

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2011 № 2

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2011 № 2

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

Павловскі Н. Б., Дрозд О. В. Оценка регенерационной способности зеленых черенков интродуцированных в Беларуси сортов голубики (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	5
Башилов А. В. Ингибирование накопления гидропероксидов в льняном масле экстрактами лабазника шестилепестного (<i>Filipendula hexapetala</i>)	10
Бородич Г. С. Особенности сезонного развития сортов бородатых ирисов (Bearded irises) при интродукции в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси	14
Завадская Л. В. Коллекционный фонд нарциссов (<i>Narcissus</i>) Центрального ботанического сада НАН Беларуси	18
Булыко С. Е. Особенности прорастания семян видов рода <i>Syringa</i>	24
Волынец А. П., Шуканов В. П., Гриб С. И. Механизмы ингибирующего действия физиологически активных веществ на предуборочное прорастание зерновок тритикале	28
Segovia J. F.O., Oliveira V. L., Gonçalves M. C. A., Resck I. S., Silva C. A. M., Silveira D., Gavrilo A. V., Gavrilo L. A., Kanzaki L. I. B. Botanical characterisation, geographical distribution and phytochemistry analysis of <i>Manilkara huberi</i> (Ducke) Stanhl autochthonous in Amapa state, Brazil	34
Ермишина Н. М., Кременевская Е. М., Гукасян О. Н., Лемеш В. А. Повышение завязываемости семян при получении отдаленных гибридов озимых гексаплоидных тритикале (<i>Triticale Thcherm.</i>) с пшеницей (<i>Triticum aestivum</i>)	41

Орловская О. А., Сакович В. И., Гузенко Е. В. Каллусогенез в культуре пыльников льна (<i>Linum usitatissimum</i>)	45
Михайлова М. Е., Белая Е. В. Полиморфные варианты генов соматотропинового каскада bPit-1 и bPrl для ДНК-типирования признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской породы	49
Жорник Е. В., Баранова Л. А., Емельянова В. П., Волотовский И. Д. Активация процессов перекисного окисления липидов и нарушение антиоксидантной защиты в лимфоцитах человека под влиянием углеродных нанотрубок	54
Щербаков Р. А., Доманская И. Н., Радюк М. С., Шалыго Н. В. Влияние избыточного оводнения на рост, накопление активных форм кислорода и защитную систему зеленых проростков ячменя (<i>Hordeum vulgare</i>)	58
Леткевич Л. Л., Ганджа А. И., Лобанок Е. С., Никольская В. П., Василевич И. Б., Симоненко В. П. Влияние условий криоконсервации на структурно-функциональное состояние замороженно-оттаянных ооцитов крупного рогатого скота	64
Гончарик Р. Г., Доманский В. П. Флуоресцентный биосенсор на основе зеленой водоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	69
Щербин Д. Г., Лозникова С. Ж., Кульчицкий В. А. Действие трипсина на внутримолекулярную динамику мембранных белков клеток ткани спинного мозга крыс	73
Балаева-Тихомирова О. М., Данченко Е. О., Нарута Е. Е. Влияние экстракта куколок дубового шелкопряда (<i>Antheraea pernyi</i>) на развитие стеатогепатоза при моделировании инсулинорезистентности у крыс	77
Конопля Е. Ф., Павленко В. С., Банецкая Н. В. Влияние ионизирующей радиации на морфологию яичников крыс в условиях Полесского радиационно-экологического заповедника	82
Гурманчук И. Е., Петракова О. В., Хватова Л. А., Новиченко Е. Н., Харламова А. Н., Соколовская Е. В. Культивирование эпидермальных кератиноцитов человека с использованием различных типов специализированных питательных сред	87
Никифоров М. Е., Тюлькова Е. Г. Экспериментальная оценка накопления кадмия в организме сизого голубя (<i>Columba livia</i>)	93
Липинская Т. П. Таксономическая и трофическая структура макрозообентоса акватории портов реки Припять	98
Ризевский В. К., Плюта М. В., Лещенко А. В., Ермолаева И. А. Новый для фауны Беларуси вид рыб – пухлощекая рыба-игла (<i>Syngnathus abaster</i>)	102

АГЛЯДЫ

Копылова Н. А. Ультраструктурные и биохимические изменения в растительной клетке под влиянием низкотемпературного стресса	106
--	-----

КАРОТКІЯ ПАВЕДАМЛЕННІ

Кудряшова О. А., Волотович А. А., Герасимович Т. В., Кудряшов А. А., Корнейчик В. Л. Ускорение роста и развития регенерантов <i>Vaccinium corymbosum</i> in vitro с использованием установки освещения на основе светодиодов	114
Джафаров М. М. Развитие молочнокислых бактерий вида <i>Lactobacillus fermentum</i> на средах различных субстратов	118

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2011 № 2

Серия биологических наук

на русском, белорусском и английском языках

Тэхнічны рэдактар М. В. Савіцкая

Компьютерная верстка Ю. В. Дзянішчык

Здадзена ў набор 15.02.2011. Падпісана ў друк 11.04.2011. Выход у свет 18.04.2011. Фармат 60×84¹/₈. Папера афсетная. Ум. друк. арк. 14,88.

Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 126 экз. Заказ 83.

Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 18 850 руб., ведамасная падпіска – 46 794 руб.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». ЛІ № 02330/0494405 ад 27.03.2009.

Вул. Ф. Скарыны, 40. 220141, Мінск. Пасведчанне аб рэгістрацыі № 395 ад 18.05.2009.

Надрукавана ў РУП «Выдавецкі дом «Беларуская навука».

© Выдавецкі дом «Беларуская навука».
Вестці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2011

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES 2011 N 2

FOUNDER IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

The Journal has been published since January 1956

Issued four times a year

CONTENTS

Pavlovski N. B., Drozd O. W. Assessment of the regeneration ability of green cuttings of introduced cultivars of blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>) in Belarus	5
Bashylau A. V. Inhibition of accumulation hydroperoxides in linseed oil by extracts <i>Filipendula hexapetala</i>	10
Borodich G. S. Peculiarities of seasonal development of varieties of bearded irises (Bearded irises) at its introduction in Central Botanical Garden of NAS of Belarus.	14
Zavadskaya L. V. The collection fund of the Narcissus of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus	18
Bulyka S. E. Features of germination of seeds of various species of genus <i>Syringa</i>	24
Volynets A. P., Shykanov V. P., Grib S. I. Inhibited impacts activity of physiologically active substances on pre-harvesting germination of triticale seeds	28
Segovia J. F. O., Oliveira V. L., Gonçalves M. C. A., Resck I. S., Silva C. A. M., Silveira D., Gavrillov A. V., Gavrilo L. A., Kanzaki L. I. B. Botanical characterisation, geographical distribution and phytochemistry analysis of <i>Manilkara huberi</i> (Ducke) Stanhl autochthonous in Amapa state, Brazil	34
Yermishina N. M., Kremenskaya E. M., Gukasian O. N., Lemesh V. A. Improving seed-set in interspecific hybridization between triticale (<i>Triticale Thechem.</i>) and wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	41
Orlovskaya O. A., Sakovich V. I., Guzenko Ye.V. Callusogenesis in flax (<i>Linum usitatissimum</i>)	45
Mikhailova M. E., Belaya Ye.V. DNA-typing of milk productivity traits in holstein cattle for polymorphic gene variants of somatotropin cascade bPit-1 and bPr1.	49
Zhornik E. V., Baranova L. A., Emelyanova V. P., Volotovskiy I. D. Activation of lipid peroxidation and antioxidant protection violation in human lymphocytes under the influence of carbon nanotubes	54
Shcherbakov R. A., Domanskaja I. N., Radyk M. C., Shalygo N. V. Influence of waterlogging on growth and reactive oxygen species accumulation and antioxidative system in green barley seedlings (<i>Hordeum vulgare</i>)	58
Letkevich L. L., Gandja A. I., Lobanok E. S., Nikolskaya V. P., Vasilevich I. B., Simonenko V. P. Influence of cryopreservation conditions on structurally functional condition of frozen-thawed of bovine oocytes	64
Goncharik R. G., Domanskii V. P. Fluorescent biosensor on the basis of green alga <i>Chlorella vulgaris</i>	69
Sheharbin D. G., Loznikova S. G., Kulchitsky V. A. Investigation of trypsin effect on internal dynamics of membrane proteins cell tissues spinal cord of rats.	73

Balaeva-Tichomirova O. M., Danchenko E. O., Naruta E. E. The effect of oak silkworm pupae (<i>Antheraea pernyi</i>) extract on development of hepatic steatosis at modelling of insulin resistance	77
Konoplya E. F., Pavlenko V. S., Banetskaya N. V. Influence of ionizing radiation on the morphology of the ovary in the Polesie Radiation-Ecological Reserve	82
Gurmanchuk I. E., Petrakova O. V., Khvatova L. A., Novichenko E. N., Kharlamova A. N., Sokoloyskaya E. V. Cultivation the epidermal human keratinocytes using different types of specialized culture media	87
Nikiforov M. E., Tulkova E. G. Cadmium experimental estimation accumulation in the blue rock pigeon (<i>Columba livia</i>) organism	93
Lipinskaya T. P. Taxonomic and trophic structure of macrozoobenthos on the Prypiat river ports	98
Ryzeuski V. K., Pljuta M. V., Leshchenko A. V., Yermalayeva I. A. A new fish species in the fauna of Belarus – pipefish (<i>Syngnathus abaster</i>)	102

REVIEWS

Kopylova N. A. Ultrastructural and biochemical changes in plant cell under the influence of chilling stress	106
--	-----

SHORT COMMUNICATIONS

Kudryashova O. A., Volotovich A. A., Gerasimovich T. V., Kudryashov A. A., Korneichik V. L. Acceleration of growth and development of <i>Vaccinium corymbosum</i> shoots in vitro using of emplacement of illumination on the basis of light-emitting diodes	114
Djafarov M. M. Development of lactic acid bacteria of different substrates <i>Lactobacillus fermentum</i> strains on environments	118

Национальная академия наук Беларуси

УДК 634.737:581.522.4:631.5

Н. Б. ПАВЛОВСКИЙ, О. В. ДРОЗД

**ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЗЕЛЕННЫХ ЧЕРЕНКОВ
ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ СОРТОВ ГОЛУБИКИ
(VACCINIUM CORYMBOSUM)**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail:pavlovskiy@tut.by

(Поступила в редакцию 11.01.2010)

Введение. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – одна из новых ягодных культур, интродуцированных в Беларусь. Для успешного применения данной культуры в промышленном и приусадебном садоводстве необходимо определить особенности ее вегетативного размножения.

В настоящее время в Беларуси основной посадочный материал голубики получают путем укоренения стеблевых черенков, приживаемость которых зависит от многочисленных факторов: времени года и суток, в которое заготавливают черенки, возраста и типа побегов, использованных для заготовки черенков, температуры и влажности воздуха и субстрата, таксономической специфики размножаемых растений и др.

Анализ литературных источников, касающихся зеленого черенкования голубики высокой, показал, что в условиях Беларуси только Т. В. Курлович и В. Н. Босак [1] изучали сортовые особенности размножения данной культуры. Авторы исследовали регенерационную способность 7 сортов. Нами было показано влияние сроков черенкования [2], типа субстрата для укоренения и его температурного режима [3] на регенерационную способность зеленых черенков голубики высокой на примере ее трех сортов. Установлено, что корнеобразующая способность стеблевых черенков данной культуры определялась главным образом сроком черенкования и сортовой принадлежностью и слабо зависела от применяемого субстрата и его температурного режима. В последнее время коллекционный фонд ЦБС пополнился новыми таксонами голубики, корнеобразующая способность стеблевых черенков которых ранее в условиях республики не исследовалась.

Цель настоящих исследований – определение регенерационной способности зеленых черенков интродуцированных сортов голубики в условиях Беларуси в зависимости от их сортовой принадлежности и числа листьев, оставляемых на черенках.

Объекты и методы исследования. Исследования проводились на Ганцевичской научно-экспериментальной базе ЦБС НАН Беларуси в 2006–2009 гг. Объектом исследования являлись 24 сорта голубики высокой и 3 сорта голубики полувисокой. Регенерационную способность зеленых черенков этой культуры, а также особенности роста и развития полученных растений изучали в условиях пленочной теплицы. Для оценки сортовых особенностей регенерации черенки заготавливали с побегов ветвления прироста текущего года после окончания весеннего роста (побеги были с «пяткой», т.е. с частью древесины и коры прошлогоднего прироста). Черенки нарезали длиной 5–8 см с 3 верхними листьями. При посадке черенки заглубляли до оставленных листьев. Высаживали по 200–500 черенков каждого сорта.

Для определения влияния числа листьев, оставляемых на черенках, на их регенерационную способность использовали побеги замещения сорта Northland. Черенки заготавливали длиной 5–8 см. У одной части черенков нижний срез делали под почкой под углом 45°, другая часть черенков была с «пяткой». Перед посадкой с нижней части черенка удаляли листья, оставляя соответственно в его верхней части по 2, 3, 4 и 5 шт. На каждый вариант высаживали по 30–50 черенков.

Заготовленные черенки высаживали по схеме 5×5 см в укоренительные гряды, заполненные смесью торфа с песком (2:1), слоем 15 см и закрытые светопрозрачной пленкой и спандбондом, натянутыми

на каркас. В течение всего периода укоренения черенков в укоренительных тоннелях поддерживали относительную влажность воздуха в пределах 90–95 %. Для этого использовали мелкокапельное дождевание. Частота полива определялась температурой воздуха, которая в теплице в период укоренения черенков колебалась в пределах 20–35 °С. Для снижения температуры воздуха в дневные часы теплицу белили известью, а также проводили орошение. Для адаптации сформировавшихся растений в сентябре с укоренительных гряд сняли спандбонд и пленку, а в середине октября раскрыли теплицу. После завершения листопада и снижения среднесуточной температуры воздуха до 0 °С укоренившиеся черенки укрывали еловыми ветками и оставляли зимовать в грядке.

В апреле следующего года теплицу накрыли пленкой. В конце июня после завершения весенне-летнего роста побегов провели учет приживаемости и определили следующие биометрические показатели: число побегов, длину каждого побега, суммарную длину всех побегов, длину корневого пучка у 20 растений каждого варианта. Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью программы Excel.

Результаты и их обсуждение. Сортовые особенности регенерации. Средняя укореняемость зеленых черенков у голубики высокой в зависимости от сорта варьировала от 46 до 91 % (табл. 1). Наиболее высокой способностью к образованию корней отличался сорт Hardyblue (91 %). Несколько ниже она оказалась у сортов Elizabeth и Rancocas (85 %). Самая низкая приживаемость черенков отмечена у сорта Concord (46 %). Наиболее стабильную укореняемость черенков на протяжении трех лет исследований показал сорт Pioneer (56–64 %). Небольшим диапазоном варьирования приживаемости черенков характеризуется сорт Hardyblue (85–95 %).

Т а б л и ц а 1. Укореняемость зеленых черенков разных сортов голубики и средние биометрические параметры полученных растений

Сорт	Укореняемость, %		Биометрические параметры		
	средняя	диапазон варьирования	суммарный прирост побегов, см	число побегов, шт.	длина корневого пучка, см
Голубика высокая					
Berkeley	72 ± 12	50–91	10,8 ± 2,2	1,5 ± 0,1	6,2 ± 0,6
Bluecrop	70 ± 11	53–90	18,9 ± 6,0	1,8 ± 0,3	7,1 ± 0,2
Bluerose	62 ± 3	41–72	19,5 ± 3,2	2,0 ± 0,7	8,4 ± 0,9
Blueray	64 ± 5	44–90	15,4 ± 4,4	1,7 ± 0,2	6,6 ± 0,9
Bluetta	59 ± 14	43–88	9,6 ± 1,6	1,5 ± 0,1	7,3 ± 0,6
Caroline Blue	56 ± 3	42–75	13,5 ± 2,5	1,6 ± 0,3	8,3 ± 0,7
Concord	46 ± 4	40–52	20,0 ± 3,3	2,0 ± 0,6	8,0 ± 1,2
Coville	72 ± 4	67–77	13,7 ± 2,0	1,3 ± 0,1	7,5 ± 0,8
Croatan	67 ± 6	53–77	17,8 ± 3,0	1,7 ± 0,3	8,6 ± 0,7
Darrow	75 ± 14	45–90	20,2 ± 5,0	1,9 ± 0,4	7,3 ± 0,4
Dixi	50 ± 7	42–60	13,1 ± 2,3	1,7 ± 0,3	6,8 ± 0,0
Duke	68 ± 14	50–94	14,5 ± 3,4	1,6 ± 0,4	8,7 ± 0,5
Earliblue	58 ± 16	45–93	12,0 ± 2,6	1,5 ± 0,2	6,6 ± 0,9
Elizabeth	85 ± 6	75–95	19,2 ± 2,8	1,7 ± 0,2	8,7 ± 0,5
Hardyblue	91 ± 3	85–95	21,9 ± 2,8	1,6 ± 0,2	9,5 ± 0,4
Herbert	73 ± 10	50–90	13,9 ± 2,5	1,6 ± 0,2	6,8 ± 0,6
Jersey	75 ± 12	58–89	21,1 ± 6,4	1,9 ± 0,4	8,1 ± 0,3
Nelson	66 ± 13	48–89	11,4 ± 2,5	1,2 ± 0,1	8,1 ± 0,9
Patriot	66 ± 13	46–90	15,7 ± 2,6	1,8 ± 0,3	7,5 ± 0,6
Pioneer	60 ± 2	56–64	20,4 ± 3,2	1,8 ± 0,5	8,1 ± 0,7
Rancocas	85 ± 6	73–94	19,4 ± 5,2	1,8 ± 0,3	8,3 ± 0,6
Rubel	75 ± 4	56–85	19,2 ± 6,9	1,8 ± 0,5	7,2 ± 1,0
Stanley	71 ± 7	60–81	20,0 ± 6,9	2,1 ± 0,5	7,4 ± 0,4
Weymouth	60 ± 6	43–75	15,8 ± 4,5	2,1 ± 0,1	8,8 ± 0,5
Голубика полувисокая					
Northblue	53 ± 13	36–62	11,9 ± 2,2	1,6 ± 0,1	6,0 ± 0,5
Northcountry	86 ± 3	76–88	16,6 ± 3,6	2,4 ± 0,4	7,3 ± 1,3
Northland	93 ± 4	85–96	21,8 ± 4,9	2,2 ± 0,4	9,2 ± 1,5

У голубики полувысокой средняя приживаемость зеленых черенков находилась в пределах от 93 % у сорта Northland до 53 % у сорта Northblue. Сорт Northcountry характеризовался наиболее стабильной укореняемостью стеблевых черенков (76–88 %).

К концу вегетационного сезона только отдельные прижившиеся черенки дали начало новым побегам. Весной следующего года практически все ювенильные растения сформировали побеги: черенки, имевшие верхушечную почку, как правило, из нее образовали по одному побегу, черенки без апикальной почки дали начало двум, реже одному или трем побегам из верхних латеральных почек.

Сравнительный анализ биометрических характеристик растений голубики высокой, сформированных из черенков, показал, что наибольший суммарный прирост побегов отмечен у сорта Hardyblue (21,9 см). Несколько ниже этот показатель оказался у сортов Jersey, Concord, Darrow, Pioneer и Stanley (20,0–21,1 см). Наименьший суммарный прирост характерен для сорта Bluetta (9,6 см). Максимальное количество побегов отмечено у сортов Stanley и Weymouth (2,1 шт.), минимальное – у сорта Nelson (1,2 шт.). Наиболее длинный корневой пучок сформировали растения сорта Hardyblue (9,5 см), тогда как у голубики сорта Berkeley отмечен самый короткий корневой пучок (6,2 см).

Среди голубики полувысокой наибольшим суммарным приростом как побегов (21,8 см), так и корней (9,2 см) обладает сорт Northland. Максимальное количество побегов (2,4 шт.) отмечено у сорта Northcountry. Наименьшими регенерационными показателями характеризуется сорт Northblue.

Анализируя литературные данные, касающиеся регенерационной способности стеблевых черенков разных сортов голубики, нельзя не отметить в них существенных противоречий. Так, R. E. Gough [4] сообщает, что черенки сортов голубики ранних сроков созревания урожая – Blueray, Earliblue, Collins, Bluecrop – в некоторой степени укореняются лучше, чем позднеспелых сортов – Berkeley и Coville. По данным польских исследователей A. Rejman, K. Pliszka [5], сорт Rancocas размножается стеблевыми черенками легко, Jersey и Blueray – относительно легко, сорта Bluetta, Bluecrop и Earliblue – значительно трудней. Т. В. Курлович и В. Н. Босак [1] на основании результатов, полученных в условиях Беларуси, характеризуют сорта Bluecrop, Concord, Herbert и Stanley как трудноукореняемые. Полученные нами результаты частично согласуются с данными A. Rejman, K. Pliszka и Т. В. Курлович, В. Н. Босак, но противоречат сведениям R. E. Gough, так как черенки многих раннеспелых сортов (Blueray, Bluetta, Earliblue и Weymouth) в условиях нашего опыта укоренялись значительно труднее, чем позднеспелых (Berkeley, Coville, Elizabeth, Darrow, Jersey и Stanley).

Практический опыт вегетативного размножения голубики и полученные результаты исследований показали, что корнеобразующая способность стеблевых черенков является лабильным показателем, существенно варьирующим по годам, но тем не менее одни сорта характеризуются более стабильной и высокой укореняемостью черенков, другие сорта слабо регенерируют придаточные корни. Поскольку укоренение черенков разных сортов проводилось в идентичных условиях, то основным фактором, определяющим их укореняемость, являлась индивидуальная способность сорта к регенерации корней. Это позволяет классифицировать исследованные нами сорта по способности регенерировать адвентивные корни на три группы: легкоукореняемые с приживаемостью более 80 %, среднеукореняемые – 80–61 % и трудноукореняемые – менее 61 % (табл. 2).

Таблица 2. Классификация сортов голубики по корнеобразующей способности

Легкоукореняемые	Среднеукореняемые	Трудноукореняемые
Elizabeth Hardyblue Rancocas Northcountry Northland	Berkeley Bluecrop Blueray Bluerose Coville Croatan Darrow Duke Herbert Jersey Nelson Patriot Rubel Stanley	Bluetta Carolina Blue Concord Dixi Earliblue Northblue Pioneer Weymouth

Из табл. 2 видно, что не представляется возможным выявить какой-либо четкой закономерности в изменении регенерационного потенциала сортов в зависимости от сроков созревания урожая, морозостойкости, происхождения или энергии роста. Так, например, в легкоукореняемую группу вошли сорта, различающиеся силой роста и разными сроками созревания урожая – позднеспелый (*Elizabeth*), среднеспелые (*Hardyblue*, *Rancocas*), среднеранний (*Northland*). В среднеукореняемую группу вошли как морозостойкие сорта (*Jersey*, *Patriot*), так и неморозостойкий (*Bluerose*), а также разные по срокам созревания и по происхождению. В трудноукореняемую группу также вошли сорта, разные по морозостойкости, силе роста и срокам созревания урожая.

Следует отметить, что корнеобразующая способность зеленых черенков других плодово-ягодных культур, таких как крыжовник, вишня и слива, также сильно варьирует (от 100 до 30 %) в зависимости от сортовой специфики [6].

Таким образом, можно заключить, что регенерационный потенциал зеленых черенков голубики определяется генотипом сорта. Сорта данной культуры, обладающие более высокой корнеобразующей способностью, как правило, продуцируют растения с большими биометрическими параметрами надземной сферы. Трудноукореняемые сорта голубики, имеющие хозяйственное значение (высокую урожайность, крупные ягоды и др.), лучше размножать другим вегетативным способом, например культурой ткани.

Регенерационная способность черенков, заготовленных с разным числом листьев. Данные, представленные в табл. 3, указывают, что увеличение числа листьев, оставляемых на черенках, заготовленных из побегов замещения, при их укоренении способствовало лучшей приживаемости черенков и формированию растений с большими биометрическими параметрами как надземной, так и подземной сфер. Особенно это характерно для черенков с нижним срезом под почкой.

Т а б л и ц а 3. Регенерационная способность зеленых черенков голубики высокой сорта *Northland*, заготовленных из разных типов побегов и разным числом листьев

Тип побега	Наличие «пятки»	Число листьев, шт.	Укореняемость, %	Число побегов, шт.	Суммарный прирост побегов, см	Длина корневого пучка, см
Формирования	да	3	38	2,2 ± 0,3	17,6 ± 5,4	9,0 ± 1,3
	нет	3	34	2,1 ± 0,6	16,2 ± 4,5	7,1 ± 0,9
Замещения	да	2	89	2,6 ± 0,6	17,2 ± 4,7	8,9 ± 1,2
		3	88	3,1 ± 0,9	23,4 ± 5,2	9,4 ± 0,7
		4	92	4,8 ± 1,2	36,2 ± 8,7	9,8 ± 1,5
		5	86	4,4 ± 1,3	41,1 ± 13,0	11,0 ± 1,3
	нет	2	43	2,0 ± 0,5	17,8 ± 5,9	8,5 ± 1,1
		3	61	2,6 ± 0,6	19,0 ± 7,0	8,6 ± 1,3
		4	82	3,3 ± 0,7	32,3 ± 9,3	10,4 ± 1,9
		5	100	3,5 ± 0,7	34,4 ± 7,2	10,5 ± 1,1
Ветвления	да	3	91	2,3 ± 0,6	17,3 ± 4,4	7,4 ± 1,3
	нет	3	79	2,9 ± 0,7	23,6 ± 4,7	9,2 ± 0,4

При черенковании происходит нарушение целостности растения. Прерванный процесс роста приводит к физиологической и структурной перестройке тканей стебля, в итоге возникают очаги быстро делящихся клеток, дающие начало новым тканям (каллусу), не возникающим в обычных условиях. Формирование новых тканей, а затем и органов (корней) связано с повышением метаболической активности листа, поставляющего стеблю пластические вещества. При недостаточном количестве листьев на черенке он не обеспечивается в необходимой мере продуктами фотосинтеза, что отрицательно отражается на процессах корнеобразования. Увеличение фотосинтезирующей площади способствовало повышению поступления энергетических и гормональных веществ в очаги деления клеток, дающее начало корням и побегам. В результате такие зеленые черенки лучше укоренялись и сформировали растения с большими морфометрическими параметрами. Поэтому очень важно при нарезке черенков оставлять на них здоровые и полностью сформированные листья.

Одновременно с функцией фотосинтеза листья выполняют функцию транспирации. Листовые пластинки на срезанных побегах обладают невысокой водоудерживающей способностью и за короткий период времени могут потерять значительное количество воды. Листья, потерявшие тургор, с трудом восстанавливают его, что отрицательно сказывается на процессах укоренения черенка. Слишком боль-

шое число листьев на черенке, которые испаряют значительное количество влаги, снижая обводненность тканей всех органов черенка, ухудшает его укоренение [6]. Поэтому для предотвращения увядания зеленых черенков в культивационных сооружениях должны быть созданы адекватные условия.

Для обеспечения высокой влажности воздуха и сдерживания транспирации укоренительные тоннели накрывали полиэтиленовой пленкой, а черенки периодически орошали. С целью предотвращения перегрева и иссушения укореняющихся черенков в дневные часы от прямого солнечного света укоренительные грядки затеняли спандбондом, а теплицу белили известью, тем самым ухудшили условия для фотосинтеза. Поскольку голубика высокая – светолюбивое растение, то соответственно ее черенки лучше укореняются в условиях полного освещения. L. L. Shelton and J. M. Moore [7] экспериментально установили, что при полном солнечном освещении и при затенении до 50 % стеблевые черенки голубики укореняются лучше, чем при ограничении освещения более чем на 50 %. Поэтому условия для укоренения черенков должны быть направлены на создание режимов, повышающих интенсивность фотосинтеза и снижающих транспирацию листьев одновременно.

Литературные данные об оптимальном числе листьев, оставляемых на черенках голубики при укоренении, весьма противоречивы. По мнению И. К. Володько с соавт. [8], на черенке должно оставаться не менее 6–8 листьев. K. Pliszka [9] и K. Smolarz [10] рекомендуют оставлять только 2–3 верхних, хорошо сформированных листа. В литературе есть сведения о том, что при недостатке маточного материала черенки голубики можно готовить с одним междоузлем и одним листом [7]. По мнению С. М. Mainland [11], на укореняемых черенках голубики можно оставлять все листья, но это затруднит посадку черенков в укоренительный субстрат. Автор рекомендует использовать длинные черенки для получения саженцев больших размеров, а короткие – при недостатке материала для черенкования.

Следовательно, можно сделать вывод, что чем большая облиственность стеблевых черенков голубики высокой при их укоренении, тем выше их регенерационная способность. Но в то же время следует отметить, что для заготовки черенков с большим числом листьев необходимо нарезать более длинные черенки, что в свою очередь приводит к снижению коэффициента размножения и ухудшению воздухообмена, способствующего развитию гнилей.

Заключение. Корнеобразующая способность зеленых черенков голубики генетически обусловлена с разной степенью выраженности у того или иного сорта. Сортные особенности ризогенеза следует учитывать при вегетативном размножении данной культуры. Сорта, стеблевые черенки которых характеризуются слабой способностью к корнеобразованию, рекомендуется размножать другим методом – культурой ткани. Чем больше облиственность укореняемых черенков, тем выше их регенерационная способность.

Литература

1. Курлович Т. В., Босак В. Н. Голубика высокорослая в Беларуси. Мн., 1998.
2. Павловский Н. Б. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2008. № 2. С. 14–19.
3. Павловский Н. Б. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2008. № 3. С. 16–19.
4. Gough R. E. The Highbush Blueberry and Its Management. New York; London; Norwood, 1994.
5. Rejman A., Pliszka K. Borówka wysoka. Warszawa, 1991.
6. Поликарпова Ф. Я., Пилюгина В. В. Выращивание посадочного материала зеленым черенкованием. М., 1991.
7. Shelton L. L. and Moore J. N. // HortScience. 1981. N 16. P. 320–321.
8. Володько И. К., Курлович Т. В., Рубан Н. Н. Голубика на садовом участке. Мн., 1998.
9. Pliszka K. Borówka wysoka czyli amerykańska. Warszawa, 2002.
10. Smolarz K. Borówka i zurawina – zasady racjonalnej produkcji. Warszawa, 2009.
11. Mainland C. M. // Blueberries For Growers, Gardeners, and Promoters. Florida, 2006. P. 49–55.

N. B. PAVLOVSKI, O. W. DROZD

ASSESSMENT OF THE REGENERATION ABILITY OF GREEN CUTTINGS OF INTRODUCED CULTIVARS OF BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM*) IN BELARUS

Summary

Rhizogenic ability of green cuttings of different blueberry cultivars is determined genetically and expressed in different scales. On the basis of investigation of 24 cultivars of highbush blueberry and 3 cultivars of half-highbush blueberry three groups were classified: easy, middle and hardly rooted. It was established that: 1) for the green grafting it is possible to apply shoots of different types, 2) the more foliage of the shoots the better its regeneration ability.

УДК 582.71:581.19

А. В. БАШИЛОВ

ИНГИБИРОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ГИДРОПЕРОКСИДОВ В ЛЬНЯНОМ МАСЛЕ ЭКСТРАКТАМИ ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО (*FILIPENDULA HEXAPETALA*)

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail:anton.bashilov@gmail.com

(Поступила в редакцию 22.03.2010)

Введение. Льняное масло характеризуется высоким содержанием незаменимых жирных кислот групп Омега-3 и Омега-6, главным образом α -линоленовой кислоты. Употребление масла в пищу нормализует функционирование сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной, гормональной и других систем организма. Однако большое содержание полиненасыщенных жирных кислот обуславливает низкую окислительную стабильность льняного масла, изменение его органолептических свойств за короткое время хранения, а значит невозможность его длительного хранения. Известные технологии не обеспечивают достаточной устойчивости льняного масла к пероксидному окислению.

В настоящее время для масел и жиров используют в основном синтетические антиоксиданты. При стабилизации льняного масла применяют, например, такие группы веществ, как ароматические оксиамины, производные гидроксихинолина и фенилендиамина, хинонимины, производные гидрохинона, фосфоновые кислоты и целый ряд других соединений, ингибирующих развитие свободнорадикальных процессов.

В качестве источника природных антиоксидантов может использоваться растительное сырье, имеющее доступную сырьевую базу на территории Республики Беларусь и не требующее специальных агротехнических приемов культивирования, например лабазник шестилепестный. Антиоксидантные свойства растительных экстрактов главным образом обусловлены наличием в их составе фенольных соединений, центром реакции у которых служит фенольная гидроксильная группа с пространственным барьером, созданным метиловой, *i*-пропиловой или *t*-бутиловой группой в α -позиции, которая обрывает цепную реакцию самоокисления [1].

Лабазник шестилепестный (*Filipendula hexapetala* Gilib.) содержит в своем составе широкий спектр физиологически активных соединений, основными из которых являются фенольные соединения и производные салициловой кислоты, а также активно используется в официальной и народной медицине как лекарственное средство широкого фармакологического действия [2].

Цель работы – изучить антиоксидантную активность (АОА) экстрактов, полученных из соцветий, листьев, корней и корневищ лабазника шестилепестного в качестве средств, ингибирующих процесс перекисидации льняного масла.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали растительное сырье *Filipendula hexapetala* Gilib., культивируемое в коллекции пряно-ароматических и лекарственных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Сушку растительного материала проводили воздушно-теневым способом, в хорошо вентилируемых помещениях, без доступа прямых солнечных лучей. Потери массы при высушивании различных органов составили: для соцветий – 70–80 %; листьев – 55–90 %; корней и корневищ – 60–80 %. Сушка считалась законченной при содержании в сырье 10–15 % гигроскопической влаги [3, 4].

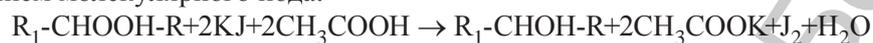
Для получения флавоноидсодержащих экстрактов в колбу объемом 150 мл помещали 1 г растительного сырья и добавляли 30 мл 90%-ного спирта, содержащего 1 % концентрированной

хлористоводородной кислоты, после чего колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин (экстракцию проводили трижды). Полученные экстракты охлаждали до комнатной температуры и фильтровали в мерную колбу с последующим удалением этанола на ротаторном испарителе до получения сухого экстракта [5].

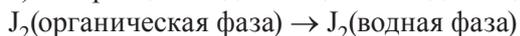
Основную роль в пероксидации ненасыщенных жирных кислот играет образование гидропероксидов как ключевых продуктов, обуславливающих цепной механизм пероксидного окисления. Наличие гидропероксидов в маслах характеризуется таким показателем, как пероксидное число (ПЧ).

Методика определения ПЧ относится к так называемым методам заместительного титрования. В основе которых лежат следующие процессы:

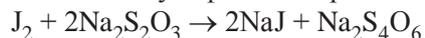
1) гомогенное окисление йодида калия гидропероксидами с образованием вторичных спиртов и выделением молекулярного йода:



2) экстракция выделяющегося йода в водную фазу:

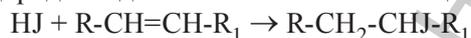


3) гомогенное восстановление йода тиосульфатом натрия в водной фазе:



Многокомпонентность такой системы обуславливает возможность протекания ряда побочных реакций:

1) присоединение йодоводорода по двойным связям ненасыщенных жирных кислот:



2) диспропорционирование йода:



Реакция диспропорционирования обратима, однако присоединение йодида водорода по двойным связям сдвигает равновесие в сторону прямой реакции. Также нужно отметить, что гипойодит-ион более слабый окислитель, чем йод. Поэтому диспропорционирование йода приводит к смещению равновесия реакции титрования тиосульфатом натрия влево и к ее ингибированию.

3) реакции замещения в органической фазе:



Все побочные реакции протекают в очень малой степени и незначимы для измерения ПЧ [6].

Эксперименты проводили по доработанной методике А. О. Здоровениной, регламентированной Государственной Фармакопеей Республики Беларусь в уксусно-хлороформной среде. В конической колбе емкостью 200 мл отвешивали 2 г масла льна. Навеску растворяли в 20 мл смеси ледяной уксусной кислоты и хлороформа (2:1 по объему), прибавляли 5 мл 50%-ного раствора йодида калия, сосуд закрывали пробкой и ставили в темное место на 35 мин, после чего доливали 50 мл дистиллированной воды и оттитровывали выделившийся йод 0,002 н. раствором тиосульфата натрия (индикатор – крахмал). Одновременно проводили также контрольное титрование (без масла).

Значение ПЧ (количество граммов йода, выделенное гидропероксидами, содержащимися в 100 г масла) рассчитывали по уравнению:

$$ПЧ = (c - o) \cdot k \cdot 0,0002538 \cdot 100 / m,$$

где c – объем 0,002 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованный при контрольном определении, мл; o – объем 0,002 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованный при титровании опытного образца, мл; k – поправочный коэффициент раствора тиосульфата натрия; 0,02538 – титр 0,002 н. раствора тиосульфата натрия по йоду (1 мл раствора соответствует 0,0002538 г йода); m – масса масла льна, г [6].

Все анализы проводились в четырехкратной повторности, полученные результаты обрабатывались с использованием компьютерной программы Statistica 6.0, данные считали достоверными при $P < 0,05$. Величины расхождения между исследуемыми данными в выборке и генеральной совокупности рассчитывали с использованием статистической ошибки для среднего. Диапазон, в котором с заданной вероятностью находились исследуемые величины для генеральной совокупности, рассчитывали с помощью доверительного интервала для среднего [7].

Результаты и их обсуждение. Оценку АОА экстрактов лабазника шестилепестного проводили на модельной системе, включающей генерацию продуктов пероксидного окисления липидов и их

детектирования. Введение в реакционную среду ингибиторов пероксидного окисления (в нашем случае – флавоноидсодержащие экстракты, 0,2 %) вызывало изменение концентрации продуктов пероксидации, что отражалось на физико-химических параметрах детектируемой системы.

В качестве источника продуктов пероксидации льняного масла использовали систему его пероксидного окисления. В основе механизма работы системы лежит процесс, приводящий к появлению в среде инкубации пероксидных соединений ненасыщенных жирных кислот – липопероксидов, являющихся ключевыми продуктами, обуславливающими реализацию цепного механизма пероксидного окисления. Содержание липопероксидов детектировали по изменению значений ПЧ.

АОА экстрактов регистрировали по уменьшению скорости образования липопероксидов в масле льна и увеличению периода индукции автоокисления по сравнению с контролем (масло льна) и стандартом АОА – кверцетином.

Кинетика пероксидного окисления масла льна представлена на рисунке. Период индукции пероксидации в среднем составил 50 сут, что вдвое короче стандарта АОА – кверцетина. После 50-суточной инкубации скорость образования липопероксидов увеличилась и составила $1,42 \pm 0,05$ мг/100 г. Начиная с 90-х суток экспозиции среднее значение уровня пероксидации составило $1,49 \pm 0,07$ мг/100 г. На 110-е сутки инкубации *in vitro* регистрировали скачок уровня окисления масла льна согласно значению ПЧ. Так, в точке, соответствующей 110 сут, уровень пероксидации составил $1,56 \pm 0,06$ мг/100 г, тогда как в точке, адекватной 200 сут, он достиг $3,16$ мг/100 г.

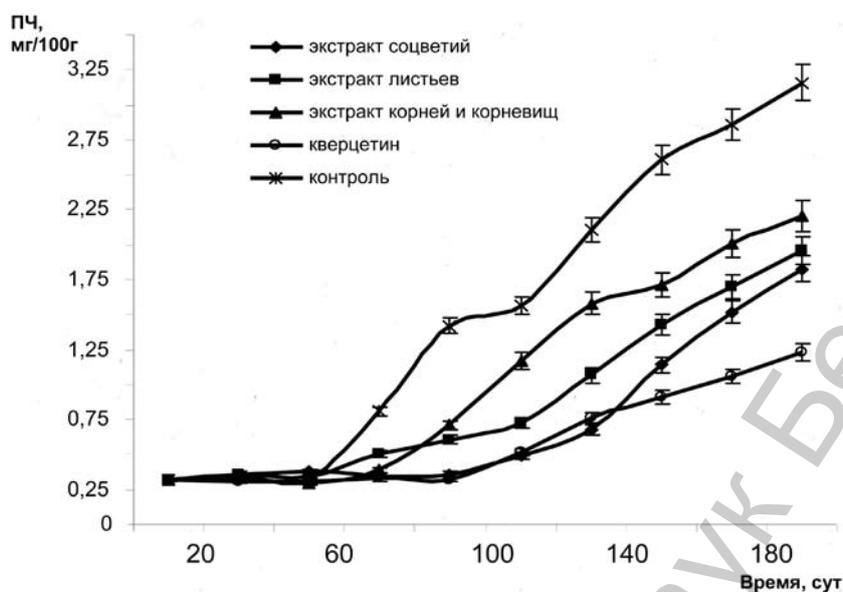
Результаты исследований АОА флавоноидсодержащего экстракта соцветий *Filipendula hexapetala* Gilib. представлены на рисунке. Индукционный период ингибирования пероксидации составил 90 сут и схож с аналогичным периодом, протекающим в присутствии кверцетина. Значение ПЧ в начальной фазе достигло $0,35 \pm 0,02$ мг/100 г, что на 45,5 % выше по сравнению с контролем. Увеличение времени экспозиции до 130 сут вызвало повышение накопления липопероксидов до $0,68 \pm 0,05$ мг/100 г, что ниже по сравнению с кверцетином на 8,6 %. В точке экспозиции, соответствующей 140 сут, происходило наложение координат пероксидации, протекающих в условиях кверцетина и экстракта с последующим ростом содержания липопероксидов в среде инкубации. Затем АОА *in vitro* снижалась, что не могло не сказаться на концентрации продуктов пероксидации. В точке «50 сут» ПЧ составило $1,14 \pm 0,11$ мг/100 г, а в конечной точке инкубации (200 сут) – $1,83 \pm 0,11$ мг/100 г, что на 32,7 % выше по сравнению с кверцетином.

Кинетика ингибирования пероксидного окисления масла льна экстрактивными веществами листьев лабазника шестилепестного свидетельствует об аналогии результатов, полученных в контрольном и стандартном вариантах (рисунок). Начиная с точки «50 сут» регистрировали накопление липопероксидов. На 70-е сутки уровень продуктов пероксидации достиг $0,50 \pm 0,03$ мг/100 г в пересчете на ПЧ.

При пролонгации времени экспозиции до 110 сут наблюдалось повышение интенсивности накопления продуктов пероксидации *in vitro*. В точке титрования, соответствующей 130 сут, ПЧ составило $1,07 \pm 0,05$ мг/100 г, а в конечной точке «200 сут» – $1,96 \pm 0,11$ мг/100 г, что на 37,2 % выше по сравнению с кверцетином и на 37,9 % ниже процессов пероксидации, протекающих в условиях контроля. Основываясь на полученных выше результатах, можно заключить, что экстрактивные вещества листьев *Filipendula hexapetala* Gilib. уступают по АОА соцветиям (рисунок).

Индукционный период ингибирования пероксидного окисления липидов экстрактом корней и корневищ лабазника шестилепестного регистрировали в течение первых 50 сут. Среднее значение ПЧ для данного периода составило $0,31 \pm 0,02$ мг/100 г. Увеличение времени инкубации вызвало снижение АОА экстракта, что отразилось на уровне пероксидации. В точке «70 сут» значение ПЧ достигало $0,39 \pm 0,03$ мг/100 г, что на 15,4 % выше по сравнению с опытами, использующими кверцетин, и на 51,8 % ниже контроля.

Начиная с 70-х суток регистрировали повышение содержания липопероксидов *in vitro*. В точке титрования «110 сут» детектировали уровень пероксидации жирных кислот, равный $1,17 \pm 0,07$ мг/100 г в пересчете на ПЧ. Максимум пероксидации соответствовал точке 130 сут, где он составил $1,58 \pm 0,09$ мг/100 г, что на 51,9 % выше по сравнению с антиокислителем – кверцетином и на 25,1 % ниже контроля. При дальнейшем увеличении времени инкубации модельной системы наблюдали затухание процессов пероксидации, среднее значение которых фиксировалось на уровне $1,64 \pm 0,07$ мг/100 г в пересчете на ПЧ. Затем регистрировали вторичное повышение уровня пероксидации и в конечной точке титрования (200 сут) ПЧ составило $2,21 \pm 0,11$ мг/100 г (рисунок).



Кинетика ингибирования пероксидного окисления масла льна экстрактами *Filipendula hexapetala* Gilib.

Из всего вышеизложенного следует, что АОА экстрактивных веществ подземной части *Filipendula hexapetala* Gilib. уступает таковой, отмеченной для экстрактов листьев и соцветий.

Обобщая полученные экспериментальные данные, можно отметить, что на примере модельной системы пероксидного окисления масла льна дана оценка АОА экстрактивных веществ, полученных из воздушно-сухого растительного сырья соцветий, листьев и подземных органов лабазника шестилепестного.

Заключение. Изучена кинетика ингибирования накопления гидропероксидов в масле льна в присутствии растительных экстрактов *Filipendula hexapetala* Gilib. На основании значений уровня пероксидации в конечной точке детектирования (200 сут) растительные образцы можно расположить в порядке возрастания их АОА: корни и корневища < листья < соцветия. Можно предположить перспективность использования в качестве стабилизатора льняного масла сухих экстрактов, полученных из *Filipendula hexapetala* Gilib.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № Б08М-004).

Литература

1. Зубцов В. А., Осипова Л. Л., Лебедева Т. И., Маслов М. А. // Материалы Междунар. науч.-практ. конф.: Высокоэффективные технологии производства и переработки льна. Вологда, 2002. С. 234–235.
2. Башилов А. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. бія. навук. 2009. № 4. С. 111–114.
3. Годовальников Г. В. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Общие методы контроля качества лекарственных средств. Мн., 2006. С. 228, 242–245.
4. Ананьева А. Р. Государственная фармакопея СССР. М., 1987. Т. 2. С. 381.
5. Косман В. М., Зенкевич И. Г. // Раст. ресурсы. 2001. Т. 37, вып. 4. С. 123–129.
6. Здорovina А. О. Повышение точности измерения содержания перекисных и карбонильных соединений в жирах: Автореф. дис. ... канд. тех. наук. СПб., 2007.
7. Рокцкий П. Ф. Биологическая статистика. Мн., 1967.

A. V. BASHYLAU

INHIBITION OF ACCUMULATION HYDROPEROXIDES IN LINSEED OIL BY EXTRACTS FILIPENDULA HEXAPETALA

Summary

The extracts obtained from leaves, inflorescences, roots and rhizomes of *Filipendula hexapetala* Gilib. inhibit the accumulation of hydroperoxides in linseed oil. These extracts can be recommended as a stabilizer of linseed oil in order to prolong the duration of its storage.

УДК 635.92.05:582.579.2:581.522.4

Г. С. БОРОДИЧ

**ОСОБЕННОСТИ СЕЗОННОГО РАЗВИТИЯ СОРТОВ БОРОДАТЫХ ИРИСОВ
(BEARDED IRISES) ПРИ ИНТРОДУКЦИИ
В ЦЕНТРАЛЬНОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ НАН БЕЛАРУСИ**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail:cbg@it.org.by

(Поступила в редакцию 27.05.2010)

Одним из критериев перспективности интродуцированных растений для зеленого строительства является продолжительность декоративного эффекта, создаваемого растениями в озеленительных посадках. Особый интерес в этой связи представляют бородастые ирисы – корневищные многолетники весенне-летнего срока цветения. По феноритмотипу они относятся к группе весенне-летне-осеннезеленых растений, которые в течение вегетационного периода образуют две генерации листьев и уходят под снег зелеными [7]. Благодаря таким качествам как декоративность, быстрота размножения, относительная устойчивость к болезням и вредителям, бородастые ирисы широко используются для озеленения.

Цель работы – изучение сроков начала и продолжительности цветения сортов бородастых ирисов в условиях Беларуси.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований явилась коллекция ирисов Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Фенологические наблюдения проводились за 5–10 растениями каждого сорта по принятой методике [1]. Амплитуда изменчивости сроков цветения определялась по методике В. Н. Былова [4]. В работе использованы данные фенонаблюдений за вегетационные сезоны 1993–1998, 2005–2009 гг. Фенологические даты сроков цветения переведены в условные дни согласно методике Г. Н. Зайцева [5]. При статистической обработке данных использовался пакет Excel.

Результаты и их обсуждение. Коллекция бородастых ирисов начала формироваться с 1956 г. [3] и в настоящее время представлена 247 сортами ириса гибридного (*Iris* × *hybrida hort.*). В ее составе 221 сорт (89 %) американской, французской и немецкой селекции, 26 сортов (11 %) российских и украинских оригинаторов. Около 85 % сортов коллекционного фонда выведены в середине и конце прошлого века.

Согласно принятой классификации, в основу которой положена высота цветоноса [6], в коллекции представлены сорта 5 из 6 известных садовых групп. Низкорослые сорта, у которых высота цветоноса не превышает 40 см, включают миниатюрные карликовые (MDB) и стандартные карликовые (SDB) ирисы. Среднерослые сорта с высотой цветоноса 40–70 см представлены группой интермедия (IB) и бордюрными (BB) ирисами. К высокорослым (TB) ирисам относятся сорта с цветоносом более 70 см.

Количественный состав групп неоднороден. 176 сортов коллекции (71 % от общего числа) относятся к группе TB. На долю групп IB и BB приходится соответственно 7 сортов (3 %) и 41 сорт (17 %). Группы MDB и SDB объединяют 23 сорта (9 %).

Исследованиями было охвачено 209 перспективных сортов бородастых ирисов. Изучение ритма сезонного развития показало, что отрастание растений начинается в первой декаде апреля при наступлении устойчивых среднесуточных температур 5 °С и выше. Первыми в фазу бутонизации вступают низкорослые карликовые ирисы. Бутоны у них начинают формироваться в период с 1 по 15 мая. Несколько позже (10–20 мая) появляются бутоны у сортов группы интермедия. Бордюрные и высокорослые ирисы начинают бутонизацию 10–30 мая.

Сезон цветения бородатых ирисов открывают миниатюрные карликовые, которые зацветают в конце апреля – начале мая. Примерно в середине мая начинается цветение у стандартных карликовых ирисов. В третьей декаде мая цветут среднерослые интермедия ирисы. Среднерослые бордюрные ирисы начинают зацветать одновременно с высокими ирисами в конце мая – начале июня.

Многолетние фенонаблюдения за бородатыми ирисами показали, что их сроки цветения могут изменяться по годам и зависят от погодных условий года. В ходе исследований для каждого сорта выявлялись самые ранние и самые поздние сроки начала цветения, определялась амплитуда изменчивости сроков начала цветения, рассчитывались средние значения сроков зацветания. Это дало возможность разделить сорта по срокам цветения на ранние, раннесредние, средние, среднепоздние и поздние в пределах садовых групп (таблица).

Распределение сортов бородатых ирисов по срокам цветения

Сроки цветения	SDB			ВВ			ТВ		
	Количество условных дней	Количество сортов	% от общего числа	Количество условных дней	Количество сортов	% от общего числа	Количество условных дней	Количество сортов	% от общего числа
Ранние	76–77 и раньше	4	21,1	90–91 и раньше	3	7,5	91–92 и раньше	6	4,0
Раннесредние	78–79	4	21,1	92–93	6	15,0	93–95	28	18,7
Средние	80–81	5	26,2	94–96	17	42,5	96–99	75	42,7
Среднепоздние	82–83	3	15,8	97–98	12	30,0	100–103	29	26,6
Поздние	84–85 и позже	3	15,8	99–100 и позже	2	5,0	104–106 и позже	12	8,0

Из таблицы видно, что изученные сорта бородатых ирисов зацветают на 76–106-е условные дни, т. е. с 15 мая по 14 июня. Амплитуда изменчивости сроков по началу цветения составляет более 30 дней. Пик зацветания коллекционных сортов приходится на 93–103-е условных дня, что календарно соответствует 1–11 июня. В это время зацветают 29 сортов (72,5 %) среднерослых и 132 сорта (88 %) высокорослых ирисов.

Многолетние наблюдения за цветением ирисов показали, что распределение их по установленным группам может изменяться. Например, в 2007 г. в группе высокорослых ирисов количество ранних и раннесредних сортов увеличилось: 20 среднецветущих сортов (26,7 %) переместились в группу ранних, 39 сортов (52,0 %) – в группу раннесредних, 23 среднепоздних сорта (79,3 %) – в среднецветущие. Раньше обычного (на 7–8 дней) зацвели поздние сорта. Такому смещению сроков цветения растений способствовала сухая и жаркая погода. Смещение сроков начала цветения у бородатых ирисов в зависимости от сорта составляет от 7 до 25 дней. Изменение сроков цветения на протяжении 5 лет наблюдений у 3 сортов высокорослых ирисов (раннего – Elsa Sass, среднего – Kytice, позднего – Sierra Skies) отражает рис. 1.

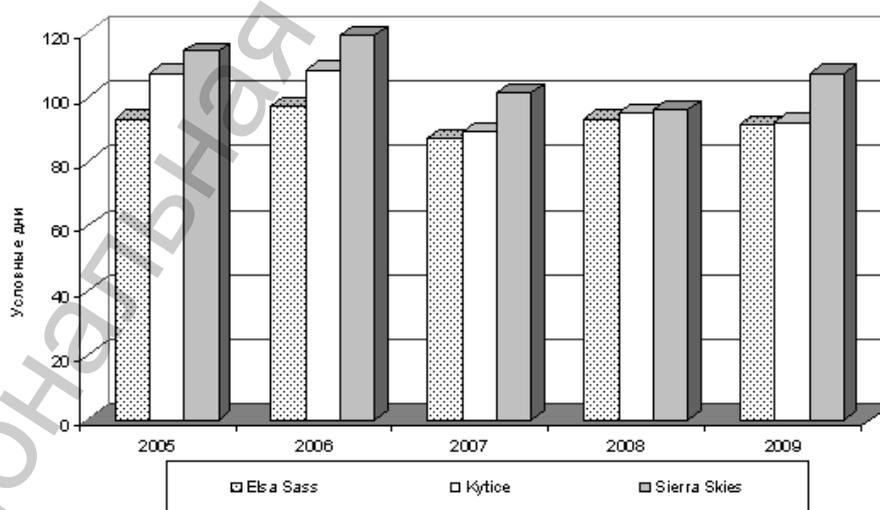


Рис. 1. Изменение сроков начала цветения у сортов ириса гибридного в 2005–2009 гг.

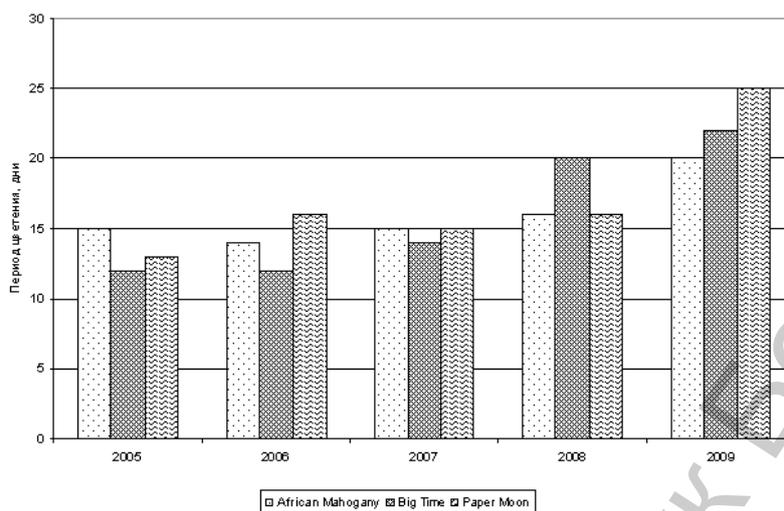


Рис. 2. Продолжительность цветения бородатых ирисов в 2005–2009 гг.

Важной биологической характеристикой сорта является не только начало, но и продолжительность цветения. Ежегодные фенонаблюдения за коллекцией показали, что период цветения бородатых ирисов длится с первых чисел мая до конца июня. Статистическая обработка данных позволила установить средний период цветения для каждой садовой группы бородатых ирисов. Так, у низкорослых сортов цветение продолжается в течение 13–23 дней [3]. Интермедия сорта цветут 15–18, бордюрные – 13–20, высокорослые – 10–19 дней. Продолжительность цветения весьма существенно отличается по годам (рис. 2).

За период наблюдений самое длительное цветение ирисов отмечено в 2009 г. Во время цветения коллекции температура воздуха ночью опускалась до 6–8 °С, а дневная температура составляла не более 13–17 °С тепла. В такие дни распускание цветков приостанавливалось и возобновлялось после повышения температуры до 20 °С и выше. В результате продолжительность цветения высокорослых сортов (Elsa Sass, Fatum, Paper Moon, Pretender) составила 20–25, а некоторых среднерослых (Lorelei, Meerschäum, Южанин) – 30 дней.

Сумма положительных среднесуточных температур в Беларуси в период вегетации ирисов является достаточной для закладки цветочных почек, поэтому цветение у бородатых ирисов практически ежегодное и обильное.

Зимуют бородатые ирисы без укрытия. Иногда у высокорослых ирисов подмерзают цветочные почки. В зависимости от степени подмерзания не цветут отдельные растения или же у них появляются укороченные цветоносы. Вымерзают сорта только в суровые бесснежные зимы, что наблюдалось в сезон 2002–2003 гг., когда в коллекции погибло 30 сортов (13 %).

Заключение. Период цветения бородатых ирисов в условиях Центральной агроклиматической зоны Беларуси приходится на май – июнь. В первой половине мая зацветают карликовые ирисы. Их цветение длится 13–23 дня. В третьей декаде начинается цветение у сортов группы интермедия, которое продолжается 15–18 дней. Бордюрные и высокорослые ирисы зацветают в конце мая – начале июня. Продолжительность цветения составляет соответственно 13–20 и 10–19 дней. Массовое цветение коллекции наблюдается в первой декаде июня. Сроки начала цветения бородатых ирисов и продолжительность цветения являются сортовыми признаками и могут изменяться в зависимости от погодно-климатических условий.

Анализ фенонаблюдений позволил разделить сорта по срокам цветения на ранние, раннесредние, средние, среднепоздние и поздние в пределах каждой садовой группы. Это дает возможность рекомендовать для промышленного ассортимента и любительского цветоводства Беларуси ранние (Elsa Sass, Forest Hills, Sapphire и др.), раннесредние (Blue Danuble, Jane Phillips, Wabash, Елена Прекрасная и др.), средние (Dotted Swiss, Fire Cracker, Margarita, Эмма, Родник и др.), среднепоздние (Cayenne Capers, Elizabeth Noble, Red Majesty, Галина Уланова и др.) и поздние

(Amethyst Flame, Juliet, Sierra Skies, Winner's Circle и др.) сорта. Разнообразие бородатых ирисов по срокам цветения, а также по колерам и высоте цветоноса дает возможность создавать цветочные композиции непрерывного длительного цветения.

Литература

1. Бейдеман И. А. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск, 1974.
2. Бородич Г. С. // Проблемы интродукции и рационального использования растительных ресурсов: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 50-летию Ставропольского бот. сада им. В. В. Скрипчинского и 100-летию профессора В. В. Скрипчинского. Ставрополь, 2009. С. 15–18.
3. Бурова Э. А. // Интродукция и селекция растений. Мн., 1972. С. 158–167.
4. Былов В. Н. // Интродукция и селекция цветочно-декоративных растений. М., 1978. С. 12–14.
5. Зайцев Г. Н. Методика биометрических расчетов. М., 1973.
6. Родионенко Г. И. Ирисы. СПб., 2002.
7. Сидорович Е. А., Лунина Н. М. Интродукция травянистых многолетников в Беларуси. Мн., 1992.

G. S. BORODICH

PECULIARITIES OF SEASONAL DEVELOPMENT OF VARIETIES OF BEARDED IRISES (BEARDED IRISES) AT ITS INTRODUCTION IN CENTRAL BOTANICAL GARDEN OF NAS OF BELARUS

Summary

The seasonal characteristics of 209 varieties of bearded irises promising in Belarus was examined. The timing and duration of flowering was determined. The studies are divided by grade timing of flowering in early, early-medium, medium, medium-later and later within the horticultural groups.

It was recommended for planting different varieties of dates and duration of flowering which gives an opportunity to significantly extend the decorative effect of flower beds.

УДК 582.572.42:635.92(476)

Л. В. ЗАВАДСКАЯ

**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ ФОНД НАРЦИССОВ (NARCISSUS)
ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail:kruchonak@gmail.com

(Поступила в редакцию 27.05.2010)

Введение. Нарциссы – многолетние луковичные растения, отличающиеся декоративностью, обильным цветением, пластичностью и сравнительной нетребовательностью к условиям произрастания. Культивируются с древнейших времен. Сорты объединены под общим названием *N. × hybridus hort.* [1]. Они являются сложными многоступенчатыми гибридами, большинство сортов – полиплоиды с крупными цветками [2]. Международный ассортимент насчитывает более 30 тыс. сортов, относящихся к 12 садовым группам. Центрами культуры являются Англия и Голландия.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси занимается интродукцией нарциссов с 1955 г. Интродукционный поиск направлен на привлечение видов и сортов, наиболее полно отражающих морфологическое разнообразие садовых групп. За сравнительно небольшой период (1980–2000) привлечено более 300 сортообразцов [3].

Целью данной работы являлось определение таксономической структуры садовых групп коллекционного фонда нарциссов Сада, выделение наиболее перспективных для культуры в Беларуси.

Объекты и методы исследования. Объектом изучения служила коллекция нарциссов (*Narcissus*) ЦБС НАН Беларуси, насчитывающая 5 видов и 403 сорта английского, голландского и австралийского происхождения. В период вегетации растения подкармливали полным комплексом минеральных удобрений в оптимальные для культуры сроки [4]. Выверка таксономической принадлежности образцов осуществлялась по доступным источникам [5–9]. Распределение нарциссов по подгруппам проводилось с учетом цветковых сочетаний долей околоцветников и привенчиков для трех первых групп по принятой международной классификации [1], для разрезнокорончатых и махровых нарциссов по методикам, предложенным соответственно Е. Т. Тимохиной [10] и Н. Я. Ипполитовой [11]. Фенологические наблюдения за ростом и развитием нарциссов проводились по методике И. Н. Бейдемана [12]. В период массового цветения по общепринятой методике оценивались декоративные качества нарциссов и описывались морфологические признаки растений [13]. Визуальная оценка дополнялась учетом биометрических параметров нарциссов (высота цветоноса, размер цветка и его привенчика).

Результаты и их обсуждение. Оценка соотношения длины привенчиков нарциссов к долям их околоцветников позволила классифицировать коллекционные образцы на 11 садовых групп.

Трубчатые нарциссы свое название получили из-за привенчиков, имеющих форму трубок, по длине равных долям околоцветников или превосходящие их. В коллекции представлены 51 сорт, относящимся к 4 подгруппам. Эти нарциссы имеют одиночные цветки в диаметре 9–12 см. Высота растений в период массового цветения 40–50 см. Цветение начинается с третьей декады апреля. Продолжительность цветения каждого сорта 15–20 дней.

Подгруппа 1а включает 23 сорта нарциссов с однотонно окрашенными желтыми цветками (*Dutch Master*, *Slieveboy*, *H. Ch. Andersen*, *Albert Schweizer*, *Bird of Dawning*, *Early Glory*, *Expressive*, *Golden Advance*, *Prizewinner*, *Rowallane* и др.). Сорты подгруппы 1в, которых в коллекции 15, име-

ют белый околоцветник и окрашенную трубку. Наиболее декоративны сорта с желтыми трубками – Music Hall, Queen of Bicolors, V. W. Favourite, Celebrity, Mrs. Ernst H. Krelage, Patria. В составе подгруппы 1c 11 сортов нарциссов с белыми цветками: Chastity, Chivarly, Beersheba, Mount Hood, Cantatrice, Broughshane, Glacier, Point Barrow, Tedstone, Empress of Ireland, White Triumphator. В большинстве случаев у распустившегося цветка трубка бывает светло-желтой или кремовой (влияние исходных родительских форм) и белеет уже в процессе цветения. Подгруппа 1d представлена двумя сортами – Limone, Lunar Sea. Их цветки окрашены в лимонно-желтый цвет. По мере старения трубка становится почти белой, лишь ее край сохраняет первоначальную окраску.

Крупнокорончатые нарциссы наиболее многочисленны и популярны во всем мире. Почти половина, зарегистрированных в международном каталоге сортов, относится к этой группе. Они получены в результате скрещивания трубчатых и поэтических нарциссов и выделяются разнообразием форм и окрасок коронок. Высота коронок не бывает меньше 1/3 длины долей околоцветника. Цветки одиночные, в диаметре 9–13 см. Высота цветоносов 25–40 см. В коллекции Сада 185 крупнокорончатых сортов, среди которых в разном соотношении встречаются представители всех подгрупп. Зацветают растения с конца апреля. Общая продолжительность цветения сортов 30 дней.

Подгруппа 2a объединяет 61 сорт с желтыми долями околоцветника и коронками желтой, оранжевой или оранжево-красной окраски. Среди желтых нарциссов декоративны сорта Carlton, Brazil, Emily, Hyperion, Jeanne Desor, Lemnos, Louis d'Or, Agathon и др. Оригинальны сорта с оранжевыми или оранжево-красными коронками: Pipe Major, Red Marley, Red Devon, Rouge, Rustom Pasha, Scarlett O'Hara, Tinker, Vulcan, Aranjuez, Bahram, Border Chief, Cavaliero, Fortissimo и др. Однако солнечные лучи обжигают края коронок, в результате декоративный эффект заметно снижается.

Подгруппа 2b представлена 113 сортами. Они имеют белые доли околоцветников, желтые, оранжевые, розовые или многоцветные коронки. По форме бывают цилиндрическими, колокольчатыми, блюдцевидными, воронковидными или плоскими. Изысканную строгость нарциссам этой подгруппы придают желтые коронки, такие как у сортов Jules Verne, Brunswick, Alceste, Daisy Schaffer, Careysville, Brookville, Court Martial, Elton Legget, Flora's Favourite, Florissant, Trianon. Из числа «розовых» нарциссов особенно привлекательны сорта Chiffon, Chelsea China, Hercules, Louise de Coligny, Pink Glory, Pink Supreme, Roseanna и Salome. На солнце розовый цвет коронок часто блекнет, становясь желтовато-кремовым. Эффектны крупнокорончатые нарциссы с оранжевыми или красными коронками, подчеркивающими белизну долей околоцветников (Milford, Orange Frilled, Orange Monarch, Paole Veronese, Professor Einstein, Red Bird, Redhill, Soestdijk, Kilworth, Salma Riante и др.). Не менее привлекательно на белом фоне долей околоцветников смотрятся ярко окрашенные коронки с каемками контрастного цвета. Такой признак характерен для сортов Belisana, Bruno, Clamor, Delibes, Ernani, Fermoy, Flower Record, Gloria Mundi и др. Оригинальны также сорта со светлыми коронками, по краю которых проходит кайма другого цвета (Aruba, Green Island, Mother Catherine Grullemans, Muscadet, Pontresina, Rocco).

Подгруппа 2c объединяет сорта с чисто белыми цветками, их в коллекции 9: Easter Moon, Good Measure, Ice Follies, Knowehead, Nuage, Pigeon, Tibet, White Plum, Worcester. И хотя у всех их околоцветники одного цвета, у каждого сорта индивидуальная форма коронки. Края коронок рассечены на гладкие или присобранные лопасти, прямые или в разной степени отогнутые.

Подгруппа 2d представлена двумя, так называемыми «обратными сортами», коронки которых светлее лимонно-желтых долей околоцветников. Это Binkie и Day Dream.

Мелкокорончатые нарциссы достаточно рослые растения, высота их цветоносов достигает 40–60 см. Цветки одиночные, в диаметре 8–9 см. Коронки не превышают трети длины отгиба. Растения этой группы завершают цветение нарциссов коллекции. В коллекции Сада 44 таксона трех подгрупп.

В подгруппе 3a собрано 7 сортов, среди них Brillancy, Edward Buxton, Star со светло-желтыми долями околоцветников и оранжевыми коронками. У сортов Birma, Lady Kesteven, Chungking доли околоцветников имеют серно-желтый цвет, а коронки – оранжево-красный. Особое положение в этой подгруппе занимает сорт Apricot Distinction. У него апельсиновые доли околоцвет-

ника и темно-красная плоская коронка. Под влиянием солнечных лучей апельсиновый цвет очень быстро трансформируется в грязновато-кремовый, в результате заметно снижается декоративный эффект.

Подгруппа 3в объединяет 30 сортов с белыми долями околоцветников и коронками кремового, желтого, оранжевого, красного цвета с каемками или без них. Форма коронок у нарциссов этой подгруппы весьма разнообразна: чашевидная, цилиндрическая, блюдцевидная, плоская. Наиболее эффектно мелкокорончатые нарциссы с красными или оранжевыми коронками: Carragee, Aflame, Enniskillen, Flaming Jewel, Limerick, Matapan, Sunrise, Verger, Barret Browning, Blarney. Декоративны сорта с желтыми коронками, по краю которых проходит оранжевая или красная кайма. Среди них Amore, Fairy Tale, Hamzali, La Riante, Margaret Mitchell, Pomona, Queen of Narcissi, Red Beacon, Shepherd, Snow Princess. По-своему оригинальны сорта Shantallow и Mystic. Их почти плоские кремовые коронки имеют изумрудно-зеленый центр и соответственно желтую и ярко-оранжевую каемки по краю коронок. Оригинален сорт Arguros. Его блюдцевидная коронка, которая в диаметре чуть больше 2 см, почти до основания рассечена на гофрированные лопасти. Дно коронки зеленоватое, ее центральная часть оранжевая, ближе к периферии коронка становится желтой, по ее гладкому краю проходит узкая оранжевая каемка. Из новых поступлений необычайно привлекателен сорт Audubon с чашевидной кремовой коронкой, окаймленной по лопастному краю розовой полосой.

Подгруппа 3с представлена 7 сортами, цветки у которых имеют белый цвет: Bithynia, Chinese White, Fairy Queen, Portrush, Verona, Weiss Klous, White Lady. Доли их околоцветников отличаются по форме и текстуре. Коронки блюдцевидные или чашевидные, с краями, в той или иной степени рассеченными и гофрированными. Диаметр коронок варьирует от 1,5 до 3,5 см, а их высота – от 1,0 до 1,7 см.

Махровые нарциссы отличаются особым морфологическим разнообразием. Группа объединяет сорта, возникшие как спортивные отклонения трубчатых, крупнокорончатых, мелкокорончатых и других нарциссов [2]. В зависимости от происхождения число цветков на стебле махровых нарциссов колеблется от 1 до 5, а их размер – от 5 до 11 см. В коллекции махровые нарциссы представлены 28 сортами. В их числе 19 сортов с махровыми одиночными цветками, 6 – с цветками, у которых махровыми являются коронки (трубки), 3 сорта имеют мелкие цветки с махровыми коронками, собранные в соцветия по 3–5 шт. Самым старым сортом коллекционного фонда является Van Sion. У него золотисто-желтые, довольно крупные махровые цветки на относительно низком (20 см) цветоносе. Невысокий, до 15 см, цветонос у сорта Rip van Winkle – мутантной формы нарцисса низкого (*N. pumilus* Salisb.), отобранной неизвестным оригинатором [14]. Цветки не крупные, в диаметре не более 6,5 см. Доли околоцветника желто-зеленые, узколанцетные, перемежающиеся с более короткими ярко-желтыми с закругленными кончиками выростами коронки. Центр цветка густомахровый. Сорт ранний, цветение растений в местных условиях приходится на конец апреля – начало мая. Из махровых нарциссов с крупными цветками заслуживают внимания сорта Acropolis, Odd's On, Flower Drift, Mary Copeland, чьи удвоенные или утроенные белые доли околоцветников прослаивают оранжево-красные выросты коронок. Оригинален сорт White Lion с белыми долями околоцветника и кремовыми выростами коронки. Представляют интерес густомахровые сорта Texas, Twink, Indian Chief, Frisun, чьи желтые доли околоцветников перемежаются с более короткими оранжевыми выростами коронок. Декоративен сорт Inglescombe с однотонно окрашенными цветками лимонно-желтого цвета. Однако у многих из перечисленных сортов слабые, лежащие цветоносы. Нарциссы последних лет селекции лишены этого недостатка. Достаточно прочны цветоносы у белоцветкового сорта Obdum, у сорта Duet, белые доли околоцветника которого отделены друг от друга желтоватыми сегментами, а также у сорта Replite, белые доли околоцветника которого перемешаны с розовыми выростами коронки.

Подгруппа нарциссов с махровыми коронками малочисленна, но наиболее оригинальна. Так, у желтоцветкового сорта Dick Wilden шесть дополнительных выростов его густомахровой трубки подняты над ней и наклонены к центру цветка. У сорта Apotheose желтые доли околоцветника располагаются в три яруса по 12 шт. Центр цветка венчает оранжевая, заполненная дополнительными сегментами коронка. Шесть белых долей околоцветника сорта Petit Four подчеркива-

ют махровость его розовой трубковидной коронки. Степенью махровости коронок отличаются белоцветковые сорта Ice King, Snowball, White Marvel. Наибольшее количество дополнительных сегментов встречается в коронках сорта Ice King, однако их число по годам может варьировать.

Подгруппа махровых многоцветковых нарциссов представлена белоцветковым сортом Cheerfulness, желтоцветковым сортом Yellow Cheerfulness, а также сортом Bridal Crown с белыми долями околоцветника и бело-желтой махровой коронкой. Упомянутые нарциссы позднего срока цветения (конец второй декады мая), обладают приятным ароматом. Высота цветоносов 30–35 см. Необходимо укрытие на зиму.

Из группы триандрусовых в коллекцию Сада привлечено 5 сортов, 3 из них (Hawera, Liberty Bells, Stoke) – желтоцветковые, 2 (Thalia, Tresamble) – белоцветковые. Растения высотой 25–34 см с 1–3 цветками на цветоносе. Диаметр цветков не превышает 6–8 см. Из числа изученных представителей группы выделяется сорт Hawera. Цветочный стебель растений не выше 17 см, а цветки не крупнее 2,5 см. Зацветают триандрусовые нарциссы в зависимости от погодных условий сезона в конце первой – в середине второй декады мая. Продолжительность цветения каждого сорта составляет 12–16 дней.

Цикламеновидные нарциссы коллекционного фонда представлены 6 сортами. Среди них желтоцветковый сорт February Gold, 2 сорта с желтыми долями околоцветников и коронками красного (Jetfire) и оранжевого (Tete-a-Tete) цветов. У сортов Dove Wings и Winged Victory доли околоцветников белые, коронки желтые. В состав группы входит также сорт Jenny с белыми цветками. У нарциссов этой группы обычно один пониклый цветок, в диаметре 7–8 см, с отогнутыми назад долями околоцветника и длиной до 3,5 см цилиндрической коронкой. Исключение составляет сорт Tete-a-Tete, в его соцветии бывает собрано от 2 до 6 цветков, в диаметре не более 5 см. Высота коронки не превышает 1,5 см. Зацветают цикламеновидные нарциссы в конце апреля – начале мая. Цветение длится не более двух недель. Высота цветоносов колеблется от 18 см (Jetfire, Tete-a-Tete) до 28–35 см (Dove Wings, February Gold, Jenny). Наиболее рослым, на фоне остальных, является сорт Winged Victory, к концу цветения его цветоносы вытягиваются до 40 см.

Жонкиллиевых нарциссов в коллекции 7 сортов. У 6 из них желтые, с заостренными кончиками доли околоцветников. Коронки, как правило, чашевидные, высотой от 0,8 до 2 см, в диаметре 1,5–3 см, лишь у сорта Sun Disc – плоские. Коронки отличаются по цвету. Так, у сортов Sun Disc, Trevithian, Tripartite они желтые, у Pipit и Step Forward – белые, у сорта Suzy коронки оранжевые. Цветками с белоснежными долями околоцветников и розовыми коронками, размером 1,2×1,5 см, из числа прочих жонкиллелей, выделяется сорт Bell Song. Цветоносы нарциссов этой группы не превышают 35 см. В соцветиях 2–3 цветка, часто ароматных. Их размеры колеблются от 6 до 7 см. Зацветают жонкиллиевые нарциссы во второй декаде мая. Цветение длится 11–17 дней.

Группа тацеттных нарциссов объединяет 5 сортов. У 4 из них белые доли околоцветников, желтые (Aspasia, Minnow) или оранжевые (Geranium, L'Innocence) коронки. У сорта Falconet доли околоцветников окрашены в желтый цвет, а коронки – в красный. На цветоносе собрано 3–6 цветков размером до 5 см. Цветки ароматные. Коронки блюдцевидные, высотой до 0,5 см, в диаметре 1–1,8 см. Высота цветоносов 30–36 см. Зацветают тацетты во второй половине мая. В зависимости от погодных условий декоративный эффект каждого сорта сохраняется 11–18 дней. Особое место среди тацеттов занимает миниатюрный сорт Minnow. Высота его цветоносных стеблей не превышает 20 см, а размер цветков, собранных по 3–4 в соцветии, – 3 см. Сорт ранний, непродолжительное (8–10 дней) цветение приходится на начало мая.

Сорта, относящиеся к **группе поэтических нарциссов**, в коллекции 2 – Actaea и Noase. Растения высокорослы, цветоносы достигают 50 см, несут один крупный, ароматный цветок с маленькой, плоской, желтой или оранжевой коронкой, по краю которой проходит красный ободок. Зацветают во второй декаде мая. Продолжительность цветения 14–18 дней.

Относительно молодая **группа разрезнокорончатых нарциссов** занимает особое место из-за привенчиков рассеченных на 6 свободных или сросшихся лишь у основания сегментов. В коллекции ЦБС разрезнокорончатые нарциссы представлены 71 сортом, что составляет 17,2 % от ее общей численности. У 57 сортов сегменты коронки располагаются в двух плоскостях над долями околоцветников (подгруппа 11а). У 14 сортов сегменты коронки лежат в одной плоскости

в виде шестилучевой звездочки (подгруппа 11в). Среди сортов подгруппы 11а выделены 6 цветковых комбинаций долей околоцветников и коронок. У 15 сортов (Baccarat, Brandaris, Chanterelle, Elisabeth Bas, Frileuse, Gold Collar, Holiday Sun, King Size, Modesta, Mol's Hobby, Moonbird, Obelisk, Sun Collar, Top Hit, Pear-Shell) доли околоцветников и сегменты коронок желтые. У 9 – Arena, Colorama, Colorange, Congress, Mondragon, Pomeranza, Rungis, Tiritomba, Vincennes – доли околоцветников желтые, сегменты коронок оранжевые. У 5 сортов (All Round, Cassata, Colblanc, Split, Travertine) доли околоцветников и коронки белого цвета. Сорта 14 наименований (Belcanto, Canasta, Chevreuse, Egard, Elysee, Estella de Mol, Fresco, Mistral, Mondial, Oecumene, Orangery, Printal, Sancerre, Changing Colors) имеют **белые доли околоцветников и желтые сегменты коронок**. Оранжевые сегменты коронок на фоне белых долей околоцветников встречаются у 8 сортов (Love Call, Joli Coeur, Parisienne, Peche Melba, Pick Up, Royal Highness, Sovereign, Tricollet). **Круг сортов с белыми долями околоцветников и розовыми сегментами коронок ограничен 6 таксонами** (Articol, Palmares, Roussilon, Pearlax, Muzett, Etincelante).

У сортов подгруппы 11в (Broadway Star, Burning Heart, Dolly Mollinger, Firestreak, First Lady, Jeanne d'Ark, La Argentina, Lemon Beauty, Madame Butterfly, Marie Jose, Nippon, Papillon Blanc, Pico-Bello, Sorbet) белые доли околоцветников и белые сегменты коронок с желтой, оранжевой или красной полосой по центру.

Разрезнокорончатые нарциссы зацветают с конца апреля по вторую декаду мая. Большинство сортов сохраняют декоративность в течение 14–15 дней, в благоприятные годы – до 20 дней. Высота растений в период массового цветения достигает 25–40 см. Размеры цветков варьируют от 7–8 до 10–15 см. Широкий диапазон изменчивости встречается и у коронок цветков этой группы нарциссов, их сегменты то почти прикрывают доли околоцветников, то едва достигают величины максимальной для мелкокорончатых нарциссов.

Дикорастущие виды нарцисса в коллекции Сада представлены 5 таксонами. Среди них эндем Карпат *Narcissus angustifolius* Curt. В местных условиях он зацветает очень поздно, в первых числах июня. Цветки диаметром до 7 см. Продолжительность цветения 6–10 дней. Высота цветоносов 50–55 см. В 20-х числах мая начинает цвести *N. poeticus* var. *recurvus* (Haw.) Baker. У него ароматные цветки, в диаметре до 7 см. Белые доли околоцветника напоминают совошки. Коронка маленькая, желтая, с красной каймой по краю. Продолжительность цветения 10–15 дней. Высота цветоноса 35–40 см. Второй вид позднего срока цветения – *N. x albus* Mill. *Plenus odoratus*. Цветки белые, ароматные, махровые, в диаметре до 5 см. Продолжительность цветения 15–17 дней. Высота цветоноса до 40 см. К суперранним относится миниатюрный вид – *N. asturiensis* (Jord.) Pigsley. Его цветение приходится на конец марта – начало апреля. Цветки трубчатые, в диаметре не более 2,5 см. Их декоративность сохраняется в течение 10–14 дней, в благоприятные годы до 20 дней. Высота растений не превышает 6–8 см. Видовой *Narcissus canaliculatus* Guss. изучается и оценивается.

Заключение. Анализ таксономического состава коллекции нарциссов ЦБС показал, что в ней, согласно международной классификации, представлены все известные садовые группы этой культуры, наиболее полно 4 из них – трубчатые, крупнокорончатые, мелкокорончатые и разрезнокорончатые нарциссы, универсальные по возможности использования. Идентификация сортов по международному регистру позволила установить год их выведения. Оказалось, что 10 % культиваров – старые и очень старые сорта, им 100 и более лет, 60 % коллекционного фонда – сорта среднего возраста, созданные 50–70 лет назад. Молодых сортов с датой «рождения» в 70–90 гг. прошлого века всего 30 % от общего количества, поэтому обновление коллекции актуально.

Литература

1. Ч о п и к В. И. // Декоративные травянистые растения. Л., 1977. Т. 1. С. 106–111.
2. М а т в е е в а Т. С. // Полиплоидные декоративные растения. Л., 1980. С. 121–137.
3. З а в а д с к а я Л. В. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1982. №5. С. 50–53.
4. М а н т р о в а Е. З. // Особенности питания и удобрения растений декоративных культур. М., 1973. С. 61–68.
5. К г а u s e J. // Narcyzy i krokusy. Warszawa, 1976. С. 7–112.
6. V a n e k et al. // Tulipany, narcisy, hyacinty. Praha, 1974. С. 104–141.

7. Classified list and international register of daffodil names. 1960–1975. J. Roy. Horticult. Soc. London.
8. Classified list and international register of daffodil names. The Royal Horticultural Society. London, 1969.
9. Daffodils to show and grow and agrided classified list of daffodil names. The Royal Horticultural Society Vincent Square London, England, American Daffodil Society, Inc. Tuner, N. C. U. S.A., 1980.
10. Тимохина Е. Т. // Бюл. Глав. бот. сада АН СССР. 1991. Вып. 161. С. 28–32.
11. Ипполитова Н. Я. // Нарциссы. М., 2001. С. 66–76.
12. Бейдеман И. Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск, 1974.
13. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (декоративные растения). М., 1968. Вып. 6. С. 58–96.
14. Чуб В. // Цветоводство. 2009. № 3. С. 32–36.

L. V. ZAVADSKAYA

**THE COLLECTION FUND OF THE NARCISSUS OF THE CENTRAL
BOTANICAL GARDEN OF NAS OF BELARUS**

Summary

The taxonomic structure of the Narcissus collection of CBG of NAS of Belarus that combines 403 cultivars and 5 species has been assessed. It has been found the collection includes all well-known groups of this culture, the 4 of them – the most complete (351 cultivars): trumpet, large-cupped, small-cupped and split-corona narcissuses, which are universal in terms of possibility to use. The age of introduced plants cultivars from 20 to 100 years and more.

УДК 635.92:582.931.4(476)

С. Е. БУЛЫКО

ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН ВИДОВ РОДА SYRINGA

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail:591@tut.by

(Поступила в редакцию 17.06.2010)

Введение. Сирень (*Syringa* L.) является одним из ценнейших декоративных кустарников. Согласно новейшей классификации, в роде насчитывается 21 вид [1]. В современном озеленении Республики Беларусь применяются в основном сорта сирени обыкновенной. Другие виды данного рода практически отсутствуют в городских посадках. Хотя сорта сирени обыкновенной считаются более декоративными по сравнению с видовой сиренью, но имеют ряд недостатков. Основной из них – сложности размножения данной культуры, что, по всей видимости, является главной причиной ограниченности ассортимента сортовой сирени в отечественных питомниках. С этой точки зрения, виды сирени имеют то преимущество, что в целом лучше размножаются вегетативно и могут передавать свои декоративные признаки семенному потомству.

В современной литературе нет единого мнения о посевных качествах семян различных видов сирени. Многие ученые считают, что семенам сирени присущ органический покой и для его преодоления необходима стратификация. З. Я. Иванова рекомендует стратифицировать семена с. волосистой в течение 1,5–2 мес, с. амурской – около 3 мес, а с. японской (сетчатой) 2,5–3 мес [2]. В. К. Горб в своей монографии приводит данные А. Г. Громова, В. Г. Рубанника, А. Ф. Мельника и З. И. Паршиной, которые рекомендуют стратифицировать семена сиреней независимо от видовой принадлежности 45–60 дней [3]. Такого же мнения придерживаются С. Г. Сааков [4] и Н. Д. Нестерович, Н. И. Чекалинская, Ю. Д. Сироткин [5]. И. Г. Пенкина указывает на необходимость стратифицировать семена с. амурской и с. сетчатой 4 и 5 мес соответственно [3]. Согласно же данным самого В. К. Горба, у большинства видов сирени, за исключением с. амурской, с. сетчатой и пониклой, покой семян отсутствует или слабо выражен. Для с. пониклой, с. амурской автор рекомендует 4-месячную стратификацию, а для сирени сетчатой – 5 мес стратификации [3]. С. И. Терещенко также говорит о необходимости стратифицировать семена с. амурской в течение 4–5 мес [6]. По данным Б. В. Дубина, семена с. амурской не нуждаются в стратификации [7]. В ассортименте древесных растений для озеленения Беларуси приводятся рекомендации по предпосевной подготовке семян с. венгерской, с. обыкновенной, с. амурской – 40–50 дней [8]. Согласно Г. В. Крылову и Н. Г. Салатовой, стратифицировать семена с. амурской необходимо в течение 30 дней [9]. В справочнике М. Г. Николаевой, М. В. Разумова, В. Н. Гладкова приводятся данные ряда ученых, из которых следует, что семенам видов с. Вольфа, с. тонковолосистая, с. Генри необходима стратификация 1,5 мес, с. обыкновенной, с. волосистой, с. пониклой, с. персидской 1–3 мес, с. гималайской, пушистой, с. мелколистной, с. юньнаньской – 1 мес. Семена с. амурской и с. пекинской, по одним данным, прорастают за 20 сут, по другим нуждаются в стратификации при 0–3 °С в течение 3–3,5 мес [10].

Представляется актуальным получить более объективные данные о посевных качествах семян сирени, сформировавшихся в условиях Республики Беларусь, поскольку даже в пределах одного вида нередко наблюдаются различия в глубине и характере покоя семян, которые являются следствием различий географического происхождения, степени зрелости, условий и длительности хранения [11].

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования были использованы семена, собранные в коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси в 2008 и 2009 гг. Семена проращивались в темноте в чашках Петри на фильтровальной бумаге при температуре 18–20 °С, по 100 шт. в трехкратной повторности. Учет проводился каждые 5 дней. Проросшими считались семена, у которых корешок достигал половины их длины. Для определения энергии прорастания нами принят срок 15 дней от начала опыта. Первым днем учета считался следующий после постановки семян на проращивание [12]. Аналогичная методика использовалась и украинскими исследователями [3, 6] со ссылкой на ГОСТ 13056.6-75, который впоследствии заменен ГОСТ 13056.6-97.

Результаты и их обсуждение. Были изучены посевные качества семян, входящих в секцию волосистых сиреней и подрода лигустрина. Из волосистых сиреней изучались следующие виды: с. венгерская (*Syringa josikaea* J. Jacq. ex Rchb.), с. волосистая (*S. villosa* Vahl), с. Вольфа (*S. wolfii* C. K. Schneid.), с. пониклая (*S. komarowii* C. K. Schneid. subsp. *reflexa* (C. K. Schneid.) P. S. Green & M. C. Chang), с. тонковолосистая (*S. tomentella* Bureau & Franch.), с. юньнаньская (*S. yunnanensis* Franch.). Данные представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Посевные качества семян секции волосистых сиреней

Вид	Всхожесть на день, %							Энергия прорастания, % (15 дней)	Средняя всхожесть, %
	5	10	15	20	25	30	35		
С. венгерская	0	19	58	64	74	–	–	58	74 ± 2,87
С. волосистой	0	42	93	96	–	–	–	93	96 ± 5,17
С. Вольфа	0	4	43	61	–	–	–	43	61 ± 8,72
С. пониклая	0	16	72	78	84	–	–	72	84 ± 8,72
С. тонковолосистая	0	8	75	82	83	85	–	75	85 ± 7,98
С. юньнаньская	0	8	53	60	–	–	–	53	60 ± 12,75

Первыми начали прорастать семена с. венгерской – на 6-й день, с. волосистой и с. пониклой – на 7-й день, а с. Вольфа, с. тонковолосистой и с. юньнаньской – на 9-й день. Наибольшая средняя всхожесть у с. волосистой 96 %, а наименьшая – у с. юньнаньской (60 %) и с. Вольфа (61 %). Высокая всхожесть у с. пониклой, с. венгерской и с. тонковолосистой – 84, 74, 85 % соответственно. Все рассмотренные виды характеризуются высокой энергией прорастания. У с. волосистой, с. пониклой, с. тонковолосистой и с. юньнаньской основная масса семян прорастает в течение 15 дней, у с. венгерской и с. Вольфа – 20 дней. Таким образом, можно утверждать, что семена данных видов сирени, сформировавшиеся в условиях Беларуси, не имеют ярко выраженного органического покоя. Следует отметить, что среди непроросших семян с. юньнаньской, с. Вольфа и с. пониклой было соответственно 32, 25 и 16 % нормально развитых здоровых семян. Наши данные в основном согласуются с литературными [3].

Были определены посевные качества семян представителей подрода лигустрина, произрастающих в ЦБС. В коллекции ЦБС произрастают разновозрастные представители с. амурской (*S. reticulata* (Blume) H. Nara subsp. *amurensis* (Rupr.) P. S. Green & M. C. Chang) и с. пекинской (*S. pekinensis* Rupr.), полученные из различных регионов. Были отобраны образцы с деревьев различного географического происхождения с. амурской и деревьев с. пекинской. Также были собраны семена с с. сетчатой (*S. reticulata* (Blume) H. Nara subsp. *reticulate*). Данные представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Посевные качества семян подрода Лигустрина

Вид, образец	Всхожесть на день, %													Средняя всхожесть, %
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	
С. амурская (1)	0	0	0	0	0	0	10	16	26	53	78	80	82	82 ± 8,72
С. амурская (2)	0	0	0	0	0	10	14	44	68	88	92	–	–	92 ± 4,97
С. амурская (3)	0	0	0	2	8	18	30	46	74	83	–	–	–	83 ± 7,99
С. пекинская (1)	0	8	40	46	64	71	–	–	–	–	–	–	–	71 ± 7,59
С. пекинская (2)	0	66	88	91	–	–	–	–	–	–	–	–	–	91 ± 3,8
С. сетчатая	0	0	22	28	34	46	56	64	78	82	–	–	–	82 ± 6,57

Семена с. пекинской начали прорастать на 6–7-й день. Период прорастания в зависимости от партии длился от 20 до 30 дней. Средняя всхожесть составила 71 и 91 %. Как видно из представленных данных, основная масса семян с. пекинской прорастает в течение 20–25 дней. Семена из третьей партии семян данного вида, а также полученные по системе международного обмена диаспорами (делектус) из Санкт-Петербурга и Берлина проросли в течение двух-трех недель. Все это подтверждает информацию В. К. Горба об отсутствии у семян данного вида органического покоя. В. Н. Былов и И. Б. Окунева сообщают, что с. пекинская слабо плодоносит в условиях Москвы, а семена дают этиолированные всходы [13, 14]. В условиях Минска этиолированные семена дают только одна географическая разновидность с. пекинской, у остальных представителей данного вида сеянцы имеют нормальную окраску.

Семена, собранные с с. сетчатой, начали прорастать на 14-й день. Весь период прорастания занял 50 дней. Средняя всхожесть составила 82 %. Следует отметить, что около 50–60 % всходов были этиолированными.

Семена, собранные с различных экземпляров с. амурской, отличались скоростью прорастания. Первые проростки появились в зависимости от партии на 17, 29 и 31-й день. Период прорастания длился соответственно 50, 55 и 65 дней. Средняя всхожесть составила 82, 92 и 83 %.

Проращивая семена с. амурской, полученные по делектусу, мы обнаружили, что они не имеют органического покоя и проросли в течение 15 дней. Поскольку семена заказывались зимой 2008–2009 гг., а получены в начале 2010 г. полагаем, что после длительного хранения семена выходят из состояния органического покоя. Чтобы проверить данное предположение мы определили всхожесть и динамику прорастания семян с. амурской, хранившихся около 1,5 лет. Семена хранились в бумажном пакете в комнатных условиях. Кроме того, посевные качества семян из этой партии нами определялись весной 2009 г. (через полгода после сбора). Полученные данные представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Посевные качества семян с. амурской в зависимости от срока хранения

Вид	Всхожесть на день, %											Средняя всхожесть, %
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	
С. амурская (6 мес хранения)	0	0	0	13	20	20	20	21	80	87	90	90 ± 6,25
С. амурская 18 мес хранения)	0	16	35	58	72	88	90	–	–	–	–	90 ± 3,8
С. амурская (присланные по делектусу – 39 шт.)	0	19 шт.	37 шт.	38 шт.	38 шт.	–	–	–	–	–	–	–

Семена, хранившиеся 1,5 года, начали прорастать на 9-й день, а хранившиеся полгода – через 19 дней. Период прорастания сократился с 55 до 35 дней. Таким образом, полученные данные подтверждают тот факт, что семена с. амурской со временем выходят из состояния органического покоя. По всей видимости, им характерен неглубокий физиологический тип эндогенного покоя (V_1), преодоление которого возможно путем хранения сухих семян [10].

Для преодоления органического покоя семян с. амурской был испытан метод теплой стратификации. В качестве субстрата использовался мох. Стратификация проводилась при комнатной температуре (18–20 °С). Стратифицировались семена, имеющие наибольший срок прорастания. Они начинали прорастать через месяц. Исходя из этого, в качестве предпосевной обработки семян с. амурской мы рекомендуем применять теплую стратификацию в течение 1 мес.

Учитывая вышеизложенное, было изучено влияние сухого хранения на посевные качества семян с. пониклой. Определена лабораторная всхожесть семян, хранившихся полгода, полтора года, а также присланных по делектусу. Данные представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Посевные качества семян с. пониклой в зависимости от срока хранения

Вид	Всхожесть на день, %						Энергия прорастания, % (15 дней)	Средняя всхожесть, %
	5	10	15	20	25	30		
С. пониклая (полгода)	0	23	87	90	–	–	87	90 ± 6,57
С. пониклая (18 мес хранения)	0	73	94	96	–	–	94	96 ± 1,43
С. пониклая (присланные по делектусу – 50 шт.)	0	4 шт.	23 шт.	26 шт.	27 шт.	29 шт.	46	58

Все партии семян с. пониклой начали прорастать на 7-й день. Средняя всхожесть составила 90, 96 и 58 %. Семена характеризовались высокой энергией прорастания. По всей видимости, у с. пониклой в условиях Беларуси образуются семена с различной глубиной покоя. У большинства он относительно неглубокий и практически не влияет на скорость прорастания. У отдельных же семян он, наоборот, достаточно сильный и задерживает их прорастание на 30 и более дней. При хранении, как и у с. амурской, семена выходят из состояния покоя, чем и объясняется увеличение всхожести и энергии прорастания.

Заключение. Виды секции волосистых сиреней в условиях Беларуси формируют семена высоких посевных качеств (всхожесть до 96 %). Период органического покоя у них отсутствует или очень короткий, тем не менее хранение семян в течение 1,5 лет только способствует увеличению всхожести.

У представителей подрода лигустрина также формируются качественные семена (всхожесть до 92 %). Быстрее и энергичнее всходят семена с. пекинской по сравнению с с. амурской, период прорастания у которой растянут до 60 дней. В этой связи предложен способ тепловой стратификации при 18–20 °С в течение 1 мес. Отмечена индивидуальная изменчивость в энергии и скорости прорастания семян различных популяций.

Литература

1. Syringa L. Checklist – botanical taxa in cultivation [Electronic resource] / ed. F. Vrugtman – Royal botanic garden. – Ontario, Canada. 1997. – Mode of access: <http://www.rbg.ca>. – Date of access: – 19.04.2009.
2. Иванова З. Я. // Сирень. М., 2005. С. 14–44.
3. Горб В. К. // Сирени на Украине. Киев, 1989. С. 76–81.
4. Деревья и кустарники СССР дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т. 5. Семейства Миртовые - Маслинные. М; Л. 1960. С. 435–462.
5. Нестерович Н. Д., Чекалинская Н. И., Сироткин Ю. Д. // Плоды и семена лиственных древесных растений. Мн., 1967. С. 211–215.
6. Терещенко С. И. // Промышленная ботаника. 2007. № 7. С. 57–62.
7. Дубина Б. В. **Интродукция видов сирени и трескуна в Молдавии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.** Днепрпетровск, 1972.
8. Сидорович Е. А., Гаранович И. М., Чаховский А. А. // Ассортимент декоративных деревьев и кустарников для зеленого строительства Беларуси и рекомендации по оптимизации условий выращивания саженцев. Мн., 1996. С. 57–61.
9. Крылов Г. В., Салатова Н. Г. // Разведение ценных деревьев и кустарников в Западной Сибири. Новосибирск, 1952. С. 62.
10. Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н. // Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л., 1985. С. 287–288.
11. Николаева М. Г. // Ускоренное проращивание покоящихся семян древесных растений. Л., 1979. С. 36–38.
12. ГОСТ 13056.6-97. Семена деревьев и кустарников. Метод определения всхожести. Мн., 1998.
13. Былов В. Н., Штанько И. И., Михайлов Н. Л. // Сирень. Краткие итоги интродукции. М., 1974. С. 103–105.
14. Окунева И. Б., Михайлов Н. Л., Демидов А. С. // Сирень: коллекция ГБС РАН: история и современное состояние. М., 2008. С. 74–76.

S. E. BULYKA

FEATURES OF GERMINATION OF SEEDS OF VARIOUS SPECIES OF GENUS SYRINGA

Summary

Selection species of series *Villosae* in conditions of Belarus form high-quality seeds (germination capacity up to 96 %). They have a short or no period of organic dormancy, however storing seeds for 1.5 years only increases germination capacity.

Representatives of subgenus *Ligustrina* in conditions of Belarus form quality seeds (germination capacity up to 92 %). Seeds of *Syringa pekinensis* germinate faster and more vigorously in comparison with *Syringa amurensis*. Its germination period reaches up to 60 days. Therefore a way of thermal stratification at 18–20 °C within 1 month has been suggested. There has been noticed individual changeability in vigour and speed of germination of seeds of various populations.

УДК 581.143:577.175

А. П. ВОЛЫНЕЦ¹, В. П. ШУКАНОВ¹, С. И. ГРИБ²

**МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
НА ПРЕДУБОРОЧНОЕ ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРНОВОК ТРИТИКАЛЕ**

¹*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, e-mail: patphysio@mail.ru,*

²*Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию,
Жодино, e-mail: usis@tut.by*

(Поступила в редакцию 22.04.2010)

Введение. Предыдущими исследованиями [1] показано, что физиологически активные вещества (ФАВ) в невысокой концентрации способны задерживать прорастание зерновок тритикале в колосе в неблагоприятных условиях предуборочного периода. В то же время они не оказывали отрицательного влияния на зерновую продуктивность и не снижали посевные качества семян. Такими веществами оказались эскулетин, α -НУК и салициловокислый калий в дозировках 30, 32 и 53 г/га, которые при обработке посевов тритикале в фазе молочной спелости задерживали прорастание зерновок в колосе в течение 7 сут и более, что обычно бывает достаточно, чтобы провести уборку урожая в благоприятных условиях.

Основными факторами, вызывающими прорастание зерновок тритикале в условиях высокой влажности, является повышение активности гидролитических ферментов и прежде всего α -амилазы [2], а также состояние и активность рострегулирующего комплекса, включающего фитогормоны и фенольные соединения [3, 4]. Учитывая функциональную связь фенольных соединений с ауксиновым обменом [5, 6], а также возможное ингибирование фенольными соединениями активности фитогормонов, целью настоящих исследований было изучение компонентного состава фенольного комплекса колоса тритикале в процессе формирования зерновок, определение содержания индивидуальных фенольных соединений и их суммарного количества для выявления возможных механизмов ингибирующего действия физиологически активных веществ на предуборочное прорастание зерновок тритикале.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили колосья тритикале сорта Лана, взятые через 1, 14 и 30 сут после обработки растений эскулетин, α -НУК и салициловокислым калием в дозировках 30, 32 и 53 г/га соответственно, т.е. в фазах молочной, восковой и полной спелости зерновок. Подготовку материала, экстракцию фенольных соединений, разделение и идентификацию их проводили по ранее описанным методам [7]. Содержание фенольных соединений определяли спектрофотометрически и рассчитывали количество их по идентичным или близким по структуре соединениям: агликоны флаванолов по кверцетину, апигенин и трицин по идентичным образцам, флавоноидные гликозиды по вицинину и гиперозиду, а эфиры оксикоричных кислот (ЭОКК) по хлорогеновой кислоте. Данные обрабатывали методом биологической статистики [8].

Результаты и их обсуждение. В колосе тритикале обнаружено 35 фенольных компонентов (рис. 1). Среди них 14 флавоноидных гликозидов, 3 флавоноидных агликона и 18 ЭОКК. Среди гликозидов 5 отнесены к гликозидам флавонола, 5 – к гликозидам лютеолина и 4 – к гликозидам апигенина. В числе идентифицированных флавоноидных агликонов выявлен трицин (соединение № 15), апигенин (№ 17), а в числе гликозидов–люценин-1 (№ 8), люценин-3 (№ 9), вицинин-2 (№ 10), изовитексин (№ 12), изосвертизин-4'-гликозид (№ 13). В составе фенольных эфиров обнаружены кофейная, феруловая и синаповая кислоты.

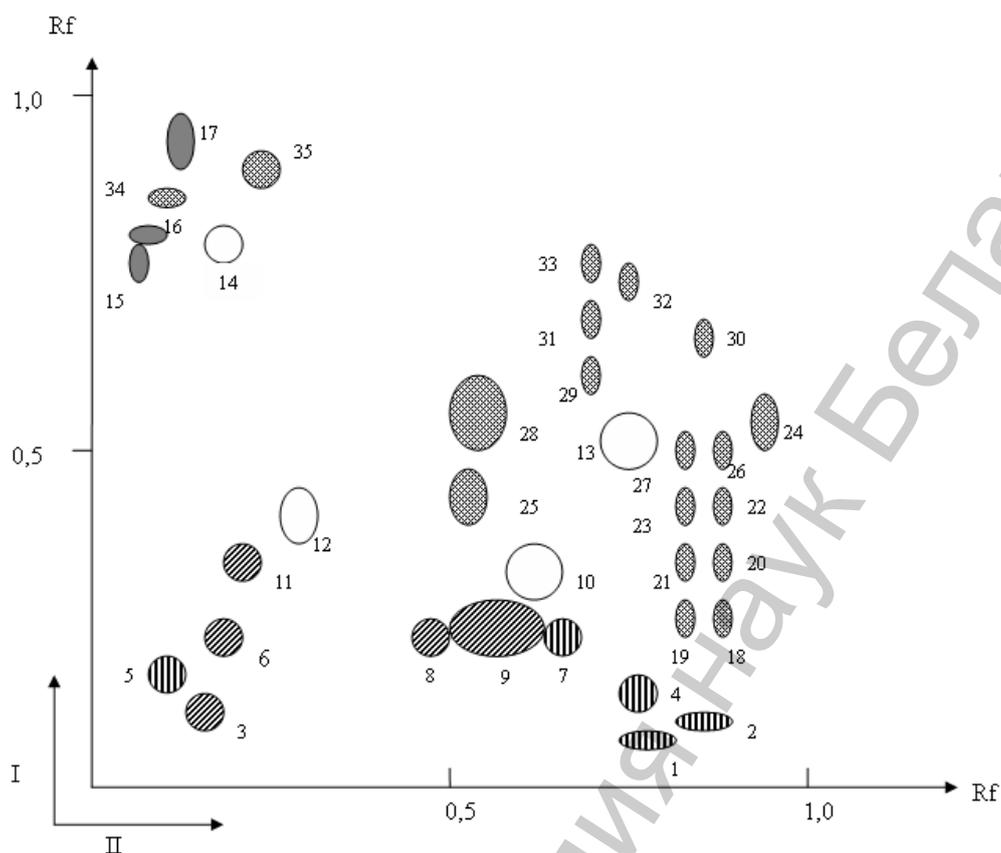


Рис. 1. Схема двумерной хроматограммы на бумаге F№16 фенольных соединений колоса тритикале сорта Лана: I – растворитель н-бутанол-уксусная кислота-вода (3:1:1), II – растворитель 5%-ная уксусная кислота; 1–14 – флавоноидные гликозиды, 15, 17 – флавоноидные агликоны, 18–35 – эфиры оксикоричных кислот; 1, 2, 4, 5, 7 – гликозиды флавонола, 3, 6, 8, 9, 11 – гликозиды лютеолина, 10, 12–14 – гликозиды апигенина; 8 – люценин-1, 9 – люценин-3, 10 – виценин-2, 12 – изовитексин, 13 – изосвертизин-4'-гликозид, 15 – трицин, 17 – апигенин

В процессе созревания тритикале изменялся компонентный состав и содержание фенольных соединений в колосе. Максимальный состав этих веществ в колосе выявлен в фазе молочной спелости, а минимальный – в фазе полной спелости. Если в контрольных растениях к полному созреванию зерновок количество отдельных компонентов в колосе снижалось на 1/3, то по вариантам с обработкой α -НУК и салициловокислым калием – в 2 раза (табл. 1). Аналогичным образом изменялось и суммарное содержание фенольных соединений в колосе, хотя в динамике отдельных групп обнаружены свои особенности (табл. 2). Так, количество гликозидов флавонола резко падало по мере созревания колоса, тогда как содержание ЭОКК плавно снижалось, оставаясь во всех фазах максимальным среди всех компонентов. Уровень гликозидов апигенина и лютеолина, а также количество агликонов существенно возрастало в фазе восковой спелости и уменьшалось к фазе полной спелости. Основной вклад в сумму фенольных соединений колоса тритикале вносили ЭОКК. Второй группой по величине были гликозиды лютеолина, третью составляли свободные флавоноидные агликоны, основным компонентом которой являлся апигенин. Последняя группа включает неидентифицированные гликозиды флавонола. Несмотря на значительное накопление их в фазе молочной спелости, в дальнейшем они оставались в следовых количествах, поэтому существенного влияния на изменение фенольного комплекса не оказывали. Такое деление фенольных соединений на группы имеет важное значение, так как каждой группе фенольных соединений характерна определенная химическая структура, от которой зависит эффективность действия их на метаболизм ауксина и активность ферментов, что будет рассмотрено ниже при обсуждении экспериментальных данных.

Т а б л и ц а 1. Изменение компонентного состава фенольных соединений в колосе тритикале сорта Лана в процессе созревания при обработке ФАВ

Вариант	Количество компонентов, шт.		
	Фаза развития колоса		
	молочная спелость	восковая спелость	полная спелость
Контроль, вода	31	27	20
Эскулетин, 30 г/га	27	26	24
α -НУК, 32 г/га	29	22	15
Салициловокислый калий, 53 г/га	29	18	14

Т а б л и ц а 2. Динамика содержания фенольных соединений в колосе тритикале сорта Лана в процессе созревания, мкг/г сухой массы

Флавоноидные гликозиды			Флавоноидные агликоны	Сумма ЭОКК	Общая сумма
апигенина	лютеолина	флавонола			
Фаза молочной спелости					
108 ± 4,8	337 ± 1,6	163 ± 2,5	228 ± 0,8	1902 ± 17,0	2738 ± 25,2
Фаза восковой спелости					
222 ± 2,0	447 ± 7,6	12 ± 0,2	339 ± 1,8	1672 ± 20,1	2692 ± 21,5
Фаза полной спелости					
70 ± 1,6	169 ± 2,6	2,0 ± 0	262 ± 0,9	1531 ± 10,7	2034 ± 16,7

α -НУК оказывала разное влияние на абсолютное и относительное содержание фенольных соединений. Абсолютное количество всех компонентов в основном снижалось (рис. 2). Исключение составляли флавоноидные агликоны и гликозиды флавонола, содержание которых возрастало соответственно в фазе молочной спелости и в течение всего срока созревания. В то же время относительная доля ЭОКК увеличивалась на 154 %, а количество флавоноидных агликонов снижалось в 3 раза. Относительное содержание гликозидов апигенина и лютеолина, как и сумма всех фенольных соединений, изменялись слабо. Следовательно, на общем фоне более или менее стабильного уровня всех фенольных соединений относительная доля о-диоксифенолов (эфиров кофейной, феруловой и синаповой кислот) резко возрастала в фазах желтой и полной спелости. Что же касается накопления гликозидов флавонола, то оно кажущееся, так как содержание их варьировало в пределах 2–10 % от суммы и не могло оказывать заметного влияния на изменение основных групп фенольных соединений в колосе тритикале. В отличие от α -НУК салициловокислый калий сильно повышал абсолютное и относительное содержание апигенин-гликозидов в колосе тритикале (рис. 3). Количество ЭОКК слабо изменялось. Вместе с тем содержание лютеолин-гликозидов и флавоноидных агликонов резко падало в фазах восковой и полной спелости зерновок. Изменения фенольного комплекса генеративных органов тритикале под влиянием эскулетина были также существенны (рис. 4). В частности, отмечалось заметное повышение абсолютного и относительного количества ЭОКК, тогда как уровень флавоноидных агликонов и гликозидов апигенина сохранялся или снижался.

Таким образом, под влиянием ФАВ происходила перестройка фенольного комплекса генеративных органов тритикале, сопровождающаяся изменением состава и содержания отдельных компонентов. При этом общее количество фенольных соединений под влиянием α -НУК слабо уменьшалось, при воздействии салицилатом калия практически сохранялось на уровне контроля и несколько возрастало при обработке эскулетинном. В то же время изменения содержания отдельных групп фенольных соединений внутри фенольного комплекса были более существенными. Так, наиболее характерной особенностью в перестройке фенольного комплекса колоса тритикале под влиянием α -НУК следует считать увеличение относительного содержания ЭОКК,

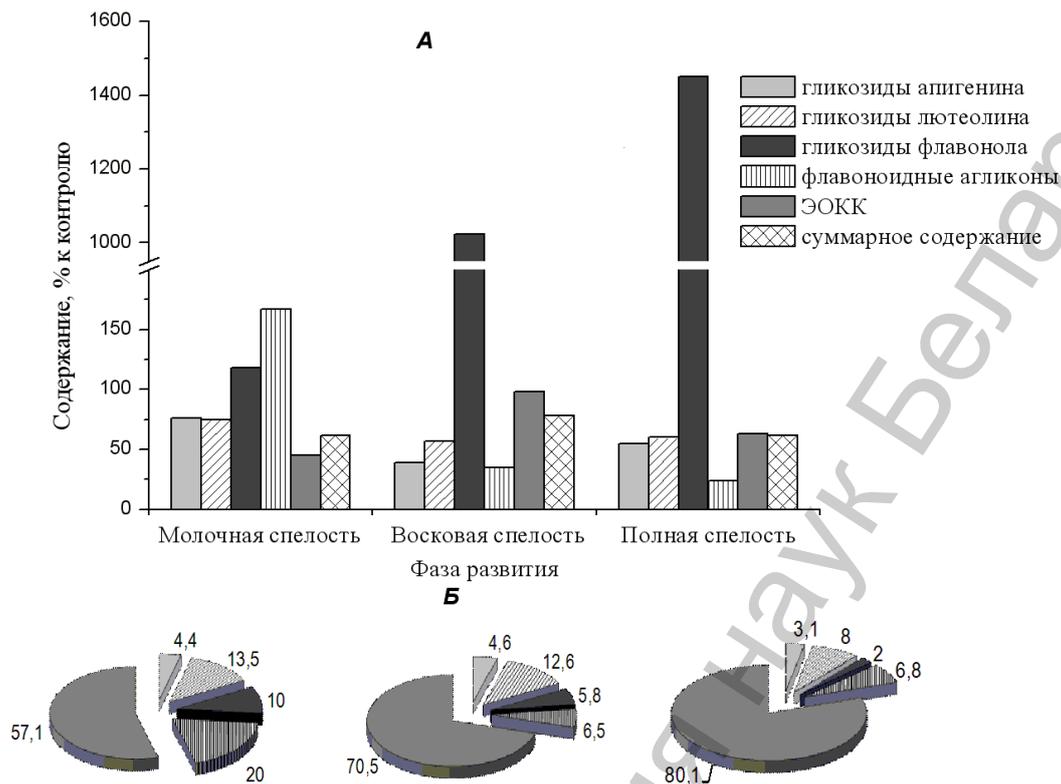


Рис. 2. Изменение содержания фенольных соединений в процессе созревания колоса тритикале сорта Лана при обработке α -НУК: А – содержание, Б – долевое соотношение компонентов

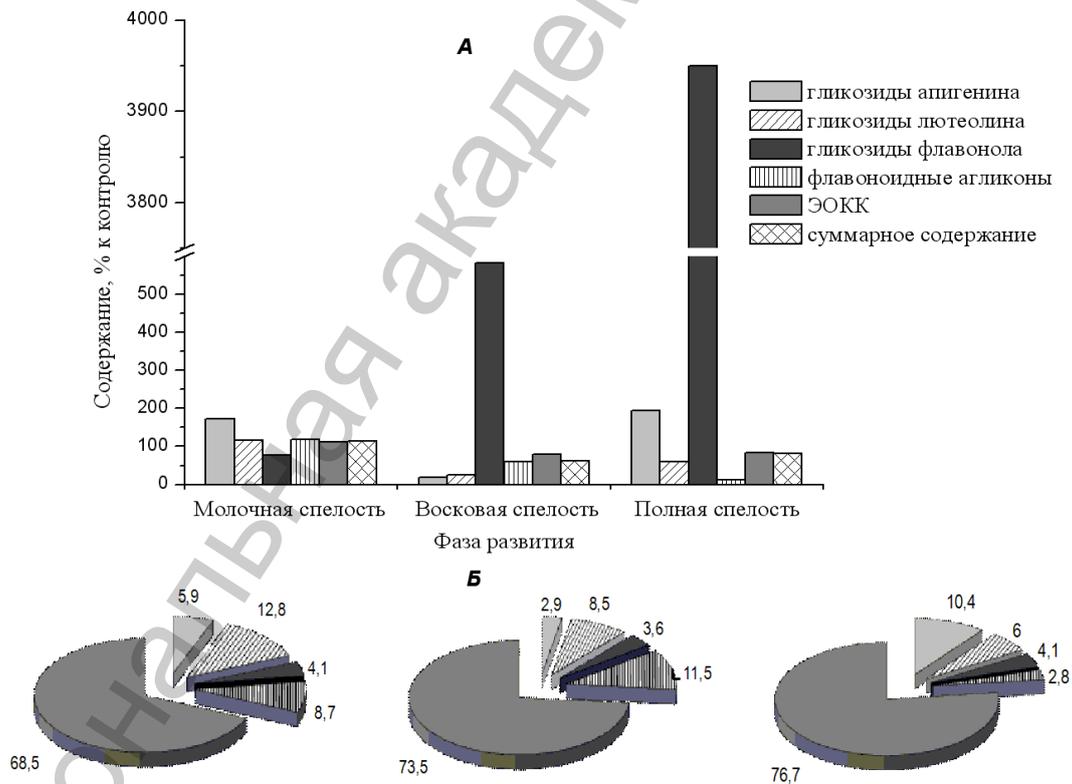


Рис. 3. Изменение содержания фенольных соединений в процессе созревания колоса тритикале сорта Лана под влиянием салициловокислого калия: А – содержание, Б – долевое соотношение компонентов

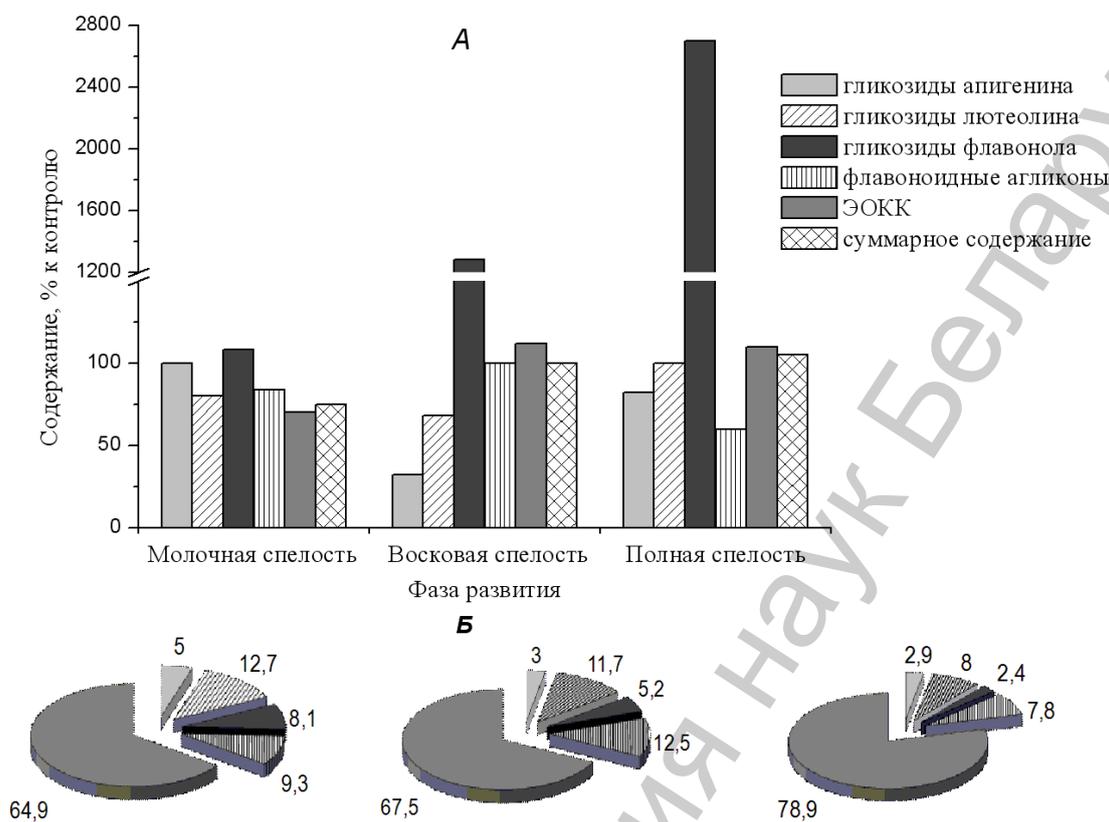


Рис. 4. Изменение содержания фенольных соединений в процессе созревания колоса тритикале сорта Лана под влиянием эскулетина: А – содержание, Б – долевое соотношение компонентов

при обработке салицилатом калия – накопление абсолютного и относительного количества гликозидов апигенина и при воздействии эскулетином – повышение абсолютного и относительного уровня ЭОКК. При сопоставлении эффективности действия физиологически активных веществ со структурой фенольных соединений видно, что α -НУК и эскулетин индуцируют перестройку фенольного комплекса в сторону накопления о-диоксифенолов, а салициловокислый калий – в сторону образования п-оксиполифенолов.

Ингибирование предуборочного прорастания зерновок тритикале фенольными соединениями возможно несколькими путями. Прежде всего при прямом действии этих веществ на прорастание. Однако для этого необходима концентрация фенольных соединений порядка 10^{-3} – 10^{-4} М [9], чего не наблюдается в опытах. Второй путь подавления прорастания зерновок в колосе возможен за счет ингибирования активности эндогенных фитогормонов фенольными соединениями, природная концентрация которых должна быть не ниже 10^{-5} М, что также не достигалось в колосе тритикале. Более эффективны фенольные соединения как ингибиторы ферментов уже в концентрациях 10^{-6} М и ниже [10, 11]. Самой высокой ингибирующей активностью обладают свободные фенольные соединения (агликоны) с о-диоксигруппой в молекуле, несколько ниже активность фенольных конъюгатов с аналогичным расположением оксигрупп. К таким соединениям в колосе тритикале относятся ЭОКК (о-диоксифенолы), трицин и гликозиды лютеолина (о-диоксиполифенолы). Этот механизм ингибирования прорастания зерновок можно ожидать при обработке растений тритикале α -НУК и эскулетином, но более выраженным при воздействии последним регулятором роста. Иная ситуация складывается при обработке тритикале салициловокислым калием. Она приводит к резкому накоплению в колосе апигенин-гликозидов (п-оксиполифенолов), которые выступают как кофакторы ауксиноксидазы, снижая в конечном счете содержание ауксина в тканях [11]. Отмечая общее сходство в действии ФАВ на прораста-

ние зерновок тритикале в колосе, все же следует признать, что механизмы ингибирующего действия их существенно различаются.

Обращает на себя внимание необычайное поведение гликозидов флавонола при обработке тритикале ФАВ. Содержание их в генеративных органах тритикале непрерывно повышается по мере созревания колоса. С чем это может быть связано? Для выяснения этого факта сошлемся на изменение эндогенных регуляторов роста в формирующихся семенах. Как следует из приведенных данных, общее количество фенольных соединений в колосе тритикале в процессе созревания снижалось. Уменьшается в созревающих семенах также содержание фитогормонов [12]. Однако процесс формирования семян при этом не прекращается. Он продолжается в затухающем темпе. Для поддержания снижающейся активности фитогормонов в созревающих семенах необходим эндогенный стабилизатор, в роли которого, как это было установлено нами [9], выступают флавонолы, способствующие сохранению и повышению активности этих веществ. Поскольку это явление происходит на фоне непрерывного снижения содержания самого стабилизатора, то для сохранения аттрагирующей способности колоса, обусловленной наличием фитогормонов, необходимо все возрастающее повышение относительного количества гликозидов флавонола, что и происходит на самом деле.

Заключение. Исследование состава и содержания индивидуальных компонентов фенольного комплекса генеративных органов тритикале, обработанного в фазе молочной спелости ФАВ, позволило выяснить механизмы ингибирующего действия этих веществ на прорастание зерновок в колосе. Установлено, что ингибирование прорастания их не связано с изменением общего содержания фенольных соединений, а вызвано перестройкой фенольного комплекса. При обработке тритикале α -НУК и эскулетинном в колосе возрастала доля о-диоксифенолов, вызывающих ингибирование ферментных систем, ответственных за прорастание зерновок. Под влиянием салициловокислого калия повышалось содержание п-оксиполифенолов, индуцирующих инактивацию ауксина.

Литература

1. Пшеничная Л. А., Шуканов В. П., Волюнец А. П., Гриб С. И. // Весці НАН Беларусі. Сербіял. навук. 2009. № 3. С. 10–13.
2. Шишлова Н. П. Физиолого-биохимические особенности озимого тритикале в связи с устойчивостью к предуборочному прорастанию: Дис. ... канд.биол.наук. Мн., 2002.
3. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян / Под ред. М. Г. Николаевой и Н. В. Обручевой. М., 1982.
4. Кефели В. И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны. М., 1974.
5. Волюнец А. П. // Докл. АН Беларусі. 1994. Т. 38, № 4. С. 68–70.
6. Волюнец А. П. // Докл. АН Беларусі. 1997. Т. 41, № 4. С. 73–76.
7. Волюнец А. П. Взаимодействие эндогенных регуляторов роста и гербицидов. Мн., 1980.
8. Роклицкий П. Ф. Биологическая статистика. Мн., 1973.
9. Волюнец А. П. Эндогенные регуляторы роста и избирательность действия гербицидов. Дис. ... д-ра биол. наук. Вильнюс, 1973.
10. Reifer J., Muszynska G. // Bull. Acad. polon. sci. Ser. sci. biol. 1968. Vol. 16, N 1. P. 9–14.
11. Волюнец А. П., Пальченко Л. А. Метаболизм и механизм действия фитогормонов. Иркутск, 1979. С. 132–134.

A. P. VOLYNETS, V. P. SHYKANOV, S. I. GRIB

INHIBITED IMPACTS ACTIVITY OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON PREHARVESTING GERMINATION OF TRITICALE SEEDS

Summary

Inhibited impacts activity of triticale seeds germination has been studied with the help of physiologically active substances. There was established that they are connected with the reconstruction of phenol complex of germinating seeds that leads to inhibition of ferments system or inactivation of auxin.

UDC 58:550.73

J. F. O. SEGOVIA¹, V. L. OLIVEIRA², M. C. A. GONÇALVES¹, I. S. RESCK³, C. A. M. SILVA⁴,
D. SILVEIRA², A. V. GAVRILOV⁵, L. A. GAVRILOVA⁶, L. I. B. KANZAKI⁷

**BOTANICAL CHARACTERISATION, GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION
AND PHYTOCHEMISTRY ANALYSIS OF MANILKARA HUBERI (DUCKE)
STANHL AUTOCHTHONOUS IN AMAPA STATE, BRAZIL**

¹The Brazilian Agricultural Research Corporation. Rod. Juscelino Kubitschek, KM-5. Fazendinha.
PO box 10. CEP 68903-000. Macapá/AP. Brazil,

²University Campus Ceilândia, University of Brasília, Ceilândia/D F. Brazil. CEP 72220-140,

³Institute of Chemistry, University of Brasília, University Campus Darcy Ribeiro.
CEP 70910-900. Brasília/DF. Brazil,

⁴Laboratory of Molecular Pharmacology, University of Brasília, University Campus Darcy Ribeiro.
CEP 70910-900. Brasília/DF. Brazil,

⁵Odessa National University, Odessa, Ukraine, e-mail alexandreg@rambler.ru,

⁶Institute of Technological Engineering «Biotechnique» of the Academy of Ukraine Agrarian Sciences,
Odessa, Ukraine,

⁷Laboratory of Bioprospection, Multiusos II, University Campus Darcy Ribeiro. University of Brasília,
CEP 70910-900. Brasília/DF. Brazil, e-mail: kanzaki@unb.by

(Submitted to the editors 06.09.2010)

1. Introduction

The *Sapotaceae* family is subdivided into five tribes that comprise 53 genera and about 1250 species; this family is distributed worldwide, mainly in the tropical and subtropical regions of Asia and South America [1]. One species, *Manilkara huberi*, is endemically found in the Amazon region, although there has been a misinterpretation of the data that mistakenly placed the species distribution beyond the limits of the wet forest.

For example, several *Manilkara* species are well-known for their chemical composition or their potential biological activity [2–6], however there is currently a lack of information about species such as *Manilkara huberi* (Ducke) Stanhl (*Mimusops huberi*), which is found in the Amazon forest, and some other species that are commonly called «maçaranduba» that have been reported in the Brazilian savannah [7]. This species can reach a height of 50 meters, and its wood is resistant to humidity, therefore it is commonly utilised for civil and shipbuilding construction, truck bodies, plates, poles, handles for tools, and musical instrument manufacturing, among other uses [8]. The *Manilkara huberi* wood is very heavy and dense (about 1000 kg/m³) and very resistant to fungal infection (*Lenzites trabea*, *Pycnoporus sanguineus* and *Polyporus fumosus*) and termite attack [9]. Studies of *Manilkara huberi* genetics have been performed with the aim to analyse the environmental impact of wood exploitation and to build a database for species conservation [7].

The triterpenes α -amyirin and β -amyirin and their derivatives are widespread in the plant kingdom and play an important role in metabolism by exhibiting several biological activities. For example, the α -amyirin and β -amyirin acetates show *in vivo* antinociceptive and anti-inflammatory (anti-arthritis) activity [10–12].

Male albino rats treated with α -amyirin acetate (10 mg/day) for 60 days presented with reproductive organ weight loss and a reduction in sperm motility and density, resulting in the complete suppression of fertility [13].

The β -amyirin acetate exhibited antimicrobial activity against *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia phaseoli*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis* and *Klebsiella pneumoniae* [14–16]. This compound also inhibited HIV-1 protease activity [17].

2. Material and Methods

2.1. Botanical description and geographical distribution of *Manilkara huberi* in Amapa state

In Amapa state, which is located in the northern region of Brazil and encompasses the Amazon flood plain and the Guyanese plateau (a transition ecosystem), it is found the botanical species *Manilkara huberi* (Ducke) Standley, belonging to the Class *Magnoliopsida*, Subclass *Dilleniidae*, Superorder *Primulanae*, Order *Ericales* and Family *Sapotaceae* and commonly named by the Amazonian native people as «maçaranduba» (an indigenous term from the Tupi language). Other species in the same *Sapotaceae* family are not easily recognised, but some phenotypic characteristics help to distinguish *M. huberi* from other similar species.

«Maçaranduba» is geographically distributed in the Central Amazon and Guyana and is found in highlands as high as 700 meters. In Amapa state, it has been reported in Laranjal do Jari, Mazagão, Pedra Branca, Serra do Navio, Tartarugalzinho and, other Amapa areas (fig. 1).

In the areas of *Manilkara huberi* exploitation, both the Ami and Amw climates predominate. According to the Köppen classification system, the former is characterised by tropical rainy weather, presents a well-defined dry season, and lacks pluviometric precipitation from August to December, and the latter is also characterised by tropical rainy weather but lacks a defined dry season; thus, there is regular rain year-round [18].

In Amapa state, arboreal species such as *Manilkara huberi* are well-adapted to highland ecosystems, which have soils of medium texture that are acidic and poor in essential nutrients such as phosphorous, potassium, calcium and manganese compounds (see table 1), therefore they are adapted to soils with a low natural fertility, of a generally yielding medium, and with high levels of toxic aluminium. Our preliminary analyses indicated a high capacity of *Manilkara huberi* to adapt to the deficient nutritional conditions of the soil; they also indicated that the plant releases organic acids into the environment and itself to neutralise the effects of the toxic aluminium compounds and reactive hydrogen.

Table 1. Physical chemistry analysis of different yellow latosol soils of highland forests ecosystems in Amapa state (0–20 cm depth)

Counties	pH (H ₂ O)	K ⁺ (Cmol _c /dm ³)	Ca ²⁺ +Mg ²⁺ (Cmol _c /dm ³)	Al ³⁺ (Cmol _c /dm ³)	H ⁺ +Al ³⁺ (Cmol _c /dm ³)	P (mg/dm ³)	M.O. (g/dm ³)	Silte (%)	Gross sand (%)	Thin sand (%)	Argil (%)
Pedra Branca	5,0	0,04	0,90	1,0	4,29	1	2,3	20	25	8	47
Pedra Branca do Amapari	4,6	0,06	0,3	1,0	11,22	4	19,26	90	549	169	192
Laranjal do Jari	4,6	0,05	1,70	0,50	13,53	6	4,0	34	12	5	49
Mazagão	4,6	0,06	0,50	1,65	8,91	1	2,5	87	1	1	11

Under the edaphic and climatic conditions described above, *Manilkara huberi* presents a corymbiform capitata canopy, a racemous and sympodial disposition of the branches and a cylindrical trunk (fig. 2).

The rhytidome displays a greyish-brown colour (fig. 3,a) that is characterised by deep fissures, forming elongated, regular, and firm plates. The plant displays a digitate shaft base (fig. 3,b), and the sapwood has a creamy colour (fig. 3,c). The bark is red (fig. 3,d), indicating its tannin content.

After being cut, the bark releases copious amounts of brilliant, white, viscous latex (fig. 4). The leaves are oblan-

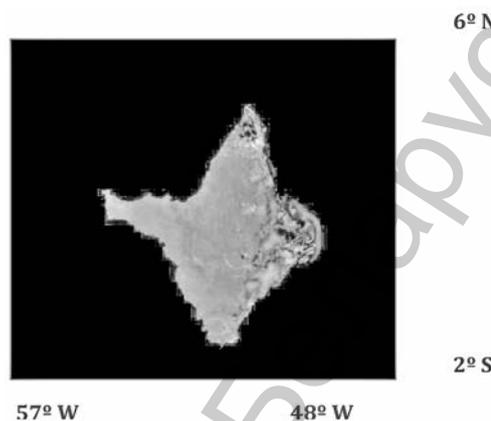


Fig. 1. Geographical distribution of *Manilkara huberi* in Amapa state in the border region between green and red areas



Fig. 2. Corymbiform capitata canopy, exhibiting a racemous and sympodial disposition of the branches



Fig. 3. Characteristics of *Manilkara huberi*: *a* – Rhytidome in a greyish-brown shade; *b* – The sapwood has a creamy colour; *c* – Digitate shaft base; *d* – The phloem in red coloration



Fig. 4. After being cut, the bark releases copious amounts of brilliant, white, viscous latex

ceolate and arranged in a spiral form; they exhibit a dark red colour on the adaxial side, yellow-silver on the abaxial surface, and rounded apsis.

The flowers are axilares, hermaphrodites, and pedicelled, forming fascicles in a set of six wine-coloured sepals that are arranged in two layers, lanceolated, in acute apsis, and generally covered by wax.

They present corolla glabra with six lobules that are divided into three segments and six stamens. They exhibit staminoides glabrous and a superior ovary in an oval format.

The fruit presents a yellow violaceous colour, varies in shape from oval to round, and measures approximately 3 cm long and 3 cm in diameter. The seeds are oblong, measure 1.5 cm long, and exhibit a well-developed dorsal prominence that is characteristic of the *Sapotaceae* family. The *Manilkara huberi* flowering season in Amapa state usually occurs between May and July, and its fruit ripens in August and September.

2.2. Phytochemistry analysis

General. Compounds were isolated using Fluka 60 silica gel (0.063–0.200 mm). Analytical TLC was performed on precoated ALUGRAM sil G Machery-Nagel silica gel (60/0.2 mm) plates using anisaldehyde reagent [19]. ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were registered using VARIAN Mercury Plus (300MHz, 7.04T, USA) spectrometer, with inverted detection probes of 5 mm of internal diameter and performed in CDCl_3 referenced with tetramethylsilane (TMS). The chemical shifts (δ) were expressed in ppm and the respective coupling constants (J) in Hertz.

Plant material. The bark samples of *Manilkara huberi* were collected in the savannah areas of Amapa state, Brazil and identified by us at The Brazilian Agricultural Research Corporation. A voucher specimen (number 16601) was deposited at the Herbarium of the Institute of Scientific and Technological Research of the Amapa State (IEPA).

Extraction procedures. It was performed according to previously reported technique [20]. Briefly, the dried and powdered plant material (226 g) was macerated at room temperature for seven days (repeated thrice) with ethanol. After filtration, the solvent was removed under reduced pressure, at temperature below 40 °C, furnishing 50.78 g of ethanol (EMH) crude extracts (22.56 % yield).

Part of the crude extract (20.1 g) was submitted to liquid-liquid partition, furnishing three fractions as showed in Fig. 8. A part (1.0 g) of fraction B ($\text{MeCN}:\text{CHCl}_3$) was chromatographed over silica gel, using the hexane-dichloromethane-methanol gradient. The collected fractions (30 mL) were monitored by TLC and pooled when presenting similar profiles. The fraction 32-37 (MHV 01) was obtained by elution with hexane: dichloromethane (8:2), furnished after usual purification process, yielding 41 mg of a white waxy solid compound, soluble in dichloromethane.

2.3. Brine shrimp toxicity test (BST)

The crude extract and fractions of *M. huberi* were tested for cytotoxicity using the brine shrimp lethality assay. The assay was performed according to simplified Meyer's method [21]. Briefly, brine shrimp *Artemia salina* L. encysted eggs (Maramar) were incubated in artificial sea water at 28 °C. Samples were dissolved in 200 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) plus 20 mL of artificial seawater. Serial dilutions (triplicate) were prepared in the same solution. Ten units of Metanauplii were added to each set of tubes containing samples and the cultures further hatched for 24 h. Controls containing DMSO were included on each set of experiments. Potassium dichromate (0.04 mg/mL) was used as standard reference (standard). The LD_{50} (after 24 h) was calculated utilizing the Probit analysis.

3. Results

3.1. Morphological characteristics and geographical distribution of *M. huberi*

The figures 1 to 4 depict the morphological characteristics of *M. huberi* found in the Amapa state.

3.2. Phytochemistry analysis

The spectrometric analysis (^1H and ^{13}C NMR and IR) was compared to the literature data and showed that MHV01 is a mixture of the α - and β -amyrin acetates (table 2).

Table 2. Attribution of the ¹³C-NMR signals from MHV 03 (CDCl₃, 75MHz) by comparison with the data of alpha- and beta-amyrin acetates related in literature [10]

C	α-amyrin	MHV 03a	β-amyrin	MHV 03b	C	α-amyrin	MHV 03a	β-amyrin	MHV 03b
1	38.4	38.43	38.2	38.03	16	26.6	26.6	26.9	26.9
2	26.6	26.6	26.6	26.6	17	33.7	33.73	32.9	32.83
3	80.9	81.00	80.9	80.86	18	59.0	59.02	47.1	–
4	37.7	37.69	37.7	37.68	19	39.6	39.61	46.8	46.76
5	55.2	55.21	55.2	55.21	20	39.6	39.61	31.0	31.07
6	18.2	18.2	18.2	18.2	21	31.2	31.22	34.7	34.68
7	32.8	32.83	32.6	32.47	22	41.5	41.50	37.1	37.10
8	40.0	39.99	38.4	38.43	23	28.0	28.1	28.0	28.1
9	47.5	47.61	47.5	47.61	24	15.5	15.7	15.5	15.7
10	36.8	36.77	36.8	36.77	25	15.7	15.8	15.7	15.8
11	23.3	23.3	23.6	23.6	26	16.8	16.8	16.8	16.8
12	124.3	124.38	121.6	121.54	27	23.2	23.4	25.9	26.1
13	139.6	139.61	145.2	145.20	28	28.7	28.8	28.3	28.1
14	42.0	42.04	41.7	41.67	29	17.5	17.5	33.3	33.7
15	28.0	28.1	26.1	26.1	30	21.2	21.4	23.6	23.6
C=O	170.9	171.0	170.9	170.85	C=O	170.9	171.0	170.9	170.85
CH ₃	38.4	38.43	38.4	38.43	CH ₃	38.4	38.43	38.4	38.43

The ethanol extract fractions of *M. huberi* bark which were obtained by chromatographic methods (MHV1a and MHV1b), yielded hydrocarbons, fatty acids, and a mixture of α- and β-amyrin acetates. The chemical composition was determined based on NMR spectral data compared to the available literature [10]. The ¹H NMR spectrum in CDCl₃ exhibited signals for eight singlet methyl groups at δ 0.86, δ 0.87, δ 0.92, δ 0.97, δ 0.98, δ 1.05, δ 1.07, and δ 1.23, one acetoxyl group at δ 2.06 (s), a signal at δ 4.5 for a methine proton attached to an acetoxyl group, and signals at δ 5.05 and δ 5.18 that were attributed to an olefinic proton at C12 of α-amyrin acetate and β-amyrin acetate.

This attribution was corroborated by the presence of signals at δ 170.9, δ 171.0 and δ 38.4, which are characteristic of an ester carbon group. The ¹³C NMR spectrum showed, in addition, two pairs of characteristic signals at δ 124.4/δ 139.6 and δ 121.6/ δ 145.2, from ursan and olean type triterpenes, respectively, as well as two oxygenated carbons at δ 81.0 and δ 80.9 (data not shown).

To define the proportion presented by MHV1 considering the triterpenes α-amyrin and β-amyrin acetate, the area from ¹H NMR characteristic signals was calculated. The proportion between these compounds was 1:2.

3.3. Toxicity assays utilising the brine shrimp lethality test

The results of the brine shrimp lethality test (BSL) are presented in table 3. In the BSL test, an LD₅₀ value lower than 1 mg/mL of the plant extract is considered bioactive [21]. The ethanol crude extract and the aqueous fractions of *Manilkara huberi* yielded LD₅₀ = 0.77 mg/mL and 0.47 mg/mL, respectively. According to Meyer's classification, this sample was toxic, while the hexanic extract and the acetonitrile/trichloromethane fractions were very toxic, displaying an LD₅₀ value > 1.0 mg/mL.

Table 3. Toxicity screening of *Manilkara huberi* crude extract and fractions against *Artemia salina*'s larvae

Sample	LD ₅₀ (mg/mL)	Confidence interval (mg/mL)
Ethanol crude extract	0.77	0.46 < LD ₅₀ < 1.1
Hexane Fraction	> 1.0	–
MeCN: CHCl ₃ Fraction	> 1.0	–
Aqueous Fraction	0.47	0.38 < LD ₅₀ < 0.57
Potassium dichromate	0.01	0.004 < LD ₅₀ < 0.02

4. Discussion and Conclusion

This is the first report of the detection of α - and β -amyrin acetate compounds in *Manilkara huberi*, despite the widespread distribution of these molecules in the plant kingdom. Additionally, we emphasise in our report the differentiation of «maçaranduba», a common name to different species of *Manilkara*, even though molecular approaches are more suitable to distinguish the species [7]. The morphological characteristics of *Manilkara huberi*, as described here, are very subtle, and a very careful analysis would help to distinguish it from other species in the same family. Concerning the matter of having different species of *Manilkara* under a single common name, it is difficult to assume that these different species have similar medicinal properties. Other than these differences among the species, secondary metabolites, as exemplified here by α and β -amyrin, are produced under peculiar conditions such as stress exposure (e. g. parasite attacks), certain climate and edaphic as also geographical distribution.

Further studies aiming to screen other biological properties of *Manilkara huberi*, mainly microbicide, antineoplastic and antiprotozoan, are currently underway, utilising the chemical fractions we have obtained, which showed cytotoxic activity by the brine shrimp lethality test. Efficacious compounds, ascertained by their medicinal properties, that undergo chemical characterisation will allow pharmaceutical companies to proceed to all necessary steps to market the drug by synthesising or chemically modifying the compound. This action would benefit the plant by avoiding its exploitation and encouraging it to be used rationally and sustainably to both preserve the species and to keep the Amazon forest intact, maintaining the natural life support processes that are currently very fragile due to extensive and irrational exploitation.

Therefore, it is very important to disseminate the medicinal properties of *Manilkara huberi* to avoid its extinction. As mentioned before, its vast array of applications [8] and its medicinal and nutraceutical properties expose this plant to a serious risk of extermination. In the Amazon region the wood is generally susceptible to the high humidity, which makes them vulnerable to many types of cellulose parasites making the *M. huberi* wood the best choice for many industrial applications as the plant has a high density and resistance to the attacks of microorganisms. Besides all properties mentioned in the text, many *Sapotaceae* family representatives plays a major role in the ecosystem, as for example their fruits are present in the diet of many vertebrate and invertebrate animals mainly including bats, monkeys and birds [22]. Therefore, we propose in this study to repopulate devastated areas in Amapa state utilising *Manilkara huberi* instead of exotic species with unknown ecological impacts, which would also favour the rational exploitation of the plant for the production of phytotherapies and nutraceuticals among other benefits.

Acknowledgements

Part of this research work was funded by Eletronorte&ANEEL and by Banco da Amazonia, both institutions located in Brazil. We are also indebted to the Amapa State Agency of Science and Technology (SETEC/AP), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC/DF) in Brazil.

Literature

1. Swenson U., Anderberg A. A. // Cladistics. 2005. N 21. P. 101–130.
2. Lavaud C., Massiot G., Becchi M., Misra G., Nigam S. K. // Phytochemistry. 1996. N 41. P. 887–893.
3. Sahu N. P. // Phytochemistry. 1996. N 41(3). P. 883–886.
4. Dar A. S., Behbahanian S., Malik A., Jahan N. H. E. // Phytomedicine 1999. N 6, P. 373–378.
5. Shah P. J., Gandhi M. S., Shah M. B., Goswami S. S., Santani D. // Journal of Ethnopharmacology 2003. N 89. P. 305–311.
6. Mali R. G., Mahajan S. G., Mehta A. A. // Pharmacognosy Magazine 2007. N 3. P. 73.
7. Azevedo V. C. R., Vinson C. C., Ciampi A. Y. // Molecular Ecology Notes. 2005. N 5. P. 13–15.
8. Tomazello-Filho M., Couto H. T. Z., Chimelo J. P., Garcia P. V. // Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. 1983. N 23. P. 21–28.
9. INPA. Catálogo de madeiras da Amazônia: Características tecnológicas. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA/CPPF, 1991.
10. Bandeira P. N., Lemos T. L. G., Costa S. M. O., Santos H. S. // Brazilian Journal of Pharmacognosia 2007. N 17. P. 204–208.

11. Kweifio-Okai G., Macrides T. A. // Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 1992. N 78. P. 367–72.
12. Soldi C., Pizzolatti M. G., Luiz A. P., Marcon R., Meotti F. C., Mioto L. A., Santos A. R. S. // Bioorganic Medicinal Chemistry 2007. N 16. P. 3377–3386.
13. Gupta R. S., Bhatnager A. K., Joshi Y. C., Sharma R., Sharma A. // Pharmaceutical Biology 2004. Vol. 42. P. 98–104.
14. Singh B., Sahu P. M., Sharma M. K. // Phytomedicine 2002. N 9. P. 355–359.
15. Jain S. C., Singh B., Jain R. // Fitoterapia. 2001. N 72. P. 666–668.
16. Schinor E. C., Salvador M. J., Ito I. Y., Dias D. A. // Brazilian Journal of Microbiology. 2007. N 38. P. 145–149.
17. Yu-B., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M., Park J. C. // Viral Enzymes. 2007. N 30. P. 820–826.
18. Köppen W. Das geographische System der Klimate. In: Wladimir Köppen und Rudolf Geiger, Hg., Handbuch der Klimatologie in fünf Bänden, Bd. I: Allgemeine Klimalehre, 1936.
19. Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Springer, 1996.
20. Perfeito J. P., Santos M. L., Lopez K. S. E., Paula J. E., Silveira D. // Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2005. Vol. 15, N 3. P. 183–186.
21. Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E., McLaughlin J. L. // Planta Medica. 1982. N 45. P. 31–34.
22. Тахтаджян А. Л., Трифонова В. И. // Жизнь растений: В 6 т. Т. 5(2). Цветковые или покрытосеменные растения (Magnoliophyta /Angiospermae/). М., 1981. С. 104–105.

J. F. O. SEGOVIA, V. L. OLIVEIRA, M. C. A. GONÇALVES, I. S. RESCK, C. A. M. SILVA, D. SILVEIRA,
A. V. GAVRILOV, L. A. GAVRILOVA, L. I. B. KANZAKI

**BOTANICAL CHARACTERISATION, GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION
AND PHYTOCHEMISTRY ANALYSIS OF MANILKARA HUBERI (DUCKE) STANHL AUTOCHTONOUS
IN AMAPA STATE, BRAZIL**

Summary

It is described in this study the morphological and phytochemical characteristics and geographical distribution of *Manilkara huberi* found in the Amapa state, Brazil and the detection of alfa and beta amyryn acetates in the bark extracts of the plant by spectrometric analysis. This is the first study to report the presence of these chemical compounds in *Manilkara huberi* species.

УДК 575.222.73:[633.11+633.14]+[633.11]

Н. М. ЕРМИШИНА, Е. М. КРЕМЕНЕВСКАЯ, О. Н. ГУКАСЯН, В. А. ЛЕМЕШ

**ПОВЫШЕНИЕ ЗАВЯЗЫВАЕМОСТИ СЕМЯН
ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ОЗИМЫХ ГЕКСАПЛОИДНЫХ
ТРИТИКАЛЕ (TRITICALE THCHERM.) С ПШЕНИЦЕЙ (TRITICUM AESTIVUM)**

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail:n.yermishina@mail.ru

(Поступила в редакцию 04.03.2010)

Введение. Создание тритикале – нового вида сельскохозяйственного злака продовольственного, зернофуражного и кормового использования – является крупнейшим достижением селекции. Посевные площади под этой культурой быстро растут во многих странах мира (Германии, Польше, Канаде и др.) [1]. Преимущество новых сортов тритикале над пшеницей обусловлено их высокой урожайностью, морозостойкостью, устойчивостью к ряду распространенных заболеваний (мучнистой росе, бурой, желтой и стеблевой ржавчине, головне и др.) Однако сорта тритикале не лишены ряда существенных недостатков. Необходимо дальнейшее совершенствование вновь создаваемых сортов по таким важнейшим направлениям селекции, как сочетание стабильно высокой урожайности с оптимальным уровнем зимостойкости и более коротким вегетационным периодом, прорастание зерна в колосе, короткостебельность, толерантность к заболеваниям, особенно фузариозным, и, главное, улучшение кормовых и хлебопекарных достоинств зерна. По сравнению с пшеницей тритикале, как правило, характеризуется пониженным содержанием белка, повышенной зольностью зерна и худшим объемом выпеченного хлеба.

У пшениц и тритикале гены, влияющие на хлебопекарные качества, локализованы на хромосомах 1A (*Glu-A1*) и 1B (*Glu-B1*). В дополнение к этому у гексаплоидных пшениц присутствует еще и ген *Glu-D1* на длинном плече хромосомы 1D, также отвечающий за этот признак. Для того чтобы улучшить качество белка и хлебопекарные свойства гексаплоидных тритикале, их скрещивают с гексаплоидной пшеницей с целью интрогрессии 1D хромосомы мягкой пшеницы в геном тритикале. Кроме того, ряд генов пшеницы, определяющих зимостойкость, устойчивость к болезням и полеганию, раннеспелость, также локализован на хромосомах D генома.

Гибридизация гексаплоидных тритикале с мягкой пшеницей предполагает широкие рекомбинационные возможности генетического материала пшеницы и ржи как за счет разнообразия аллелей геномов A и B тритикале и мягкой пшеницы, так и замещений хромосом геномов D и R. Однако одной из основных проблем получения таких гибридов является несовместимость исходных видов. В связи с этим целью настоящей работы было выявление способов преодоления несовместимости при проведении отдаленных скрещиваний гексаплоидных тритикале с гексаплоидной пшеницей.

Материал и методы исследования. Исходными формами для получения отдаленных гибридов служили сорта озимых гексаплоидных тритикале различного географического происхождения, характеризующиеся рядом полезных признаков, сорта озимой гексаплоидной пшеницы с высокими хлебопекарными качествами (табл. 1), а также полученные нами в процессе эксперимента межсортовые гибриды F₁ и F₂ тритикале.

Таблица 1. Исходные сорта тритикале и пшеницы

Сорт	Вид	Страна происхождения
Михась	Тритикале	Беларусь
Виктор	Тритикале	Россия
Гермес	Тритикале	Россия
Дубрава	Тритикале	Беларусь
Aswo	Тритикале	Польша
GWT-1983-91	Тритикале	Англия
Samson	Тритикале	США
SV89207	Тритикале	Швеция
Капылянка	Пшеница	Беларусь
Knirps	Пшеница	Германия

Растения выращивали на Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси с сентября по август (2008–2009) на суглинистой дерново-подзолистой почве с площадью питания 5×20 см² рандомизированным способом. В фазах кушения, флагового листа и колошения осуществляли некорневые подкормки растений аммиачной селитрой в дозе 40 кг/га.

Для проведения скрещиваний брали по 20–30 растений сорта или гибрида в каждой комбинации, опыление проводили твел-методом [2]. Растения кастрировали в начале колошения, удаляя средние колоски и оставляя боковые. Колосковые и цветочные чешуи подрезали, пинцетом извлекали пыльники. На колосья надевали изоляторы. На 5-й день пылящие колосья опылителя в пробирках с водой подсаживали под общий изолятор с откастрированными растениями. Завязываемость семян рассчитывали как отношение числа семян к количеству опыленных цветков, выраженное в процентах.

Результаты и их обсуждение. Для интродукции хромосом или сегментов хромосом D-генома гексаплоидные тритикале (*Triticale*, геномный состав AABBRR) скрещивают с гексаплоидной пшеницей (*Tr. aestivum*, AABBDD) или октоплоидным тритикале (AABBDDRR). Полученные гибриды, содержащие хромосомы всех четырех геномов (AABBDR), самоопыляют или беккроссируют гексаплоидными тритикале. При этом отбирают формы с замещением хромосом геномов A, B, R на соответствующие хромосомы генома D [3]. В этом процессе проблематичным является проведение отдаленных скрещиваний между тритикале и пшеницей из-за значительных пре- и постзиготных межвидовых барьеров несовместимости.

Для преодоления барьеров репродуктивной изоляции между разными видами используют такой генетический прием, как скрещивания на внутривидовых гибридах [4–6]. Однако следует отметить, что лишь определенная степень гетерозиготности исходных форм способствует увеличению завязываемости. Это наблюдается, когда гетерозиготная форма (межсортовой гибриды) берется только в качестве материнского или только в качестве отцовского компонента, тогда как гибридность обоих родительских компонентов не всегда способствует лучшей завязываемости [7]. Тем не менее сорта гибридного происхождения лучше скрещиваются, чем сорта чистолинейные [8].

Для оценки эффективности данного приема нами в 2008 г. проведены скрещивания, в которых сорта и межсортовые гибриды F₁ тритикале опыляли пылью сорта Капылянка (табл. 2).

Таблица 2. Завязываемость (%) семян у отдаленных гибридов озимых тритикале с пшеницей в 2008 г.

№ п/п	Комбинация скрещиваний	Количество опыленных цветков	Количество завязавшихся семян	% завязываемости
1	Aswo×Капылянка	330	1	0,30
2	Дубрава×Капылянка	320	1	0,31
3	(Aswo×Дубрава F ₁)×Капылянка	363	12	<u>3,30</u>
4	Samson×Капылянка	320	0	0,00
5	(Aswo×Samson F ₁)×Капылянка	436	4	<u>0,92</u>

Примечание. Черта под цифрами показывает наиболее высокий процент завязываемости семян. То же для табл. 3.

Как видно из данных табл. 2, число завязавшихся семян оказалось больше, когда межсортовой гибрид тритикале (F_1) опыляли пылью сорта пшеницы, чем при опылении сорта тритикале. Так, процент завязываемости в комбинации скрещивания ($Aswo \times \text{Дубрава } F_1$) \times Капылянка был выше, чем у $Aswo \times \text{Капылянка}$ и $\text{Дубрава} \times \text{Капылянка}$, а в комбинации ($Aswo \times \text{Samson } F_1$) \times Капылянка – выше, чем у $Aswo \times \text{Капылянка}$ и $\text{Samson} \times \text{Капылянка}$. Вероятно, это связано с большей жизнеспособностью гамет у материнских растений-гибридов (гетерозигот), которая может быть объяснена явлением гетерозиса, а также большим разнообразием гамет у гибрида, среди которых могут быть совместимые с пшеницей. Как правило, колосья гибридов более крупные, что немаловажно при проведении кастрации.

Таким образом, установлено, что для получения отдаленных гибридов тритикале с пшеницей предпочтительнее использовать в качестве материнской формы межсортовой гибрид тритикале F_1 . Поэтому для получения большего количества семян отдаленных гибридов в 2009 г. нами были проведены скрещивания, в которых межсортовые гибриды F_1 тритикале опыляли сортами пшеницы Knirps и Капылянка. Сорта озимой пшеницы Капылянка и Knirps были выбраны нами в качестве опылителей по следующим причинам. Сорт Капылянка характеризуется высоким содержанием белка (12,4 %), урожайностью выше стандарта, содержанием клейковины 28,7 %, хорошими мукомольно-хлебопекарными качествами [9]. Сорт Knirps и гибриды, полученные с его участием, не поражаются снежной плесенью. Он обладает хорошей скрещиваемостью с используемыми в наших опытах гибридами тритикале (средний % завязываемости составил 4,47), что, вероятно, связано с наличием в его геноме пшенично-ржаной транслокации [10–12]. Кроме того, сорта Капылянка и Knirps наиболее подходят в качестве отцовских форм по срокам опыления.

Использование в качестве материнской формы гибрида при отдаленных скрещиваниях тритикале с пшеницей позволило получить семена у 10 из 12 комбинаций (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Завязываемость (%) семян при получении отдаленных гибридов тритикале с пшеницей в 2009 г.

№ п/п	Комбинация скрещиваний	Количество опыленных цветков	Количество завязавшихся семян	% завязываемости
1	($Aswo \times \text{Дубрава } F_1$) \times Knirps	204	1	0,49
2	(Гермес \times Дубрава F_1) \times Knirps	516	15	3,10
3	(GWT-1983-91 \times Михась F_1) \times Knirps	300	16	<u>5,33</u>
4	(Samson \times Михась F_1) \times Knirps	476	12	2,52
5	(SV89207 \times Михась F_1) \times Knirps	323	15	4,64
6	(Виктор \times Михась F_1) \times Knirps	308	36	<u>11,69</u>
	Среднее	2127	95	4,47
7	($Aswo \times \text{Дубрава } F_1$) \times Капылянка	304	10	3,29
8	(Гермес \times Дубрава F_1) \times Капылянка	308	0	0
9	(GWT-1983-91 \times Михась F_1) \times Капылянка	304	1	0,33
10	(Samson \times Михась F_1) \times Капылянка	312	0	0
11	(SV89207 \times Михась F_1) \times Капылянка	289	5	1,73
12	(Виктор \times Михась F_1) \times Капылянка	292	1	0,34
	Среднее	1809	17	0,94

Наибольший процент завязываемости наблюдался у гибридов (Виктор \times Михась F_1) \times Knirps и (GWT-1983-91 \times Михась F_1) \times Knirps.

Особую трудность представляет получение беккроссов. По мнению А. Мюнтцинга [13], хромосомы разных видов плохо конъюгируют, или же конъюгация между ними протекает неправильно. Очень часто разные виды отличаются друг от друга в отношении числа и строения хромосом (инверсии, транслокации и т.д.). Причем особенно чувствительна к «несбалансированному» числу хромосом пыльца; зародышевые мешки обычно лучше выносят отклонения от нормального числа хромосом. Поэтому для повышения завязываемости семян беккроссов немаловажное значение имеет направление скрещиваний. Отдаленные гибриды, полученные нами при проведении скрещиваний тритикале с пшеницей, представляют собой анеуплоиды, у которых наблюдается несбалансированность по хромосомам пшеницы и ржи, что сказывается на функциональности их гамет. Представляло интерес изучить завязываемость семян в прямых и обратных комбина-

циях скрещивания сорта тритикале и отдаленного гибрида F₂ тритикале с пшеницей. Поскольку растения F₂ генетически разнородны, для чистоты эксперимента колосья-опылители брали от растений, другие колосья которых были предварительно откастрированы и использованы в скрещиваниях в качестве материнской формы. Для того чтобы исключить фактор влияния цитоплазмы при анализе данных опыта, были использованы гибриды с одинаковой пшеничной цитоплазмой – от тритикале сорта Aswo (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Завязываемость (%) и выполненность семян прямых и обратных гибридов Aswo×(Aswo×Капылянка F₂) BC₁

Комбинация скрещиваний	Количество опыленных цветков	Количество завязавшихся семян	% завязываемости	Масса 1000 зерен, г
(Aswo×Капылянка F ₂)×Aswo BC ₁	792	316	39,9	38,6
Aswo×(Aswo×Капылянка F ₂) BC ₁	814	180	22,1	25,6

Как видно из данных табл. 4, эффективнее осуществляется беккроссирование, при котором отдаленные гибриды F₂ опыляли пыльцой сорта тритикале, чем в обратном скрещивании (39,9 и 22,1 % соответственно). Выполненность зерновок в первом варианте была также выше, о чем свидетельствует показатель «масса 1000 зерен».

Таким образом, полученные нами данные показывают, что анеуплоидное состояние мужского гаметофита в значительно большей степени влияет негативно на завязываемость и выполненность зерновок по сравнению с женским.

Заключение. Для повышения завязываемости семян при гибридизации тритикале и мягкой пшеницы предпочтительнее использовать в качестве материнской формы межсортовые гибриды тритикале F₁ по сравнению с сортами тритикале.

При получении беккроссов BC₁ анеуплоидия женского гаметофита в меньшей степени отрицательно влияет на завязываемость семян по сравнению с анеуплоидией мужского гаметофита. Поэтому для повышения эффективности получения беккроссов BC₁ предлагается использовать в качестве материнской формы межвидовые гибриды, а в качестве опылителей – сорта тритикале.

Литература

1. Кадыров М. А., Лужинский Д. В., Кусякова А. Н. Современные биотехнологии производства растениеводческой продукции в Беларуси: Сб. науч. материалов. Мн., 2005.
2. Мережко А. Ф. // Вестн. с.-х. науки. 1974. № 6. С. 56–68.
3. Lukaszewski A. J. // Proc. 2nd Int. Triticale Symp., CYMMYT, Mexico, D. F., 1991. P. 397–401.
4. Мичурин И. В. Сочинения. Т. 1–4. М., 1948.
5. Банникова В. П. // Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений в Белоруссии. Мн., 1961а. С. 63.
6. Банникова В. П. // Агробиология. 1961б. С. 296.
7. Банникова В. П. Цитозембриология межвидовой несовместимости у растений. Киев, 1975. С. 231.
8. Цицин Н. В. Многолетняя пшеница. М., 1978.
9. Мухаметов Э. М., Казанина М. А., Тупикова Л. К., Макасева О. Н. Технология производства и качество продовольственного зерна. Мн., 1996.
10. Rabinovich S. V. // Euphytica. 1998. Vol. 100. P. 323–340.
11. Beschreibende Sortenliste für Getreide, Mais, Ölfruchte, Leguminosen (groskornig), Hackfruchte (außer Kartoffeln), 1991. Verlag Alfred Strothe.
12. Schlegel R., Vahl U., Müller G. // Annual Wheat Newsletter. 1994. Vol. 40. P. 336.
13. Мюнтцинг А. Генетические исследования. М., 1963. С. 305.

N. M. YERMISHINA, E. M. KREMENEVSKAYA, O. N. GUKASIAN, V. A. LEMESH

IMPROVING SEED-SET IN INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION BETWEEN TRITICALE (TRITICALE THCHERM.) AND WHEAT (TRITICUM AESTIVUM)

Summary

The data on seed set in hybridization between hexaploid triticale and common wheat was presented. It has been shown that it is preferably to use as maternal forms the intervarietal F₁ hybrids of triticale than triticale varieties to improve seed set in producing hybrids between triticale and common wheat. It was revealed that aneuploidy of female gametophyte of interspecies hybrids influenced negatively on seed set in a lesser degree than aneuploidy of male gametophyte. Therefore, it was proposed to use interspecies hybrids as maternal forms and triticale varieties as pollinators to improve the efficacy of BC₁ production.

УДК 57.086.83:633.521

О. А. ОРЛОВСКАЯ, В. И. САКОВИЧ, Е. В. ГУЗЕНКО

**КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА
(LINUM USITATISSIMUM)**

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by

(Поступила в редакцию 01.07.2010)

Введение. В настоящее время биотехнологические методы нашли широкое распространение при создании новых форм растений с заданными свойствами. Одним из таких методов является культивирование пыльников *in vitro*. Явление гаплоидии было открыто А. Бергнером в 1921 г., а в 1922 г. было опубликовано сообщение об экспериментально полученном гаплоидном мутанте дурмана *Datura stramonium* [1]. Это открытие привлекло к себе внимание ученых и в скором времени появилось большое количество новых исследований в этом направлении. Сегодня гаплоиды используются для решения целого ряда задач в селекционно-генетических исследованиях: для получения гомозиготных диплоидных линий в селекции на гетерозис путем удвоения гаплоидов, для получения триплоидов у полиплоидных видов растений, при преодолении межвидовой несовместимости, в декоративном цветоводстве и т.д. Известно, что метод гаплоидии позволяет преодолеть ряд селекционных трудностей. Обычно селекционный процесс – довольно продолжительный и занимает несколько лет, а иногда и десятилетий. Это обусловлено в первую очередь весьма длительным периодом получения гомозиготного материала. В традиционной селекции вначале нужно скрестить особей с желаемыми признаками, затем приходится проводить целый ряд самоопылений для достижения генетической однородности полученных гибридов. Культура пыльников позволяет получать гомозиготные линии за несколько месяцев, а не за несколько поколений, как при использовании стандартных подходов. Кроме того, гаплоидия предоставляет возможность обнаруживать растения с нужными комбинациями признаков уже в первом поколении, поскольку у гаплоидов каждый признак представлен лишь одним аллелем. Известен факт о регистрации сорта ячменя (Mingo) в Канаде, который был создан за 5 лет с момента скрещивания родителей [2]. Гаплоиды в настоящее время используются для создания новых сортов риса, пшеницы, рапса, картофеля и других культур. В последнее время активно развиваются исследования по получению гаплоидов у льна [3–6]. Однако на сегодняшний момент на льне не отработана технология, обеспечивающая возможность получения гаплоидов в достаточно большом количестве от любого генотипа, включенного в селекцию, что ограничивает использование явление гаплоидии в селекции данной культуры.

Цель данного исследования – подбор оптимальных условий культивирования пыльников в условиях *in vitro* сортов льна-долгунца и масличного льна.

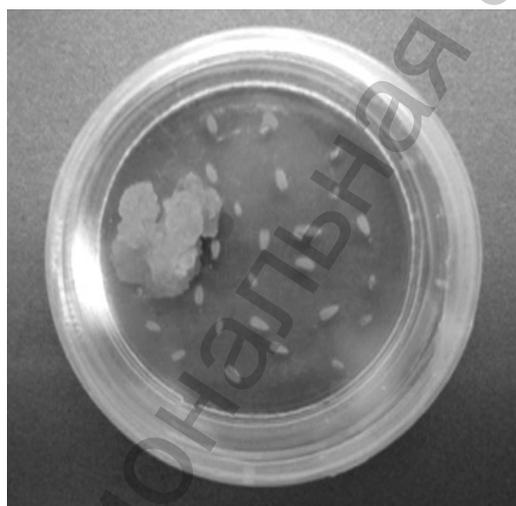
Материалы и методы исследования. Для отработки методики культивирования пыльников *in vitro* использовали 6 сортов льна-долгунца (Прамень, Вита, М 12, Нива, Оршанский 2, К 65) и 5 сортов масличного льна (Ручеек, Лирина, Небесный, Gold Flax, Lola). Донорные растения выращивали в полевых условиях на участке Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Бутоны собирали в период, когда пыльца находилась на одноядерной стадии развития. Стадию развития пыльцы определяли цитологическим методом, окрашивая временные препараты ацетокармином. Срезанные соцветия льна подвергались предобработке пониженной температурой (+5 °С) в течение 12, 24 и 48 ч. В качестве базовой основы мы использовали среды MS и N₆. Для

индукции каллусогенеза пыльники высаживали на твердую питательную среду, содержащую макро- и микросоли среды MS, витамины по Гамборгу, 60 г/л сахарозы и два варианта гормонов: MS 1–1,5 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) и 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП); MS 2–2 мг/л 2,4 Д и 1 мг/л БАП. Также использовали среду N₆ с двумя вариантами гормонов: 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП (N₆-1); 1 мг/л зеатина (N₆-2). Бутоны предварительно стерилизовали 30 с в 70%-ном этаноле, затем 5 мин в растворе диацетида и 3 раза промывали в автоклавированной дистиллированной воде по 10 мин. Чашки с пыльниками помещали в темное место при $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 14 дней, затем переносили в световую камеру с фотопериодом 16 ч день / 8 ч ночь. Всего было высажено 2838 пыльников, из них на среду MS – 1942 шт., на N₆ – 896 шт.

Результаты и их обсуждение. Инициация регенерации в каллусной культуре у многих видов требует особых усилий, поскольку не все генотипы регенерируют с одинаковой способностью [7, 8]. Кроме генотипа, выявлено множество факторов, от которых зависит процесс андрогенеза в культуре *in vitro*. Важнейшие из них – физиологическое состояние донорного растения и экспланта, стадия развития пыльцы, условия выращивания донорных растений (температурный и световой режимы), предобработка цветочных бутонов, стрессовые воздействия на донорные растения и на изолированные пыльники в условиях *in vitro*, условия культивирования пыльников, состав питательных сред и многие другие.

Немаловажную роль в индукции новообразований в культуре изолированных пыльников играет температурный фактор. Для некоторых культур, в частности рапса, он может иметь даже ключевое значение [9]. Важна как температура предобработки бутонов, так и температура культивирования пыльников. Бутоны льна рекомендуют выдерживать при пониженной температуре +5...+7 °С перед посадкой на питательную среду в течение 1–2 сут. Более длительная обработка возможна, но частично приводит к повреждению бутонов. В наших экспериментах изолированные соцветия льна подвергались предобработке пониженной температурой (+5 °С) в течение 12, 24 и 48 ч. После посадки пыльники культивировались при температуре +20...+25 °С. Образование каллуса у изученных генотипов льна происходило только после воздействия холодом на протяжении 48 ч, при предобработке пониженной температурой в течение 12, 24 ч процесса каллусогенеза не наблюдали.

Питательная среда является одним из факторов, оказывающих большое влияние на индуцирование новообразований в культуре *in vitro*. Состав среды должен благоприятствовать переключению пути развития микроспор с обычного на спорофитный. При выборе питательной среды необходимо учитывать, что, кроме неорганических ингредиентов, для образования и роста эмбриоидов необходимы органические вещества, особенно аминокислоты и витамины. Кроме того, важна концентрация углеводов (для регуляции осмотического давления среды), баланс регуляторов роста и прочее. Даже агар может содержать вредные вещества, которые будут оказывать в культуре пыльников ингибирующее действие. Большое значение имеет чистота воды, на которой готовят среду, поскольку ее доля по сравнению с другими компонентами значительно больше. Поэтому для приготовления сред необходимо брать только специальным образом очищенную воду, например бидистиллированную или пропущенную через систему особых фильтров с ионообменными смолами. Для культивирования пыльников льна используют агаризованные среды MS, N₆, N&N, LMA-1.



Каллус в культуре изолированных пыльников у сорта льна-долгунца Прамень

В качестве базовой основы мы использовали среды MS [10] и N₆ [11]. Для индукции каллусогенеза пыльники высаживали на агаризованную питательную среду, содержащую макро- и микросоли среды MS, витамины по Гамборгу, 60 г/л сахарозы и два варианта гормонов: MS 1 – 1,5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП; MS

2–2 мг/л 2,4 Д и 1 мг/л БАП. Также использовали твердую среду N₆ с двумя вариантами гормонов: 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП (N₆-1), 1 мг/л зеатина (N₆-2). На данном этапе эксперимента процесс каллусогенеза отмечен для 4 сортов льна-долгунца (таблица). Наиболее отзывчивым генотипом на культивирование пыльников *in vitro* оказался сорт льна-долгунца Прамень (рисунок), у которого каллус образовался на трех средах из четырех использованных. Сорта Оршанский 2 и К 65 продуцировали каллус только на среде N₆-1. Можно отметить, что данная среда была наиболее эффективной для индукции каллусогенеза большинства изученных генотипов льна-долгунца (таблица). Только у сорта Прамень на среде N₆-1 формировалось меньше каллусов, чем на средах, созданных на основе MS. Наибольшая частота каллусообразования на среде N₆-1 (9,8 %) отмечена для сорта Вита.

Способность к каллусогенезу у сортов льна-долгунца и масличного льна в культуре пыльников *in vitro*

Генотип	Количество высаженных пыльников, шт.				Количество образовавшихся каллусов							
	MS 1	MS 2	N ₆ -1	N ₆ -2	MS 1, шт.	%	MS 2, шт.	%	N ₆ -1, шт.	%	N ₆ -2, шт.	
Прамень	85	118	63	55	3	3,53	3	2,54	1	1,59	–	
Вита	75	54	51	–	1	1,33	–	–	5	9,8	–	
М 12	61	92	35	23	–	–	–	–	–	–	–	
Нива	48	110	23	23	–	–	–	–	–	–	–	
Оршанский 2	104	71	66	27	–	–	–	–	2	3,03	–	
К 65	70	35	27	14	–	–	–	–	2	7,41	–	
Gold Flax	145	182	30	68	–	–	–	–	–	–	–	
Ручеек	80	94	70	34	–	–	–	–	–	–	–	
Лирина	102	139	67	34	–	–	–	–	–	–	–	
Небесный	34	30	39	39	–	–	–	–	–	–	–	
Lola	69	149	75	33	–	–	–	–	–	–	–	

Эффективность каллусогенеза сортов масличного льна была равна нулю, что говорит о необходимости дальнейшей доработки и оптимизации условий регенерации в культуре пыльников льна. Возможно, выращивание растений в естественных условиях не позволяет получать материал, способный формировать гаплоидный каллус или эмбриониды в условиях *in vitro*. Причиной может быть как недостаточная освещенность, так и высокая температура воздуха в период бутонизации донорных растений льна. Рядом ученых обнаружено, что регенерация побегов из пыльников была максимальной, когда растения льна выращивали при 16-часовом дне и температуре 14 °С днем и 8 °С ночью [12]. В литературе также имеются данные, согласно которым при выращивании растений ранней весной число пыльников с новообразованиями было наибольшим, а поздней весной и летом – наименьшим [6]. Все это говорит о положительном влиянии пониженных температур на образование каллуса в культуре пыльников. Кроме того, в Институте натуральных волокон (Польша) и в фирме Агритек (Чехия) изучалось влияние дополнительного внесения удобрений на индуцирование новообразований у льна в культуре пыльников. В этом опыте донорные растения каждые две недели, начиная с фазы быстрого роста, подкармливали питательным раствором, содержащим минеральные вещества питательной среды Sh. **Полученные результаты показали, что дополнительные подкормки увеличивают частоту новообразований у пыльников льна при культивировании *in vitro* [6].**

Заключение. Проведенные исследования выявили, что предобработка бутонов пониженной температурой (+5 °С) в течение 48 ч перед посадкой на питательную среду способствует образованию каллуса при культивировании пыльников льна-долгунца. Наиболее эффективной для индукции каллусогенеза большинства изученных генотипов льна-долгунца оказалась питательная среда N₆ с добавлением 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. В дальнейших исследованиях по получению регенерантов льна в культуре изолированных пыльников необходимо обратить внимание на условия выращивания донорных растений.

Литература

1. Blakeslee A. F., Belling J., Farnham M. E., Bergner A. D. // Science. 1922. Vol. 55. P. 646–647.
2. Картель Н. А., Кильчевский А. В. Биотехнология в растениеводстве. Мн., 2005.
3. Obert B., Dedicova B., Hricova A. et al. // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2004. Vol. 79. P. 233–238.
4. Steiss R., Schuster A., Freidt W. // Industrial Crops Products. 1998. Vol. 7, N 3. P. 303–309.
5. Chen Y., Dribnenki P. // Plant. Cell Rep. 2002. Vol. 21. P. 204–207.
6. Pretova A., Obert B., Bartosova Z. // Protoplasma. 2006. Vol. 228, N 1. P. 107–114.
7. Chen Y., Kenaschuk E. O., Procunier J. D. // Euphytica. 1998. Vol. 102, N 2. P. 183–189.
8. Pugliesi C., Cecconi F. et al. // Plant Breed. 1991. Vol. 106, N 1. P. 114–121.
9. Custers J. B. M., Cordewener J. H. G., Nollen Y. et al. // Plant Cell Rep. 1994. Vol. 13, N 3. P. 267–271.
10. Murashige T., Scoog F. // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, N 4. P. 473–497.
11. Chu C. C. // Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. China, 1978. P. 43–50.
12. Nichterlein K., Umbach H., Friedt W. // Euphytica. 1991. Vol. 58, N 2. P. 157–164.

O. A. ORLOVSKAYA, V. I. SAKOVICH, Ye. V. GUZENKO

CALLUSOGENESIS IN FLAX (*LINUM USITATISSIMUM*)

Summary

The choice of optimum conditions for anther culturing under in vitro conditions was made in flax cultivars, for using a haploidy phenomenon in breeding of this crop.

УДК 636.2.082.22

М. Е. МИХАЙЛОВА, Е. В. БЕЛАЯ

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА *bPit-1* И *bPrl* ДЛЯ ДНК-ТИПИРОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: M.Mikhailova@jgc.bas-net.by

(Поступила в редакцию 08.07.2010)

Введение. Одним из современных направлений селекции является маркер-сопутствующая селекция (marker assisted selection (MAS)), основанная на информации о взаимосвязях молекулярно-генетических полиморфизмов, маркерных точек с данными о их фенотипических проявлениях. Поиск потенциальных генов-кандидатов активно ведется среди генов, белковые продукты которых отвечают за проявление количественных признаков. Редкие полиморфные варианты таких генов, ассоциированные с повышенной продуктивностью животных по тем или иным признакам, рассматриваются в качестве генетических маркеров. В настоящее время в MAS-селекции крупного рогатого скота широко ведутся работы по выявлению полиморфных вариантов генов системы гормона роста, так как они принимают участие в формировании признаков молочной и мясной продуктивности. Однако данные исследования являются фрагментированными, это приводит к тому, что полученные результаты трудно сопоставимы и зачастую противоречат друг другу. Поэтому для более глубокого и обоснованного понимания механизмов формирования признаков молочной продуктивности, мы предприняли попытку комплексного исследования полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада. Нами исследован *HinFI*- и *StuI*-полиморфизм гена гипофизарного фактора-1 *bPit-1* (запускающего экспрессию гена гормона роста) [1, 2] и *RsaI*-полиморфизм гена пролактина, белковый продукт которого является гуморальным регулятором лактации [3]. Исследуемые полиморфные варианты генов обусловлены однонуклеотидными заменами, расположенными в транслируемых областях.

Цель работы – изучение взаимосвязи аллельных вариантов генов соматотропинового каскада (*bPit-1* и *bPrl*) с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы для применения изученных полиморфизмов в качестве генетических маркеров молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования послужила белорусская популяция голштинского скота, так как эта порода является несомненным лидером среди пород молочного направления и активно применяется селекционерами для повышения молочной продуктивности крупного рогатого скота в Республике Беларусь. Материал для исследования – образцы ДНК, выделенные из проб крови коров голштинской породы, предоставленные СПК АК «Снов». Источником информации о молочной продуктивности (удой, жирномолочность, белкомолочность) послужили племенные карты исследуемых животных.

Статистическая оценка проведена с использованием стандартного пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Ink. 1994–2001). При проведении статистического анализа для количественных данных первоначально определяли характер распределения (Shapiro-Wilk`W test). В случае, если в одной из групп распределение было отличным от нормального, количественные признаки оценивали с использованием методов непараметрической статистики для независимых переменных. Данные представлены в виде M_e (25%; 75%), где M_e – медиана признака,

25 %; 75 % – интерквантильный размах признака. Оценка связи генотипа с показателями молочной продуктивности проводилась с помощью непараметрического метода корреляционного анализа «Ранговая корреляция по Кендалу (τ)». Проверялась нулевая статистическая гипотеза об отсутствии связи признаков, т. е. коэффициент корреляции равен нулю [4]. Полученные данные во всех случаях рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

Определение генотипа осуществлялось методом ПЦР ПДРФ (полимеразная цепная реакция-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в табл 1.

Т а б л и ц а 1. Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов *bPit-1* и *bPrl*

Полиморфизм	Условия ПЦР	Последовательности праймеров
<i>bPit-1-HinfI</i> [1]	94° -1 мин; (95° - 45 с; 56° - 60 с; 72° - 60 с) · 35; 72° - 10 мин	<i>HinfI</i> -F: 5'-aaaccatcatctccccttctt-3' <i>HinfI</i> -R: 5'-aatgtacaatgtgcctctgag-3'
<i>bPit-1-StuI</i> [2]	95° - 5 мин; (95° - 45 с; 55° - 45 с; 72° - 45 с) · 35; 72° - 10 мин	<i>StuI</i> -F: 5'caaatggctcttcttctgtgttacaggg-3' <i>StuI</i> -R: 5'-ctttaaactcattggcaaacctttc-3'
<i>bPrl-RsaI</i> [3]	95° - 5 мин; (95° - 30 с; 63° - 30 с; 72° - 30 с) · 30; 72° -10 мин	<i>RsaI</i> -F: 5'-gcctccagaagtcgtttgttttc-3' <i>RsaI</i> -R: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'

Схемы ПДРФ-анализа для каждого из исследуемых полиморфизмов генов *bPit-1* и *bPrl* представлены в табл 2.

Т а б л и ц а 2. Схемы ПДРФ-анализа продуктов амплификации исследуемых полиморфных участков генов *bPit-1* и *bPrl*

Полиморфизм гена	Фермент	Замена нуклеотида / замена аминокислоты	Распознаваемый нуклеотид / аллель	Генотипы и соответствующие длины рестрикционных фрагментов
<i>bPit-1-HinfI</i> , Экзон 6	HinfI	A→G	A / <i>bPit-1-HinfI</i> ^B	<i>Pit-1-HinfI</i> ^{AA} : 451; <i>Pit-1-HinfI</i> ^{BB} : 244+207; <i>Pit-1-HinfI</i> ^{AB} : 451+244+207
<i>bPit-1-StuI</i> , Экзон 2	Stu I	C→A /Pro→His	C / <i>bPit-1-StuI</i> ^C	<i>Pit-1-StuI</i> ^{AA} : 234; <i>Pit-1-StuI</i> ^{CC} : 197+37; <i>Pit-1-StuI</i> ^{AC} : 197+37+234
<i>bPrl-RsaI</i> , Экзон 4	RsaI	A→G	A / <i>bPrl-RsaI</i> ^B	<i>Prl-RsaI</i> ^{AA} : 156; <i>Prl-RsaI</i> ^{BB} : 82+74; <i>Prl-RsaI</i> ^{AB} : 156+82+74

Результаты и их обсуждение. В результате ДНК-типирования коров голштинской породы по *HinfI*-полиморфизму гена гипофизарного фактора роста-1 были выявлены животные с генотипами *bPit-1-HinfI*^{AA}, *bPit-1-HinfI*^{AB} и *bPit-1-HinfI*^{BB} (наиболее распространен). Данные по исследованию взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-HinfI* с признаками молочной продуктивности представлены в табл 3.

Т а б л и ц а 3. Анализ взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-HinfI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы М_с (25%; 75%)

Генотип	<i>bPit-1-HinfI</i> ^{AA}	<i>bPit-1-HinfI</i> ^{AB}	<i>bPit-1-HinfI</i> ^{BB}	Корреляционный анализ по Кендалу	
				R	P*
Выборка, n	5	40	73		
Удой, кг	9463 (9118; 10408)	10004 (9318; 10895)	10258 (9525; 11226)	0,11	0,07
Жирномолочность, кг	361 (356; 363)	363 (336; 390)	374 (345; 406)	0,13	0,03
Белковомолочность, кг	296 (296; 311)	311 (281; 333)	316 (297; 339)	0,13	0,03

*Полученные данные рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

Нами выявлено, что аллель *bPit-1-HinfI*^B у коров голштинской породы положительно ассоциирован со всеми тремя исследуемыми параметрами продуктивности: удой, жирномолочность и белковомолочность. В группе животных с генотипом *bPit-1-HinfI*^{BB} по всем трем исследуе-

мым признакам наблюдается наибольшее срединное значение показателя, в то время как для группы животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* отмечено наименьшее значение медианы. Статистически значимая положительная корреляция генотипа *bPit-1-HinFI^{BB}* отмечена по признакам белковомолочности и жирномолочности. Ранее, в работе R. Renaville et al. показано, что аллель *bPit-1-HinFI^A* ассоциирован с повышенной продуктивностью молока и более высоким содержанием молочного белка у животных голштино-фризской породы [1]. L. Zwierzchowski et al. в своем исследовании подтвердили положительную ассоциацию *bPit-1-HinFI^A* аллеля с продуктивностью молока и содержанием молочного жира при исследовании польского чернопестрого скота [5]. Так как данный полиморфизм не сопровождается аминокислотной заменой в структуре белкового продукта, можно предположить, что он не является непосредственной причиной отмеченных фенотипических эффектов на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота. Вероятно, на молочную продуктивность влияет другой функциональный локус, который у представителей разных пород может быть расположен ближе или дальше от локуса *bPit-1-HinFI* [6]. В таком случае привлечение данного полиморфизма в качестве генетического маркера признаков молочной продуктивности потребует дополнительных исследований по каждой породе, участвующей в селекционных программах.

Данные по исследованию взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-StuI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы представлены в табл. 4. В результате исследования *StuI*-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста-1 были выявлены животные с генотипами *bPit-1-StuI^{AA}*, *bPit-1-StuI^{AC}* и *bPit-1-StuI^{CC}* (наиболее распространен).

Т а б л и ц а 4. Анализ взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPit-1-StuI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы М_с (25 %; 75 %)

Генотип	<i>bPit-1-StuI^{CC}</i>	<i>bPit-1-StuI^{AC}</i>	<i>bPit-1-StuI^{AA**}</i>	Корреляционный анализ по Кендалу	
				R	P*
Выборка, n	90	27	1		
Удой, кг	10193 (9480; 10985)	10217 (9159; 11343)	9176	0,02	0,78
Жирномолочность, кг	367 (344; 395)	363 (338; 403)	380	- 0,00	0,88
Белковомолочность, кг	312 (293; 334)	319 (283; 349)	271	0,03	0,57

* Данные рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

** Генотип не был включен в корреляционный анализ.

Получены данные о том, что животные с генотипом *bPit-1-StuI^{AC}* характеризуются более высокими показателями удоя и белковомолочности. Коровы с генотипом *bPit-1-StuI^{CC}* обладали более высоким уровнем жирномолочности. По данным W. Huang et al., изучавших этот полиморфизм на популяции северно-американских коров голштинской породы, отмечено, что носители редкого генотипа *bPit-1-StuI^{AA}* характеризуются как более продолжительным периодом лактации, так и более высокими показателями общей молочной продуктивности [2]. Несмотря на то что выявленные нами тенденции не подтверждаются результатами корреляционного анализа, данный полиморфизм требует дальнейшего изучения, так как он сопряжен с изменением аминокислотной последовательности белка.

Результаты исследования влияния *RsaI*-полиморфных вариантов гена пролактина *bPrl* на признаки молочной продуктивности представлены в табл 5.

Т а б л и ц а 5. Анализ взаимосвязи генотипа по полиморфизму *bPrl-RsaI* с признаками молочной продуктивности у коров голштинской породы М_с (25 %; 75 %)

Генотип	<i>bPrl-RsaI^{BB**}</i>	<i>bPrl-RsaI^{AB}</i>	<i>bPrl-RsaI^{AA}</i>	Корреляционный анализ по Кендалу	
				R	P*
Выборка, n	1	24	93		
Удой, кг	10533	10072 (9310; 11202)	10216 (9347; 11063)	0,01	0,80
Жирномолочность, кг	370	363 (351; 391)	367 (339; 397)	0,01	0,79
Белковомолочность, кг	306	311 (293; 337)	314 (292; 335)	0,00	0,96

* Данные рассматривались как статистически значимые при $P < 0,05$.

** Генотип не был включен в корреляционный анализ.

В результате ДНК-типирования исследуемых коров по RsaI-полиморфизму гена пролактина были выявлены животные с генотипами $bPrl-RsaI^{BB}$, $bPrl-RsaI^{AB}$ и $bPrl-RsaI^{AA}$ (наиболее распространен). Редкий генотип $bPrl-RsaI^{BB}$ обнаружен у одного животного. Поэтому в ходе корреляционного анализа исследовались только животные с генотипами $bPrl-RsaI^{AB}$ и $bPrl-RsaI^{AA}$. Нами отмечено, что по всем трем исследуемым признакам молочной продуктивности (удой, жирномолочность и белковомолочность) более высокие показатели характерны для коров с генотипом $bPrl-RsaI^{AA}$ (табл. 5). По данным P. Brum et al., у коров черно-пестрой породы польской селекции аллель $bPrl-RsaI^A$ ассоциирован с более высокой молочной продуктивностью [3]. По данным других авторов для черно-пестрой породы была выявлена ассоциация аллеля $Prl-RsaI^B$ с высоким показателем процентного содержания молочного жира. У красно-пестрой породы аллель $Prl-RsaI^B$ был ассоциирован с более высокой общей продуктивностью молока, жира и молочного протеина [7]. В данном случае, как и в случае HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста ($bPit-1$), однонуклеотидная замена не сопровождается изменением аминокислотной последовательности белка. В этом случае также отмечаются противоречия фенотипических эффектов RsaI-полиморфизма гена пролактина у представителей разных пород. Эти факты позволяют предположить, что сам по себе RsaI-полиморфизм гена пролактина, так же как и в случае HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста ($bPit-1$), является всего лишь генетическим маркером, связанным с другими, недостаточно изученными факторами. Поэтому необходимо проведение предварительного анализа ассоциации RsaI-полиморфизма в каждой конкретной популяции крупного рогатого скота перед применением его в селекционных программах.

Заключение. Исследовано влияние полиморфных вариантов гена $bPit-1$ гипофизарного фактора роста-1 (HinFI- и StuI-полиморфизм) и гена $bPrl$ пролактина (RsaI-полиморфизм) на признаки молочной продуктивности (удой, жирномолочность и белковомолочность) у коров голштинской породы. По результатам исследования HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста $bPit-1$ в качестве предпочтительного по влиянию на такие признаки молочной продуктивности, как удой, жирномолочность и белковомолочность можно отметить аллель $bPit-1-HinFI^B$. Статистически значимая положительная корреляция генотипа $bPit-1-HinFI^{BB}$ отмечена по признакам белковомолочности и жирномолочности. По результатам нашего исследования взаимосвязи полиморфизма $bPit-1-StuI$ с молочной продуктивностью предпочтительным является редкий аллель $bPit-1-StuI^A$. Животные с генотипом $bPit-1-StuI^{AC}$ характеризуются более высокими показателями удоя и белковомолочности. При изучении влияния на признаки молочной продуктивности полиморфизма $bPrl-RsaI$ отмечено, что по всем трем исследуемым признакам (удой, жирномолочность и белковомолочность) более высокие срединные значения показателей характерны для коров с генотипом $bPrl-RsaI^{AA}$, что позволяет определить в качестве предпочтительного аллель $bPrl-RsaI^A$.

Наибольший практический интерес в маркер-сопутствующей селекции представляют собой полиморфизмы, аллельные варианты которых одинаково положительно или одинаково отрицательно ассоциированы со всеми тремя исследуемыми признаками молочной продуктивности: общим удоем, жирномолочностью и белковомолочностью. По результатам нашего исследования, в качестве таких универсальных маркеров, рекомендуемых для раннего типирования признаков молочной продуктивности коров голштинской породы, разводимых на территории Республики Беларусь, можно рассматривать HinFI-полиморфизм гена гипофизарного фактора роста $bPit-1$ и RsaI-полиморфизм гена пролактина $bPrl$.

Литература

1. Renaville R., Gengler N., Vrech A. // J Dairy Sci. 1997. Vol. 80, N 12. P. 3431–3438.
2. Huang W., Maltecca C., Khatib H. // Animal Genetics. 2008. Vol. 39. P. 554–557.
3. Brum P., Kaminski S., Wojcik E. // J. Appl. Genet 2005, Vol. 45, N 2. P.179–185.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2002.

5. Z wierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N. et al. // Anim. Sci. Pap. Rep. 2002. Vol. 20. P. 213–227.
6. Edriss V., Edriss V., Rahmani R. // Biotechnology. 2008. Vol. 7, N 2. P. 209–212.
7. Alipanah M., Kalashnikova L. A., Rodionov G. V. // Archivos Zootec. 2008. Vol. 57, N 218. P. 131–138.

M. E. MIKHAILOVA, Ye. V. BELAYA

DNA-TYPING OF MILK PRODUCTIVITY TRAITS IN HOLSTEIN CATTLE FOR POLYMORPHIC GENE VARIANTS OF SOMATOTROPIN CASCADE *bPit-1* AND *bPr1*

Summary

Polymorphisms of pituitary growth factor gene *bPit-1*: *bPit-1-HinFI*, *bPit-1-StuI* and those of prolactin gene *bPr1-RsaI* were tested in 118. Statistically significant positive correlation of the genotype *bPit-1-HinFI*^{BB}, to the protein and fat content in milk was revealed. The data were obtained that animals with the genotype *bPit-1-StuI*^{AC} are characterized by high values of milk yield and protein content. It was observed that as to three tested traits of milk productivity, higher values were characteristic of cows with the genotype *bPr1-RsaI*^{AA}.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.1/2:612.017:504.05

Е. В. ЖОРНИК, Л. А. БАРАНОВА, В. П. ЕМЕЛЬЯНОВА, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ

**АКТИВАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
И НАРУШЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА
ПОД ВЛИЯНИЕМ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, r344@ibp.org.by

(Поступила в редакцию 25.11.2010)

Введение. Характерной особенностью ответов животных клеток на действие многочисленных стрессовых воздействий является избыточное образование в них активных форм кислорода (АФК), обладающих высокой реакционной способностью, что приводит к окислительным повреждениям практически всех компонентов клетки. Образующиеся при действии экзогенных факторов высокие концентрации АФК способны инициировать различные деструктивные процессы в клетке: перекисное окисление липидов (ПОЛ), фрагментацию ДНК, деградацию РНК и белков. В условиях нормы свободные радикалы не вызывают дезорганизацию биологических мембран и других компонентов цитозоля клеток, поскольку минимальный уровень их содержания в клетке адекватно нивелируется биоантиоксидантами [1, 2].

Защита от цитотоксического действия свободных радикалов осуществляется на всех уровнях организации биосистем, прежде всего за счет ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту (АОЗ), таких как супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, а также за счет восстановленного глутатиона – донора SH–групп. Однако в условиях избыточного образования свободных радикалов под влиянием различных физико-химических факторов антиоксидантная система может не справиться с данной задачей. В этих условиях биологические молекулы становятся мишенями АФК, причем объектами «атаки» могут быть биомолекулы различной химической природы, прежде всего липиды, а затем белки и нуклеиновые кислоты [3].

Последнее десятилетие характеризуется стремительным развитием нанотехнологий. Материалы, созданные на основе наночастиц, обладают особыми свойствами и значительными преимуществами. При этом очевиден тот факт, что глобальный технологический прогресс, связываемый с развитием нанотехнологий, несет в себе и большие потенциальные опасности, оценки размеров которых столь же неясны и противоречивы, как и перспективы.

Согласно имеющимся на сегодняшний день представлениям, доминирующим механизмом токсичности наночастиц является окислительный стресс, который играет ключевую роль в реализации негативных воздействий различных изученных патогенных частиц и волокон [4]. Углеродные нанотрубки, как было показано нами ранее, также вызывают развитие окислительного стресса [5].

Цель работы – изучить влияние многостенных углеродных нанотрубок на систему АОЗ в лимфоцитах человека, а также оценить способность углеродных нанотрубок (УНТ) оказывать влияние на мембрану клеток и индуцировать ПОЛ.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали лимфоциты периферической крови доноров и искусственно синтезированные многостенные УНТ длиной 0,5–30 мкм.

Получение лимфоцитов проводили согласно стандартной методике выделения мононуклеаров периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина [6].

Для определения диеновых конъюгатов (ДК) к 0,2 мл образца добавляли 4 мл гептана, 2 мл изопропанола и энергично встряхивали. Затем добавляли 1 мл HCl, pH 2,0 и повторно встряхивали. Через 20–30 мин отбирали верхнюю фракцию, содержащую липиды, и измеряли ее оптическую плотность при длине волны 233 нм [7].

Для определения уровня малонового диальдегида (МДА) 100 мкл суспензии лимфоцитов добавили к 0,9 мл буфера TBS, содержащего углеродные нанотрубки. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, после чего добавили 1 мл водного раствора 0,5%-ной тиобарбитуровой кислоты, 10 % ТХУ и 20 % SDS в соотношении 10:9:1. Образцы поместили в кипящую воду на 15 мин. Реакцию останавливали путем помещения образцов на лед и охлаждения до 4 °С. Поглощение измеряли колориметрически при длине волны 540 нм [8].

Для определения супероксиддисмутазы использовали непрямой спектрофотометрический метод В. А.Костюка [9], основанный на использовании реакции супероксидзависимого окисления кверцитина, протекающей в щелочной среде в присутствии тетраметилэтилендиамина.

Активность каталазы определяли с помощью метода, основанного на способности пероксида водорода к образованию окрашенного комплекса с солями молибдата аммония [10].

Результаты и их обсуждение. Ранее было показано, что многостенные УНТ, имеющие в своем составе примеси металлов переменной валентности, способны индуцировать образование АФК в лимфоцитах человека [5]. АФК вступают во взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК). В результате их окисления образуются гидропероксиды (ДК), которые затем метаболизируются во вторичные (МДА) и третичные продукты ПОЛ.

Основным процессом, приводящим к деструкции мембран, является свободнорадикальное окисление липидов. В зонах наибольшей активности перекисного окисления мембранных фосфолипидов возникают каналы пассивной проницаемости, через которые свободно проходят ионы и вода. ДК, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты.

Определение ДК имеет значительное преимущество для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления. Известно, что ДК имеет характерный максимум поглощения в УФ части спектра при длине волны 232–234 нм, на этом основано определение данного продукта ПОЛ. Было показано, что УНТ в концентрации 100 мкг/мл вызывают увеличение уровня ДК на 31 % по сравнению с контрольными образцами (рис. 1).

Дальнейшими продуктами ПОЛ являются альдегиды и кетоны (МДА и др.). В экспериментах по изучению образования МДА использовали культуру клеток лимфоцитов (10^6 /мл), подверженных воздействию искусственных углеродных нанотрубок в концентрации 100 мкг/мл. Суспензия углеродных нанотрубок предварительно была обработана ультразвуком в течение 10 мин. Было показано, что при инкубации лимфоцитов с УНТ в течение 30 мин наблюдается незначительное увеличение уровня МДА по сравнению с контролем, которое, однако, не является статистически достоверным. В дальнейших экспериментах время инкубации было увеличено до 1 ч. Повышение уровня МДА при этом носило статистически достоверный характер (контроль $1,39 \pm 0,10$, эксперимент $2,42 \pm 0,16$ нмоль/мг белка) (рис. 2).

Повреждающее действие ПОЛ обусловлено, по-видимому, двумя механизмами [11]. Во-первых, изменяются структурно-функциональные свойства мембран в результате потери ПНЖК и накопления окисленных липидов. Во-вторых, образуются низкомолекулярные, токсичные продукты окисления мембранных липидов. Среди этих соединений особое значение придается на-

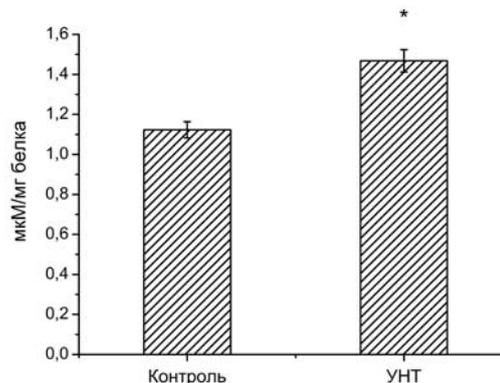


Рис. 1. Образование диеновых конъюгатов в лимфоцитах, подверженных действию УНТ в течение 1 ч. Звездочка (*) – статистически значимое различие по сравнению с контролем ($P < 0,05$). То же для рис. 2

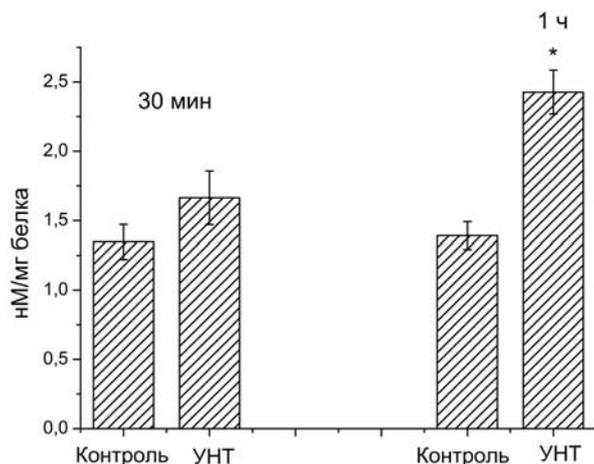


Рис. 2. Уровень малонового диальдегида в лимфоцитах, подверженных действию УНТ в течение 30 мин и 1 ч

сыщенным и ненасыщенным альдегидам. Так, МДА, один из конечных продуктов ПОЛ, образует внутри- и межмолекулярные перекрестные сшивки, в результате происходит инактивация ферментов, в том числе и не имеющих сульфгидрильных групп, сшивание белков и нуклеиновых кислот.

Регуляция свободнорадикального окисления обеспечивается в клетке системой АОЗ. Эукариотические клетки содержат множество первичных и вторичных механизмов защиты от ПОЛ и других негативных последствий окислительного стресса [12]. Многокомпонентная антиоксидантная система выполняет защитную функцию, надежно подавляя ПОЛ на всех его этапах. Ослабление любого ее звена активизирует ПОЛ. Первичная линия «обороны» в основном носит профилактический характер, в то время как вторичная линия защиты заключается в удалении/репарации возникших повреждений. Первичная защита клеток представляет собой инактивацию АФК или окислительно-восстановительных ионов металлов до того как произойдет активация процессов ПОЛ.

В норме существует определенное соотношение между эффективностью ПОЛ и антиоксидантной системы. Нарушения в системе АОЗ могут быть связаны с недостаточной активностью одного или нескольких ферментов, что приводит к усилению процессов ПОЛ в организме и нарушению стабильности цитомембран.

К ферментам, участвующим в первичной цитопротекции, относят **Cu/Zn-зависимую (цитозольную)** и **Mg-зависимую (митохондриальную)** супероксиддисмутазы, цитозольную и митохондриальную глутатионпероксидазы, каталазу. В связи с тем что супероксиддисмутаза является ключевым ферментом антиоксидантной системы организма человека, защищающим клетки от токсического действия свободных радикалов, целью работы явилось выяснение влияния многостенных УНТ на активность СОД в лимфоцитах человека.

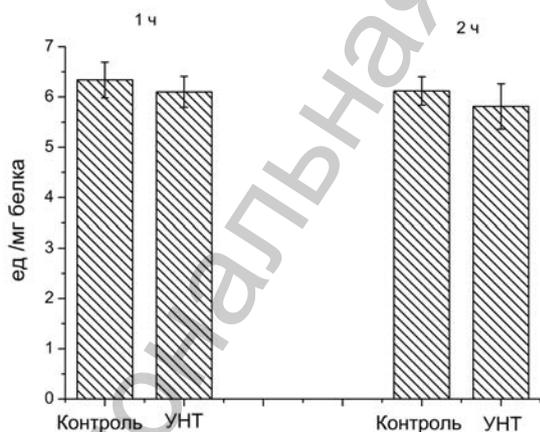


Рис. 3. Активность супероксиддисмутазы в лимфоцитах, подверженных действию УНТ в течение 1 ч, 2 ч

Согласно полученным данным, инкубация лимфоцитов с многостенными УНТ в концентрации 100 мкг/мл в течение 1 и 2 ч приводила к незначительному снижению активности фермента, которое, однако, не носило статистически достоверного характера (рис. 3).

Еще одним ферментом АОЗ организма является каталаза. Накапливающийся в процессе ПОЛ

пероксид водорода обезвреживается с помощью данного фермента, присутствующего во всех тканях организма. В экспериментах по исследованию активности каталазы в образцах лимфоцитов человека, подверженных действию многостенных УНТ в концентрации 100 мкг/мл, было показано снижение активности данной ферментативной системы, что свидетельствует о нарушении защитного механизма клетки.

Система антиоксидантов, тормозящих ПОЛ, в норме успешно справляется с «перекисной опасностью», но нарушение какого-либо звена в этой защитной системе ведет к повреждению мембран клеток крови. Полученные результаты о влиянии УНТ на систему АОЗ свидетельствуют о том, что при действии УНТ на культуру лимфоцитов наблюдается нарушение функционирования антиоксидантной системы организма. Обнаруживаемое при этом снижение уровня активности каталазы наряду со статистически недостоверным уменьшением содержания СОД в лимфоцитах позволяет сделать вывод о том, что в клетках наблюдается избыточное накопление АФК, в частности пероксида водорода, что приводит к повреждению мембранных компонентов клетки и к активации процессов ПОЛ. Таким образом, при действии многостенных УНТ в концентрации 100 мкг/мл на культуру лимфоцитов на фоне интенсификации процессов ПОЛ наблюдается снижение активности АОЗ.

Заключение. Образующиеся под влиянием многостенных углеродных нанотрубок активные формы кислорода способны вовлекаться в последующие метаболические процессы, в результате чего инициируются процессы перекисного окисления липидов. В ходе экспериментов по изучению влияния углеродных нанотрубок, содержащих примеси металлов переменной валентности, были получены данные, свидетельствующие об увеличении содержания продуктов перекисного окисления липидов в лимфоцитах человека, а также показано нарушение функционирования защитных систем клетки, что проявляется в подавлении активности ферментов антиоксидантной защиты.

Литература

1. Frei B., Gaziano J. M. // J. Lipid Res. 1993. N 34. С. 2135–2145.
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. // Lancet. 1984. N 1. С. 1396–1398.
3. Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. // Успехи совр. биол. 1993. Т. 113, № 4. С. 456–469.
4. Donaldson K., Tran C. L. // Inhal. Toxicol. 2002. N 14. С. 5–27.
5. Жорник Е. В., Баранова Л. А., Емельянова В. П., Волотовский И. Д. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2010. № 3. С. 58–62.
6. Beckman K. B., Ames A. M. // J. Biol. Chem. 1997. N 272. С. 19633–19636.
7. Костюк В. А., Потапович И. А., Лунец Е. Ф. // Вопр. мед. химии. 1984. № 30. С. 125–127.
8. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии. М., 1977. С. 66–68.
9. Костюк В. А., Потапович И. А., Ковалева Ж. В. // Вопросы химии. 1990. Т. 36, № 2. С. 88–91.
10. Королук М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
11. Dianzani M. U. // Boll. Soc. It. Biol. Sper. 1992. N 68. С. 491–511.
12. Girotti A. W. // Journal of Lipid Research. 1998. N 39. С. 1529.

E. V. ZHORNIK, L. A. BARANOVA, V. P. EMELYANOVA, I. D. VOLOTOVSKY

ACTIVATION OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT PROTECTION VIOLATION IN HUMAN LYMPHOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF CARBON NANOTUBES

Summary

The ability of multiwall carbon nanotubes to break the antioxidant protection in human lymphocytes, as well as the ability of CNTs to influence the cell membrane and induce lipid peroxidation (LPO) was investigated to assess the potential risks of using the artificial nanostructures. The experimental data demonstrate the ability of multiwall carbon nanotubes containing metal impurities of variable valence to increase of LPO products in human lymphocytes, but also shows the disruption of the functioning of cell protective systems, which results in suppressing of the activity of antioxidant enzymes.

УДК 581.13:577.15

Р. А. ЩЕРБАКОВ, И. Н. ДОМАНСКАЯ, М. С. РАДЮК, Н. В. ШАЛЫГО

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТОЧНОГО ОВОДНЕНИЯ НА РОСТ, НАКОПЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ЗАЩИТНУЮ СИСТЕМУ ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ (HORDEUM VULGARE)

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail:domanin07@mail.ru

(Поступила в редакцию 26.11.2009)

Введение. Избыточное увлажнение растений происходит, когда почва перенасыщается водой в результате обильных и продолжительных осадков или при избыточном поливе, а также в низинах и при неглубоком залегании грунтовых вод. Переувлажнение почвы приводит к дефициту кислорода в корнях растений, что связано с его низкой скоростью диффузии и ограниченной растворимостью в воде [1]. Вода, окружающая корни, постепенно становится анаэробной, особенно в течение ночи [2]. Снижение содержания кислорода ниже оптимального уровня – гипоксия – наблюдается при кратковременном переувлажнении, когда корни оказываются под поверхностью воды, а листья остаются на воздухе. При более длительном нахождении корней ниже уровня воды или при полном погружении растений в воду поступление кислорода полностью прекращается и развивается аноксия [3]. Гипоксия, так же как и аноксия, влияет на уровень электронного транспорта в процессе дыхания. Отсутствие акцептора электронов приводит к быстрому насыщению окислительно-восстановительной цепи, накоплению НАД(Ф)Н и снижению образования АТФ [4]. Так же, как и при других видах стресса, при гипоксии генерируются активные формы кислорода (АФК) [5]. В тканях, подвергнутых гипоксии, образование АФК связано с функционированием митохондрий [3].

Защита растения от АФК находится под контролем антиоксидантной системы, к важнейшим низкомолекулярным компонентам которой относят аскорбат, глутатион, токоферолы, каротиноиды и фенольные соединения (ФС). Изменения в содержании аскорбата, глутатиона и ФС наиболее информативно характеризуют состояние антиоксидантной защиты растительной клетки. Аскорбат является субстратом аскорбат-глутатионового цикла, в котором с участием фермента аскорбатпероксидазы происходит разрушение H_2O_2 [6]. Аскорбат может участвовать в неферментативной детоксикации супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) и гидроксильного радикала ($\cdot OH$). Он также регенерирует радикальные формы каротиноидов и токоферолов [7]. Глутатион может существовать как в восстановленной форме (GSH), так и в окисленной (GSSG). GSH выполняет важную роль в антиоксидантной защите, при этом он превращается в GSSG [7]. Показано, что концентрация GSH в клетках растений может составлять 10 мМ и достигает 90–99 % от общего пула GSH+GSSG. GSH участвует в неферментативной детоксикации ряда АФК, с его участием поддерживается пул восстановленного аскорбата [7]. ФС представляют собой вторичные метаболиты растительной клетки, многие из которых обладают антиоксидантной активностью и защищают клетку от окислительного повреждения, вызываемого действием АФК на биомолекулы [8]. Ранее было показано, что стресс, вызванный низкими температурами, индуцирует накопление ФС в растениях ячменя [9, 10], однако влияние избыточного оводнения на содержание ФС в листьях ячменя до сих пор не исследовалось.

Значительную роль в защите растительной клетки от действия стрессоров разной природы играют стрессовые белки: белки теплового шока (БТШ) и белки-дегидрины (ДГ). БТШ класси-

фицируются по молекулярной массе, выраженной в килодальтонах. БТШ70 – один из важнейших стрессовых белков, выполняющий функцию шаперона в условиях стресса и в метаболизме белков [11]. Он связывает и освобождает развернутые или денатурированные белки, способствуя их сворачиванию и ренатурации. БТШ70 предотвращает агрегацию денатурированных белков и осуществляет рефолдинг белков, денатурированных в условиях стресса. Он также участвует в процессах трансляции, транслокации и в функции рецепции стероидов [11]. Белки ДГ препятствуют образованию льда в клетках [12]. Механизм защитного действия ДГ связан с их взаимодействием с гидрофобными участками денатурированных белков по типу шаперонов. Они обеспечивают формирование гидрофобной оболочки вокруг экспонированных гидрофобных поверхностей клеточных компонентов, что предотвращает коагуляцию макромолекул и способствует их ренатурации [12]. Ранее было показано, что синтез ДГ индуцируется при обезвоживании, засолении, а также при низких температурах [13].

Цель настоящей работы состоит в изучении влияния избыточного оводнения на рост проростков ячменя, генерацию в них АФК и ответа антиоксидантной системы на действие стресса, включающее анализ низкомолекулярных антиоксидантов и стрессовых белков.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили листья зеленых проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Гонар, выращенные при температуре 22 °С в режиме 10 ч темноты и 14 ч света (люминесцентные лампы ЛД-40, 130 $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Растения выращивали на водопроводной воде в специальных кюветах, имеющих отверстия для корней. Для моделирования избыточного увлажнения (оводнения) 5-дневные проростки ячменя заливали водой так, чтобы под водой были корни и корневая шейка (гипокотиль) на 3 сут (стрессовый период), после чего растения возвращали в первоначальные условия выращивания (постстрессовый период). В пробы отбирали отрезки первого листа длиной 6 см. Отбор проб производили до начала действия стрессового фактора, а также в течение стрессового и постстрессового периодов.

Определение АФК. Растительный материал (навеска – 0,5 г) растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте до порошка, приливали 4 мл 0,2 н HClO_4 , гомогенизировали, гомогенат количественно переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 7000 g. Для нейтрализации супернатанта к 500 мкл последнего добавляли 37 мкл 4 М КОН и центрифугировали 5 мин при 13 000 g. Для определения АФК к 950 мкл 0,15 М Трис-НСI буфера (рН 7,5) последовательно добавляли 25 мкл нейтрализованного супернатанта и 25 мкл 0,5 мМ дихлорофлуоресцеин-диацетата. Контролем служила проба, состоящая из 975 мкл 0,15 М Трис-НСI буфера и 25 мкл 0,5 мМ дихлорофлуоресцеин-диацетата. Пробы инкубировали 20 мин в термощейкере (Termomixer comfort, Польша), после чего регистрировали спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 496$ нм, $\lambda_{\text{регист}} = 524$ нм), используя спектрофлуориметр (Solar, Беларусь). Содержание АФК рассчитывали как количество образовавшегося ДХФ в $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ сырой массы листьев.

Окисленный и восстановленный глутатион определяли с помощью модифицированного в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси спектрофлуориметрического метода, подробно описанного в работе [14]. Флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре (Solar, Беларусь).

Определение аскорбата. Общий и восстановленный аскорбат определяли с помощью спектрофотометрического метода по [15]. Для этого 0,5 г растительного материала растирали на холоду в 5 мл 5 % сульфосалициловой кислоты и центрифугировали 10 мин при 13 000 g. К 1,5 мл супернатанта приливали 1,5 мл К-фосфатного буфера (рН 7,4) и 90 мкл 5 М раствора NaOH так, чтобы довести рН раствора до 5,5–6,5. Для определения общего аскорбата к 200 мкл нейтрализованного экстракта добавляли 50 мкл 10 мМ раствора дитиотрейтола. После инкубации смеси при комнатной температуре в течение 15 мин добавляли 50 мкл 40 мМ раствора N-этилмалеимида. Для определения восстановленного аскорбата к 200 мкл нейтрализованного экстракта приливали 100 мкл дистиллированной воды, после чего к образцам, предназначенным для определения как общего, так и восстановленного аскорбата, последовательно приливали (тщательно перемешивая) по 200 мкл 10 % ТХУ, 44 % фосфорной кислоты и 4 % 2,2'-дипиридила, а также 100 мкл 3%-ного раствора FeCl_3 . После 60 мин инкубации при 30 °С пробы спектрофотометрировали при 525 нм против контрольной пробы, используя спектрофотометр Uvikon-931 (Kontron instruments,

Германия). Контрольная проба вместо растительного экстракта содержала равное количество воды. От оптической плотности к концентрации аскорбата переходили используя коэффициент молярной экстинкции $8,7 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [15].

Определение ФС. Навеску 0,5 г растительного материала экстрагировали 3 раза по 5 мл горячей воды ($90 \text{ }^\circ\text{C}$), каждый раз центрифугируя 10 мин при 7000 g. Последовательно полученные супернатанты объединяли. Для спектрофотометрического определения ФС к 250 мкл супернатанта приливали 1500 мкл воды и 125 мкл реактива Фолина. Через 3 мин приливали 250 мкл насыщенного раствора Na_2CO_3 и 375 мкл воды. После 1 ч инкубации измеряли оптическую плотность при 725 нм на спектрофотометре Uvikon-931 (Kontron instruments, Германия).

Гель-электрофорез и иммуноблотинг. Для проведения денатурирующего гель-электрофореза 0,5 г отрезков листьев растирали в 3,0 мл буфера для экстракции, содержащего 56 мМ ДТТ, 56 мМ Na_2CO_3 , 2 мМ ЭДТА, 12 % сахарозы и 2 % SDS-Na. Полученный гомогенат нагревали при $75 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 g. Содержание белка в супернатанте определяли по Брэдфорд [16]. Форез проводили используя 12%-ный разделяющий и 4%-ный концентрирующий гель при напряжении 110 В до вхождения белков в разделяющий гель, после чего напряжение увеличивали до 200 В и продолжали форез еще в течение 1 ч. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану размером 6×9 см проводили используя прибор для полусухого переноса TE 77 фирмы Amersham Biosciences при токе 216 мА в течение 2 ч. Для переноса использовали анодный буфер, содержащий 39 мМ глицина, 48 мМ Триса, 0,0375 % SDS-Na и 20 % метанола. После окончания переноса нитроцеллюлозную мембрану извлекали, прокрашивали в растворе Ponceau Rot в течение 1 мин, подсушивали с помощью фильтровальной бумаги и отмечали положение белковых маркеров. Для проведения иммуноблотинга антитела растворяли в среде, содержащей 10 мМ Трис-HCl pH 7,5 и 0,15 М NaCl (TBS) с 4 % сухого молока. Прокрашенную нитроцеллюлозную мембрану сначала инкубировали в течение 1 ч в 50 мл TBS с 4 % сухого молока, затем в течение 1 ч в среде, содержащей первичные антитела. Далее мембрану промывали раствором TBS, содержащим 0,005 % Tween 20 (TBST) в течение 30 мин. Раствор TBST меняли 2–3 раза. Промытую мембрану инкубировали в среде, содержащей вторичные антитела, в течение 1 ч. Затем мембрану промывали TBST в течение 30 мин. Мембрану кратковременно (1–2 мин) инкубировали с 0,1 М буфером для щелочной фосфатазы, содержащим 100 мМ NaCl и 5 мМ MgCl_2 . Для проявления мембрану инкубировали в темноте с 25–40 мл проявляющей смеси, содержащей 10 мг NBT (p-nitro-blue-tetrazolium-chloride) и 5 мг BCIP (5-bromo-4-chloro 3-indolyl-phosphate) в 25 мл буфера для щелочной фосфатазы. После четкой визуализации полос мембрану тщательно промывали водой и подсушивали на воздухе. Интенсивность окраски оценивали с помощью программы TotalLab.

Данные, представленные на рисунках и графиках, являются средними из 3–6 повторностей.

Результаты и их обсуждение. Избыточное оводнение проростков ячменя, обусловленное затоплением корней и гипокотила, негативно сказалось на росте растений, что согласуется с данными, имеющимися в литературе [17]. За 3 дня действия стрессового фактора они отставали в росте на 25 % по сравнению с контролем. После переноса растений в нормальные условия выращивания (постстрессовый период) рост опытных растений ускорялся и через 4 сут они по высоте практически не отличались от контрольных растений (рис. 1, А).

В стрессовых условиях в листьях ячменя увеличивалось содержание АФК. Так, уже через сутки количество АФК в листьях опытных растений возрастало на 70 %, а через 3 сут – в 2,5 раза. После снятия стрессового воздействия содержание АФК снижалось до уровня, зарегистрированного до начала действия стрессового фактора (рис. 1, Б).

При избыточном оводнении в листьях ячменя возрастало содержание стрессовых белков, таких как БТШ70 и ДГ, особенно ДГ. При этом к концу стрессового периода (через 3 сут) содержание БТШ70 увеличивалось на 10–15 % (рис. 2, кривая 1), а количество ДГ возрастало на 35 % по сравнению с их исходными уровнями соответственно (рис. 2, кривая 2). В постстрессовый период содержание как БТШ70, так и ДГ снижалось. Однако если количество БТШ70 через 2 сут постстрессового периода снижалось практически до исходного уровня, то содержание ДГ в таких условиях оставалось в среднем на 25 % выше количества ДГ, обнаруженного в контроле.

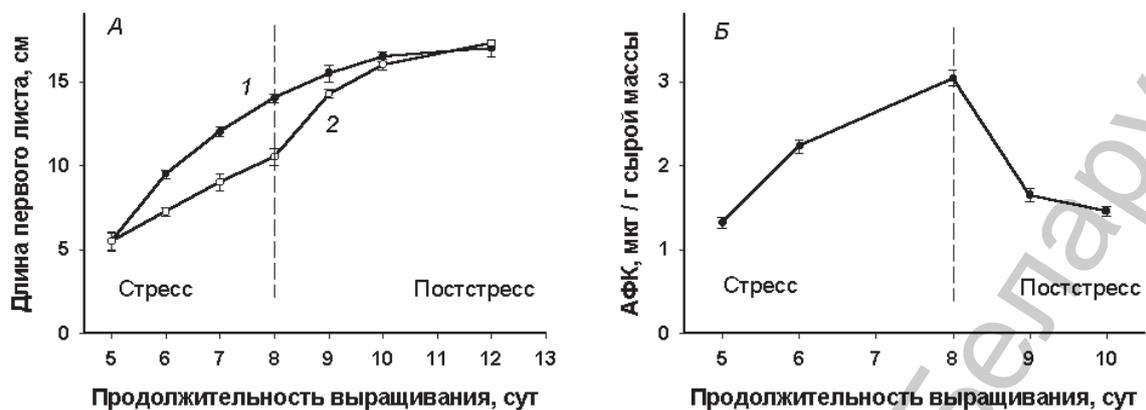


Рис. 1. Рост растений ячменя (А) и изменение содержания АФК (Б) в условиях стресса, вызванного избыточным оводнением. Вертикальная штриховая линия указывает на окончание действия стрессового фактора и начало постстрессового периода

Относительно высокое содержание ДГ в листьях в постстрессовый период может указывать на их важную роль в адаптации растений к меняющимся условиям выращивания, обусловленных избыточным оводнением и последующей реаэрацией. Известно, что гипоксия в первую очередь негативно действует на митохондрии [4]. Показано, что ДГ необходимы для активации функций митохондрий, в основе механизма которой лежит связывание ДГ с их внешними мембранами [12].

Возрастание количества ФС (на 5–8 %) отмечено только в течение 1-х суток действия стрессового фактора, после чего их содержание снижалось даже в условиях стресса. В постстрессовый период уровень ФС продолжал уменьшаться и через 2 сут составлял 85 % от исходного значения (рис. 2, кривая 3). Снижение образования ФС может быть результатом их потребления для лигнификации клеточных стенок. Не исключено, что снижение уровня ФС связано с ингибированием активности фенилаланинаммиаклиазы, фермента катализирующего дезаминирование фенилаланина – предшественника фенолов [18].

Особо следует остановиться на изменении уровней аскорбата и глутатиона при избыточном оводнении. Так, содержание общего аскорбата через 3 сут действия стрессового фактора снижалось в 2 раза по сравнению с исходным уровнем. При этом в течение 2 сут постстрессового периода уровень общего аскорбата не восстанавливался. Напротив, количество общего аскорбата снизилось на 28 % по отношению к его содержанию, зарегистрированному в конце стрессового периода (рис. 3, А, кривая 1). Количество восстановленного аскорбата в 1-е сутки действия стрессового фактора повышалось на 29 %, однако его количество в условиях оводнения постепенно понижалось до уровня контроля. Уменьшение количества восстановленного аскорбата (на 8 % ниже контроля) зарегистрировано также и в постстрессовый период (рис. 3, А, кривая 2). Снижение уровня общего аскорбата, а также восстановленного аскорбата в стрессовый и постстрессовый периоды указывает, с одной стороны, на активное потребление этого низкомолекулярного антиоксиданта, с другой стороны, свидетельствует об ингибировании его синтеза *de novo*. В отличие от аскорбата содержание общего глутатиона (GSH+GSSG), а также его восстановленной формы в листьях ячменя при оводнении и в постстрессовый период возрастало (рис. 3, Б, кривые

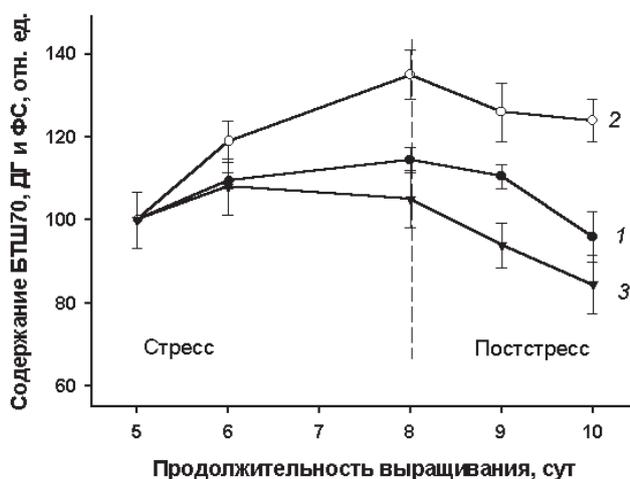


Рис. 2. Изменение содержания БТШ70 (1), ДГ (2) и ФС (3) в проростках ячменя в условиях стресса, вызванного избыточным оводнением

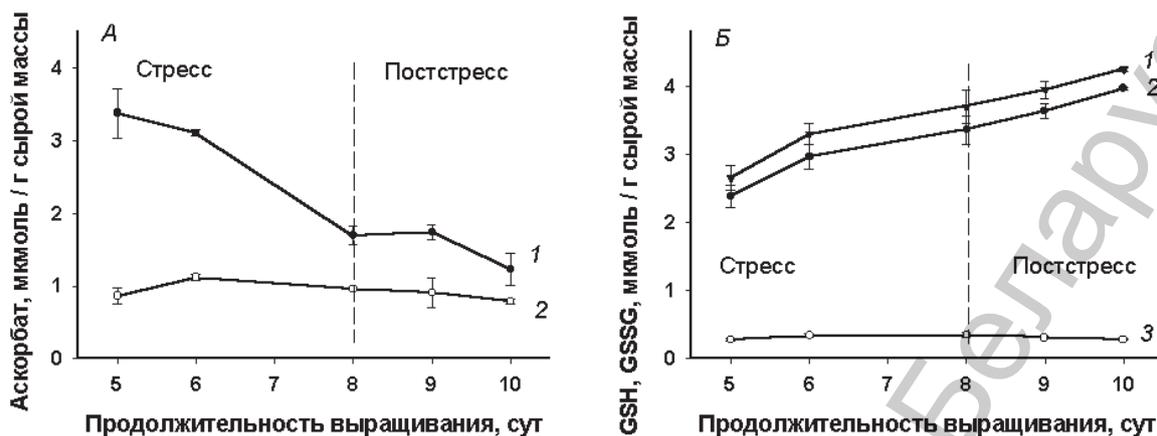


Рис. 3. Изменение содержания аскорбата (А) и глутатиона (Б) в проростках ячменя, выращенных в условиях стресса, вызванного избыточным оводнением: А – общий аскорбат (1), восстановленный аскорбат (2); Б – общий глутатион – GSH+GSSG (1), GSH (2), GSSG (3)

1 и 2). При этом количество GSSG в ходе всего эксперимента оставалось практически неизменным (рис. 3, Б, кривая 3). Из этого следует, что уровень GSH эффективно пополняется за счет восстановления GSSG.

Заключение. Показано, что избыточное оводнение (затопление корней и гипокотыля) приводит к торможению роста проростков ячменя и накоплению в них АФК. При этом активируется синтез стрессовых белков БТШ70 и в большей степени белков ДГ, истощаются уровни общего и восстановленного аскорбата, содержание GSH и общего пула глутатиона (GSH+GSSG) возрастает, в то время как уровень GSSG остается практически неизменным. После прекращения действия стрессового фактора (постстрессовый период) содержание АФК снижается до уровня контроля, количество стрессовых белков уменьшается. Однако содержание ДГ в листьях опытных растений остается достаточно высоким, что указывает на важную роль ДГ в процессе адаптации проростков ячменя к стрессу, вызванному избыточным оводнением. Установлено, что в постстрессовый период на фоне неизменного уровня GSSG, а также продолжающегося возрастания количества GSH и GSH+GSSG содержание общего и восстановленного аскорбата еще более снижается по сравнению с их количеством, зарегистрированным при действии стрессового фактора. Полученные результаты свидетельствуют об активной работе в условиях избыточного оводнения и в постстрессовый период аскорбат-глутатионового цикла, в котором происходит разрушение пероксида водорода, а также указывают на исключительно важную роль низкомолекулярного антиоксиданта GSH, уровень которого пополняется за счет восстановления его окисленной формы – GSSG.

Литература

1. Armstrong A. C. // J. Agr. Sci. 1978. Vol. 91. P. 229–235.
2. Setter T. L. et al. // Plant Cell Environ. 1987. Vol. 10. P. 767–776.
3. Sairam R. K. et al. // Biologia Plantarum. 2008. Vol. 52. P. 401–412.
4. Crawford R. M. M., Brandle R. // J. of Exp. Botany. 1996. Vol. 47. P. 145–159.
5. Foyer C. H. et al. // Plant Cell Environ. 1994. Vol. 17. P. 507–523.
6. Gapper C., Dolan L. // Plant Physiol. 2006. Vol. 141. P. 341–345.
7. Foyer C. H., Noctor G. // Plant Cell Environ. 2005. Vol. 28. P. 1056–1071.
8. Kirakosyan A. et al. // J. Agr. Food Chem. 2003. Vol. 51. P. 3973–3976.
9. Шалыго Н. В., Доманская И. Н., Щербаков Р. А., Радюк М. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2008. № 2. С. 61–64.
10. Радюк М. С., Доманская И. Н., Щербаков Р. А., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2009. № 3. С. 57–63.
11. Sung D. Y., Vierling E., Guy C. L. // Plant Physiol. 2001. Vol. 126. P. 789–800.

12. Боровский Г. Б. и др. // Физиол. растен. 2005. Т. 52, № 2. С. 221–226.
13. Rock C. D. // New Phytologist. 2000. Vol. 148. P. 357–396.
14. Шалыго Н. В., Щербачков Р. А., Доманская И. Н., Радюк М. С. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2007. Т. 39, № 3. С. 264–270.
15. Nakano Y., Asada K. // Plant Cell Physiol. 1981. Vol. 22. P. 867–880.
16. Bradford M. // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
17. Collaku A., Harrison S. A. // Crop Sci. 2002. Vol. 42. P. 444–450.
18. Majak W., Quinton D. A., Broersma K. // J. Range Management. 1980. Vol. 33. P. 197–199.

R. A. SHCHERBAKOV, I. N. DOMANSKAJA, M. C. RADYK, N. V. SHALYGO

INFLUENCE OF WATERLOGGING ON GROWTH AND REACTIVE OXYGEN SPECIES ACCUMULATION AND ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN GREEN BARLEY SEEDLINGS (HORDEUM VULGARE)

Summary

Influence of waterlogging stress on generation of reactive oxygen species (ROS), content of ascorbate, glutathione, phenol compounds and stress proteins such as HSP70 and dehydrins (DH) in green barley (*Hordeum vulgare*) seedlings were investigated. Significant increase of ROS level under stress condition was found. Content of ascorbate was decreased during stress period while amount of GSH, phenol compounds, HSP70 and DH were increased. During post-stress period level of ascorbate continued to go down while GSH content was increased. These results indicate on active work of ascorbate-glutathione cycle and demonstrate the important role of GSH under stress induced by waterlogging.

УДК 636.2.034.612.602

Л. Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, А. И. ГАНДЖА¹, Е. С. ЛОБАНОК²,
В. П. НИКОЛЬСКАЯ², И. Б. ВАСИЛЕВИЧ², В. П. СИМОНЕНКО¹

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ
НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ
ЗАМОРОЖЕННО-ОТТАЯННЫХ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

¹НПЦ НАН Беларуси по животноводству, Жодино, e-mail:Gandja_Alla@tut.by,

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail:krzhes@yandex.ru

(Поступила в редакцию 17. 12. 2009)

Введение. Криоконсервация гамет и эмбрионов является основным методом сохранения генетического фонда млекопитающих. Криобанки могут обеспечить сохранность генетической информации в виде репродуктивных клеток и эмбрионов. Возможность получения полноценного организма с использованием криоконсервированного материала экспериментально подтверждается не только для большинства лабораторных, многих сельскохозяйственных животных, но и для человека [1–3]. Однако, несмотря на методологическое достоинство этого метода, в процессе криоконсервации при понижении температуры клетки подвергаются холодовому шоку, сопровождающемуся изменениями проницаемости клеточной и митохондриальной мембран, повреждением цитоскелета и осмотическому стрессу.

При замораживании и последующем оттаивании на клетки воздействуют два основных фактора: формирование кристаллов льда и обезвоживание [1, 2]. Использование криопротекторов, выбор оптимальных условий замораживания и последующего оттаивания позволяют значительно снизить повреждающее влияние вышеуказанных факторов и сохранить функциональную полноценность ооцитов [2, 4, 5].

Различают криопротекторы двух типов: проникающие и непроникающие в клетку [2, 4, 6]. Наиболее распространено применение проникающих криопротекторов, таких как глицерин (ГЛ), пропандиол (ПД), этиленгликоль (ЭГ), диметилсульфоксид (ДМСО) [7, 8]. Данные соединения образуют водородные связи с молекулами внутри- и внеклеточной воды и тем самым препятствуют формированию в клетках кристаллов льда. В качестве непроникающих криопротекторов чаще всего используют олигосахариды – сахарозу и трегалозу, принцип действия которых в значительной степени связан с защитой от осмотических перепадов и снижением скорости роста кристаллов в процессе замораживания клеток [4]. Непроникающие криопротекторы используют как дополнительные компоненты в криоконсервирующих смесях, поскольку в отсутствие проникающих криопротекторов они малоэффективны.

Условия криоконсервации, тип криопротектора, его концентрация, проникающая способность, влияние на состояние клеточных мембран, время экспозиции и температура определяют выраженность изменения ионного гомеостаза, клеточного объема, активности ферментных комплексов и, как следствие, функциональное состояние оттаянных ооцитов [6–10].

С целью оптимизации метода криоконсервации ооцитов крупного рогатого скота в работе проведена сравнительная оценка структурно-функционального состояния (сохранности) замороженно-оттаянных ооцитов коров при использовании различных систем криопротекторов.

Объекты и методы исследования. Выделение ооцитов. Яичники доставляли в лабораторию в бытовом термосе в стерильном растворе Хенкса, содержащем 200 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Из яичников выделяли ооциты в растворе Хенкса, содержащем 10 ЕД/мл

гентамицина, 1 ЕД/мл гепарина и 1 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС). В эксперимент отбирали ооциты с многослойным компактным кумулюсом, плотно прилегающим к зоне пеллюцида, с мелкозернистой однородной ооплазмой.

Криоконсервация ооцитов. Для насыщения клеток криопротекторами использовали следующие смеси и время воздействия: I – а) 10%-ный ГЛ + 20%-ный ПД, 10 мин; б) 25%-ный ГЛ + 25%-ный ПД, 5 мин; II – 1,4М ГЛ в три этапа по 5 мин по возрастающей концентрации; III – 1,5М ЭГ в три этапа по 5 мин по возрастающей концентрации; IV – а) 1,4М ГЛ + 0,3М сахарозы, 15 мин; б) 1,5М ЭГ + 0,3М сахарозы, 15 мин; в) 1,5М ПД + 0,3М сахарозы, 15 мин. Базовой средой для приготовления криопротекторов служила среда ТС-199 с 20 % ФБС. Ооцит-кумулюсные комплексы с помощью микроаспиратора помещали в пайетты, криоконсервировали на программном замораживателе (Cryocell 1200), затем хранили в парах жидкого азота в сосуде Дьюара [12].

Размораживание ооцитов. Оттаивание образцов осуществляли тремя способами: пайетту, извлеченную из жидкого азота помещали в водяную баню (+25 °С) на 1 мин, ооциты переводили в 1,0 М сахарозу на 5 мин, промывали 4 раза по 2 мин ТС-199 с 20 % ФБС (1); пайетту выдерживали 10 с на воздухе, помещали в водяную баню (+25 °С) на 10 с, ооциты переводили в 0,7М ГЛ или 0,75М ЭГ с добавлением 0,5М сахарозы, промывали 4 раза по 2 мин ТС-199 с 20 % ФБС (2); пайетту помещали в водяную баню (+25 °С) на 3 мин, ооциты переводили в 0,5М сахарозу (смесь 1,0М сахарозы и 20 % ФБС) на 5 мин, затем отмывали 3 раза, последовательно выдерживая по 2–3 мин в среде ТС-199 с 20 % ФБС и переводили в ТС-199, содержащую 5 % ФБС (3).

Анализ функционального состояния ооцитов после криоконсервации. Сохранность ооцит-кумулюсных комплексов коров после криоконсервации регистрировали по наличию кумулюса, деформации оболочки, фрагментации ооплазмы, функциональную активность оценивали по уровню оплодотворяемости. В работе исследовали две группы ооцитов: 1-я группа – криоконсервированные сразу после выделения из яичников (свежевыделенные); 2-я группа – замороженные после созревания в среде ТС-199 под слоем минерального масла в течение 20 ч в 5%-ной атмосфере CO₂ при 38,5 °С и 98%-ной влажности.

Замороженно-оттаянные ооциты 1-й группы вносили в лунки планшета со средой ТС-199 для созревания на 24 ч при 38,5 °С в CO₂-инкубаторе, затем оплодотворяли спермой, прошедшей криоконсервацию и капацитацию по общепринятой методике [11]. Замороженно-оттаянные ооциты 2-й группы вносили в лунки планшета со средой ТС-199, содержащие сперму, прошедшую ту же обработку, помещали в CO₂-инкубатор на 18 ч при 38,5 °С.

Оценка энергетического статуса замороженно-оттаянных ооцитов. Внутриклеточное содержание АТФ измеряли в ооцитах, размороженных по способу IV. Количество АТФ определяли по интенсивности свечения флуоресцирующего продукта АТФ-зависимой люциферин-люциферазной реакции на хемилюминометре ТД – 20/20 Turner Biosystems (США) при $\lambda=560-580$ нм и рассчитывали по формуле: $[АТФ]_{обр, моль/л} = [АТФ]_{к, моль/л} \times I_{обр} / I_{к}$, где $[АТФ]_{к, моль/л}$ – концентрация и $I_{к}$ – интенсивность хемилюминесценции АТФ контроля; $[АТФ]_{обр, моль/л}$ – концентрация и $I_{обр}$ – интенсивность хемилюминесценции образца [13].

Состояние митохондрий тестировали на спектрофлуориметре Solar SM 2203 (РБ) по отношению интенсивности флуоресценции ($I_{фл}$) потенциал-чувствительного зонда родамина 123 (Rd123) в суспензии ооцитов при $\lambda_{рег}=535$ нм ($\lambda_{возб}=495$ нм) к $I_{фл}$ белковых триптофанилов при $\lambda_{рег}=340$ нм ($\lambda_{возб}=280$ нм) [13]. В качестве флуоресцентного стандарта использовали родамин В.

Результаты и их обсуждение. Влияние условий криоконсервации и оттаивания на состояние ооцитов, замороженных как сразу после извлечения из яичников (1-я группа), так и через 20 ч созревания в условиях культуры (2-я группа), представлены в табл. 1 и 2.

Криоконсервирование ооцитов в растворе, содержащем смесь 10 % ГЛ и 20 % ПД с предварительной эквilibрацией в 10 % ГЛ+20 % ПД, независимо от условий и стадии развития позволило сохранить кумулюс у 100 % ооцитов. Признаки деформации оболочки наблюдались у 10,7 % свежевыделенных ооцитов и у 12,5 % клеток, прошедших созревание в культуре. Фрагментация ооплазмы выявлена у 82,1 % ооцитов 1-й и 79,2 % – 2-й групп. Замораживание ооцит-кумулюсных комплексов после их обработки раствором 1,4М ГЛ (насыщение в 3 этапа по 5 мин), оттаивание на воздухе 10 с, водяной бане при 25 °С 10 с и перевод в смесь 0,7М ГЛ + 0,5М саха-

розы приводит к сохранению кумулюса у 94,4 % 1-й и 87,5 % – 2-й групп. Деформация оболочки отмечена у 13,9 и 8,3 %, фрагментация ооплазмы у 88,9 и 79,2 % свежевыделенных и созревших ооцитов соответственно. Использование в качестве криопротектора 1,5 М ЭГ и вышеописанной схемы выведения из заморозки также позволило сохранить кумулюс у 100 % ооцитов (1-я группа). В этих условиях деформация оболочки наблюдалась у 10,8 %, фрагментация ооплазмы – у 54,1 % ооцитов (табл. 1). Во 2-й группе при данной технике криоконсервации число ооцитов с сохраненным кумулюсом снижалось на 9,5 %, увеличивался в 1,4 раза процент клеток с фрагментированной ооплазмой.

Таблица 1. Влияние условий криоконсервации на сохранность ооцитов после оттаивания

Режим		Стадия развития	Состояние ооцит-кумулюсных комплексов			
насыщения	оттаивания		n	Наличие кумулюса, n-%	Деформация оболочки, n-%	Фрагментация ооплазмы, n-%
I – а) 10 %-ный ГЛ + 20 %-ный ПД (10 мин); б) 25 %-ный ГЛ + 25 %-ный ПД (5 мин)	Водяная баня 25 °С (1 мин) + 1,0 М сахарозы (5 мин) + ТС-199, 20 % ФБС (2 мин)	Свежевыделенные	28	28–100	3–10,7	23–82,1
		Созревшие <i>in vitro</i>	24	24–100	3–12,5	19–79,2
II – 1,4 М ГЛ в 3 этапа (15 мин)	Воздух (10 с) + водяная баня 25 °С (10 с) + 0,7 М ГЛ или 0,75 М ЭГ + 0,5 М сахарозы + ТС-199, 20 % ФБС (2 мин)	Свежевыделенные	36	34–94,4	5–13,9	32–88,9
		Созревшие <i>in vitro</i>	24	21–87,5	2–8,3	19–79,2
III – 1,5 М ЭГ в 3 этапа (15 мин)		Свежевыделенные	37	37-100	4–10,8	20–54,1
		Созревшие <i>in vitro</i>	21	19-90,5	1–4,8	16–76,2

Таблица 2. Влияние условий криоконсервации на способность к оплодотворению замороженно-оттаянных ооцитов

Режим		Стадия развития	Состояние ооцит-кумулюсных комплексов				
насыщения	оттаивания		n	Наличие кумулюса, n-%	Деформация оболочки, n-%	Фрагментация ооплазмы, n-%	Дробящиеся клетки, n-%
I – а) 10 %-ный ГЛ + 20 %-ный ПД (10 мин); б) 25 %-ный ГЛ + 25 %-ный ПД (5 мин)	Водяная баня 25 °С (1 мин) + 1,0 М сахарозы (5 мин) + ТС-199, 20 % ФБС (2 мин)	Свежевыделенные	25	14–56,0	6–24,0	22–88,0	1–4,0
		Созревшие <i>in vitro</i>	21	6–28,6	8–38,1	20–95,2	–
II – 1,4 М ГЛ в 3 этапа (15 мин)	Воздух (10 с) + водяная баня 25 °С (10 с) + 0,7 М ГЛ или + 0,75М ЭГ + 0,5 М сахарозы + ТС-199, 20 % ФБС (2 мин)	Свежевыделенные	35	2–34,3	7–20,0	34–97,1	–
		Созревшие <i>in vitro</i>	20	15–75,0	5–25,0	18–90,0	1–5,0
III – 1,5М ЭГ в 3 этапа (15 мин)		Свежевыделенные	31	25–80,6	7–22,6	27–87,1	3–9,7
		Созревшие <i>in vitro</i>	18	13–72,2	5–27,8	17–94,4	1–5,6

Из табл. 2 видно, что при насыщении ооцитов перед заморозкой смесью ГЛ и ПД способностью к оплодотворению после оттаивания обладали только клетки 1-й группы (4,0 % дробящихся клеток), тогда как у ооцитов 2-й группы наблюдались значительные изменения ооцит-кумулюсных комплексов и не отмечено появление ранних эмбрионов. Использование же в качестве криопротектора для ооцитов 2-й группы одного ГЛ без ПД позволило получить 5,0 % дробящихся клеток. Обработка ооцитов 1,5М ЭГ обеспечила более высокую сохранность кумулюса и увеличила выход дробящихся клеток после оплодотворения как в 1-й, так и во 2-й группах. При этом в случае криоконсервации клеток сразу после выделения из яичника наблюдается самый высокий процент дробящихся клеток. Замораживание ооцитов, прошедших предварительное созревание (20 ч) в культуре в 1,5М ЭГ, увеличивает фрагментацию ооплазмы и снижает в 1,7 раза число зародышей на начальных стадиях дробления.

Таким образом, использование программного замораживателя для глубокой криоконсервации свежевыделенных ооцитов крупного рогатого скота при поэтапном насыщении и выведении с использованием раствора 1,5М ЭГ обеспечивает высокую сохранность ооцит-кумулюсных комплексов на уровне 90–100 % и получение 5,6–9,7 % дробящихся клеток.

Одной из главных причин выявленных отличий в выходе ранних эмбрионов из замороженно-оттаянных ооцитов после их оплодотворения *in vitro* возможно является криоповреждение митохондрий [9, 10]. С учетом этого мы провели сравнительную оценку изменения трансмембранного потенциала митохондрий и содержания основного «аккумулятора» энергии – АТФ в интактных (свежевыделенных) ооцитах и замороженных с использованием следующих смесей криопротекторов: 1,4М ГЛ + 0,3М сахарозы, 1,5М ЭГ + 0,3М сахарозы, 1,5М ПД + 0,3М сахарозы (способ IV).

Количество Rd123, которое входит в клетки и избирательно связывается с митохондриями, определяется их функциональным состоянием и трансмембранным потенциалом. Установлено, что в интактных ооцитах отношение $I_{\text{фл}} \text{ Rd123}$ к $I_{\text{фл}}$ белковых триптофанилов равно 4,0, в суспензии клеток, замороженных в смеси 1,4М ГЛ + 0,3М сахарозы или смеси 1,5М ЭГ + 0,3М сахарозы данный параметр снижается в 1,7 и в 2,0 раза соответственно (рис. 1). При насыщении ооцитов смесью 1,5М ПД + 0,3М сахарозы данный параметр составляет – 3,8, что в 1,9 раза выше, чем в замороженных с использованием ЭГ и 1,6 раза по сравнению с ГЛ.

Хорошо известно, что работа дыхательной цепи и количество синтезируемого клеткой АТФ зависит от мембранного потенциала митохондрий. Установлено, что интактные ооциты содержат 8,2 пМ/ооцит АТФ (рис. 2), а после замораживания-оттаивания в смеси 1,4М ГЛ + 0,3М сахара и отмывки от криоконсервантов уровень макроэрга в них снижается до 4,5 пМ/ооцит. Использование вместо ГЛ в смеси с сахарозой 1,5М ЭГ также приводит к снижению содержания АТФ до 4,3 пМ/ооцит. Оказалось, что наиболее высокую криозащиту проявляет ПД (1,5М), поскольку уровень АТФ в замороженно-оттаянных ооцитах составляет 7,0 пМ/ооцит, что лишь в 1,2 раза ниже содержания АТФ в свежевыделенных ооцитах (рис. 2). Протекторный эффект ПД на ооциты подтверждают результаты, приведенные в табл. 1 и 2. Несмотря на то что процент дробящихся клеток при насыщении ооцитов ПД был в 2,0 раза ниже, чем от ЭГ, следует отметить, что последний использовали в смеси с ГЛ. Тогда как показано, что ГЛ имеет самый низкий, зарегистрированный как по состоянию ооцит-кумулюсных комплексов, так и процентному выходу дробящихся клеток эффект. В клетках, обработанных ГЛ, после замораживания-оттаивания также резко снижается уровень АТФ и изменяется состояние митохондрий. Кроме того, концентрация ПД, используемая в смеси с ГЛ, была выше, чем при оценке энергетического статуса ооцитов. Вероятно, применение совместно с ПД непроникающего криопротектора – сахарозы

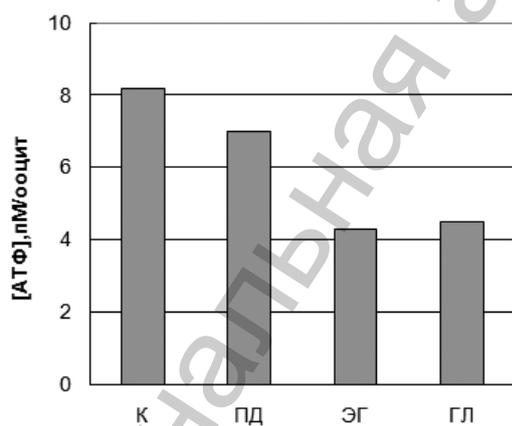


Рис. 1. Влияние условий криоконсервации на связывание митохондриями замороженно-оттаянных ооцитов потенциал-чувствительного зонда Rd123: К – контроль (интактные ооциты); ПД – 1,5М ПД + 0,3М сахарозы; ЭГ – 1,5М ЭГ + 0,3 М сахарозы; ГЛ – 1,4М ГЛ + 0,3М сахарозы

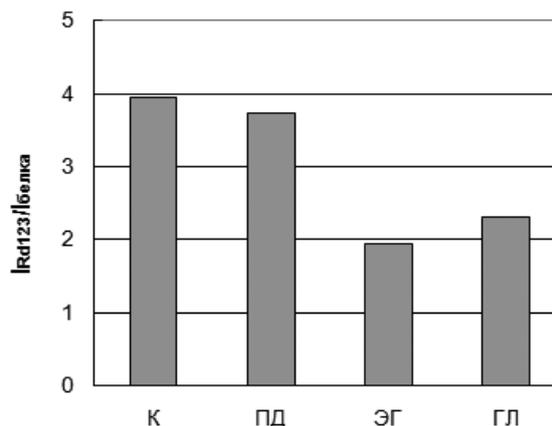


Рис. 2. Влияние условий криоконсервации на содержание АТФ в замороженно-оттаянных ооцитах: К – контроль (интактные ооциты); ПД – 1,5М ПД + 0,3М сахарозы; ЭГ – 1,5М ЭГ + 0,3 М сахарозы; ГЛ – 1,4М ГЛ + 0,3М сахарозы

(0,3M) – существенно для защиты ооцитов. Таким образом, для увеличения выхода жизнеспособных эмбрионов, полученных из замороженно-оттаянных ооцитов в условиях культуры *in vitro*, наиболее перспективными являются ПД и ЭГ, используемые в концентрациях, не превышающих 1,5 M.

Заключение. Сохранность генетической информации и выход ранних эмбрионов крупного рогатого скота после оплодотворения замороженно-оттаянных ооцитов выше при криоконсервации свежевыделенных ооцитов, по сравнению с клетками, прошедшими период созревания в условиях культуры. Замораживание свежевыделенных ооцит-кумулюсных комплексов при поэтапном насыщении 1,5M раствором ЭГ обеспечивает их сохранность на уровне 100 % и получение 9,7 % дробящихся клеток. Дозревание ооцитов перед замораживанием *in vitro* в течение 20 ч позволяет получить после оттаивания и оплодотворения 5,6 % зародышей на начальных стадиях дробления. Использование потенциал-чувствительного зонда Rd 123, отражающего состояние митохондрий, и определение внутриклеточного уровня АТФ являются ранними прогностическими критериями функционального состояния замороженно-оттаянных ооцитов и их способности к оплодотворению.

Литература

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. // Криобиология. Киев, 1994.
2. Petrunkina A. M. // J Reproduktionsmed. endokrinol. 2007. Vol. 4. P. 78–91.
3. Семенов Х. Х., Игнатъева Е. Л. // Ланималогия. 1993. С. 88–91.
4. Chen Z., Li M., Li Y et al. // Hum. Reprod. 2004. Vol. 19. P. 2345–2349.
5. Hunter J. E., Bernard A., Fuller B. J. et al. // Cryobiology. 1992. Vol. 29. P. 240–249.
6. Paynter S. J., Cooper A., Gregory L. et al. // Human Reprod. 1999. Vol. 14. P. 2338–2342.
7. Paynter S. J., O'Neil L., Fuller B. J. et al. // Fertil. Steril. 2001. Vol. 75. P. 532–538.
8. Paynter S. J. // Reprod. Biomed. Online. 2005. Vol. 10. P. 578–586.
9. Stojkovic M., Machado S. A., Stojkovic P., Zakhartchenko V. et al. // Biology of Reproduction. 2001. Vol. 64. P. 904–909.
10. Смирнова А. А., Тур-Каспа И. // Проблемы репродукции. 2005. №1. С.25–29.
11. Samardzija M., Karadjole M., Getz I., Makek Z. et al. // Reprod. Biol. Endocrin. 2006. Vol. 4, N 58. P. 1–7.
12. Fabbri R., Porcu E., Marsella T. et al. // Technical aspects of oocyte cryopreservation. Mol. Cell. Endocrinology. 2000. Vol. 169. P. 39–42.
13. Lobanok E. S., Mezhevikina L. M., Belynovich L. M. // The influence of LIF (leukemia inhibitory factor) on the functional status of R1 mouse embryonic stem cells. Biomedical Chemistry. 2009. Vol. 3. P. 54–59.

L. L. LETKEVICH, A. I. GANDJA, E. S. LOBANOК, V. P. NIKOLSKAYA,
I. B. VASILEVICH, V. P. SIMONENKO

INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION CONDITIONS ON STRUCTURALLY FUNCTIONAL CONDITION OF FROZEN-THAWED OF BOVINE OOCYTES

Summary

It was shown that bovine oocytes, cryopreserved prior to their maturation *in vitro* and saturated with cryoprotectants: ethylene glycol or propane 1,2-diol and sucrose before freezing showed higher safety, mitochondria stability, ATP levels and the ability to fertilization and cleavage after thawing.

УДК 632.95

Р. Г. ГОНЧАРИК, В. П. ДОМАНСКИЙ

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, rusgon@mail.ru

(Поступила в редакцию 26.08. 2010)

Введение. Для мониторинга окружающей среды на степень антропогенных загрязнений могут быть использованы биосенсоры [1]. Применение в качестве биологического компонента тест-системы микрокультуры одноклеточных организмов, способных к размножению, позволяет сделать его самовоспроизводящимся, что значительно увеличивает срок службы такого сенсора и удешевляет его. Использование флуоресценции хлорофилла у фотосинтезирующих организмов для тестирования состояния тест-объекта дает возможность осуществлять его бесконтактным способом, что значительно упрощает проблему создания нормальных физиологических условий для его жизнедеятельности. Сенсоры на основе одноклеточных водорослей для обнаружения гербицидов известны и описаны в литературе [2–4]. Менее изучены возможности таких биосенсоров для обнаружения других видов загрязнений техногенного происхождения. Ранее нами было описано использование одноклеточной водоросли хлореллы в качестве активного элемента биосенсора [5]. Используемые в этой работе препараты хлореллы, иммобилизованной в агаровых дисках, в высушенном виде хранились при температуре -12°C более 3 лет, в течение которых их периодически (через 6 мес) регенерировали и регистрировали их активность. Опыт показал, что предел длительности такого хранения обусловлен только зарастанием культуры посторонними микроорганизмами, происходящим в период активности тест-объекта.

В настоящей работе изучены возможности флуоресцентного биосенсора на основе *Chlorella vulgaris* по обнаружению токсических соединений (в частности, ионов тяжелых металлов и молекул аммиака), а также возможности создания на его основе миниатюрного автономно работающего устройства с автоматической сигнализацией о наличии загрязнений в водной среде. Выбор был обусловлен тем, что этот вид водоросли легко культивировать (эта технология хорошо отработана), а также его неприхотливостью и жизнеспособностью, что немаловажно для сенсорной системы.

Объекты и методы исследования. В работе использовали агаровые диски толщиной 0,5 мм, содержащие клетки зеленой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* L.). Суспензию клеток вводили в агар при температуре $+38^{\circ}\text{C}$, после чего агар заливали между двумя стеклами (подогретыми до той же температуры). Из застывшего и охлажденного геля делали круглые высечки диаметром 5 мм. Диски выдерживали сутки на свету в среде Таммийя, после чего использовали в эксперименте или высушивали и хранили при -12°C в морозильной камере бытового холодильника.

Лабораторный вариант биосенсора представлял собой миниатюрный компьютеризированный РАМ (Pulse Amplitude Modulated)-флуориметр, способный регистрировать кривые индукции флуоресценции хлорофилла и передавать их в компьютер для последующей обработки. Все его узлы с использованием современных технологий в принципе могут быть изготовлены на одном монокристалле кремния (чипе), за исключением собственно активного элемента – гелевого диска с инкорпорированными клетками хлореллы, отделенного от электронной схемы стеклянной подложкой.

Лабораторный вариант сенсора состоял из оптического и электронного блоков. В оптической части расположены два светодиода синего свечения (460 нм) и фотоприемник – кремниевый фо-

тодиод с красным фильтром для отделения флуоресценции от возбуждающего света. Один светодиод излучал импульсный измерительный свет для возбуждения флуоресценции, второй создавал постоянную подсветку (актиничный свет). Электронный блок содержал микроконтроллер, который по программе управлял источниками света, считывал значение интенсивности флуоресценции и посылал это значение в компьютер по USB-каналу. Программа компьютера позволяла производить эти измерения многократно, с произвольными темновыми и световыми интервалами и строить графики индукционной кривой переменной флуоресценции хлорофилла. Используемая в работе интенсивность измерительного света равна $1,8 \text{ мВт/см}^2$, интенсивность актиничного света – $0,5 \text{ мВт/см}^2$. Интенсивности измерены с помощью термоэлемента РТН-30С (чувствительность – $2,2 \text{ В/Вт}$, площадь приемной площадки – 9 мм^2).

Регистрация индукционных кривых происходила следующим образом. В некоторый момент времени включается измерительный свет. При этом на соответствующий светодиод в течение 15 мс подается пять прямоугольных импульсов со скважностью $0,5$. Прибор регистрирует разницу в показаниях фотодиода в моменты времени, когда ток через светодиод течет, и в паузе между импульсами, причем эта разница усредняется по пяти импульсам. Полученное значение характеризует флуоресценцию объекта в данный момент времени, вызванную измерительным светом, независимо от наличия постоянной подсветки. Эта процедура повторяется каждые 300 мс .

Через 20 с после включения измерительного света включается актиничный, который освещает объект в течение 20 с . При этом регистрация флуоресценции продолжается и после выключения актиничного света в течение еще 40 с . Программа, управляющая работой экспериментальной установки, позволяет проводить регистрацию индукционных кривых тест-объекта каждые 5 мин в автоматическом режиме.

Проведение эксперимента подразумевает изменение светового режима тест-объекта с дневного света на режим автоматической регистрации кривых индукции флуоресценции хлорофилла (чередование пятиминутного темнового интервала и полутораминутной регистрации кривой индукции флуоресценции хлорофилла). В результате адаптационных процессов форма индукционной кривой будет изменяться, пока не достигнет стационарной формы. Обычно требовалось около получаса, чтобы кривая индукции флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* достигла этой стационарной формы. Лишь после этого к тест-объекту добавляли интересующий реагент.

Результаты и их обсуждение. Известно, что данный биосенсор обладает высокой чувствительностью к гербицидам, являющимся ингибиторами фотосинтеза. Именно к этому классу гербицидов относится метрибузин, который имеет широкое применение в Беларуси. На рис. 1 представлено влияние этого вещества на индукционные кривые тест-объекта. Как видно из рисунка, прибор способен детектировать данный вид гербицида в концентрациях намного ниже его предельно допустимой концентрации (ПДК, ПДК метрибузина – $0,1 \text{ мг/л}$).

В качестве параметра индукционной кривой, изменяющегося при воздействии гербицида, может быть выбран параметр F_0 – интенсивность флуоресценции до включения актиничного света (актиничный свет необязателен).

В работе [6] отмечается, что действие 7 ммоль аммиака на клетки сои приводит к уменьшению фотосинтетического выделения кислорода в расчете на единицу содержания хлорофилла. В связи с этим имело смысл выяснить, способен ли флуоресцентный биосенсор детектировать молекулы аммиака в концентрациях, сравнимых с ПДК для аммиака.

На рис. 2 представлены индукционные кривые тест-объектов в присутствии аммиака в концентрациях 20 , 100 и 200 мг/л .

Для того чтобы проверить, не является ли действие аммиака результатом изменения рН при его добавлении, были проведены опыты, когда к образцу добавлялся фосфатный буфер, значение рН которого было равно таковому у раствора аммиака. Изменения кривой индукции флуоресценции хлорофилла, вызванные добавлением фосфатного буфера, являются весьма незначительными по сравнению с изменениями, вызванными добавлением раствора аммиака. Из этого можно заключить, что аммиак уменьшает скорость фотосинтеза за счет прямого воздействия на фотосистему II, а не в результате изменения рН среды. Порог чувствительности для аммиака не намного меньше его ПДК (ПДК аммиака для водоемов равна 40 мг/л).

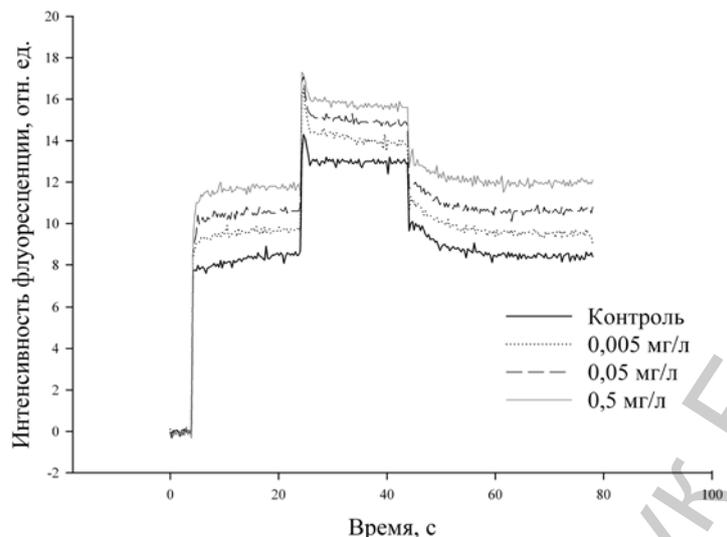


Рис. 1. Влияние метрибузина в различных концентрациях на индукционные кривые тест-объекта (хлорелла в агаровом гелевом диске)

В работе [7] исследовали ингибирование активности электронного транспорта в сферопластах *Synechococcus* 6301 в присутствии хлорида ртути. Ингибирование активности всей цепи происходило при низких концентрациях ионов ртути (6 мкмоль/л). Это ингибирование в большей степени являлось результатом взаимодействия пластоцианина и Hg^{2+} . При более высоких концентрациях (24 мкмоль/л) ртуть индуцировала ингибирование, воздействуя на фотосистему II. При этих концентрациях она также изменяла характеристики поглощения и излучения света фикоцианином. Ингибирование на 50 % фотосистемы I наблюдали только при высоких концентрациях хлорида ртути (36 мкмоль/л).

На рис. 3 представлен результат воздействия ионов ртути на тест-объект в различных концентрациях. Для ртути установлено несколько значений ПДК, и указанные на рисунках значения концентраций ртути сопоставимы лишь с наивысшей из ПДК, а именно ПДК ртути в почве – 2,1 мг/кг.

Также в ходе нашей работы были проведены исследования воздействия ионов кадмия на индукционную кривую флуоресценции хлорофилла водоросли. Качественно этот эффект напоминает результат воздействия ионов ртути. Однако порог чувствительности для кадмия оказался выше,

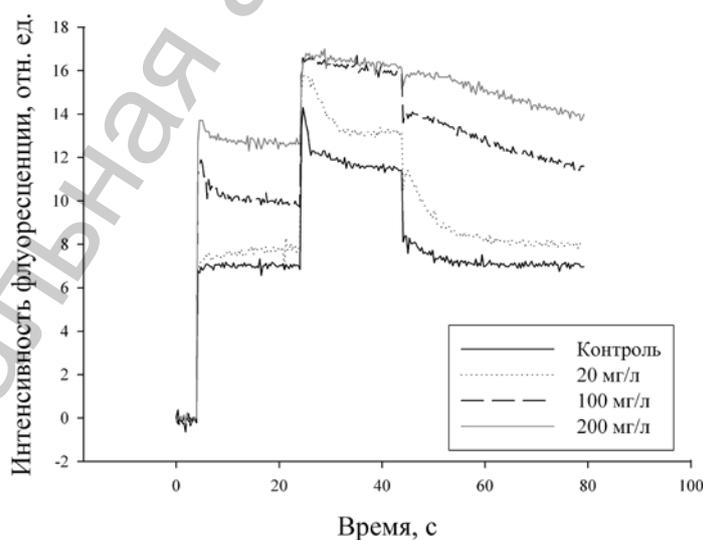


Рис. 2. Влияние аммиака в водном растворе в различных концентрациях на индукционную кривую тест-объекта

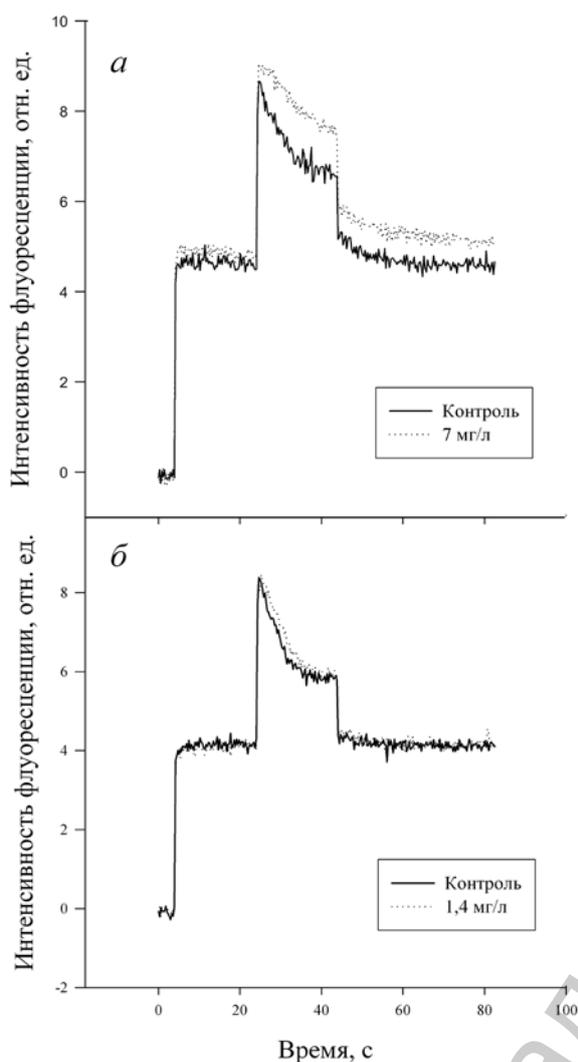


Рис. 3. Влияние ионов ртути в концентрации 7 мг/л (а) и 1,4 мг/л (б) на индукционную кривую тест-объекта

ртути для почв превышает остальные значения ПДК ртути, определенные для других сред. Повышение чувствительности детектирования токсических веществ в дальнейшем может происходить двумя путями: улучшением технических характеристик прибора и выбором фотосинтезирующего организма, чувствительного к определенным токсическим веществам.

Литература

1. Биосенсоры: основы и приложения / Ред. Тёрнер Э., Карубе И., Уилсон Дж. М., 1992
2. Merz D., Geyer M., Moss D. A., Ache H. J. // J. Anal. Chem. 1996. Vol. 354, N 3. P. 299–305.
3. Campanella L., Cubadda F., Sammartino M. P., Saoncella A. // Water Res. 2001. Vol. 35, N 1. P. 69–76.
4. Nguyen-Ngoc H., Tran-Minh C. // Anal. Chimica Acta. 2007. Vol. 583, N 1. P. 161–165.
5. Доманский В. П., Мананкина Е. Е. // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50, № 1. С. 66–69.
6. Smolov A. P., Ladygin V. G., Semenova G. A. // Russian J. of Plant Physiol. 2004. Vol. 51, N 5. P. 590–596.
7. Murthy S. D. S., Mohanty P. // J. Biosci. 1993. Vol. 18, N 3. P. 355–360.

R. G. GONCHARIK, V. P. DOMANSKII

FLUORESCENT BIOSENSOR ON THE BASIS OF GREEN ALGA CHLORELLA VULGARIS

Summary

The possibility is shown of using the unicellular alga *Chlorella vulgaris* for making biosensor for toxic compounds – ammonia and heavy metals Hg and Cd.

чем для ртути (минимальная концентрация ионов кадмия, детектируемая лабораторным макетом биосенсора, была равна 11 мг/л), соответствующие данные не приведены.

Заключение. Полагаем, что предлагаемый метод может быть использован при создании биосенсора, способного детектировать токсические вещества в окружающей среде за счет их воздействия на фотосинтетический аппарат растительной клетки. В данной работе рассмотрено применение только одного тест-объекта – зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*. Вместе с тем известно, что чувствительность к некоторым загрязнениям выше у других типов организмов. Однако это должно быть предметом отдельного исследования, в рамках данной работы нас интересовали наиболее общие закономерности, которые могут изучаться и на *Chlorella vulgaris*.

Отметим, что наибольший практический интерес представляет использование водоросли *Chlorella vulgaris* для обнаружения гербицидов, ингибирующих фотосинтез. Практическая ценность использования водоросли для детектирования аммиака не так велика как для обнаружения гербицидов, так как порог чувствительности лишь в несколько раз меньше предельно допустимой концентрации аммиака для водоемов. Однако такой сенсор уже может быть использован для автоматического детектирования критических ситуаций, например, сбросов содержащих аммиак отходов в водоем. Использование хлореллы для обнаружения тяжелых металлов имеет смысл при определении их содержания в почве, так как ПДК

УДК 577.322.7

Д. Г. ЩЕРБИН¹, С. Ж. ЛОЗНИКОВА¹, В. А. КУЛЬЧИЦКИЙ²

ДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА НА ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИНАМИКУ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ КЛЕТОК ТКАНИ СПИННОГО МОЗГА КРЫС

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: d.sheharbin@ibp.org.by,

²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 26.08.2010)

Введение. Ключевой проблемой физиологии и медицины является разработка способов коррекции процессов запоминания и обучения. Решение этого вопроса связано с выяснением механизмов реализации этих процессов. Важную роль в контроле процессов запоминания и обучения могут играть протеолитические ферменты и функционирование системы «протеазы – ингибиторы протеаз». Согласно современным представлениям, действие сериновых протеаз на клетки опосредовано специфическими протеазо-активируемыми рецепторами (PARs – protease-activated receptors) [1–3]. Показано присутствие протеазо-активируемых рецепторов на клетках нервной системы человека и крыс, в том числе на нейронах и глиальных клетках головного мозга [4, 5]. В глиальных клетках, синапсах, а также капиллярах и гладкомышечных клетках коры головного мозга обнаружена экспрессия эндогенного ингибитора протеаз [6, 7]. В участках головного мозга человека, в которых экспрессируются рецепторы тромбина PAR-1 и PAR-4, обнаружен протромбин [8]. Установлено, что протеазы рецептор-опосредованно регулируют концентрацию цитоплазматического кальция в нейронах и астроцитах, а также активность протеинкиназ, и контролируют таким образом функциональную активность нервных клеток – их возбудимость и выброс трансммиттеров [9].

Изменение баланса между активностью протеаз и антипротеаз может привести к нарушению нормального функционирования клеток ткани головного мозга и изменению интегративной деятельности мозга [10]. Протеолитические ферменты участвуют в контроле физиологических и патофизиологических процессов в организме благодаря способности непосредственно регулировать функциональную активность клеток, а также участию в образовании, инактивации и модификации гормонов, ферментов, биологически активных белков и пептидов.

С целью выяснения механизмов нейротропного действия сериновых протеаз и ингибиторов протеаз проведены модельные эксперименты, в которых изучена способность сериновой протеазы трипсина в низких концентрациях в активном состоянии и в условиях ингибирования ее активности влиять на медленную внутримолекулярную динамику (ВМД) белков ткани спинного мозга крыс *in situ*.

Объекты и методы исследования Объектом исследования являлся участок спинного мозга крыс, включающий сегменты с С1 по С5. Образцы любезно предоставлены ст. н. с. Г. П. Мировой. В работе использовали трипсин из поджелудочной железы быка, активность 37,6 ед/мл (Sigma, США), ингибитор протеаз – контрикал (Sigma, США).

Нативные ткани спинного мозга крыс помещали в 0,15 М Na- фосфатный буфер, рН 7,4 и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. В экспериментах с протеазой к 950 мкл Na-фосфатного буфера добавляли 50 мкл раствора трипсина в различных исходных концентрациях в активном состоянии и в присутствии ингибитора, вносили ткани спинного мозга крыс и инкубировали в течение часа при 37 °С. С целью ингибирования активности протеазы использовали контрикал в концентрациях, в три раза превышающих концентрацию протеазы.

Измерения кинетики затухания триптофановой флуоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) выполнены с помощью созданного в лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси автоматизированного тау-флуориметра, описанного ранее [11, 12].

При регистрации кинетик затухания ТФКТ ткани спинного мозга крыс, ткани нативные и преинкубированные с протеазой переносили в кварцевую кювету и после удаления кислорода помещали в кюветное отделение. Возбуждение осуществляли светом с длиной волны 297 нм, регистрацию – при 446 нм, удаление кислорода из образцов – с помощью сульфита натрия (80 мМ) [12].

Кинетику затухания ТФКТ ткани спинного мозга крыс анализировали в биэкспоненциальном приближении с помощью программы Origin 8.0 по формуле

$$I(t) = I_0 \cdot (\alpha_1 \exp^{-t/\tau_1} + \alpha_2 \exp^{-t/\tau_2}),$$

где $I(t)$ – интенсивность флуоресценции; I_0 – интенсивность флуоресценции в начальный момент времени; τ_1 и τ_2 – времена жизни быстрого и медленного компонентов флуоресценции; α_1 и α_2 – вклады быстрого и медленного компонентов затухания флуоресценции соответственно. Для оценки адекватности выбранной модели экспериментальным данным использовали критерий χ^2 . Полученные результаты являются средними значениями пяти независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение Кинетика затухания ТФКТ ткани спинного мозга крыс характеризуется биэкспоненциальностью. Значения времен жизни ТФКТ для спинного мозга крыс, преинкубированного в течение 60 мин при 37 °С, составляют $\tau_1=99,8 \pm 10$ мс, $\tau_2=574,5 \pm 40$ мс. Ранее в нашей лаборатории на большой группе клеток было показано [13–16], что в клетках способностью к миллисекундной ТФКТ обладают преимущественно мембранные белки. Данный эффект объясняется тем, что у растворенных в цитоплазме и матриксах органелл белков тушащие ТФКТ низкочастотные флуктуации структуры выражены в гораздо большей степени, чем у мембранных белков. Большинство водорастворимых белков клетки осуществляют интенсивные внутримолекулярные движения, которые приводят к тушению ТФКТ до уровня, не позволяющего осуществлять ее стабильную регистрацию. Контрастные различия в способности к ТФКТ мембранных и водорастворимых клеточных белков позволяют проводить селективный мониторинг медленной (миллисекундной) ВМД мембранных белков *in situ* без предварительного выделения их из клеток. Однако до недавнего времени сведения о ТФКТ белков в составе биомембран в литературе (кроме работ авторов) отсутствуют.

Наблюдаемые высокие значения τ_1 и τ_2 ТФКТ мембранных белков ткани спинного мозга крыс свидетельствуют о том, что их структура характеризуется высокой конформационной жесткостью. Следовательно, медленная ВМД интактных мембранных белков ткани спинного мозга крыс ограничена. Наблюдаемая биэкспоненциальность кинетических кривых затухания ТФКТ может быть объяснена гетерогенностью структурно-динамических свойств мембранных белков в местах локализации триптофанилов. С временем жизни τ_2 флуоресцируют триптофанилы, локализованные в тех местах, где ВМД белков заторможена в наибольшей степени. Обычно участки с такой жесткой структурой находятся в глубине жесткого гидрофобного ядра глобулы. Триптофанилы, флуоресцирующие с временем жизни τ_1 , включены в состав участков структуры мембранных белков с умеренно лабильной ВМД.

Методом ТФКТ исследовано действие сериновой протеазы трипсина в активном состоянии и в присутствии ингибитора контрикала на медленную ВМД мембранных белков ткани спинного мозга крыс. На рис. 1 представлена зависимость времен жизни τ_1 и τ_2 ТФКТ мембранных белков ткани спинного мозга крыс от концентрации трипсина. Как видно из рисунка, за период в 60 мин инкубации при 37 °С действие трипсина в концентрациях 3–15 мкг/мл приводит к увеличению значений τ_1 ТФКТ белков ткани спинного мозга крыс до 26 %. Как известно [17], медленная ВМД белков отражает крупномасштабные внутримолекулярные движения белков с миллисекундным и секундными временами, которые осуществляются на уровне крупных фрагментов полипеп-

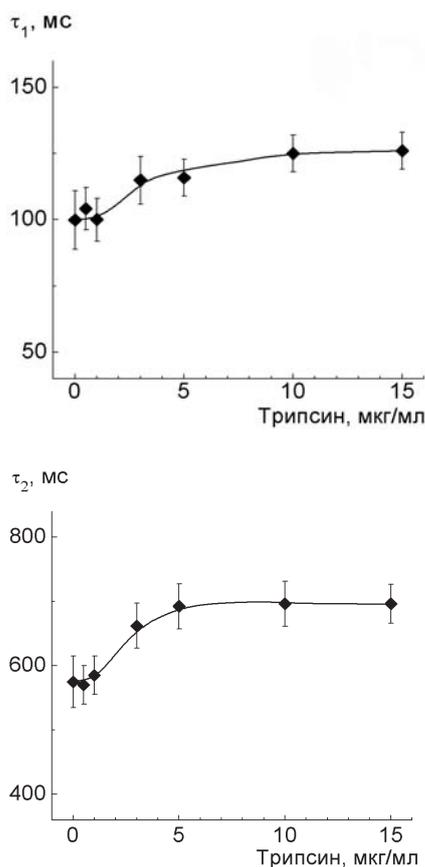


Рис. 1. Зависимость быстрого (τ_1) и медленного (τ_2) компонентов ТФКТ мембранных белков клеток ткани спинного мозга крыс от концентрации трипсина; $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; время преинкубации клеток с протеазой – 60 мин при 37 °С

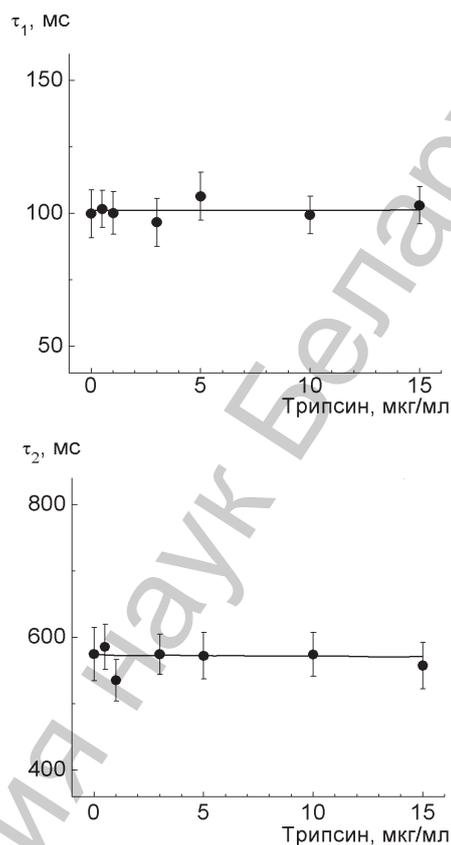


Рис. 2. Зависимость времен жизни быстрого (τ_1) и медленного (τ_2) компонентов ТФКТ ткани спинного мозга крыс от концентрации трипсина в условиях ингибирования его активности контрикалом; $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; время преинкубации клеток с протеазой в условиях ингибирования ее активности – 60 мин при 37 °С

тидной цепи, доменов и субъединиц. Следовательно, наблюдаемое в эксперименте возрастание значений τ_1 ТФКТ мембранных белков ткани спинного мозга крыс при действии трипсина свидетельствует о снижении крупномасштабных низкочастотных флуктуаций структуры мембранных белков в участках с умеренно лабильзированной ВМД. Под действием трипсина в концентрациях 3–15 мкг/мл происходит возрастание значений τ_2 ТФКТ до 28 %, свидетельствующее о том, что действие повышенных концентраций трипсина ограничивает медленную ВМД белков ткани спинного мозга крыс в более жестких участках, локализованных обычно вблизи гидрофобного ядра глобулы. Полученные результаты свидетельствуют о способности трипсина снижать медленную ВМД в участках белков, отличающихся повышенной жесткостью. Таким образом, трипсин изменяет медленную ВМД белков ткани спинного мозга крыс в сторону ее ограничения. Учитывая, что действие протеазы проявляется в низких концентрациях, можно предположить, что вызываемые трипсином изменения медленной ВМД структуры мембранных белков имеют функциональную значимость при реализации его биологических эффектов.

В условиях ингибирования активности трипсина контрикалом изменений значений τ_1 и τ_2 ТФКТ белков ткани спинного мозга крыс не происходит (рис. 2), что указывает на обусловленность сдвигов медленной ВМД белков протеолитической активностью фермента.

Заключение. Показано, что трипсин в низких концентрациях 3–15 мкг/мл индуцирует сдвиги медленной внутримолекулярной динамики мембранных белков ткани спинного мозга крыс в сторону ее ограничения. При этом действие этой протеазы на медленную ВМД мембранных белков ткани спинного мозга крыс реализуется в результате протеолитической активности фер-

мента, а не путем комплексования с белковыми структурами ткани спинного мозга крыс. Полученные данные проясняют механизмы действия сериновых протеаз и свидетельствуют о том, что биологические эффекты протеолитических ферментов могут быть связаны с изменениями медленной ВМД мембранных белков ткани спинного мозга. Полученные результаты могут быть использованы при разработке научно обоснованных методов коррекции поведения и процессов запоминания и обучения, основанных на применении ингибиторов протеиназ.

Литература

1. Trejo J., Coughlin S. R. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 2216–2224.
2. Brass L. F., Ahuja M., Belmonte E. et al. // *Semin. Hematol.* 1994. Vol. 31, N 3. P. 251–260.
3. Vu T.-K. H., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R. // *Cell.* 1991. Vol. 64. P. 1057–1068.
4. Sawada K., Nishibori M., Nakaya N. et al. // *J. Neurochem.* 2000. Vol. 74. P. 1731–1738.
5. Smith–Swintosky V. L., Cheo–Isaacs C. T., D'Andrea M. R. et al. // *J. Neurochem.* 1997. Vol. 69. P. 1890–1896.
6. Uhl J. J., Vohringer C., Reiser G. // *Neuroscience.* 1998. Vol. 86. P. 597–609.
7. Kaufmann R., Patt S., Zieger M. et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2000. Vol. 126. – P. 91–94.
8. Dihanich M., Kaser M., Reinhard E. et al. // *Neuron.* 1991. Vol. 6. P. 575–581.
9. Even–Ram S., Uziely B., Cohen P. et al. // *Nature Med.* 1998. Vol. 4. P. 909–914.
10. Кульчицкий В. А., Азев О. Ф., Никандров В. Н. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Т. 44. № 3. С. 67–69.
11. Мажуль В. М., Ивашкевич Л. С., Щербин Д. Г. и др. // Журн. прикл. спектр. 1997. Т. 64. С. 489–493.
12. Mazhul V., Shcharbin D. // *Current Topics in Biophysics.* 1998. Vol. 22. P. 138–142.
13. Мажуль В. М., Ермолаев Ю. С., Бобров В. А. и др. // Весті АН БССР. Сер. біял. навук. 1976. № 6. С. 52–56.
14. Мажуль В. М., Конев С. В., Ермолаев Ю. С. и др. // Биофизика. 1983. Т. 28, № 6. С. 980–988.
15. Мажуль В. М., Кананович С. Ж., Прокопова Ж. В. // Весті НАН Беларусі. 2001. № 1. С. 60–64.
16. Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Щербин Д. Г., Галец И. В. // Журн. прикл. спектр. 2003. Т. 70, № 3. С. 346–350.
17. *Reviews in Fluorescence 2008* / Ed. C. D. Geddes. Springer: N. Y. 1st Edition, 2010. Vol. 5. P. 37–67.

D. G. SHCHARBIN, S. G. LOZNIKOVA, V. A. KULCHITSKY

INVESTIGATION OF TRYPSIN EFFECT ON INTERNAL DYNAMICS OF MEMBRANE PROTEINS CELL TISSUES SPINAL CORD OF RATS

Summary

It was investigated the effect of serine protease trypsin at low concentrations 0,5–15 mg / ml in the active state and in conditions of inhibition by contrical on slow (millisecond) internal dynamics of membrane proteins of spinal cord tissue of rats by the method of room temperature tryptophan phosphorescence. It was shown that trypsin in concentrations 3–15 micrograms/ml induces changes slow internal dynamics of membrane proteins tissue of the spinal cord of rats in the direction of its limitations. It was found that the effect of serine protease on the slow internal dynamics of membrane proteins tissue spinal cord of rats is realized as a result of proteolytic enzyme activity, rather than by complexation with protein structures of the spinal cord tissue.

УДК 577.12

О. М. БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА¹, Е. О. ДАНЧЕНКО¹, Е. Е. НАРУТА²

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА
(ANTHERAEA PERNYI) НА РАЗВИТИЕ СТЕАТОГЕПАТОЗА
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У КРЫС**

¹Витебский государственный университет им. П. М. Машерова, e-mail:olgabal.tih@gmail.com,

²Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Гродно

(Поступила в редакцию 28.01.2010)

Введение. Инсулинорезистентность (ИР) представляет собой нарушенный биологический ответ периферических тканей организма на воздействие инсулина при его достаточной концентрации в крови. Феномен ИР эволюционно закреплялся для выживания в неблагоприятных условиях за счет накопления энергии в виде отложенных жиров. В настоящее время механизмы ИР, исчерпав свою защитную роль, продолжают обеспечивать накопление запасов жира уже во вред организму человека: развиваются ожирение и связанные с ним метаболические нарушения [1]. Возможными причинами ИР являются рецепторные (уменьшение числа рецепторов к инсулину на поверхности клеток-мишеней; изменение структуры и функции отдельных субъединиц рецептора, в частности тирозинкиназы) и пострецепторные (изменение активности белков-переносчиков глюкозы; изменение активности внутриклеточной фосфодиэстеразы и концентрации внутриклеточного цАМФ) дефекты. Развитие ИР может быть следствием гипокинезии, нарушений питания (избыточное поступление углеводов и жиров), эндокринных расстройств, реализации врожденной предрасположенности, активации пероксидного окисления липидов мембран и др. [2].

ИР – одна из причин развития неалкогольного стеатогепатоза, при котором отмечается накопление триацилглицеролов в печени [3]. Повышенная концентрация инсулина подавляет отток триацилглицеролов из печени [4]. Стратегия коррекции ИР и неалкогольного стеатогепатоза заключается в снижении массы тела, использовании препаратов, повышающих чувствительность к инсулину, антиоксидантных средств, гепатопротекторов [5].

Одной из перспективных субстанций для коррекции метаболизма при ИР является экстракт куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.). Известно, что в гемолимфе куколок дубового шелкопряда, находящихся в диапаузе 7–8 мес, содержатся вещества, необходимые для формирования эукариотического организма – бабочки, и вещества, обеспечивающие антиоксидантное и бактериостатическое действие. Показаны низкая токсичность водорастворимых экстрактов из гемолимфы куколок дубового шелкопряда, их антиаллергенная, противоопухолевая, адаптогенная активности [6]. Установлено, что экстракт куколок дубового шелкопряда содержит жиро- и водорастворимые витамины, набор аминокислот и биологически активных пептидов [7]. Выявлено, что одним из патогенетических механизмов развития стеатогепатоза при ИР является окислительный стресс [8].

Целью работы являлось изучение возможности использования экстракта куколок дубового шелкопряда для профилактики нарушений метаболизма при моделировании инсулинорезистентности у крыс.

Материал и методы исследования. Для воспроизведения ИР использовали содержание животных на высокожировой диете (ВЖД) по Либери-Де Карли (Liber-De Carli). Для эксперимента брали крыс-самок, находящихся перед этим на стандартном рационе вивария. После двухнедель-

ной адаптации животные были введены в опыт и разделены на следующие пять групп: 1-я группа – контроль вивария (интактные крысы) (n = 10); 2-я группа – воспроизведение ИР путем содержания животных на ВЖД 2 мес (n = 10); 3-я группа – воспроизведение ИР путем содержания животных на ВЖД 3 мес; 4-я группа – воспроизведение ИР путем содержания животных на ВЖД 3 мес с введением водного экстракта куколок дубового шелкопряда в дозе 7 мкг свободных аминокислот на 100 г массы тела внутрижелудочно ежедневно в течение последнего месяца питания ВЖД (n = 9); 5-я группа – воспроизведение ИР путем содержания животных на ВЖД 3 мес с введением водного экстракта куколок дубового шелкопряда в дозе 70 мкг свободных аминокислот на 100 г массы тела внутрижелудочно ежедневно в течение последнего месяца питания ВЖД (n = 10).

Содержание триацилглицеролов печени определяли с помощью наборов фирмы LaChema (Чехия), холестерина – по методу Bragdon [9]. Определение триацилглицеролов, общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке осуществляли с помощью наборов фирмы «ДиаконДиасис». Измерение уровня инсулина сыворотки крови проводили радиоиммунным методом с использованием набора «РИО-инсулин-ПГ-J¹²⁵» производства ИБОХ НАН Беларуси (Минск). Определение содержания адипонектина проводили иммуноферментным методом (ELISA) с использованием наборов фирмы BioCat (Германия). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.43) определяли в микросомально-цитоплазматической фракции, полученной центрифугированием гомогенатов при 6000 об/мин и выражали в мкмоль НАДФ · г⁻¹ · ч⁻¹ при 37 °С [10]. Гомогенаты готовили при 2–4 °С на растворе, содержащем 0,05 М Трис-НСl, 0,15 М хлорид калия и 0,001 М ЭДТА (рН 7,8).

Результаты и их обсуждение. При кормлении животных ВЖД отмечено достоверное увеличение содержания триацилглицеролов в печени крыс: через 2 мес исследуемый показатель повышался более чем в 2 раза, через 3 мес – в 3 раза. Полученные результаты обусловлены развитием инсулинорезистентности, при которой снижается антилиполитический эффект инсулина и происходит усиленный синтез триацилглицеролов из свободных жирных кислот, высвобождаемых из жировой ткани. Использование экстракта куколок дубового шелкопряда в обеих дозах не оказывало эффекта на уровень триацилглицеролов в печени (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Содержание холестерина, триацилглицеролов (мг/г) в печени крыс при моделировании инсулинорезистентности и применении экстракта куколок дубового шелкопряда ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатель	Группа животных				
	1	2	3	4	5
ХС	2,51 ± 0,22	6,11 ± 1,96 ^{1,2}	8,18 ± 2,22 ¹	5,63 ± 0,87 ^{1,2}	7,11 ± 2,60 ¹
ТГ	13,1 ± 0,42	28,9 ± 0,47 ¹	39,6 ± 0,83 ¹	40,0 ± 0,63 ¹	40,7 ± 0,78 ¹

П р и м е ч а н и е. ХС – холестерол; ТГ – триацилглицеролы.

¹P < 0,05 по сравнению с группой 1.

²P < 0,05 по сравнению с группой 3.

Содержание животных на ВЖД привело к увеличению содержания холестерина в печени: в 2,4 раза – через 2 мес, в 3,2 раза – через 3 мес диеты. Экстракт куколок дубового шелкопряда, применяемый в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела, достоверно снижал уровень холестерина в печени по сравнению с животными, находящимися на ВЖД 3 мес (табл. 1).

Усиление синтеза триацилглицеролов в печени является компенсаторным механизмом, препятствующим накоплению свободных жирных кислот, высвобождающихся при липолизе из жировой ткани, уменьшая их липотоксический эффект, связанный с нарушением функции лизосом [11]. Увеличение содержания липидов в печени может быть также обусловлено избыточным поступлением их с пищей, нарушением окисления жирных кислот и изменением экспорта триацилглицеролов из печени в составе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Для оценки синтеза и метаболизма транспортных форм липидов в печени было изучено содержание липидов в сыворотке крови.

Как следует из данных табл. 2, в сыворотке крови крыс, питавшихся ВЖД, отмечено увеличение уровня триацилглицеролов по сравнению с интактными животными, что, возможно, обусловлено усилением их синтеза и выведением из печени в составе ЛПОНП. Нарушения метаболизма этого класса липопротеинов можно связать с изменением активности липопротеинлипазы и печеночной триглицеридлипазы, регулируемой инсулином. Вероятно, увеличение синтеза триацилглицеролов происходит с большей скоростью, чем выведение из печени. Ускорение экспорта триацилглицеролов не способно нормализовать их содержание в печени. При инсулинорезистентности снижается тормозящее действие инсулина на высвобождение ЛПОНП в печени, вследствие чего нарушается баланс между ЛПОНП, поступающими из кишечника, и ЛПОНП, высвобождающимися из печени [12]. Выявлен позитивный эффект при введении экстракта куколок дубового шелкопряда в обеих применяемых дозах: концентрация триацилглицеролов, хотя и оставалась более высокой, чем у интактных животных, но достоверно уменьшилась по сравнению с уровнем триацилглицеролов в печени крыс, находящихся на ВЖД в течение 3 мес.

Таблица 2. Содержание общего холестерина, холестерина ЛПВП и триацилглицеролов (ммоль/л) в сыворотке крови крыс при моделировании инсулинорезистентности и применении экстракта куколок дубового шелкопряда ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатель	Группа животных				
	1	2	3	4	5
ОХС	2,26 ± 0,26	1,99 ± 0,33	3,24 ± 0,74 ¹	1,56 ± 0,14 ^{1,2}	1,35 ± 0,13 ^{1,2}
ХС ЛПВП	0,78 ± 0,09	0,64 ± 0,08 ¹	0,64 ± 0,11 ¹	0,81 ± 0,07 ²	0,72 ± 0,09
ТГ	0,89 ± 0,03	1,02 ± 0,03 ¹	1,22 ± 0,06 ¹	0,98 ± 0,03 ^{1,2}	1,00 ± 0,03 ^{1,2}

Примечание. ОХС – общий холестерол; ХС ЛПВП – холестерол липопротеинов высокой плотности; ТГ – триацилглицеролы.

¹ $P < 0,05$ по сравнению с группой 1.

² $P < 0,05$ по сравнению с группой 3.

В крови крыс, питавшихся ВЖД 3 мес, выявлена гиперхолестеролемиа, которая, возможно, связана с нарушением рецепторного захвата липопротеинов печенью и периферическими тканями при развитии ИР. При применении экстракта в обеих дозах отмечено достоверное снижение уровня общего холестерина в крови. Высокожировая диета вызывала снижение уровня ХС ЛПВП, что предотвращалось введением экстракта куколок дубового шелкопряда в обеих дозах.

Нарушению обмена липидов способствует изменение содержания гормонов, регулирующих энергетический обмен – инсулина и адипонектина. Известно, что при развитии стеатогепатоза только 60 % триацилглицеролов печени образуются из свободных жирных кислот, высвобождающихся при периферическом липолизе, 25 % – из вновь синтезированных жирных кислот, 15 % – из поступающих с пищей [13]. Ключевым ферментом, регулирующим синтез триацилглицеролов, является ацетил-КоА-карбоксилаза, активность которого активируется инсулином и грелином и ингибируется адипонектином. Проведенные исследования показали, что концентрация инсулина в крови крыс повышалась по мере увеличения длительности содержания животных на ВЖД: отмечалась тенденция к увеличению через 2 мес диеты и достоверное увеличение в 1,9 раза через 3 мес диеты (табл. 3).

Таблица 3. Концентрация инсулина (пмоль/л) и адипонектина (пг/мл) в сыворотке крови крыс при моделировании инсулинорезистентности и применении экстракта куколок дубового шелкопряда ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатель	Группа животных				
	1	2	3	4	5
Инсулин	91,2 ± 12,5	143,7 ± 22,2 ³	170,6 ± 13,7 ¹	122,3 ± 12,2 ²	140,7 ± 7,2 ¹
Адипонектин	8888 ± 434	7799 ± 411	7443 ± 498 ¹	7221 ± 641 ¹	7307 ± 518 ¹

¹ $P < 0,05$ по сравнению с группой 1.

² $P < 0,05$ по сравнению с группой 3.

³ $P = 0,05-0,1$ по сравнению с группой 1.

Эти результаты подтверждают данные о количественных взаимоотношениях между накоплением липидов в печени и степенью инсулинорезистентности [14]. Вероятно, при развитии ИР путь синтеза жирных кислот сохраняет чувствительность к инсулину, что усиливает накопление триацилглицеролов в печени. Экстракт куколок дубового шелкопряда в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела снижал уровень инсулина в крови до значений интактных животных.

В сыворотке крыс, содержащихся на ВЖД 3 мес, выявлено снижение содержания адипонектина. Показано, что низкая концентрация адипонектина коррелирует с высоким содержанием липидов в печени и нарушением метаболизма хиломикронов и ЛПОНП [15]. Не обнаружено позитивного эффекта экстракта куколок дубового шелкопряда на данный показатель.

При проведении корреляционного анализа, установлено, что между уровнями холестерина и инсулина существует практически полная линейная корреляционная связь ($r = 0,96$) и сильная корреляционная связь между содержанием триацилглицеролов и инсулина ($r = 0,73$); между уровнем липидов и адипонектина – обратная корреляционная связь, более выраженная с концентрацией триацилглицеролов ($r = -0,99$) по сравнению с концентрацией холестерина ($r = -0,85$). Корреляционные отношения между гормонами и липидами сыворотки крови составили: триацилглицеролы/инсулин – $r = 0,93$, холестерол/инсулин – $r = 0,40$, холестерол ЛПВП/инсулин – $r = -0,80$, триацилглицеролы/адипонектин – $r = -0,54$, холестерол/адипонектин – $r = 0,22$, холестерол ЛПВП/адипонектин – $r = 0,19$.

Как известно, для синтеза высших жирных кислот и холестерина необходим никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный (НАДФН), источником которого в организме является пентозофосфатный путь распада глюкозы и действие малик-фермента. При содержании животных на ВЖД выявлено снижение активности ферментов пентозофосфатного пути – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (табл. 4). Это может быть обусловлено повышением концентрации глюкозы в кровотоке при ИР и уменьшением ее содержания в печени. Поэтому возможно, что основным источником НАДФН для синтеза холестерина и жирных кислот при развитии ИР является реакция, катализируемая малик-ферментом. Введение экстракта куколок дубового шелкопряда не изменило активности исследуемых ферментов.

Т а б л и ц а 4. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (мкмоль НАДФ·г⁻¹·ч⁻¹ при 37 °С) в печени крыс при моделировании инсулинорезистентности и применении экстракта куколок дубового шелкопряда ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатель	Группа животных				
	1	2	3	4	5
Г-6-ФДГ	163,7 ± 60,6	51,5 ± 22,7 ¹	47,2 ± 35,3 ¹	37,4 ± 18,8 ¹	48,8 ± 34,8 ¹
6-ФГ ДГ	156,9 ± 28,3	114,1 ± 31,6 ¹	78,1 ± 21,8 ¹	86,4 ± 39,4 ¹	91,2 ± 24,0 ¹

П р и м е ч а н и е. Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 6-ФГ ДГ – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа.

¹ $P < 0,05$ по сравнению с группой 1.

Заключение. Экстракт куколок дубового шелкопряда оказывал позитивное действие на обмен липидов при моделировании инсулинорезистентности: снижалось содержание холестерина в печени, триацилглицеролов и холестерина в сыворотке крови, повышался уровень холестерина ЛПВП. Кроме того, отмечалось уменьшение содержания инсулина в сыворотке крови. Наибольший эффект проявлялся при введении экстракта в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела. Данный результат может быть обусловлен содержанием в экстракте куколок дубового шелкопряда антиоксидантов, поскольку известна связь между окислительным стрессом, проявлением инсулинорезистентности и развитием стеатогепатоза.

Литература

1. Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты / Под ред. И. И. Демидова, Г. А. Мельниченко. М., 2004. С. 48–62.
2. Г и н з б у р г М. М., К о з у п и ц а Г. С. // Пробл. эндокринологии. 1996. Т. 42, № 6. С. 30–34.

3. Marchesini G., Brizi M., Bianchi G. et al. // *Diabetes*. 2001. Vol. 50. P. 1844–1850.
4. Sanyal A. J., Campbell-Sargent C., Mirshahi F. et al. // *Gastroenterology*. 2001. Vol. 120. P. 1183–1192.
5. Mendez-Sanchez N., Arrese M., Zamora-Valdes D. et al. // *Liver International*. 2007. Vol. 9. P. 1157–1165.
6. Трокоз В. А., Аретинская Т. Б., Трокоз Н. В. // 2 Всерос. конф. по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных: Сб. тез. М., 2006. С. 21–28.
7. Чиркин А. А., Коваленко Е. И., Шейбак В. М. // Уч. зап. «УО ВГУ им. П. М. Машерова». Витебск, 2007. Т. 6. С. 247–265.
8. Yamamoto M., Iwasa M., Iwata K. et al. // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007. Vol. 22, № 4. P. 498–503.
9. Braodon J. H. // *Lipids and steroid hormones in clinical medicine*. 1960. Vol. 2. P. 78–83.
10. Захарин Ю. Л. // *Лаб. дело*. 1967. № 6. С. 327–330.
11. Feldstein A. E., Werneburg N. W., Canbay A. et al // *Hepatology*. 2004. Vol. 40. P. 185–190.
12. Fabbrini E., Mohammed B. S., Magkos F. et al. // *Gastroenterology*. 2008. Vol. 134, № 2. P. 424–431.
13. Alner P., Bolinder J., Engfeldt P. et al. // *J. Clin. Invest.* 1984. Vol. 73. P. 673–680.
14. Samuel V. T., Liu Z. X., Qu X. et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 32345–32353.
15. Kotronen A., Seppälä-Lindroos A., Bergholm R., Yki-Järvinen H. // *Diabetologia*. 2008. Vol. 52, № 1. P. 130–138.

O. M. BALAEVA-TICHOMIROVA, E. O. DANCHENKO, E. E. NARUTA

**THE EFFECT OF OAK SILKWORM PUPAE (ANTHERAEA PERNYI)
EXTRACT ON DEVELOPMENT OF HEPATIC STEATOSIS AT MODELLING OF INSULIN RESISTANCE**

Summary

The development of hepatic steatosis was found is associated with of insulin resistance in experiment. It was characterized by accumulation of triacylglycerols and cholesterol in a liver. Disturbance of lipid metabolism was accompanied by change of level of hormones which regulate of energy exchange: insulin concentration increased and adiponectin concentration decreased. The extract of oak silkworm pupae in a doze 7 mkg of free amino acids/100 g of body weight provided positive effect on a lipid metabolism in insulin resistance: the content of cholesterol in a liver, triacylglycerols and cholesterol in blood serum decreased, the level of HDL cholesterol increased, the concentration of insulin normalized up to value of intact animals. This effect may be caused by antioxidant properties of an extract of oak silkworm pupae.

УДК 611.65.651-013.9:614.87/876]599.323.4

Е. Ф. КОНОПЛЯ¹, В. С. ПАВЛЕНКО¹, Н. В. БАНЕЦКАЯ²

**ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ
НА МОРФОЛОГИЮ ЯИЧНИКОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ
ПОЛЕССКОГО РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАПОВЕДНИКА**

¹Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, e-mail:valen-pavlenko@yandex.ru,

²Белорусский государственный университет физической культуры, Минск, e-mail:ka@sportedu.tut.by

(Поступила в редакцию 22.03.2010)

Введение. Проблема развития отдаленных биологических эффектов длительного действия ионизирующей радиации (ИР) привлекает пристальное внимание ученых и клиницистов [5]. Среда обитания с повышенным радиоактивным фоном может оказывать существенное влияние на морфофункциональное состояние внутренних органов в ряду поколений [4, 6, 11]. Особенно значимым является изучение вопроса о последствиях облучения половых желез, в том числе и яичников, у потомства. В литературе недостаточно изучен вопрос о длительном влиянии комплекса радиоэкологических факторов зоны отчуждения Чернобыльской АЭС на морфофункциональное состояние яичника в поколениях.

Обнаружено проявление различных отклонений в развитии потомства у родителей, овоциты которых на созревающих и постмейотических стадиях подверглись однократному облучению в больших [7–9] и малых [10, 15] дозах.

Ранее нами [1, 2] были выявлены отдаленные последствия внешнего пролонгированного облучения в малых дозах не только в развитии самих зародышей крыс, но и в морфофункциональном состоянии яичника потомства первого поколения. В литературе [12] известно положение о том, что наиболее чувствительными к действию ИР являются овоциты на ранних стадиях созревания, а наибольшей генетической радиопоражаемостью обладают зрелые яйцеклетки. Однако в условиях действия длительного облучения в малых дозах овоциты на стадиях примордиальных фолликулов (1-3а) могут пережить это воздействие и обуславливать развитие отдаленных последствий в ряду поколений.

Цель работы – изучить особенности структуры яичника у крыс потомства первого поколения, внутриутробное развитие которого, как и содержание его родителей, проходило в условиях действия комплекса радиоэкологических факторов зоны отчуждения ЧАЭС.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на беспородных лабораторных крысах. Экспериментальные животные – 300 самок и 90 самцов – в половозрелом (3 мес) возрасте были размещены в Полесском радиационно-экологическом заповеднике (зона отчуждения ЧАЭС, реперная точка Массаны). Животных содержали в данных условиях на протяжении 124 сут. В качестве корма использовали продукты, выращенные в условиях радиоактивного загрязнения. Мощность эквивалентной дозы излучения в реперной точке, где содержались животные, составляла в среднем 5 мкЗв/ч, а суммарная эквивалентная доза – 0,01704 Зв. Плотность загрязнения почвы радионуклидами в этом месте достигала: по ¹³⁷Cs – 1890,00 кБк/м², ⁹⁰Sr – 238,00 кБк/м², ^{239,240}Pu – 3,78 кБк/м², ²³⁸Pu – 1,75 кБк/м², ²⁴¹Am – 5,67 кБк/м². В конце срока содержания (за 20 дней) животные были спарены (свободное спаривание) и перед родами были возвращены в виварий Института радиобиологии НАН Беларуси. В результате эксперимента было получено потомство, первое поколение (F₁). В условиях вивария потомство F₁ продолжало полу-

чать радиоактивный корм, удельная активность которого была 275–757 Бк/кг. Удельная активность ^{137}Cs в тушках животных F_1 в неполовозрелом (30 сут) возрасте составляла 0,220 кБк/кг, а в зрелом (180 сут) возрасте – 0,142 кБк/кг. У F_1 поглощенная доза рассчитывалась начиная с момента рождения животных. Суммарная поглощенная доза внутреннего облучения от инкорпорированного ^{137}Cs у потомства F_1 в неполовозрелом и зрелом возрасте равнялась соответственно $2,90 \cdot 10^{-5}$ Гр и $3,20 \cdot 10^{-5}$ Гр. Расчеты поглощенной дозы на F_1 проводили сотрудники лаборатории радиоэкологии Института радиобиологии НАН Беларуси.

Из каждого помета полученного потомства F_1 было отобрано по одному крысенку. Животных (F_1 и контрольных; $n = 8$) декапитировали на 30-е и 180-е сутки постнатальной жизни. У животных зрелого возраста (180 сут) определяли стадию проэструс-эструс по влагалищным мазкам. Контролем служили крысы соответствующего возраста, содержащиеся в стандартных условиях вивария.

Из брюшной полости животных выделяли яичники. Определяли некоторые соматометрические параметры (массу тела крыс, абсолютную и относительную массу яичников).

Для проведения гистологических исследований яичники (правый) помещали в фиксатор Буэна, затем обезжовивали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин. Серии срезов через весь орган толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Для определения динамики фолликулогенеза по всему объему органа подсчитывали количество фолликулов на различных стадиях развития согласно О. В. Волковой и Т. Г. Боровой [3]. В каждом пятом срезе яичника зрелых животных считали фолликулы на стадиях 3б-8, а у неполовозрелых – на стадиях 3б-7, имеющих максимальное поперечное сечение. Маркером наибольшего сечения служило ядрышко овоцита. Фолликулы на стадии 1-3а подсчитывали в каждом десятом срезе (маркером наибольшего сечения служило ядро овоцита) с пересчетом их абсолютного числа по формуле Аберкромби [3].

Атретические тела определяли в каждом пятом срезе, количество желтых тел – в срединном срезе. Фолликулы считали атретическими при наличии выраженных дегенеративных признаков: дистрофически измененных клеток зернистого слоя с пикнотическими ядрами, лейкоцитов в стенке фолликулов, вакуолизации овоцита.

В общее количество генеративных элементов включали фолликулы на всех стадиях, а также атретические и желтые тела.

При статистической обработке использовали t -критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что относительная масса яичников потомства F_1 в исследованные возрастные периоды существенно не отличается от ее значений у контрольных животных (табл. 1). Другие авторы [16] также не выявили изменений относительной массы яичника, несмотря на изменение структуры органа облученного потомства.

Т а б л и ц а 1. Соматометрические показатели (масса тела, абсолютная и относительная массы яичников) у потомства первого поколения (F_1)

Условия эксперимента	Возраст, сут	Масса крысы, г	Абсолютная масса яичников, мг	Относительная масса яичников, %
Контроль	30	31,60 ± 3,00	16,00 ± 0,77	0,046 ± 0,002
F_1	30	35,70 ± 2,00	14,90 ± 0,54	0,043 ± 0,003
Контроль	180	221,00 ± 11,00	66,40 ± 5,20	0,030 ± 0,002
F_1	180	202,00 ± 3,00	60,00 ± 5,80	0,030 ± 0,002

При исследовании динамики фолликулогенеза в яичнике потомства F_1 обнаружены определенные морфофункциональные нарушения.

В яичнике животных F_1 в неполовозрелом (30 сут) возрасте на 40 % ($P < 0,05$) уменьшается количество примордиальных фолликулов (табл. 2). Фолликулы на данной стадии составляют резервный фонд женских половых клеток. Известно, что чувствительность клеток к действию радиоактивного излучения зависит от их пролиферативной активности. Поскольку половые клетки (овогонии) крыс в эмбриогенезе активно делятся, то, вероятнее всего, большая часть их погибла именно в этот период развития. Это и отразилось на фонде сформировавшихся примордиальных фолликулов.

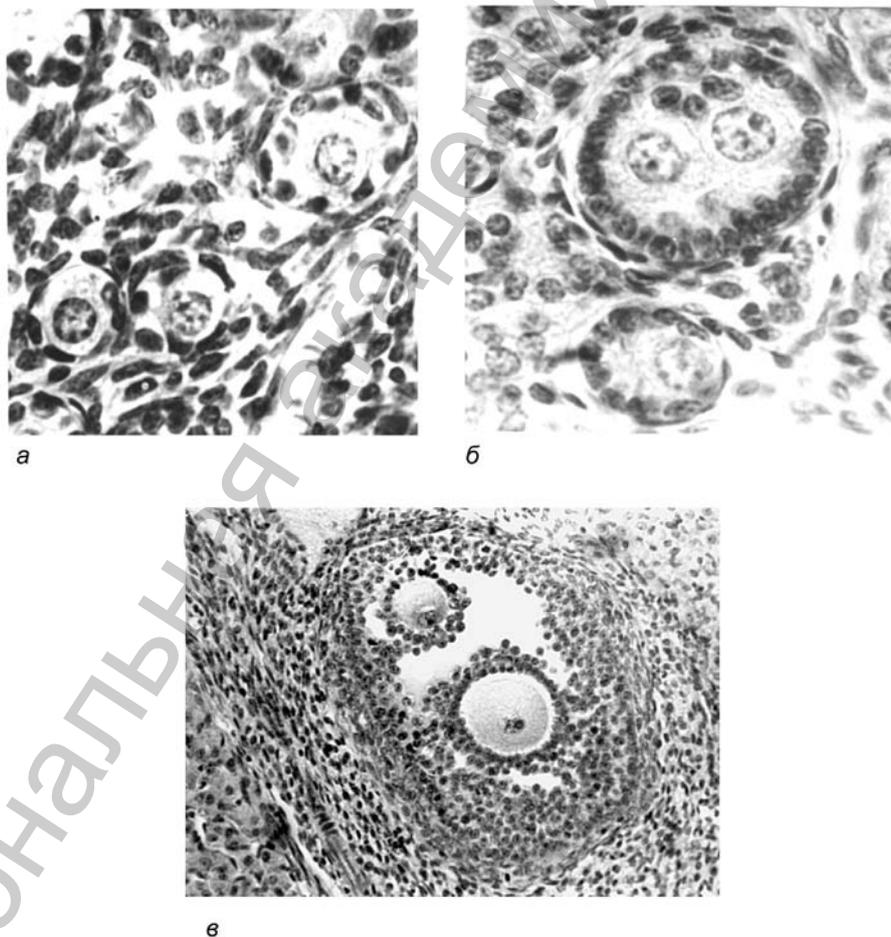
Т а б л и ц а 2. Количество фолликулов в яичнике крыс первого поколения (F₁) в неполовозрелом (30 сут) и зрелом (180 сут) возрасте

Стадии развития фолликулов	Контроль, 30 сут	F ₁ , 30 сут	Контроль, 180 сут	F ₁ , 180 сут
Примордиальные фолликулы (1-3а)	1584 ± 160	954 ± 167*	701 ± 151	674 ± 87
Средние (3б-5а)	134 ± 42	121 ± 20	65 ± 8	89 ± 16
Крупные (5б-8)	181 ± 63	195 ± 27	46 ± 10	95 ± 16*
Крупные дегенерирующие	38 ± 4	41 ± 9	12 ± 1	38 ± 5*
Атретические тела	182 ± 31	284 ± 57	43 ± 9	55 ± 14
Желтые тела			12 ± 1	16 ± 3
Всех генеративных элементов	2120 ± 194	1596 ± 243	896 ± 159	967 ± 87

*Статистически достоверно по сравнению с контролем при $P < 0,05$.

Количество фолликулов на других стадиях созревания в яичнике неполовозрелых животных F₁ не отличается от контрольных значений. Они доходят до седьмой стадии развития, а затем дегенерируют. По сведениям некоторых авторов [16, 18], после гибели значительной части половых клеток в яичнике животных, облученных в период эмбриогенеза в дозе 1,5 Гр, процесс фолликулогенеза в ранние сроки постнатального онтогенеза может быть задержан. Однако это не влияло на момент наступления полового созревания животных. В дальнейшем, к зрелому возрасту, происходило угнетение репродуктивной функции.

Характерно, что в яичнике неполовозрелых животных F₁ обнаружены фолликулы, содержащие по две яйцеклетки – полиовулярные фолликулы (рисунок, б). Они составляют 0,5 % от об-



Фолликулы яичника контрольных животных (а) и потомства крыс первого поколения в неполовозрелом (б) и зрелом (в) возрасте: а – примордиальные фолликулы; б, в – полиовулярные фолликулы. Гематоксилин-эозин. Ок. 10, об. 40

шего количества исследуемых структур. В яичнике контрольных животных аналогичного возраста подобные структуры не выявлены.

При изучении структуры яичника F_1 в более отдаленный период наблюдения (180 сут) выявлено развитие деструктивных изменений в фолликулах на более поздних стадиях созревания. Достоверно увеличено количество крупных гормонозависимых фолликулов, однако основная часть их дегенерирует ($P < 0,05$). Некоторые персистирующие фолликулы довольно крупных размеров с полостью, заполненной жидкостью. В других – образуются кисты. Фолликулярные кисты обнаружены в яичнике у 80 % животных потомства F_1 . Выявлены также кисты желтого тела. Подобные изменения, характеризующие сложные эндокринные и метаболические нарушения в организме, связаны с гормональной регуляцией процесса фолликулогенеза. Они являются одной из самых частых причин прекращения овуляций у женщин репродуктивного возраста [13].

Различные структуры (желтые тела, мозговое вещество, интерстициальная ткань) яичника животных F_1 в отдаленный срок наблюдения интенсивно инфильтрированы клеточными элементами крови. Как и у неполовозрелых животных, в органе потомства F_1 в зрелом возрасте обнаружены полиовулярные фолликулы на разных стадиях созревания (рисунок, в). Такие структуры составляют 1,0 % от общего количества фолликулов. У контрольных животных аналогичного возраста полиовулярные фолликулы не выявлены.

Формирование полиовулярных фолликулов наблюдали в яичнике других животных [20]. Подобные образования встречаются также в яичнике женщин в разные возрастные периоды [19]. Гипотетически этиология формирования таких структур в разные возрастные периоды может отличаться [14, 17, 19]. Предполагается, что механизм образования полиовулярных фолликулов заключается либо в слиянии нескольких, либо в нарушении процессов формирования зернистого слоя овоцитов на ранних этапах их созревания.

Заключение. Комплекс радиозэкологических факторов зоны отчуждения ЧАЭС негативно влияет на структуру яичника потомства первого поколения. В неполовозрелом возрасте (30 сут) это проявляется уменьшением части фонда половых клеток, а в отдаленный период (180 сут) – дегенерацией фолликулов и формированием кист.

Литература

1. Банецкая Н. В., Павленко В. С., Амвросьев А. П. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. Вып. 3. С. 250–253.
2. Банецкая Н. В., Павленко В. С., Амвросьев А. П. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43, № 6. С. 113–117.
3. Волкова О. В., Боровая Т. Г. // АГЭ. 1990. Т. 99. Вып. 11. С. 81–84.
4. Ермакова О. В. Структурные перестройки периферических эндокринных желез мышевидных грызунов в условиях хронического облучения в малых дозах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2008.
5. Конопля Е. Ф., Тимохина Н. И., Никитин А. Н. и др. // Радиация и Чернобыль: Ближайшие и отдаленные последствия (Радиация и Чернобыль. Т. 4). Гомель, 2007. С. 3–18.
6. Лягинская А. М., Осипов В. А., Овдиенко Н. И. // Актуальные проблемы ионизирующего облучения на репродуктивную функцию. Обнинск, 1992. С. 44–45.
7. Нефедов И. Ю., Палыга Г. Ф., Нефедов И. Ю. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. Вып. 3. С. 370–374.
8. Нефедов И. Ю., Палыга Г. Ф. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. Вып. 3. С. 375–380.
9. Нефедов И. Ю. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. Вып. 3. С. 381–387.
10. Палыга Г. Ф., Домбровский А. В., Лепехин Н. П. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39, № 4. С. 384–387.
11. Сокур Т. Н., Цыбульская И. С., Малышева В. А. // Актуальные проблемы влияния ионизирующего излучения на репродуктивную функцию. Обнинск, 1992. С. 1–3.
12. Шахдинарова Л. В. Радиочувствительность овоцитов млекопитающих в онтогенезе и ее модификация мексамином и гипоксической гипоксией: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Обнинск, 1989.
13. Franks S. // Arch. Dis. Child. 1997. Vol. 77. P. 89–90.
14. Iguchi T., Takasugi N. // Anat. and Embriol. 1986. Vol. 175, N 1. P. 53–55.
15. Max C. // Hereditas. 1977. Vol. 85, N 2. P. 199–206.

16. Mazaud Guittot S., Guigon C. J., Lozach A. et al. // Endocrinology. 2002. Vol. 143, N. 12. P. 4775–4787.
17. Mazaud Guittot S., Guigon C. J., Coudouel N., Magre S. // Biology of Reproduction, 2006. Vol. 75, N 5. P. 749–759.
18. Meijs-Roelofs H. M. A., van Cappellen W. A. et al. // Endocrinology 1990. Vol. 124. P. 247-253.
19. Papadaki L. // Fertil. Steril. 1978. Vol. 29, N 3. P. 342–350.
20. Szollosi D. // Cell Tissue Res. 1978. Vol. 191, N 1. P. 115–119.

E. F. KONOPLYA, V. S. PAVLENKO, N. V. BANETSKAYA

**INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON THE MORPHOLOGY
OF THE OVARY IN THE POLESSIE RADIATION-ECOLOGICAL RESERVE**

Summary

Structural changes of the first posterity are clearly recognized in ovary tissue of prenatal and postnatal evolution was taking in conditions under the influence of radiological factors. It is obvious that destructive processes in ovary tissues (degeneration and cystic degeneration of follicles) become apparent with the animals' age increase.

УДК 616.591-018.23.08

*И. Е. ГУРМАНЧУК, О. В. ПЕТРАКОВА, Л. А. ХВАТОВА,
Е. Н. НОВИЧЕНКО, А. Н. ХАРЛАМОВА, Е. В. СОКОЛОВСКАЯ*

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, e-mail: Petrakava@open.by

(Поступила в редакцию 12.05.2010)

Введение. Клеточные культуры находят все более широкое применение в разных областях биологии и медицины. Если ограничиться рассмотрением кожи, то общим подходом, лежащим в основе этого раздела регенеративной медицины, является использование клеток кожи человека: кератиноцитов, фибробластов, меланоцитов и их комбинаций для лечения тяжелых повреждений кожных покровов [1–4]. Проводимые в мире исследования подтверждают, что разработанные и применяемые дермальные, эпидермальные и комбинированные трансплантаты позволяют повысить эффективность лечения таких заболеваний, как трофические язвы, длительно незаживающие раны, свищи различной природы, тяжелые ожоги и другие заболевания [5].

В последние годы активно ведется разработка и внедрение бессывороточных сред для культивирования клеток. Чаще всего эти среды узко специализированы, т.е. предназначены для определенного типа клеток. Бессывороточные среды имеют определенные преимущества: улучшение воспроизводимости результатов опыта вследствие большей стабильности состава среды; снижение риска заражения культуры вирусами, грибами, микоплазмами и др. Таким образом, разработка технологии культивирования клеток человека и, в частности, клеток кожи с использованием компонентов с известным составом является важной практической задачей.

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ эффективности культивирования кератиноцитов кожи человека с использованием двух типов специализированных сред: бессывороточной и содержащей эмбриональную телячью сыворотку.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета при участии специалистов Республиканского ожогового центра при больнице Скорой медицинской помощи г. Минска. В работе были использованы остатки кусочков кожи, забор которой проводился с целью выполнения аутодермопластики больной (женщина, 36 лет), проходившей лечение в Республиканском ожоговом центре по поводу термических ожогов.

Для работы были использованы следующие питательные среды, ферменты и реагенты: диспаза II (Sigma, США), трипсин (Sigma, США), ЭДТА (Helicon, Россия), среда MCDB 153 (Sigma, США), человеческий рекомбинантный эпидермальный ростовой фактор (hEGF) (Sigma, США), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), инсулин (Sigma, США), гидрокортизон (Alfa Aesar, США), экстракт гипофиза коров (Sigma, США), специфическая культуральная среда Difened Keratinocyte SFM (Gibco, США), пластиковые флаконы для культивирования клеток (Greiner bio-one, Германия), растворы аминокислот (гистидин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, тирозин) (Fresenius-Kabi, Германия), растворы антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) (РУП «Белмедпрепараты», РБ).

После получения кожу обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II в концентрации 2,4 ЕД/мл в течение 18 ч при 4 °С, после чего механически отделяли эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток эпидермиса его ножницами измельчали до кусочков размером 2–3 мм и помещали в раствор трипсина и ЭДТА. Под действием ферментов межклеточные связи разрушались и кератиноциты высвобождались в среду либо в виде единичных клеток, либо в виде агрегатов, которые состояли из разного количества (от 2–5 до 20–30) клеток. Полученные клетки осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин), после чего осадок ресуспендировали в соответствующей питательной среде. С использованием камеры Горяева оценивали количество выделенных клеток, их жизнеспособность (по исключению трипанового синего), которая составила 75 %. После дезагрегации полученную из эпидермального слоя кожного образца суспензию клеток вносили в пластиковые культуральные флаконы, покрытые коллагеном. Суспензию клеток готовили с использованием той питательной среды, в которой проводили их дальнейшее выращивание, при посеве учитывали количество жизнеспособных клеток на единицу площади флакона. Флаконы помещали в инкубатор в условия 37 °С и 5 % CO₂. Ростовую среду во флаконе с культивируемыми клетками меняли каждые 3–4 дня. Культуры кератиноцитов выращивали в одинаковых температурных и атмосферных условиях, при одинаковой посевной дозе на единицу площади культурального флакона (использовали флаконы площадью 25 см²). Посевная доза клеток составила 250 тыс/мл. После заполнения культурой необходимой площади покрытия флакона осуществляли снятие образовавшегося клеточного монослоя и пересев культуры.

В работе проведен сравнительный анализ эффективности культивирования эпидермальных кератиноцитов человека с использованием двух типов специализированных питательных сред. Первый вариант питательной среды: среда MCDB 153 с добавлением эпидермального фактора роста, инсулина, гидрокортизона, экстракта гипофиза крупного рогатого скота, аминокислот, антибиотиков. Для улучшения ростовых качеств среды вносили эмбриональную телячью сыворотку (10 %). Второй вариант питательной среды: бессывороточная среда Difened Keratinocyte SFM (DK SFM) и стандартная добавка к ней.

Наблюдение за ростом и формированием колоний кератиноцитов проводилось ежедневно под микроскопом в условиях фазового контраста. Особенности роста клеточной культуры регистрировали с помощью цифровой фотокамеры микроскопа Olympus (Япония) на разные сутки культивирования, учитывая использованные варианты применяемых питательных сред и ростовых факторов. Микроскопию культур и учет результатов проводили в одно и то же время.

Результаты и их обсуждение. Питательная среда MCDB 153 была специально разработана для обеспечения клонального и длительного роста эпидермальных кератиноцитов человека без добавления эмбриональной сыворотки. Она является модификацией среды MCDB 151 с дополнительным внесением таких микроэлементов, как селен, олово, кремний, никель, молибден, магний, ванадий и со значительным увеличением концентрации меди, железа и цинка [6]. Уровень хлорида кальция в этой среде – 0,03 мМ. Питательная среда DK SFM представляет собой среду, в состав которой входят подготовленные производителем эпидермальный фактор роста, инсулин и фактор роста фибробластов. Отличительной особенностью этой питательной среды является то, что благодаря своему составу она не требует внесения экстракта гипофиза коров. Более точный состав среды не расшифровывается производителем в спецификации. Уровень хлорида кальция в этой среде – 0,1 мМ. Кальций – важный фактор, регулирующий адгезию, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов, и, согласно составу использованных сред, они значительно отличаются по содержанию этого элемента.

Дезагрегация ткани и получение жизнеспособных клеток является первым и весьма важным этапом технологии. Дальнейшая эффективность культивирования кератиноцитов во многом зависит от того, как была выполнена эта процедура. Замечено, что длительная обработка ферментами приводит к резкому снижению жизнеспособности кератиноцитов, в результате чего клетки плохо прикрепляются к культуральному флакону, а на формирование многослойного пласта может потребоваться очень большое время или же он вообще может не сформироваться.

При обработке эпидермального слоя кожи с использованием метода дезагрегации ткани в растворах ферментов и хелатирующих агентов с целью выделения кератиноцитов и их пред-

шественников получаемая популяция всегда гетерогенна и состоит из базальных клеток и клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Ранее было показано [7], что при использовании специальных питательных сред, характеризующихся присутствием ряда специфических компонентов, в том числе низким содержанием кальция, к поверхности сосуда для культивирования прочно прикрепляются главным образом клетки базального слоя эпидермиса, а также некоторые клетки супрабазального слоя. Подобную реакцию со стороны клеток наблюдали и мы, когда во время первой смены питательной среды количество клеток, находящихся в суспензии составляло до 90 % от общего числа клеток, внесенных во флакон. При этом жизнеспособность их составляла не более 5 %. Это свидетельствует о том, что неприкрепившиеся к субстрату в течение этого времени клетки уже на момент выделения из кожи находились в состоянии терминальной дифференцировки и не были способны к адгезии и дальнейшей пролиферации в условиях *in vitro*.

Так же как и *in vivo*, в культуре *in vitro* происходит постоянное обновление клеточной популяции за счет стволовых клеток, пролиферация транзиторно амплифицирующихся клеток, созревание и необратимая дифференцировка постмитотических дифференцирующихся клеток, сопровождающаяся их выходом в среду, в которой ведется культивирование. Баланс между дифференцировкой и пролиферацией зависит от множества факторов: стадии развития клетки и ее способности к пролиферации, состава ростовой среды (присутствия сыворотки, гормонов, факторов роста, микроэлементов), взаимодействия с белками внеклеточного матрикса, плотности монослоя и др.

После внесения полученной клеточной суспензии в культуральные флаконы в течение 48 ч кератиноциты прикреплялись и распластывались на поверхности подложки, после чего начинали активно делиться формируя колонии из 4–5 клеток (рис. 1, А).

После наиболее критичных этапов (прикрепления к субстрату и индукции пролиферации) начинается активное размножение клеток, проявляющееся в росте их количества в колонии и увеличении ее размера. На этапе пролиферации уже хорошо проявляются отличия в поведении клеток при культивировании в различных средах. В среде MCDB 153 на 4-е сутки культивирования после смены питательной среды клетки были представлены четко ограниченными колониями, состоящими из 20–40 клеток (рис. 1, Б). В ряде случаев эти колонии имели характерную звездчатую форму, а в центре многих из них обнаруживались конгломераты клеток,

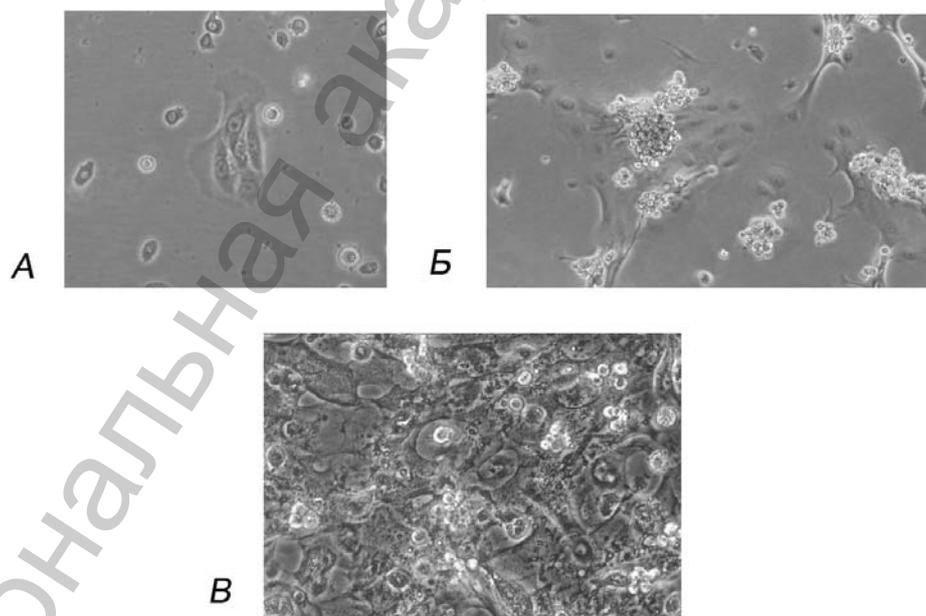


Рис. 1. Культура кератиноцитов кожи человека при культивировании в среде MCDB 153 (фазово-контрастная микроскопия): А – колония на 2-е сутки культивирования (ув.×400); Б – колонии на 4-е сутки культивирования (ув.×100); В – культура на 7-е сутки в период образования монослоя (ув.× 200)

возвышающиеся над поверхностью колонии и представляющие собой, по-видимому, группы дифференцирующихся клеток.

При одинаковой посевной дозе по сравнению со средой MCDB 153 на единицу площади флакона при культивировании в среде DK SFM клетки проявили себя менее активным образованием колоний и отсроченным формированием монослоя. Однако при этом небольшие образующиеся колонии были распределены более равномерно по площади культурального флакона (рис. 2, А).

Как видно из представленных рис 1, Б и 2, А, на 4-е сутки культивирования в средах MCDB 153 и DK SFM морфология клеток значительно отличается.

В среде MCDB 153 адгезированные клетки в значительной степени отличаются морфологически – единичные клетки округлой формы и вытянутые клетки неправильной формы, ограничивающие или направляющие собой, чаще всего, зоны размножения других клеток. Ранее авторами было показано [8], что частота деления кератиноцитов возрастает с увеличением степени их распластывания. Возможно, что в значительной степени распластанные клетки могут улавливать больше молекул ростовых факторов и поглощать больше питательных веществ благодаря своей большей поверхности. В крупных клетках неправильной звездчатой формы обнаруживались вакуоли, которые, по всей видимости, свидетельствуют о высокой секреторной активности этой популяции клеток. Кроме адгезированных клеток в среде MCDB 153 в отличие от среды DK SFM обнаруживалось большое число клеточных конгломератов округлой формы, расположенных главным образом над центрами пролиферации колонии клеток и непрочного закрепленных с ними. По всей вероятности, неадгезированные клетки представляют собой дифференцированные клетки, потерявшие способность к адгезии и ставшие на путь терминальной дифференцировки.

В отличие от среды MCDB 153 в среде DK SFM на 4-е сутки культивирования после смены питательной среды число присутствующих во флаконе клеток было значительно меньше, однако практически все они были адгезированы к поверхности. Отсутствовали большие колонии пролиферирующих клеток, а их количество в колонии составляло в среднем от 3 до 10 клеток. Клетки были распределены равномерно и морфологически были однородны. Обнаруживалось большое количество крупных клеток неправильной звездчатой формы с большим числом вакуолей, которые, как свидетельствует морфология культуры кератиноцитов в среде MCDB 153, являются ключевыми в образовании пролиферирующих колоний.

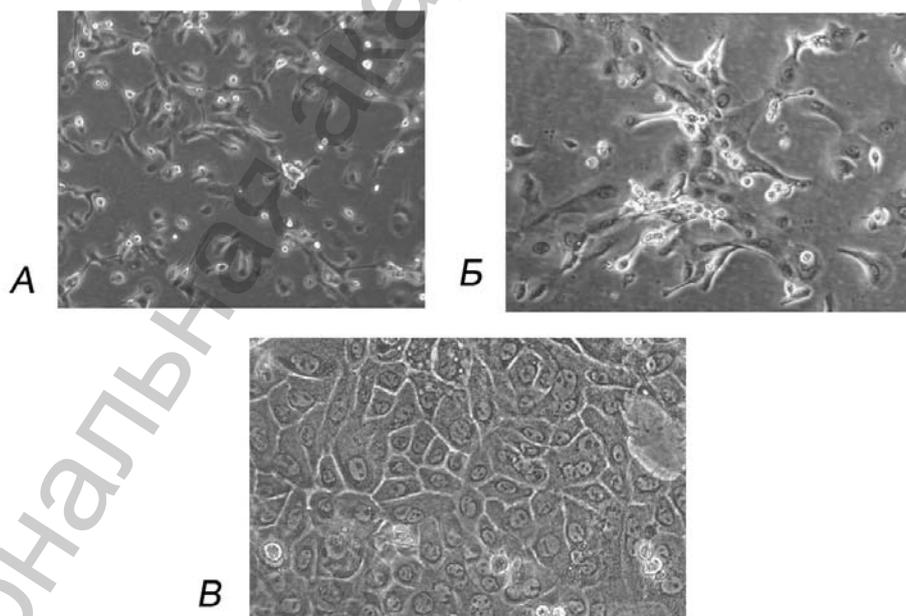


Рис. 2. Культура кератиноцитов кожи человека при культивировании в среде DK SFM (фазово-контрастная микроскопия): А – колонии на 4-е сутки культивирования (ув.×100); Б – колонии на 7-е сутки культивирования (ув.×200); В – культура на 17-е сутки в период образования монослоя (ув.×400)

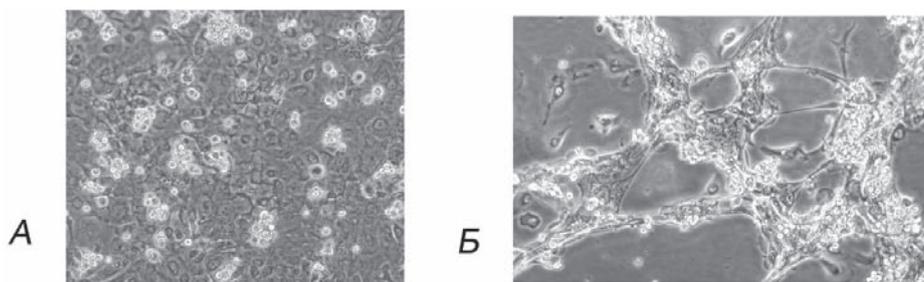


Рис. 3. Культура кератиноцитов кожи человека при культивировании в среде MCDB 153 в повышенной посевной дозе (фазово-контрастная микроскопия): *А* – культура на 4-е сутки культивирования (ув. $\times 100$); *Б* – самопроизвольно открепившаяся от поверхности флакона культура на 7-е сутки культивирования (ув. $\times 100$)

На 7-е сутки культивирования, в среде MCDB 153 регистрировалось интенсивное слияние колоний между собой с формированием монослойной культуры, а также активная дифференцировка клеток и открепление их от поверхности культурального флакона, что свидетельствует о переходе большого числа кератиноцитов к терминальной дифференцировке (рис. 1, *Б*).

В отличие от среды MCDB 153 в среде DK SFM на 7-е сутки культивирования не наблюдалось образования монослоя, однако сохранялась достаточно высокая пролиферативная активность клеток и низкая интенсивность их дифференцировки, которая проявлялась главным образом в зонах активной пролиферации клеток. Клетки были расположены равномерно, регистрировалось образование колоний среднего размера (рис. 2, *Б*). Так же как и на 4-е сутки культивирования, обнаружилось значительное количество крупных клеток неправильной звездчатой формы с большим числом вакуолей, чаще всего, являвшихся центром образующейся колонии клеток. Регистрировался переход небольшого количества клеток в суспензию.

В отличие от среды MCDB 153 при культивировании в среде DK SFM сформированный монослой клеток был получен с задержкой в 10 дней, однако он был более равномерный, составляющие его клетки были более однородны, а в целом культура характеризовалась менее интенсивным откреплением клеток от поверхности флакона, а также наличием многослойных зон без признаков открепления клеток (рис. 2, *Б*).

Дополнительный анализ показал, что большое значение имеет посевная доза клеток, вносимых в культуральный флакон. Количество клеток является важным и определяющим фактором интенсивности их роста. Так, при увеличении посевной дозы в 2 раза (до 500 тыс/мл) при использовании среды MCDB 153 уже на 4-е сутки культивирования был получен почти сформированный монослой с элементами многослойных дифференцированных зон (рис. 3, *А*). Такая высокая скорость пролиферации, по всей видимости, связана с активным взаимодействием клеток при внесении их в высокой посевной дозе. Это взаимодействие происходит как посредством прямых клеточных контактов, так и путем продукции кератиноцитами регуляторных ростовых факторов, концентрация которых в среде увеличивается пропорционально количеству продуцирующих их клеток.

Однако, несмотря на возможность получения интенсивно пролиферирующей монослойной культуры путем увеличения посевной дозы клеток в связи с их высокой активностью достаточно сложно соблюсти необходимые сроки снятия монослоя клеток с флакона. В результате чего возможна потеря культуры в связи с ее самопроизвольным откреплением. Так, оказалось, что даже небольшое превышение длительности нахождения интенсивно пролиферирующей культуры кератиноцитов во флаконе без своевременного ее пересева приводит к интенсивному, волнообразному откреплению клеток от поверхности культурального флакона и их гибели (рис. 3, *Б*).

Заключение. Применение питательной среды MCDB 153 с внесением необходимых стимуляторов и ростовых факторов обеспечивает быстрое формирование отдельных пролиферирующих колоний клеток и высокую скорость их пролиферации по сравнению со средой DK SFM. В описанных условиях полное заполнение флакона и образование монослоя наблюдается на 8–7-е сутки с момента внесения во флакон первичного материала. При этом высокая скорость проли-

ферации клеток в среде MCDB 153 сопряжена с активной терминальной дифференцировкой клеток и откреплением их от поверхности культурального флакона. В отличие от среды MCDB 153 использование питательной среды DK SFM обеспечивает равномерную адгезию большого количества клеток, позволяет избежать их быстрой дифференцировки. В описанных условиях полное заполнение флакона и образование монослоя наблюдается на 17–18-е сутки, клетки характеризуются морфологической однородностью и чистотой. Увеличение посевной дозы клеток и использование питательной среды MCDB 153 позволяет в более короткие сроки получить confluentный монослой, однако при этом требует тщательно контролировать рост культуры и своевременно ее пассировать.

Литература

1. ElGhalbzouri A., Hensbergen P., Gibbs S. et al. // *Laboratory Investigation*. 2004. Vol. 84. P. 102–112.
2. Lacroix S., Bouez Ch., Vidal S. et al. // *Biogerontology*. 2007. Vol. 8, N 2. P. 97–109.
3. Horch R. E., Kopp J., Kneser U. et al. // *J. Cell. Mol. Med.* 2005. Vol. 9, N 3. P. 592–608.
4. Fleischmajer R., MacDonald E. D., Contard P., Perlish J. S. // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1993. Vol. 41, N 9. P. 1359–1366.
5. Волков А. В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2006. Т. 6, № 4. С. 62–65.
6. Boyce S. T., Ham R. G. // *J. Invest. Dermatol.* 1983. Vol. 33, N 81. P. 33s–40s.
7. Bikle D. D., Ratnam A., Mauro T. et al. // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol 97, N 4. P. 1085–1093.
8. Van Haute L., DeBlock G., Liebaers I. et al. // *Resp. Res.* 2009. Vol. 5, N 10. P. 105–118.

*I. E. GURMANCHUK, O. V. PETRAKOVA, L. A. KHVATOVA,
E. N. NOVICHENKO, A. N. KHARLAMOVA, E. V. SOKOLOYSKAYA*

CULTIVATION THE EPIDERMAL HUMAN KERATINOCYTES USING DIFFERENT TYPES OF SPECIALIZED CULTURE MEDIA

Summary

A comparative analysis of the results of cultivation the epidermal human keratinocytes using two types of specialized growth medium (MCDB and DK SFM) is determined. It is shown that using the growth media MCDB 153 provides both rapid formation of individual colonies of proliferating cells and a high rate of proliferation compared with medium DK SFM. High rate of cell proliferation in medium MCDB 153 connected with an active terminal cells differentiation and their separation from the surface of the culture vial.

УДК 636.596:619:546.48

М. Е. НИКИФОРОВ, Е. Г. ТЮЛЬКОВА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА НАКОПЛЕНИЯ КАДМИЯ
В ОРГАНИЗМЕ СИЗОГО ГОЛУБЯ (COLUMBA LIVIA)**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск,
e-mail:nikiforov@biobel.bas-net.by,*

*Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации, Гомель,
e-mail:tut-3@mail.ru*

(Поступила в редакцию 04.11.2010)

Введение. Наряду с ртутью, свинцом, мышьяком, медью, оловом, цинком и железом кадмий входит в число наиболее опасных токсичных элементов, обязательных для контроля в сфере международной торговли в соответствии с решением объединенной комиссии ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) и ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения). Кадмий широко используется в металлургическом производстве, выделяется при сжигании промышленных отходов. Для кадмия отсутствует механизм гомеостатического контроля, поэтому он длительно удерживается в организме, аккумулируясь преимущественно в почках и печени [1]. Токсическое действие элемента проявляется в том, что он угнетающе действует на синтез нуклеиновых кислот и белков, разобщает процессы окислительного фосфорилирования и дыхания, ингибирует ряд ферментов, снижает активность витамина D₃, уменьшает фагоцитирующие способности макрофагов, угнетает секрецию инсулина, увеличивает синтез глюкозы. Хроническое отравление кадмием приводит к нарушениям работы почек, анемии, легочной недостаточности, остеомалации. Кроме того, по токсичности этот элемент принадлежит к первому классу опасности и в списке химических загрязнителей занимает приоритетное положение [2].

В этой связи целью нашего исследования явилось экспериментальное изучение особенностей накопления кадмия в органах и тканях птиц при задаваемых условиях и возможности использования показателей накопления для оценки степени антропогенной нагрузки на природную среду региона.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проводился в течение 2009–2010 гг. на сизых голубях как типичных представителях растительноядных видов. Всего было сформировано 6 групп птиц: 1-я – контрольная, 2–6-я – опытные. Перед началом эксперимента у птиц извлекли перья: по 4 рулевых и по 2 маховых с каждой стороны. Во время эксперимента каждую птицу содержали отдельно. Кадмий и свинец совместно с кадмием скармливали с хлебом в виде растворов солей CdCl₂·2,5H₂O и (CH₃COO)₂Pb·3H₂O.

Размеры скармливаемых доз элементов представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Количество кадмия и свинца, ежедневно скармливаемого голубям в эксперименте

Доза кадмия и свинца	Количество кадмия и свинца, мг
10 Cd	0,28
20 Cd	0,568
30 Cd	0,84
10 Cd + 10 Pb	3,2+0,28
20 Cd + 20 Pb	0,568+6,4

Птицы контрольной группы ежедневно получали только корм, птицы 2–6-й опытных групп – с хлебом и кормом раствора соли кадмия в дозах, превышающих ПДК по кадмию (0,4 мг/кг в кормах) в 10, 20 и 30 раз, а также совместно кадмий и свинец в дозах, превышающих ПДК по свинцу в 10 и 20 раз. Совместное введение кадмия и свинца обусловлено выяснением возможного синергического или антагонистического влияния свинца на уровень накопления кадмия в тканях и органах птиц.

В состав кормовой смеси птиц входили зерно злаковых культур, шрот подсолнечный, мука кормовая, мел, фосфат, премикс, соль, авизим. Массовая доля сырого протеина в корме составляла 14,26 %, кальция – 2,03 %, фосфора – 0,58 %.

Эксперимент продолжали до момента, когда на месте извлеченных перьев сформировались новые, которые также были извлечены, что осуществили на 45-й день после удаления старых перьев. Кроме того, в конце эксперимента для анализа были извлечены также и старые перья птиц по такой же схеме: по 4 рулевых и по 2 маховых с каждой стороны. В дальнейшем понятием «старые перья» обозначаются перья, которые находились на птицах до начала эксперимента, «новые перья» – выросли на месте удаленных старых в процессе эксперимента.

По окончании введения кадмия и кадмия совместно со свинцом птицы были усыплены, а их органы и ткани подвергли исследованиям. Были исследованы пробы печени, почек, сердца, мышечной и костной ткани, перья.

Анализ содержания кадмия в перечисленных органах и тканях, а также перьях сизых голубей проводили в химико-аналитической испытательной лаборатории Научно-практического центра НАН Беларуси по биоресурсам методом индуктивно сопряженной плазменной масс-спектрометрии. Подготовка проб осуществлялась методом мокрой минерализации в присутствии концентрированных соляной и серной кислот.

В работе были определены коэффициенты накопления кадмия как отношение содержания кадмия в органах и перьях птиц к его количеству, поступившему с кормом, выраженное в процентах, а также коэффициенты корреляции между содержанием кадмия, вводимого в организм сизых голубей с кормом, и его содержанием в перьях и органах, а также между содержанием кадмия в исследованных органах и тканях птиц.

Результаты и их обсуждение. Результаты определения содержания кадмия в тканях и органах сизого голубя, представленные в табл. 2, показали, что накопление кадмия различными органами и тканями птиц происходит неравномерно при различном его количестве, вводимом с кормом.

Т а б л и ц а 2. Содержание кадмия в органах и тканях сизого голубя

Количество кадмия	Содержание кадмия, мкг/г сухого вещества							
	сердце	печень	почки	мышцы	кости	перья		
						старые, удаленные до скармливания кадмия	новые	старые после окончания скармливания кадмия
10 Cd	0,037 ± 0,00004	2,136 ± 0,0074	10,836 ± 0,0311	0,057 ± 0,0005	0,084 ± 0,00017	0,023	0,266 ± 0,0004	0,095 ± 0,0008
20 Cd	0,038 ± 0,00008	5,038 ± 0,0187	17,728 ± 0,0289	0,076 ± 0,0004	0,094 ± 0,00045	0,034	0,441 ± 0,0008	0,734 ± 0,0011
30 Cd	0,112 ± 0,00029	6,933 ± 0,0172	37,403 ± 0,0867	0,084 ± 0,0007	0,097 ± 0,00044	0,039	0,693 ± 0,0007	0,650 ± 0,0072
10Cd + 10Pb	0,014 ± 0,00004	1,637 ± 0,0015	6,785 ± 0,0020	0,045 ± 0,0002	0,072 ± 0,00016	–	0,203 ± 0,0003	0,109 ± 0,0004
20Cd + 20Pb	0,049 ± 0,00007	4,871 ± 0,0074	17,717 ± 0,0237	0,073 ± 0,0004	0,091 ± 0,00029	0,056	0,436 ± 0,0004	0,767 ± 0,0032
Контроль	0,023 ± 0,0011	0,142 ± 0,0002	2,270 ± 0,0093	0,029 ± 0,00006	0,016 ± 0,00004	0,008	0,00004 ± 0,0000014	0,0005 ± 0,00002

Следует отметить, что в сердце, печени, почках, мышцах, костях и новых перьях, выросших в условиях эксперимента, наблюдается рост величины содержания кадмия при росте его количества в корме. При этом наибольшие уровни накопления кадмия при всех его дозах в корме и наиболее резкий рост концентраций кадмия обнаружены в почках птиц, что видно из данных табл. 2 и, очевидно, связано с почечной функцией выведения токсичных веществ из организма.

В старых перьях птиц, извлеченных после окончания эксперимента, наблюдалась неравномерная тенденция роста концентрации кадмия по мере роста его содержания в корме: после концентрации в 20 доз ПДК дальнейшего увеличения содержания кадмия в пере не происходило, а наблюдалось даже его незначительное снижение.

Интерес представляют результаты определения содержания кадмия в перьях, выросших в условиях эксперимента. Количество кадмия в новых перьях устойчиво увеличивалось по мере роста вводимых с кормом доз с 0,266 мкг/г сухого вещества при 10 дозах до 0,693 при 30 дозах.

Содержание кадмия в костной ткани сизых голубей возрастало незначительно в ходе эксперимента от 0,086 мкг/г сухого вещества при 10 дозах до 0,108 при 30 дозах и контроле 0,016 мкг/г сухого вещества.

Сердечная и скелетные мышцы в среднем характеризуются более низким по сравнению с другими органами, но также закономерным накоплением кадмия при его введении в организм птиц с кормом, что отличает их в этом плане от тканей органов выведения.

Для сопоставления полученных величин накопления кадмия в эксперименте с известными данными для свободноживущих птиц нами использованы обобщенные литературные данные (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Содержание кадмия в органах и тканях птиц

Локализация	Содержание (концентрация)	Библиографическая ссылка
Почки	1,9–6,4 мг/кг сухого вещества	[3]
Почки	0,11–1,45 мг/кг сухого вещества	[4]
Почки взрослых птиц	7,8 мг/кг сухого вещества	[5]
Почки птенцов	4,1 мг/кг сухого вещества	[5]
Почки взрослых птиц (чистая зона)	6,0 мкг/г сухого вещества	[6]
Почки птенцов (чистая зона)	0,35 мкг/г сухого вещества	[6]
Почки взрослых птиц (грязная зона)	21,2 мкг/г сухого вещества	[6]
Почки птенцов (грязная зона)	0,35 мкг/г сухого вещества	[6]
Почки (сизый голубь)	1,92–8,96 мг/г сухого вещества	[1]
Печень птиц	0,1– 2,2 мг/кг сухого вещества	[3]
Печень	0,11–1,04 мг/кг сухого вещества	[4]
Печень взрослых птиц	0,8 мг/кг сухого вещества	[5]
Печень	0,01–48,01 мг/г сухого вещества	[1]
Перья	0,01–0,15 мг/г сухого вещества	[7]
Перья	2,40–9,12 мкг/кг сухого вещества	[8]
Перья	0,01–4,20 мг/г сухого вещества	[1]
Мышцы	0,48–6,82 мкг/кг сухого вещества	[8]
Мышцы	0,02–0,65 мг/кг сухого вещества	[9]
Сердечная мышца	0,01–0,37 мг/кг сухого вещества	[9]
Костная ткань	0,97–1,66 мг/кг сухого вещества	[9]

Как показывает сопоставление данных табл. 2 и 3, в некоторых случаях уровни накопления кадмия в печени (48,01 мкг/г), костной ткани (1,66 мг/кг) или почках (21,2 мг/кг) свободноживу-

ших диких птиц сопоставимы и даже существенно превышают показатели, достигнутые в эксперименте при потреблении доз, равных 30 ПДК для пищевых продуктов. Это может свидетельствовать о наличии в природе очень существенных локальных загрязнений токсичными металлами и возможности индицирования таких случаев при обследовании птиц.

Согласно литературным данным, наиболее изученными в качестве загрязнителей металлами по наличию их в печени и почках птиц являются свинец, цинк и медь. Что касается зависимости накопления различных токсичных металлов от особенностей экологии и биологии птиц, то, например, в костной ткани установлена видовая специфика в уровнях накопления свинца, никеля, кадмия, молибдена и ртути, но не железа, марганца и цинка, а также преимущественная аккумуляция никеля и кадмия в костях птиц-фитофагов, а свинца и молибдена – у хищных птиц [9]. Кроме того, по литературным данным [1], концентрации некоторых металлов в костях коррелируют между собой. Умеренная корреляция в костях установлена между медью и кобальтом (0,52), медью и хромом (0,58), мышьяком и хромом (0,45), свинцом и никелем (0,44). Сильная корреляция отмечена между хромом и марганцем (0,82).

Нами в эксперименте ставилась задача выяснения характера влияния свинца на накопление кадмия при совместном их поступлении в организм птицы (см. табл. 2). Как видно из табл. 2, отмечено в основном слабое уменьшение накопления в органах и тканях кадмия при параллельном введении свинца, кроме сердечной мышцы и новых перьев, где однозначной тенденции не просматривается. В старых перьях при тех же условиях, наоборот, отмечено увеличение накопления кадмия. Можно предположить, что усиление в целом токсической нагрузки стимулирует функции выведения токсикантов из организма путем их депонирования в оперении.

С целью определения соотношения поступившего в организм кадмия и его количества, накопленного в органах и тканях, нами были рассчитаны коэффициенты накопления, значения которых показаны в табл. 4. Из данных этой таблицы видно, что наибольшими коэффициентами накопления кадмия и их ростом при нарастании дозы в корме характеризуются почки, что указывает на преобладающую реакцию почек на увеличение величины токсического воздействия на организм.

Таблица 4. Коэффициенты накопления кадмия в органах и тканях сизого голубя в эксперименте

Органы птиц	Коэффициенты накопления кадмия при различных его дозах в корме, %		
	10 Cd	20 Cd	30 Cd
Сердце	0,013	0,007	0,013
Печень	0,763	0,887	0,825
Почки	3,870	3,121	4,453
Мышцы	0,020	0,013	0,010
Кости	0,030	0,017	0,012
Перья новые	0,095	0,078	0,083
Перья старые	0,034	0,129	0,077

Для остальных исследованных органов этот показатель несколько ниже, и для печени и старых перьев птиц наблюдается незначительный рост коэффициентов накопления кадмия по мере увеличения его содержания в корме.

С целью установления характера связей уровней накопления в различных органах и тканях были определены коэффициенты корреляции между величиной дозы кадмия, вводимой в организм сизых голубей с кормом, и его содержанием в перьях и органах, а также между содержанием кадмия в исследованных органах и тканях птиц.

Результаты расчета парных коэффициентов корреляции показали наличие высокой корреляционной связи между содержанием кадмия в корме и печени, мышцах и новых перьях, выросших в условиях эксперимента (коэффициенты корреляции 0,995, 0,977, 0,993 соответственно), что видно из данных табл. 5.

Т а б л и ц а 5. Матрица парных коэффициентов корреляции

Органы	Количество кадмия в корме	Сердце	Печень	Почки	Мышцы	Кости	Перья новые
Сердце	0,864	1,000					
Печень	0,995	0,807	1,000				
Почки	0,959	0,971	0,924	1,000			
Мышцы	0,977	0,736	0,994	0,877	1,000		
Кости	0,960	0,687	0,984	0,841	0,998	1,000	
Перья новые	0,993	0,918	0,975	0,986	0,944	0,919	1,000
Перья старые	0,809	0,402	0,866	0,609	0,916	0,942	0,733

Кроме того, отмечается наличие высокой корреляционной связи между количеством кадмия в мышцах и печени (коэффициент корреляции 0,994). Высокая степень корреляции показателей уровней в печени, почках и перьях, выросших в условиях эксперимента (коэффициенты корреляции 0,975, 0,986 соответственно), вероятно, является результатом влияния на рост пера метаболических процессов в организме, происходящих при этом, и может быть использовано для разработки тестов по оценке характера загрязнения организма птицы путем прижизненного исследования перьевого покрова.

Заключение. Использованием комплексного подхода к экспериментальной оценке уровня загрязнения организма птиц в системе «окружающая среда – вид индикатор» на сизых голубях путем введения в организм птиц различных доз кадмия с кормом установлено, что наибольшие уровни накопления кадмия при всех его дозах в корме и наиболее резкий рост концентраций кадмия при этом обнаружены в почках птиц.

Наибольшими коэффициентами накопления кадмия и их ростом при нарастании количества элемента в корме характеризуются почки птиц; для печени и контурного оперения птиц наблюдается незначительный рост коэффициентов накопления кадмия по мере увеличения его содержания в корме.

Отмечается наличие высокой корреляционной связи между содержанием кадмия в корме и печени, мышцах и отрастающем контурном оперении, а также между содержанием в печени, почках и перьях, выросших в условиях эксперимента, что создает основу для разработки тест-метода прижизненного определения накопления токсичных металлов в организме птиц.

Литература

1. Лебедева Н. В. Экоотоксикология и биогеохимия географических популяций птиц. М., 1999.
2. Куценко С. А. Основы токсикологии. СПб., 2002.
3. Pieter H. // Water SA. 2003. Vol. 29, № 3. P. 3133–22.
4. Сергеев А. А. Тяжелые металлы в охотничьих птицах Кировской области (биологические, индикационные и санитарно-гигиенические аспекты): Дис. ... канд. биол. наук. Киров, 2003.
5. Родзин Е. В., Константинов В. М., Федоровский Н. Н. // Врановые птицы в антропогенном ландшафте: межвуз. сб. науч. тр. Липецк, 2001. Вып. 4. С. 104–107.
6. Glen Fox A., Grasman Keith A., Hobson Keith A. // J. Great Lakes Res. 2002. Vol. 28, N 4. P. 643–663.
7. Connell D. W., Wong B. S. F., Lam P. K. S. // Ecotoxicology. 2002. Vol. 11, № 1. P. 49–59.
8. Кирьякулов В. М. Последствия загрязнения свинцом и другими поллютантами среды обитания водоплавающей дичи: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009.
9. Безель В. С., Бельский Е. А., Курамшина Н. Г. // Сибирский эколог. журн. 2005. № 3. С. 489–496.

M. E. NIKIFOROV, E. G. TULKOVA

CADMIUM EXPERIMENTAL ESTIMATION ACCUMULATION IN THE BLUE ROCK PIGEON (COLUMBA LIVIA) ORGANISM

Summary

The comparative estimation of cadmium accumulation in experiment to heart, a liver, kidneys, muscles, bones and feathers of a blue rock pigeon at its various quantity in forage was spent. It was shown, that the greatest levels of cadmium accumulation at all its doses in a forage are found out in kidneys of birds. There is a high correlation communication between the cadmium maintenance in a forage and in a liver, muscles and feathers of the birds which have grown in the conditions of experiment is marked; between quantity of cadmium in muscles and in a liver; a liver, kidneys and the feathers which have grown in the conditions of experiment.

УДК 574.587.063:556.53

Т. П. ЛИПИНСКАЯ

**ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ И ТРОФИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
МАКРОЗООБЕНТОСА АКВАТОРИИ ПОРТОВ РЕКИ ПРИПЯТЬ**

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, e-mail: liptan86@mail.ru

(Поступила в редакцию 08.04.2010)

Введение. Известно, что как таксономическая, так и трофическая структура макрозообентоса достаточно жестко связана с величинами загрязнения речных экосистем, которые, как правило, достигают своего максимума в портах. Тем не менее информация о таксономической структуре речных экосистем республики представлена единичными работами и носит весьма ограниченный характер.

Цель исследования – анализ таксономической и трофической структуры макрозообентоса акватории портов реки Припять с разной степенью антропогенной нагрузки.

Материал и методы исследования. Материалом для данной работы послужили одноразовые сборы макрозообентоса в летний период (начало июня) 2008 г. в портах р. Припять – городах Микашевичи (Брестская обл.), Мозырь и Наровля (Гомельская обл.).

При описании ландшафтной и гидроморфологической характеристики обследованных створов за основу были приняты показатели, разработанные для стран ЕС в программе AQEM. Согласно этой программе, необходимо дать характеристику участка реки по морфологии русла, гидрологии и растительности таким образом, чтобы эти данные отражали его состояние на изучаемом створе реки (базовое описание створа).

Течение на двух створах было 0,12 м/с, а в порту г. Микашевичи вовсе отсутствовало (табл. 1). Тип субстрата на створах был компактным/размытым, а его основу составлял песок с большим или меньшим содержанием ила.

Таблица 1. Ландшафтная и гидроморфологическая характеристика створов

Показатель	Характеристика створа		
	Микашевичи	Мозырь	Наровля
Координаты	N 52°06'620 E 029°06'267	N 52°01'761 E 029°18'517	N 51°47'326 E 029°31'954
Тип русла	Глубокое	Пологое	Ассиметричное
Скорость течения, м/с	Отсутствует	0,12	0,12
Тип растительности на берегах	Поливидовой гетерогенный	Поливидовой гетерогенный	Поливидовой гетерогенный
Тип растительности в точке отбора проб	Ежеголовник	Роголистник, рдест	Ежеголовник, рдест
% покрытия растительностью в точке отбора	20	50	80
Температура, °С	20,8	19,0	19,0
pH	7,42	7,72	7,63
Тип субстрата	Компактный	Размытый	Неизвестный
Общее описание субстрата	Заиленный песок	Заиленный песок	Заиленный песок
Наличие других предметов на дне	Коряги	Нет	Ползатоупленные деревья
Окружающие земли	Населенные пункты	Населенные пункты	Смешанный лес, луг, кустарники
Характер антропогенного воздействия	Обвалование русла, смыыв с берегов, регулярное судоходство	Водопой скота, стоки бытовые, стоки с. х., регулярное судоходство	Спорадическое судоходство

Пробы зообентоса отбирали в прибрежной зоне с глубины 0,5–0,7 м с помощью гидробиологического ручного сачка согласно стандарту ISO 7828. Количество отборов в разных биотопах проводилось пропорционально занимаемой ими площади на исследуемом створе [1]. Пробы фиксировали 70%-ным раствором спирта. Разбор материала по таксонам и видовую идентификацию проводили общепринятыми методами [2].

Определение отдельных систематических групп, таких как Oligochaeta, Diptera и некоторых других, ограничивалось крупными таксонами.

Результаты и их обсуждение. Донные биоценозы портов характеризовались богатой и разнообразной фауной макробеспозвоночных, в которой были представлены все основные таксономические группы бентосных организмов.

В результате проведенного исследования было собрано и изучено 3 446 экз. водных беспозвоночных, находящихся на личиночной и имагинальной стадиях развития.

Количество особей в пробах варьировало от 577 (г. Наровля) до 1 637 экз. на одну пробу (г. Микашевичи). В составе донной фауны обследованных портов р. Припять выявлено 36 видов и таксонов беспозвоночных более высокого ранга, относящихся к трем типам и семи классам (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Таксономическая структура сообщества макрозообентоса в портах р. Припять

№ п/п	Тип	Класс	Количество		
			семейств	родов	видов
1	ANNELIDAE	Oligochaeta	1	–	–
		Hirudinea	2	2	2
2	MOLLUSCA	Bivalvia	1	1	1
		Gastropoda	4	8	9
3	ARTHROPODA	Arachnida	1	1	–
		Crustacea	1	5	6
		Insecta	13	25	18
Всего	3	7	23	42	36

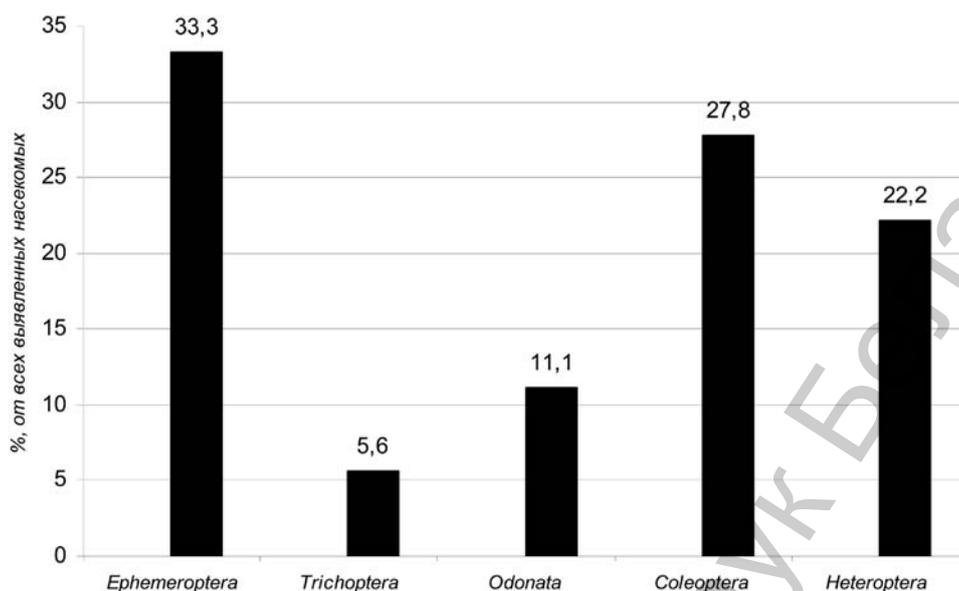
В порту г. Мозырь обнаружено 18 семейств, в г. Микашевичи – 17, наименьшее количество семейств макрозообентоса (11) отмечено в порту г. Наровля.

Наиболее разнообразно в бентофауне представлены насекомые – 18 видов, что составило 50,0 % от общего числа видов макрозообентоса портов р. Припять. Это личинки поденок, веснянок, стрекоз, ручейников, полужесткокрылых (клопов), жесткокрылых (жуков) и двукрылых.

Как видно из рисунка, наибольшее видовое богатство характерно для отряда поденок (Ephemeroptera) – 33,3 % (от всех выявленных насекомых на створах), а также значительная доля принадлежит жесткокрылым (Coleoptera) – 27,8 % и полужесткокрылым (Heteroptera) – 22,2 %.

Необходимо отметить, что среди изученных насекомых 38,9 % составляют виды, в основном относящиеся к так называемому «реофильному комплексу» (веснянки, поденки и ручейники). В пробах были обнаружены представители отряда Ephemeroptera (*Cloeon simile* EATON, *Cloeon dipterum* LINNAEUS, *Centroptilum luteolum* MÜLLER, *Procloeon ornatum* TSCHERNOVA, *Baetis sp.*, *Caenis lactea* BURMEISTER, *Caenis horaria* LINNAEUS) и Trichoptera (*Hydropsyche bulgaromanorum* MALICKE). Представители отряда Plecoptera (веснянки), которые так же как поденки и ручейники, относятся к «реофильному комплексу», не были обнаружены. Данный факт связан с тем, что пробы отбирали в июне, а вылет имаго веснянок происходит ранней весной.

Проанализировав данные по видовому составу и проценту содержания в пробах представителей отряда Ephemeroptera от общего числа особей (0,06 % – порт г. Микашевичи; 2,97 % – порт г. Наровля), можно отметить, что наиболее загрязненным оказался порт г. Микашевичи, а наименее загрязненным – порт г. Наровля. Следует отметить, что такие же данные были получены и по соотношению ЕРТ (Ephemeroptera + Plecoptera + Trichoptera) к Oligochaeta. В порту г. Микашевичи соотношение ЕРТ/ОЛ было – 0,005 %, в порту г. Наровля – 0,171 %, т. е. чем меньше величина, тем хуже качество воды, так как количество видов, чувствительных к загрязнению, уменьшается, а малощетинковых червей – увеличивается.



Процентное содержание видов в различных отрядах класса насекомых

По типу питания представители макрозообентоса относились к различным экологическим группам: соскребателям, хищникам, фильтраторам, собирателям. На всех створах количество собирателей превалировало над остальными группами. На исследованном участке реки оно колебалось от 30,4 % (% от общего количества особей в пробе) (г. Мозырь) до 34,5 % (г. Микашевичи); фильтраторов – от 13,5 % (г. Наровля) до 17,0 % (г. Мозырь); соскребателей – 16,3 % (г. Наровля) до 40,7 % (г. Мозырь); хищников – от 6,8 % (г. Микашевичи) до 15,1 % (г. Наровля). Таким образом, количество групп собирателей выше в порту г. Микашевичи, а доля хищников (% от общего количества функциональных групп) была максимальной (15,1 %) в порту г. Наровля. Увеличение доли собирателей (детритофагов), а также уменьшение доли хищников указывает на то, что трофическая структура бентоса упрощается в связи с изменением экологического качества воды.

Анализируя данные по трофической структуре макрозообентоса в портах р. Припять, в целом можно отметить, что наиболее загрязненный порт – в г. Микашевичи, а менее загрязненный – в г. Наровля.

При рассмотрении таксономической структуры были также определены группы макрозообентоса по их отношению к скорости течения.

Макрозообентос по отношению к скорости течения разделяется на следующие группы [3]: лимнобионты (обитают только в стоячих водах); лимнофилы (предпочитают стоячую воду, редко встречается в медленно текущих реках); лимно-реофилы (предпочитают стоячую воду, как исключение, медленно текущие реки); рео-лимнофилы (обычные представители рек; предпочитают медленно текущие реки и непроточные водоемы); реофилы (предпочитают реки со средним и быстрым течением); реобионты (обитают только в реках с быстрым течением) и безразличные к скорости течения.

В сообществе макрозообентоса на всех створах доминировала группа рео-лимнофилов – 20,3–73,6 % (% от общего количества видов), это связано с тем, что течение в портах было медленное (города Мозырь, Наровля), а в порту г. Микашевичи оно отсутствовало. Наименьшее количество представителей макрозообентоса встречалось из группы лимнофилов (0,06 % – г. Микашевичи; 0,42 % – г. Наровля) и реофилов (0,07 % – г. Мозырь; 0,21 % – г. Наровля).

Наибольшее количество безразличных к скорости течения представителей донной фауны наблюдали в порту г. Микашевичи (46,1 %). Представители группы реофилов не были обнаружены в исследуемых пробах.

Поскольку таксономическая и трофическая структура макрозообентоса достаточно жестко связана с величинами загрязнения речных экосистем, можно сделать вывод, что порт г. Наровля

является менее загрязненным, а порт г. Микашевичи – наиболее загрязненный. Проведенное сравнение экологического качества воды в этих портах с использованием различных биотических индексов [4] и оценка по структурным и трофическим характеристикам макрозообентоса показали аналогичное ранжирование портов по степени загрязнения.

Заключение. В ходе данной работы было изучено сообщество макрозообентоса по таксономическому и трофическому составу, а также по отношению к скорости течения воды в речных портах с различной степенью антропогенной нагрузки.

В составе донной фауны обследованных портов р. Припять выявлено 36 видов. Представители класса насекомых составили половину от общего числа видов макрозообентоса портов р. Припять. Среди них 38,9 % (от числа видов) – виды, относящиеся к так называемому «реофильному комплексу». Высокое видовое разнообразие фауны водных насекомых и большая численность группировки видов, чувствительных к загрязнению водотоков, в целом указывают на относительно высокое качество воды в портах.

На всех створах портов в трофической структуре бентосного сообщества доминировали собиратели, а по отношению к скорости течения доминировали рео-лимнофилы.

Данные по результатам исследования таксономической и трофической структуры макрозообентоса позволяют говорить о степени загрязнения акватории речных портов. С этой точки зрения, наиболее загрязненная акватория порта из трех изученных – в г. Микашевичи, а наименее загрязненная – в г. Наровля.

Литература

1. Barbour M. T., Gerritsen J., Snyder B. D., Stribling J. B. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition // EPA 841-B-99-002. U. S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D. C., 1999. <http://www.epa.gov/owow/monitoring/rbp/ch07main.html>.
2. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем / Под ред. В. А. Абакумова. СПб., 1992. С. 26–33.
3. Schmidtje U. & Colling M. // Informations-berichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft. 1996. № 4. P. 37–54.
4. Липинская Т. П. // Природные ресурсы. 2010. № 1. С. 46–51.

T. P. LIPINSKAYA

TAXONOMIC AND TROPHIC STRUCTURE OF MACROZOOBENTHOS ON THE PRYPIAT RIVER PORTS

Summary

The structure of macrozoobenthos community on different river ports for estimation of the anthropogenic pressure has been studied. The comparative analysis of the EPT and EPT/Oligochaeta index in the different ports shown that they in the Mykashевичy river port were minimal. The collectors dominated in all ports (from 30,4 to 40,7 %) and were related with referred above indexes.

The Mykashевичy river port also characterized by the low number of trophic groups and percent of predators.

УДК 597.58(476)

В. К. РИЗЕВСКИЙ, М. В. ПЛЮТА, А. В. ЛЕЩЕНКО, И. А. ЕРМОЛАЕВА

**НОВЫЙ ДЛЯ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ ВИД РЫБ – ПУХЛОЩЕКАЯ РЫБА-ИГЛА
(SYNGNATHUS ABASTER)**

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, e-mail:salmo@biobel.bas-net.by

(Поступила в редакцию 12.05.2010)

Введение. В 2007 г. в реках Припять и Днепр были выявлены четыре вида рыб, ранее не встречавшихся в водоемах и водотоках Беларуси: бычок-цуцик *Proterorhinus marmoratus* (Pallas) [1–3], балтийская щиповка (переднеазиатская щиповка) *Sabanejewia baltica* Witkowski, малая южная колюшка *Pungitius platigaster* (Kessler) [3] и пескарь белоперый *Romanogobio albipinnatus* (Lukasch) [3, 4]. Одни из новых видов (пескарь белоперый и балтийская щиповка), вероятно, являются аборигенными видами, ранее не описанными для водотоков Беларуси; другие – видами-интервентами, проникшими на территорию Беларуси естественным путем по р. Днепр из Киевского водохранилища.

Анализ имеющихся материалов по видовому составу фауны рыб Киевского водохранилища [5], созданного на р. Днепр, показал, что в нем обитает ряд видов рыб, не отмеченных на территории Беларуси. К таковым относилась и пухлощекая рыба-игла *Syngnathus abaster* Risso, 1827 (подотряд *Syngnathoidei* – игловидные, семейство *Syngnathidae* Bonoparte, 1831 – игловые, род *Syngnathus* Linnaeus, 1758 – морские иглы).

Пухлощекая рыба-игла – сравнительно широко распространенный в Европе вид. Обитает в Восточной Атлантике южнее Бискайского залива к Гибралтару, а также в бассейнах Средиземного, Черного и Азовского морей. Эвригалитный вид, обитающий как в морях, так и в реках. После зарегулирования рек плотинами ГЭС остается в созданных водохранилищах и образует пресноводные популяции. В бассейне Черного и Азовского морей заходит в реки и связанные с морем водоемы: устьевые участки Дуная (включая придунайские озера Кагул и Ялпух), нижний Днестр, Южный Буг, Днепр и его водохранилища [6]. В русскоязычной литературе этот вид до сих пор часто называют *Syngnathus nigrolineatus*. Из Каспийского моря он описан как *S. caspius* Eichwald [7], который в настоящее время проник в волжские водохранилища [8].

До настоящих исследований верхней границей распространения иглы-рыбы в р. Днепр являлся участок реки в районе современного Киевского водохранилища [5] на территории Украины. Помимо этого, данный вид был выявлен в 1984–1987 гг. при обследовании водоемов верхнего участка бассейна р. Припять на территории Волынской и Ровенской областей Украины [9]. Таким образом, появление (обнаружение) ее в реках Днепр и Припять на территории Беларуси было вполне предсказуемым и ожидаемым.

Цель работы – подробное морфометрическое описание пухлощеккой рыбы-иглы из водотоков Беларуси.

Материалы и методы исследования. Пухлощекая рыба-игла была обнаружена нами в результате проведенных в летний период 2008 г. обловов мелководным неводом (длина 30 м, ячей 8–10 мм) мелководных прибрежных участков р. Днепр в пределах Брагинского района Беларуси (рисунок). Всего выловлены 4 экз. рыбы-иглы. В 2009 г. во время повторных исследований здесь же отловлены еще 14 экз. У двух самцов в выводковой камере были личинки длиной около 20 мм. Таким образом, подтверждено обитание рыбы-иглы в р. Днепр в пределах Беларуси.



Пухлошекая рыба-игла *Syngnathus abaster* Risso из р. Днепр на территории Беларуси

Морфометрический анализ проводили на фиксированном материале, в растворе формалина (4 %). Всего исследовано 7 меристических и 18 пластических признаков. Полученные данные обработаны статистически [10]. Значения морфометрических признаков (меристических и пластических) рыбы-иглы из р. Днепр приведены в таблице. Морфометрические измерения проводили на смешанном материале без разделения по половой принадлежности.

Морфометрические признаки пухлошекой рыбы-иглы *Syngnathus abaster* Risso, 1827 из р. Днепр (n = 18)

Показатель		min – max	M ± m	σ
Длина рыбы (без С), см		83,9–133,0	115,94 ± 3,65	15,47
Меристические признаки				
Количество лучей в D		31–37	34,78 ± 0,42	1,77
Количество лучей в А		3	3,00	0,00
Количество лучей в Р		11–13	12,00 ± 0,08	0,34
Количество лучей в С		10	10	–
Число туловищных колец		14–16	15,22 ± 0,13	0,55
Число хвостовых колец		35–39	37,22 ± 0,24	1,00
Число субдорсальных колец		6–8	7,72 ± 0,14	0,57
Пластические признаки, в % от длины тела без С				
Длина туловища,	l	85,83–88,45	86,85 ± 0,17	0,71
Наибольшая высота тела,	H	3,20–4,88	3,77 ± 0,14	0,58
Наибольшая толщина тела,	iH	2,38–4,10	3,40 ± 0,10	0,44
Наименьшая высота тела,	h	0,57–0,88	0,76 ± 0,02	0,08
Антедорсальное расстояние,	aD	39,04–42,79	40,71 ± 0,23	0,99
Постдорсальное расстояние,	pD	45,70–48,78	46,95 ± 0,24	1,01
Антеанальное расстояние,	aA	40,64–43,80	42,29 ± 0,21	0,91
Длина основания D		10,76–13,02	12,26 ± 0,14	0,60
Высота D		1,91–3,23	2,57 ± 0,08	0,34

Показатель		min – max	M ± m	σ
Длина P		2,04–2,48	2,28 ± 0,03	0,13
Длина головы,	c	12,19–14,07	13,29 ± 0,13	0,55
Пластические признаки, в % от длины головы				
Ширина головы,	ic	22,73–32,68	28,65 ± 0,59	2,51
Ширина лба,	io	5,81–11,41	8,41 ± 0,40	1,72
Длина рыла,	r	45,45–54,07	49,77 ± 0,57	2,40
Диаметр глаза,	o	10,00–16,13	12,61 ± 0,34	1,44
Заглазничный отдел головы,	op	34,86–41,13	37,71 ± 0,53	1,99
Высота головы у затылка,	hc	23,67–28,24	25,86 ± 0,34	1,45
Высота головы ч/сред. глаза, hc ₁		17,75–22,99	20,09 ± 0,40	1,68

Результаты и их обсуждение. Места обнаружения рыбы-иглы. На территории Беларуси пухлощекая рыба-игла была обнаружена в р. Днепр на участке ниже г.п. Комарин вблизи дер. Нижние Жары (Брагинский р-н, Гомельская обл.).

Описание биотопов. Проведенные исследования позволили установить, что пухлощекая игла-рыба в летний период держится на небольшой глубине (до 2,0 м) прибрежных участков реки с водной растительностью и замедленным течением. Дно в местах обитания было песчаное, песчано-галечное с различной степенью заиленности. Из растительности преобладали наяда большая *Najas major* All. и роголистник *Ceratophyllum demersum* L., которые служили рыбам в качестве укрытий.

Интересен факт, что места встречаемости наяды большой весьма редки (включена в Красную книгу Республики Беларусь в III категорию охраны). Известны отдельные места ее обнаружения в р. Днепр (на участке Брагинского, Лоевского и Речицкого районов) и низовьях его притоков: Березина (Речицкий и Жлобинский районы), Сож (Лоевский р-н), Припять (Петриковский р-н), а также в р. Горынь (приток Припяти) [11]. Учитывая достаточно высокую привязанность рыбы-иглы к зарослям наяды большой, в дальнейшем весьма вероятно обнаружение в указанных местах и рыбы-иглы.

Отличительные признаки *Syngnathus abaster* от других представителей рода. Обе половины грудного пояса неподвижные, без выемки, передний (верхний) край их заостренный, внизу сращены между собой, под ними есть непарная пластинка. На заднем конце гребней щитков туловищных и хвостовых колец шипики отсутствуют; субдорсальных колец не более 10, хвостовых колец обычно не более 39. Длина рыла не более 53 % длины головы [6].

Описание. Тело длинное, низкое, несжатое с боков. Спинной, грудные, анальный и хвостовой плавники имеются. Брюшных плавников нет. Анальный плавник очень маленький, едва заметный, расположен сразу за анальным отверстием. В отличие от самок у самцов под хвостовой частью туловища сразу за анальным отверстием расположена длинная выводковая камера, образованная двумя продольными складками.

Заключение. Проведенные нами исследования морфометрических признаков рыбы-иглы из р. Днепр (Беларусь) и сравнение их с аналогичными признаками из других водотоков показали, что пределы варьирования отдельных меристических признаков, таких как число туловищных и субдорсальных колец, шире, чем они указывались ранее для пухлощеккой рыбы-иглы в ареале [6]. Так, ранее указывалось, что минимальное число туловищных и субдорсальных колец равно соответственно 15 и 7, по нашим данным, – 14 и 6. Кроме того, ранее указывалось [6], что такой отличительный признак, как длина рыла составляет не более 53 % длины головы, тогда как в нашем материале был один экземпляр рыбы, длина рыла которого составляла 54,07 % длины головы. Данные характеристики этих признаков могут быть использованы в определительных таблицах видов рода *Syngnathus* – морские иглы. По другим пластическим признакам существенных (достоверных) различий отмечено не было.

Литература

1. Rizevsky V., Pluta M., Leschenko A. and Ermolaeva I. // Aquatic Invasions. 2007. Vol. 2. Issue 3. P. 275–277.
2. Ризевский В. К., Плюта М. В., Лещенко А. В., Ермолаева И. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2010. № 1. С. 100–103.
3. Ризевский В. К., Плюта М. В., Лещенко А. В. и др. // Докл. НАН Беларусі. 2009. Т. 53, № 3. С. 95–97.
4. Ризевский В. К., Плюта М. В., Лещенко А. В., Ермолаева И. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2009. № 3. С. 89–93.
5. Зимбалевская Л. Н., Сухойван П. Г., Черногоренко М. И. и др. Беспозвоночные и рыбы Днепра и его водохранилищ. Киев, 1989.
6. Мовчан Ю. В. Фауна Украины. Рыбы. Киев, 1988. Т. 8, вып. 3.
7. Богуцкая Н. Г., Насека А. М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М., 2004.
8. Решетников Ю. С., Богуцкая Н. Г., Васильева Е. Д. и др. // Вопр. ихтиол. 1997. Т. 37, вып. 6. С. 723–771.
9. Лесник В. В. // Тез. Всесоюз. совещ. по проблемам кадастра и учета животного мира. Ч. III. Уфа, 1989. С. 353–356.
10. Рокитский П. Ф. Основы вариационной статистики для биологов. Мн., 1961.
11. Красная книга Республики Беларусь. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений. Мн., 2005.

V. K. RYZEUSKI, M. V. PLJUTA, A. V. LESHCHENKO, I. A. YERMALAYEVA

A NEW FISH SPECIES IN THE FAUNA OF BELARUS – PIPEFISH (SYNGNATHUS ABASTER)

Summary

Morphometric data of pipefish *Syngnathus abaster* Risso, 1827, first recorded in the fauna of Belarus are given.

АГЛЯДЫ

УДК 581.17/19.012.4:58.036.5

Н. А. КОПЫЛОВА

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 01.04.2010)

Введение. Интерес к проблеме низкотемпературной устойчивости обусловлен прежде всего ее значимостью для растениеводства, терпящего огромные потери урожая из-за заморозков. Известно, что на 64 % территории суши растения испытывают губительное действие низких температур [1]. Кроме того, под влиянием антропогенных факторов усиливается нестабильность климата, которая может проявляться в резких перепадах температуры в относительно короткие промежутки времени. Холодовой стресс у растений может быть вызван температурами большого диапазона: от 10–15 °С (такому стрессу наиболее подвержены растения тропических и субтропических зон) до отрицательных температур.

Известно, что сохранение жизнеспособности растений при действии неблагоприятных факторов окружающей среды обеспечивается целым комплексом адаптивных реакций, цель которых – поддержание гомеостаза внутренней среды организма. Многочисленные исследования установили, что под действием низкотемпературного стресса в организме растения происходят значительные изменения практически на всех уровнях организации – от организменного до молекулярного. Показано, что гибель клеток, тканей и растений под действием морозов обусловливается необратимыми изменениями, происходящими в протопласте клеток: его коагуляцией, денатурацией коллоидов, механическим давлением льда, повреждающим поверхностные структуры цитоплазмы, кристаллами льда, нарушающими мембраны и проникающими внутрь клетки. Деструктивное влияние оказывают повышение концентрации и изменение pH клеточного сока, сопровождающие обезвоживание клеток. Признаками повреждения клеток морозом являются потеря ими тургора, инфильтрация межклетников водой и выход ионов из клеток. Выход ионов K^+ и сахаров из клеток, по-видимому, связан с повреждением мембранных систем активного транспорта. Клетки разных растений имеют свой критический предел обезвоживания и сжатия, превышение которого, а не только снижение температуры, приводит к их гибели [2, 3].

Изменения на клеточном уровне, вызванные охлаждением

Низкотемпературный стресс был признан уникальным экологическим воздействием на растительную клетку много лет назад. Однако явление холодового стресса на мембранном и молекулярном уровнях не было систематически исследовано до 1970–1980-х годов. В этот период наиболее многочисленными являются работы P. van Hasselt (Нидерланды) на огурце, исследования А. О. Taylor et al. на кукурузе (Австралия), V. Kaniuga и др. о холодовом воздействии на томаты (Польша) [4]. Основное направление данных исследований – изучение воздействия низких температур на физиологию и структуру фотосинтетических тканей. Хотя существует множество переменных показателей, обуславливающих серьезность повреждающего воздействия и степень низкотемпературного стресса, имеется ряд признаков, которые являются общими для многих видов растений [5–8].

Влияние холодового стресса на хлоропласты

Учитывая организацию фотосинтетического аппарата и его чувствительность к холодовому стрессу, становится очевидным, что влияние низких температур ранее всего проявляется на хлоропластах [9, 10]. При оптимальных температурах хлоропласты содержат многочисленные зерна крахмала и хорошо развитые стопки гран, связанные со стромальными ламеллами, обе мембраны хлоропласта не повреждены.

Набухание хлоропластов – почти универсальный признак изменений клеточной ультраструктуры под действием низких температур. Это позволяет прийти к заключению, что холодовой стресс сопровождается увеличением стромального осмотического давления. Накоплено множество данных, свидетельствующих о накоплении продуктов деградации крахмала, которые являются осмотически активными веществами:

1. Неоднократно отмечалось исчезновение гранул крахмала в период охлаждения [5, 11–13].

2. Активация при низких температурах разрушающих крахмал ферментов в картофельных клубнях [15], листьях томата [16], клетках паренхимы киселемных пучков [4].

3. Транспорт ассимилятов из хлоропластов может быть ограничен при низких температурах. Действительно ли происходит прямое ингибирование транспорта триозофосфатов из хлоропластов, еще предстоит исследовать. Однако поглощение белка хлоропластами (энергозависимый процесс) ингибировано при низких температурах из-за отсутствия необходимой протон-движущей силы [17]. Поэтому вероятно, что экспорт ассимилятов из хлоропластов, другой энергозависимый процесс, может аналогично быть ингибирован. Транспорт ассимилятов может также подавляться из-за вызванного холодом уменьшения загрузки флоэмы [18] или самого флоэмного транспорта [19]. Известно, что концентрация растворимых сахаров в листьях увеличивается при действии низких температур [20], но распределение углеводов по клеточным компартментам исследовано недостаточно.

Показано, что при низких температурах на свету в хлоропластах, чувствительных к холоду растений, происходит фотоокисление [21] и набухание тилакоидов – обычное явление при таких экологических условиях. Увеличение размеров тилакоидов также наблюдали при использовании фотоокислительных гербицидов, например, параквата [22] и атразина [21]. Это предполагает существование связи между фотоокислением и набуханием тилакоидов, вызванным действием низких температур.

Таким образом, первые признаки холодового стресса – набухание хлоропластов, дезорганизация и набухание тилакоидов, уменьшение количества и размеров крахмальных зерен, формирование маленьких пузырьков из внутренней мембраны хлоропласта, называемых периферическим ретикулумом [14]. Длительное охлаждение приводит к накоплению липидных капель, потемнению стромы, дезорганизации гран и разрушению оболочек хлоропластов, приводящему к смешиванию содержимого стромы с цитоплазмой. Гранулы крахмала продолжают уменьшаться и, если холодовой стресс продолжается, исчезают полностью [5, 11–13]. В дополнение к вышеупомянутому другие исследователи сообщили о дезориентации гран относительно друг друга и деформации стопок гран, сопровождаемой разрушением и последующим исчезновением ламелл стромы [6, 14, 24]. Любопытным фактом является то, что хлоропласты листьев мезофилла кукурузы более восприимчивы к холодовому стрессу, чем хлоропласты смежных проводящих пучков [25]. Вместе с тем А. Н. Kingston-Smith et al. [26] отмечают большую чувствительность к низким температурам белков проводящих пучков по сравнению с белками мезофилла.

Реакция митохондрий на действие низких температур

В отличие от хлоропластов митохондрии, по-видимому, являются более устойчивыми к низким температурам. Ультраструктура митохондрий в листьях *Nicotiana tabacum* L. не была заметно затронута влиянием холодового стресса, тогда как в хлоропластах наблюдались начальные стадии разрушения [6]. Эти же явления отмечены в листьях огурца [27] и кукурузы [5]. С другой стороны, С. Murphy и J. Wilson [13] сообщили о набухании и дезорганизации митохондрий *Episcia reptans* Mart., чрезвычайно чувствительного к холоду растения, после выдерживания

в течение 6 ч при 5 °С. Р. С. Leddet, L. Geneves [28] также отметили набухание митохондрий у *Ephedra vulgaris* (Richt) после экспозиции в течение 24 ч при 2 °С. Кроме того, Н. А. Ishikawa [8] наблюдал увеличение количества вакуолей и крист в клетках листьев бобов (*Vigna radiata* L., var. *Wilczek*), подвергнутых холодному стрессу. Это растение также является холодочувствительным.

По-видимому, заметные повреждения под действием холода происходят главным образом в митохондриях растений, сверхчувствительных к низким температурам.

Ядро и другие клеточные структуры при воздействии холодного стресса

Сообщений о влиянии низких температур на ядро в литературе имеется немного. По-видимому, это связано с тем, что видимые изменения наблюдаются редко. Однако, J. Yun et al. наблюдали уплотнение хроматина в ядре охлажденных тканей *Saintpaulia ionantha* (cv. *Ritali*) [24]. С. М. Gazeau упоминает о появлении дополнительных ядрышек у *Triticum aestivum* L. (cv. *Dukat*) [29]. Н. А. Ishikawa et al. [8] сообщили о набухших ядрах с фрагментированным хроматином и множеством ядрышек, а также о появлении пучков микрофиламентов и другого плотного материала в ядре и цитоплазме клеток *Vigna radiata*, подвергнутого холодному стрессу. Увеличение размера пузырьков Гольджи и расширение эндоплазматического ретикулула предшествовало набуханию мембран, вызванному действием низких температур. О сходном изменении цитоплазматических мембран *Ephedra reptans* сообщается в статье С. Murphy, J. Wilson [13].

Факторы, влияющие на ультраструктурные изменения, вызванные холодным стрессом

Влияние неблагоприятных условий окружающей среды обычно является многосторонним, и холодовой стресс в данном случае не исключение. Существует много факторов, например интенсивность света, относительная влажность, наследственная устойчивость растения к низким температурам, которые могут либо усиливать действие стресса, либо уменьшать его эффект. Действительно, практически невозможно контролировать совокупность всех этих факторов, но любое исследование будет неполным без рассмотрения их влияния на ультраструктуру клетки.

Чувствительность к низким температурам. Некоторые растения по своей природе являются более стойкими к холодному стрессу, чем другие. Поэтому точное обсуждение влияния низких температур на ультраструктуру клетки должно включать идентификацию описываемого вида. Очевидно, что чем более чувствительно растение к стрессу, тем быстрее происходят ультраструктурные изменения и тем они масштабнее [6, 7, 10]. У холодоустойчивых растений не наблюдаются заметные изменения даже при охлаждении в течение длительного промежутка времени, если одновременно не накладывается влияние другого стрессового фактора.

R. R. Wise et al. [14] выделяют три группы растений, отличающихся по чувствительности к холоду, освещению и водному стрессу. У самых чувствительных к низким температурам видов (*Gossypium hirsutum* L., cv. *Stoneville 213-Delta Pine*), подвергнутых охлаждению в течение 24 ч, ответная реакция проявлялась в полном разрушении оболочки хлоропластов и плазмолизе клеток. Менее чувствительные к холоду растения (*Phaseolus vulgaris* L., cv. *Blue Lake Bush Bean*) проявили более растянутую во времени реакцию (в пределах 144 ч), которая характеризовалась набуханием хлоропластов и тилакоидов, беспорядочно наклоненными стопками гран, накоплением липидных капелек в строме. Самые холодоустойчивые растения, отнесенные к третьей группе (например, *Brassica oleracea* L., var. *acephala*), не проявляли никаких признаков повреждения до тех пор, пока не были подвергнуты длительному охлаждению, световому и водному стрессу одновременно. Но даже в этом случае пластиды клетки остались неповрежденными.

Влияние освещения на последствия холодного стресса у растений. Самый сложный фактор, которому уделяется большое внимание, – действие света на развитие холодного стресса. Это логично, поскольку основная функция хлоропластов связана со светосбором и преобразованием световой энергии. Выше уже упоминалось о холодочувствительности хлоропластов. Показано, что интенсивное освещение в период охлаждения усиливает повреждающее влияние холодного стресса [14]. Эксперименты R. Jagels на *Selaginella* spp. показали, что в темноте при пониженных

температурах рост растений останавливался, но они оставались зелеными, повреждения хлоропластов не наблюдалось. Количество крахмальных зерен сильно уменьшалось [11]. Однако во время охлаждения на свету происходило разрушение хлорофилла, накапливались липидные включения, изменялась структура тилакоидов [11]. В листьях *Sorghum* (гибрид NK 145) наблюдали градиентное нарастание степени повреждения хлоропластов при действии низких температур при дополнительном влиянии света. При этом максимальная степень повреждения наблюдалась у поверхности листьев, т. е. в части, подвергшейся непосредственному действию света [5]. Эти градиенты интенсивности повреждения в пределах листа были впоследствии подробно описаны I. Terashima, Y. Inoue [30]. С другой стороны, хлоропласты в паренхиме флоэмы *Paspalum dilatatum* Poir подверглись ультраструктурным изменениям раньше, чем хлоропласты мезофилла, находящегося глубже [5]. Авторы предполагают, что в данном случае крахмал сыграл роль своеобразного замедлителя влияния холодого стресса.

Низкая температура также ускоряет формирование хромопластов при постепенном увеличении интенсивности освещения от умеренной степени к высокой. Этот процесс зависит также от вида растения [11].

Влияние относительной влажности. Много работ было посвящено влиянию водного дефицита на ультраструктуру растительной клетки [31]. Однако относительная влажность – фактор, который часто игнорируется в исследованиях холодого стресса. Высокая относительная влажность (100 %), как показано R. R. Wise et al. [14], оказывала защитное действие на хлоропласты как у холодочувствительного хлопка, так и у холодоустойчивых бобов. Защитный эффект усиливался при выдерживании растений в темноте. Повреждения ультраструктуры хлоропластов во влажной атмосфере при действии холода наблюдали у очень холодочувствительного тропического растения *Ephedra reptans* [13].

Зависимость от этапа онтогенеза. Холодовый стресс может оказывать заметное влияние на рост и развитие растения и его внутренних структур. I. Karpilova et al. [32] исследовали влияние низких температур на ультраструктуру органелл *Cucumis sativus* (сорт Клинский урожайный) на различных этапах онтогенеза. Авторы наблюдали увеличение количества тилакоидов и зерен крахмала в хлоропластах охлажденных растений по сравнению контролем в период иницирования видимого роста листа. Цитоплазма и другие органеллы не были заметно затронуты на данном этапе. В течение фазы растяжения клеток происходило увеличение количества липидных включений в хлоропластах охлажденных растений. В третью фазу роста, когда происходит прекращение роста листа и начало старения, наблюдали более развитую систему гран и ламелл в хлоропластах охлажденных растений по сравнению с контролем. I. Karpilova et al. [32] интерпретировали эти изменения как адаптивные и связали их с общим замедлением процессов роста, наблюдаемых у растений, выращенных при низких температурах. Они также отметили, что отток ассимилятов у растений, выращенных при благоприятных условиях, достиг максимума в листьях, которые закончили рост, тогда как при низких температурах наибольшие величины транспорта ассимилятов наблюдали в листьях, площадь которых составила приблизительно 60 % от максимальной.

K. Humbeck, A. Melis, K. Krupinska [33] также сообщили о замедлении развития хлоропластов в листьях *Hordeum vulgare* (cv. *Carina*), выращенных при 5 °С. Эти растения отличались более высокой фотосинтетической продуктивностью на единицу хлорофилла, меньшим содержанием хлорофилла на грамм сырой массы и уменьшенной эффективностью работы реакционных центров фотосистемы II. K. Humbeck et al. [33] обнаружили противоположный эффект у теплолюбивых растений (кукурузы и томатов). Это говорит о том, что способность адаптироваться к низким температурам является видовой особенностью.

Механизмы адаптации клетки к действию низких температур

Способность клетки адаптироваться к низким температурам объясняет главные различия в холодоустойчивости различных видов и защищает их от необратимых разрушений, вызванных холодным стрессом. Точный механизм, благодаря которому происходит акклиматизация, пока еще неизвестен и, скорее всего, таких механизмов несколько [34].

В исследованиях механизма холодоустойчивости важная роль отводится клеточным мембранам. Существовала гипотеза, что фазовые изменения мембран могли бы служить наиважнейшим «первичным датчиком» неблагоприятных для растения температур [35], хотя впоследствии в данной формулировке она оказалась несостоятельной [36].

M. Garber, P. L. Steponkus [37] изучали закаливающее влияние низких температур на тилакоидные мембраны холодоустойчивого сорта *Spinacia oleracea*. Для этого использовалась техника электронной микроскопии, метод замораживания-скалывания. Показано образование паракристаллического окружения белков в тилакоидных мембранах акклиматизированных растений, уменьшение концентрации частиц во внутренней фракции поверхности тилакоидных мембран и однородность частиц по размеру по сравнению с тилакоидными мембранами неакклиматизированных растений, которые имеют две разновидности мембранных частиц. Общеизвестно, что в замороженном состоянии мембраны раскалываются по гидрофобной области. Поэтому обнаруженные различия могут быть связаны с изменениями в гидрофобной области тилакоидных мембран после холодной акклиматизации. Идентичность мембранных частиц не была исследована, но предполагают, что их гомогенность могла возникнуть из-за увеличения содержания ненасыщенных липидов в составе мембран.

Подобный эффект акклиматизации наблюдали также N. P.A. Huner et al. [38, 39] в тилакодах холодоустойчивого сорта *Secale cereale* (cv. *Puma*). Кроме того, они обнаружили цитологические различия между клетками мезофилла в листьях акклиматизированных растений по сравнению с контрольными: закаливающие температуры вызвали появление как одновacuольных, так и многоvacuольных клеток в листьях акклиматизированных растений. В листьях контрольного варианта все клетки имели одну vacuоль. Ультраструктура хлоропласта была изменена, так как произошло уменьшение стопок гран. Содержание хлорофилла, β -каротина и ксантофилла увеличилось под влиянием закаливающих температур, тогда как величина фотосинтетической единицы осталась неизменной.

S. O'Neil, D. Priestly, B. Chabot показали, что в период закалки в мембранах клеток холодоустойчивого сорта *Fragaria virginiana* Duchesne произошло увеличение содержания фосфолипидов с одновременным пропорциональным уменьшением концентрации свободных стероидов [40]. Эти авторы выдвинули предположение, что изменение липидного состава мембран приводит к быстрому увеличению эндоплазматического ретикулума, мембраны тонопласта и появлению мембранных пузырьков у закаленных растений (см. также [41]). Благодаря этому устойчивость клеток к низким температурам увеличивается, потому что образование пузырьков и увеличение общей поверхности мембран дает возможность растению приспособиться к сокращению мембранной поверхности, которая происходит в результате обезвоживания, вызванного замораживанием, и последующей регидратации при размораживании. Z. Ristic, E. Ashworth [42] также сообщили о существенном расширении плазматической мембраны и фрагментированном эндоплазматическом ретикулуме в результате холодной акклиматизации *Arabidopsis thaliana*.

В работе K. Zhong et al. выдвинуто предположение, что молекулярные механизмы устойчивости к холоду у растений включают активацию транскрипции факторов CBF, которые запускают сигнальную индукцию акклиматизации. Это приводит к экспрессии гена COR, от которого зависит устойчивость растений к низким температурам [43]. Другие адаптационные изменения на молекулярном уровне организации клетки рассмотрены ниже.

Изменения на молекулярном уровне, вызванные охлаждением

В отличие от других экологических стрессов, например засухи, сильного освещения или загрязнения воздуха, действие низких температур оказывает интенсивные, быстрые, практически одномоментные изменения в термодинамическом окружении каждой молекулы в растительной клетке. Ферментативные реакции замедляются из-за уменьшения скорости диффузии молекул субстрата. Транспортные процессы через мембраны также ингибируются пониженными температурами. Поэтому любое ультраструктурное повреждение, вероятно, будет прямым или косвенным последствием этих первичных эффектов.

Одним из следствий влияния низкотемпературного стресса является накопление токсичных веществ в клетке, в том числе активных форм кислорода (АФК). Как известно, существует пря-

мая связь между способностью растений обезвреживать АФК и устойчивостью к холодовому стрессу. N. Suzuki, R. Mittler [44] показали, что скорость и место образования АФК в клетке при действии низких температур могут играть центральную роль в формировании ответной реакции на стресс и индукции механизмов защиты. Уровень АФК и связанная с ними сигнальная система контролируются у растений совокупностью генов, которые, в свою очередь, отвечают за процесс акклиматизации растения и его устойчивость к влиянию низких температур [44].

Во многих случаях окислительный стресс приводит к снижению эффективности использования энергии света в метаболических реакциях. И поскольку при накоплении АФК в хлоропластах при низкотемпературном стрессе происходит поглощение избыточной световой энергии, этот процесс зачастую ассоциируется с условиями фотоингибирования [45]. D. M. Hodges et al. показано наличие корреляции между уровнем активности антиоксидантных ферментов и степенью ингибирования активности фотосинтетического аппарата [46]. Установлено, что трансгенные растения тополя [47], риса [48], табака [49] и хлопчатника [50] с повышенной активностью глутатионредуктазы обладают большей устойчивостью к фотоингибированию при низкой температуре по сравнению с растениями дикого типа [51]. Однако при выращивании этих растений в условиях постепенного снижения температуры не выявлено отличий в активности фотосинтетического аппарата между растениями трансгенными и дикого типа. Интересно, что при этом наблюдали адаптационное повышение активности глутатионредуктазы в листьях растений дикого типа [52].

D. Kornyejev et al. [53] считают, что антиоксидантная система может играть роль альтернативного стока электронов и в ситуациях, когда активность цикла Кальвина понижена (влияние низких температур, засуха, резкое увеличение интенсивности света), система метаболизма активных форм кислорода осуществляет не только их дезактивацию, но и поддерживает поток электронов за счет использования восстановительных эквивалентов в ферментативных реакциях. При этом поглощаемая фотосинтетическим аппаратом световая энергия становится менее избыточной, что приводит к снижению ее повреждающего действия [53].

Еще один характерный признак низкотемпературного стресса – активация гидролитических ферментов: амилаз, десатураз. При понижении температуры отмечается также повышение содержания криопротекторов. Это прежде всего водорастворимые углеводы, гидрофильные белки, аминокислоты. Увеличение концентрации водорастворимых углеводов считают сигналом для запуска механизмов адаптации растений к низким температурам. Кроме того, происходит увеличение количества полярных липидов и снижение насыщенности их жирнокислотных остатков; увеличение количества защитных белков.

В научной литературе имеется множество сообщений о белках, выполняющих защитные функции при охлаждении растений. В последнее время исследователи выделяют несколько типов белков низкотемпературного стресса: антифризные белки, шапероны и дегидрины, а также белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях во время холодового шока [54]. Значительное число таких белков выделено и идентифицировано.

Показано, что антифризные белки имеют многочисленные гидрофильные домены, связывающие лед и способные подавлять рост и перекристаллизацию льда в межклетниках. Интересно, что многие антифризные белки гомологичны белкам патогенеза и характеризуются двойной функцией: защита от болезней и повышение морозоустойчивости. Гетерологическая оверэкспрессия генов антифризных белков приводила к повышению холодоустойчивости [55]. M. W. F. Yaish et al. [56] сообщают, что при понижении температуры у озимой ржи (*Secale cereale*) синтезируются внеклеточные, связанные с патогенезом белки, включая глюканазы, и проявляют антифризную активность. Эти белки также формируют у растений устойчивость к патогенам и, кроме того, способны модифицировать кристаллы льда, не допуская появления крупных образований, опасных для клеточной жизнедеятельности. Авторы считают глюканазы озимой ржи примером эволюции белков при адаптации к условиям холода и мороза [56].

В семенах, побегах и корнях при действии низких температур обнаружены гидрофильные белки типа дегидринов, которые являются защитными продуктами биомембран. Эти соединения способствуют изменению состава мембран, влияют на фотосинтетический потенциал при

холодовом закаливании [57]. Из тканей растений озимой пшеницы было выделено семейство белков WCS120 (wheat cold stimulated), специфичных для злаков. Установлено, что содержание этих белков регулируется низкой температурой и связано с развитием морозоустойчивости [58].

Еще одной важной группой соединений, защищающих клетку от холодового стресса, являются разобщающие белки. Благодаря им происходит термогенез в первые моменты стрессового воздействия, что дает растению возможность подготовиться к последующему действию отрицательной температуры. Этот защитный механизм распространен в животных клетках (разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях) [59].

Разобщающие белки были обнаружены и в митохондриях растений: у картофеля, озимой ржи, томатов, кукурузы и в плодах ряда растений [60–63]. К ним относятся PUMP (plant uncoupling mitochondrial protein), St UCP (*Solanum tuberosum* uncoupling protein) и БХШ 310 (белок холодового шока). Показано, что PUMP функционирует при созревании плодов и при усилении дыхания. Синтез St UCP регулируется холодом и, по-видимому, этот белок принимает участие в работе системы терморегуляции у растений. PUMP и St UCP являются интегральными белками внутренней мембраны митохондрий, БТШ в отличие от них локализован в цитозоле. Механизм его действия еще неясен. Предполагают, что имеется целое семейство подобных белков.

Холодовая акклиматизация теплолюбивых растений сопровождается также синтезом специфических белков, в котором участвуют митохондрии и хлоропласты. Так, в закаленных проростках кукурузы обнаружено большое количество транскриптов, соответствующих трем генам – *car 333*, *car 30* и *car 757* (chilling acclimation responsive) [64].

Индукцированные охлаждением изменения экспрессии генов могут быть связаны с общей реакцией растений на понижение температуры. Их можно рассматривать как *cor*-гены (cold regulated genes), экспрессия которых, приводящая к образованию БТШ, регулируется по-разному в условиях холодových воздействий [65].

Заключение. Изменения на всех уровнях организации растения под влиянием низких температур, несмотря на их разнонаправленность и многообразие, подчинены единой генеральной стратегии избегания стресса. Из имеющихся в литературе данных видно, что морозостойкость и другие биологические особенности растений тесно связаны с обменом веществ. Поэтому одним из перспективных направлений исследований является изучение метаболических процессов в условиях низкотемпературного стресса, в том числе под воздействием экзогенных химических соединений. Использование физиологически активных соединений позволит реализовать потенциальные возможности, заложенные в геноме растений, повысить их продуктивность и устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды. Исследование механизмов устойчивости и адаптивных реакций растений на влияние низкой температуры позволит разработать эффективные способы защиты сельскохозяйственных культур от холодового стресса и в некоторой степени преодолеть природно-климатические ограничения при их выращивании.

Литература

1. Bunyard P. // Ecologist. 1999. Vol. 29. P. 79.
2. Самыгин Г. А. // Физиол. растен. 1997. Т. 44. С. 275–286.
3. Климов С. В., Астахова Н. В., Трунова Т. И. // Физиол. растен. 1997. Т. 44. С. 794–801.
4. Kratsh H. A., Wise R. R. // Plant, Cell and Environment. 2003. Vol. 23, N 4. P. 337–350.
5. Taylor A. O., Craig A. S. // Plant Physiology. 1971. Vol. 47. P. 719–725.
6. Nessler C. L., Long R. C., Wernsman E. A. // Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie. 1980. Vol. 99. P. 27–35.
7. Ma S., Lin C., Chen Y. // Botanical Bulletin of the Academia Sinica. 1990. Vol. 31. P. 263–272.
8. Ishikawa H. A. // American Journal of Botany. 1996. Vol. 83. P. 825–835.
9. Taylor A. O., Rowley J. A. // Plant Physiology. 1971. Vol. 47. P. 713–718.
10. Kimball S. L., Salisbury F. B. // American Journal of Botany. 1973. Vol. 60. P. 1028–1033.
11. Jagels R. // Canadian Journal of Botany. 1970. Vol. 48. P. 1853–1860.
12. van Hasselt P. // Proceedings Koninkl Nederl Akademie Van Wetenschappen Amsterdam Series C. 1974. Vol. 77. P. 50–56.
13. Murphy C., Wilson J. M. // Plant, Cell and Environment. 1981. Vol. 4. P. 261–265.
14. Wise R. R., McWilliam J., Naylor A. W. // Plant, Cell and Environment. 1983. Vol. 6. P. 525–535.
15. Deiting U., Zrenner R., Stitt M. // Plant, Cell and Environment. 1998. Vol. 21. P. 127–138.

16. Bruggemann W., vander Kooij T. A. W., van Hasselt P. R. // *Planta*. 1992. P. 179–187.
17. Leheny E. A., Theg S. M. // *Plant Cell*. 1994. Vol. 6. P. 427–437.
18. Gamalei Y. V., van Bel A. J. E., Pakhomova M. V., Sjutkina V. // *Planta*. 1994. Vol. 194. P. 443–453.
19. Mitchell D. E., Madore M. A. // *Plant Physiology*. 1992. Vol. 99. P. 966–971.
20. Strand A., Hurry V., Gustafsson P., Gardestrom P. // *Plant Journal*. 1997. Vol. 12. P. 605–614.
21. Wise R. R. // *Photosynthesis Research*. 1995. Vol. 5. P. 79–97.
22. Harvey B. M. R., Fraser T. W. // *Plant, Cell and Environment*. 1980. Vol. 3. P. 107–117.
23. Ashton F. M., Gifford E. M., Bisalputra T. // *Botanical Gazette*. 1963. Vol. 124. P. 336–343.
24. Yun J. G., Hayashi T., Yazawa S. et al. // *Journal of Plant Research*. 1996. Vol. 109. P. 339–342.
25. Slack C. R., Roughan P. G., Bassett H. C. // *Planta*. 1974. Vol. 118. P. 57–73.
26. Kingston-Smith A. H., Harbinson J., Foyer C. H. // *J. Exp. Bot.* 2000. Vol. 51, N352. P. 123–130.
27. Wise R. R., Naylor A. W. // *Plant Physiology*. 1987. Vol. 83. P. 272–277.
28. Leddet P. C., Geneves L. // *Annales Des Sciences Naturelles*. 1982. Vol. 13. P. 27–49.
29. Gazeau C. M. // *Canadian Journal of Botany*. 1985. Vol. 63. P. 663–671.
30. Terashima I., Inoue Y. // *Plant and Cell Physiology*. 1985. Vol. 26. P. 781–785.
31. Fellows R. J., Boyer J. S. // *Protoplasma*. 1978. Vol. 93. P. 381–395.
32. Karpilova I., Chugunova N., Bil' K. et al. // *Soviet Plant Physiology*. 1980. Vol. 29. P. 113–120.
33. Humbeck K., Melis A., Krupinska K. // *Journal of Plant Physiology*. 1994. Vol. 143. P. 744–749.
34. Senser M., Beck E. // *Journal of Plant Physiology*. 1984. Vol. 117. P. 41–55.
35. Wolfe J. // *Plant, Cell and Environment*. 1978. Vol. 1. P. 241–247.
36. Martin B. // *Plant, Cell and Environment*. 1986. Vol. 9. P. 323–331.
37. Garber M., Steponkus P. L. // *Plant Physiology*. 1976. Vol. 57. P. 681–686.
38. Huner N. P. A., Elfman B., Krol M. et al. // *Canadian Journal of Botany*. 1984. Vol. 62. P. 53–60.
39. Huner N. P. A., Öquist G., Hurry V. M. et al. // *Photosynthesis Research*. 1993. Vol. 37. P. 19–39.
40. O'Neil S. D., Priestley D. A., Chabot B. F. // *Plant Physiology*. 1981. Vol. 68. P. 1409–1415.
41. Pomeroy M. K., Andrews C. J. // *Plant Physiology*. 1978. Vol. 61. P. 806–811.
42. Ristic Z., Ashworth E. N. // *Protoplasma*. 1993. Vol. 172. P. 111–123.
43. Zhong K., Ye M., Hu X. et al. // *Hereditas*. 2006. Vol. 28, N 2. P. 249–254.
44. Suzuki N., Mittler R. // *Physiol. plant*. 2006. Vol. 126, N 1. P. 45–51.
45. Badger M. R., von Caemmerer S., Ruuska S. et al. // *Phil. Trans. R. Lond. B*. 2000. Vol. 355, N 1402. P. 1419–1431.
46. Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A. et al. // *J. Exp. Bot.* 1997. Vol. 48, N 310. P. 1105–1113.
47. Foyer C. H., Harbinson J. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 109, N3. P. 1047–1057.
48. Kouril R., Lazar D., Lee H. et al. // *Photosynthetica*. 2000. Vol. 41, N 4. P. 571–578.
49. Stevens R. G., Creissen G. P., Mullineaux P. M. // *Planta*. 2000. Vol. 211, N 4. P. 537–545.
50. Kornyejev D., Logan B. A., Payton P. et al. // *Funct. Plant. Biol.* 2003b. Vol. 30, N 2. P. 101–110.
51. Kornyejev D., Logan B. A., Payton P. et al. // *Funct. Plant. Biol.* 2003b. Vol. 30, N 2. P. 101–110.
52. Logan B. A., Monteiro G., Kornyejev D. // *Amer. J. Bot.* 2003. Vol. 90, N 3. P. 1400–1403.
53. Kornyejev D., Logan B. A., Payton P. et al. // *Funct. Plant. Biol.* 2003b. Vol. 30, N 2. P. 101–110.
54. Колесниченко А. В., Побежимова Т. П., Войников В. К. // *Физиол. растен.* 2000. Т. 47, № 4. С. 624–630.
55. Wang R., Li R., Sun Z. et al. // *J. Appl. Ecol.* 2006. Vol. 17, N 3. P. 551–556.
56. Yaish M. W. F., Doxey A. C., McConkey B. J. et al. // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141, N 4. P. 1459–1472.
57. Beck E. N., Fettig S., Knake C. et al. // *J. Biosci.* 2007. Vol. 32, N 3. P. 501–510.
58. Houde M., Daniel C., Lachapelle M. et al. // *Plant J.* 1995. Vol. 8. P. 583–593.
59. Скулачев В. П. *Энергетика биологических мембран*. М., 1989.
60. Jezek P., Engstova H., Zaskova M. et al. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1998. P. 319–327.
61. Jezek P., Engstova H., Zaskova M. et al. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1998. P. 327–336.
62. Laloi M., Klein M., Riesmeier D. A. et al. // *Nature*. 1997. Vol. 389. P. 135–136.
63. Voinikov V., Побежимова Т., Колесниченко А. et al. // *J. Therm. Biol.* 1998. Vol. 23. P. 1–4.
64. Guy C., Kaplan F., Kopka J. et al. // *Physiol. Plantarum*. 2008. Vol. 132. P. 220–235.
65. Кошкин Е. И. *Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур*. М., 2010.

N. A. KOPYLOVA

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN PLANT CELL UNDER THE INFLUENCE OF CHILLING STRESS

Summary

The influence of chilling stress on structure and metabolism of plant cell is considered. Possible mechanisms of protection and adaptation to a cold at cellular and molecular levels of the organization are discussed.

КАРОТКІЯ ПАВЕДАМЛЕННІ

УДК 57.085:634.73

О. А. КУДРЯШОВА¹, А. А. ВОЛОТОВИЧ¹, Т. В. ГЕРАСИМОВИЧ¹,
А. А. КУДРЯШОВ², В. Л. КОРНЕЙЧИК²

УСКОРЕНИЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ *VACCINIUM CORYMBOSUM* IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УСТАНОВКИ ОСВЕЩЕНИЯ НА ОСНОВЕ СВЕТОДИОДОВ

¹Полесский государственный университет, Пинск, e-mail: volant777@tut.by,

²ООО «Ellis Amalgamated LLC», Минск

(Поступила в редакцию 24.03.2010)

Введение. Светодиод (по-английски, light emitting diode, или LED) – это полупроводниковый прибор с электронно-дырочным *p–n*-переходом или контактом «металл – полупроводник», преобразующий электрический ток непосредственно в световое излучение [1]. Главное преимущество светодиода в отличие от лампы накаливания или люминесцентной лампы заключается в том, что электрический ток преобразуется в световое излучение практически без потерь, при этом светодиод практически не нагревается, что определяет длительный срок его службы. Светодиод излучает в узкой части спектра, излучение идет полностью в переднюю сферу, механически прочен, исключительно надежен. В отличие от ламп накаливания и всех других типов ламп светодиоды излучают свет в относительно узкой полосе спектра, ширина которой составляет 20–30 нм, что делает их особенно удобными для формирования светильников со специальным спектром излучения. Срок службы светодиода может достигать 100 тыс. ч, что почти в 100 раз больше, чем у лампочки накаливания, и в 5–10 раз больше, чем у люминесцентной лампы. Падение яркости свечения светодиодов, например, через 50 000 ч, как правило, не превышает 25 %. Светодиод является низковольтным электроприбором, это качество определяет безопасность работы со светодиодами в целом. Сверхминиатюрность и встроенное светораспределение (оптические линзы) дополняют положительные качества светодиода [1–4].

За период февраль – ноябрь 2009 гг. при научном сопровождении сотрудников сектора микрклонального размножения растений УО «Полесский государственный университет» (Пинск, Республика Беларусь) и содействию компании ООО «Ellis Amalgamated LLC» (Минск, Республика Беларусь) был сконструирован опытный образец установки освещения на основе светодиодов. Опытный образец созданной установки испытывался на предмет стимуляции роста и развития растений семейства *Ericaceae* в биотехнологической лаборатории сектора микрклонального размножения растений УО «Полесский государственный университет» с ноября 2009 г. по февраль 2010 г. В настоящей статье приведены результаты испытаний созданного опытного образца светодиодной лампы и сравнительного анализа эффективности использования световых установок с разным типом ламп для стимуляции роста и развития регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro*.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали регенеранты голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. сорта Brigitta blue, размножаемые микрклонально *in vitro*. В качестве экспланта для формирования регенеранта использовали фрагмент побега из двух метамеров. Метамер состоит из узла с листом и пазушной почкой и нижележащего междоузлия. Регенеранты в колбах объемом 100 мл, содержащими по 20 мл агаризованной питатель-

ной среды для размножения [5], размещали на стеллажах световой установки биотехнологической лаборатории при освещении либо оригинальными светодиодными лампами (4000 лк; полезная мощность 7,5 Вт; потребляемая мощность 14,0 Вт; $\lambda = 400\text{--}440$ нм; 530–550 нм; 660–690 нм), либо люминесцентными лампами OSRAM L36W/76 Natura (6000 лк; потребляемая мощность 36 Вт; CCT = 6200–6500 К) при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) и при температуре 24 ± 1 °С.

Пассаж регенерантов и учет количественных признаков проводили через 7 недель культивирования *in vitro*. Анализировали изменчивость следующих признаков: «высота регенерантов», «коэффициент размножения/побеги» (как количество развившихся побегов из одного экспланта) и «коэффициент размножения/экспланты» (как количество полноценных эксплантов для последующего размножения, получаемое после черенкования побегов, развившихся у одного регенеранта). Количество анализируемых регенерантов при освещении светодиодными и люминесцентными лампами составило 385 и 331 соответственно (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Биометрические показатели изменчивости высоты регенерантов голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Тип лампы	Номер колбы	Количество анализируемых регенерантов, шт.	Высота регенерантов, см	Минимальная высота регенеранта, см	Максимальная высота регенеранта, см
Лампа светодиодная ($\lambda = 400\text{--}440$; 530–550; 660–690 нм)	1	39	1,63±0,06	0,75	3,00
	2	98	1,19±0,04	0,50	2,00
	3	146	1,01±0,02	0,60	1,70
	4	102	0,94±0,03	0,60	1,80
OSRAM L 36W/76 Natura (CCT=6200–6500 К)	1	88	0,81±0,02	0,30	1,30
	2	113	0,78±0,02	0,45	1,20
	3	46	0,96±0,04	0,40	1,50
	4	84	1,00±0,02	0,40	1,60
HCP ₀₅		–	0,08	–	–
HCP ₀₁		–	0,10	–	–

П р и м е ч а н и е. Прочерк «–» – отсутствие данных. Высота регенерантов приводится как «среднее арифметическое ± стандартная ошибка».

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [6]. Дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе AB-Stat, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси.

Результаты и их обсуждение. Результаты биометрического анализа изменчивости признака «высота регенерантов» приведены в табл. 1. Согласно полученным данным, средняя высота регенерантов, культивируемых *in vitro* при освещении светодиодными лампами, в отдельных вариантах опыта достоверно (при $P < 0,01$) на 6,3–8,5 мм превышала таковую у регенерантов, культивируемых *in vitro* при освещении люминесцентными лампами указанного выше типа. Максимальная высота отдельных регенерантов при освещении светодиодными лампами достигала 2,0–3,0 см, в то время как у регенерантов, освещаемых люминесцентными лампами, не превышала 1,6 см (табл. 1). В целом разбегка по высоте регенерантов для вариантов опыта со светодиодной и люминесцентной подсветкой составила 0,5–3,0 см и 0,3–1,6 см соответственно (табл. 1).

Усредненные результаты анализа изменчивости исследуемых признаков приведены в табл. 2. Согласно полученным данным, высота регенерантов под светодиодной лампой достоверно (при $P < 0,01$) на 4,0 мм превышала высоту регенерантов под люминесцентной, а коэффициент размножения (по количеству полноценных эксплантов) у регенерантов под светодиодной лампой достоверно (при $P < 0,05$) в 1,49 раза превышал таковой у регенерантов под люминесцентной лампой. По количеству развившихся побегов из одного регенеранта достоверных различий выявить не удалось, тем не менее следует отметить тенденцию повышения коэффициента размножения (по побегам) в 1,39 раз у регенерантов под светодиодной лампой (табл. 2). Таким образом, за один и тот же промежуток времени при использовании созданных светодиодных ламп для освеще-

щения регенерантов *Vaccinium corymbosum L. in vitro* возможно производство большего количества качественного материала в виде полноценных эксплантов для размножения, что позволяет существенно сократить сроки производства необходимого количества регенерантов для их последующего укоренения и адаптации.

Т а б л и ц а 2. Изменчивость количественных признаков у регенерантов голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Тип лампы	Высота регенерантов, см	Коэффициент размножения/побеги, шт.	Коэффициент размножения/экспланты, шт.
OSRAM L 36W/76 Natura CCT=6200–6500 К (контроль)	0,93	3,12	4,16
Лампа светодиодная ($\lambda = 400-440; 530-550; 660-690$ нм)	1,33**	4,36	6,19*
HCP ₀₅	0,08	1,70	1,91
HCP ₀₁	0,10	3,12	3,52

* Достоверно отличается от контроля при $P < 0,05$.

** При $P < 0,01$.

Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора «тип лампы» на изменчивость признаков «высота регенерантов» (при $P < 0,01$) и «коэффициент размножения/экспланты» (при $P < 0,05$) (табл. 3). Доля влияния фактора на изменчивость данных признаков составила 28,4 и 46,7 % соответственно. Несмотря на то что доля влияния фактора на изменчивость признака «коэффициент размножения/побеги» составила 56,6 %, достоверность влияния при этом не установлена (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Однофакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов голубики высокой *in vitro* при освещении разными типами ламп

Источник варьирования	Степень свободы	Высота регенерантов		Степень свободы	Коэффициент размножения/побеги		Коэффициент размножения/экспланты	
		Средние квадраты	Доля влияния, %		Средние квадраты	Доля влияния, %	Средние квадраты	Доля влияния, %
Общее	311	0,143	—	7	0,771	—	2,507	—
Фактор А (тип лампы)	1	12,644**	28,376	1	3,050	56,557	8,201*	46,742
Повторности	155	0,089	30,791	3	0,213	11,860	2,393	40,910
Случайные отклонения	155	0,117	40,833	3	0,568	31,583	0,722	12,347

П р и м е ч а н и е. Прочерк «—» – отсутствие данных.

* Значимо при $P < 0,05$.

** При $P < 0,01$.

Заключение. Регенеранты, культивируемые *in vitro* при освещении созданными светодиодными лампами, в отдельных случаях достоверно (при $P < 0,01$) превышали по высоте на 6,3–8,5 мм регенеранты, культивируемые под люминесцентными лампами OSRAM L36W/76 Natura.

В среднем высота регенерантов под светодиодными лампами достоверно (при $P < 0,01$) на 4,0 мм превышала высоту регенерантов под люминесцентными лампами OSRAM L36W/76 Natura.

По количеству полноценных эксплантов, полученных после черенкования побегов, развившихся из одного регенеранта, установлено достоверное (при $P < 0,05$) превышение в 1,49 раза у регенерантов под светодиодными лампами.

В процессе однофакторного дисперсионного анализа установлено достоверное при $P < 0,01$ и $P < 0,05$ влияние типа лампы на изменчивость признаков «высота регенерантов» и «коэффициент размножения/экспланты» соответственно.

Результаты исследований свидетельствуют о достоверном ускорении роста и развития регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* при освещении их опытным образцом созданной установки освещения на основе светодиодов.

Литература

1. Юнович А. Э. // Экология и жизнь. 2003а. Т. 33, № 4. С. 62–65.
2. Алферов В. Ю., Митрохин Ю. В. // Светотехника. 2009. № 5. С. 9–12.
3. Билунд Л. // Светотехника. 2009. № 6. С. 64–66.
4. Юнович А. Э. // Светотехника. 2003б. № 3. С. 2–6.
5. Trigiano R. N., Gray D. J. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. US/MA, CRC Press LLC. 1999–2000.
6. Боровиков В. П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере. СПб., 2001.

*O. A. KUDRYASHOVA, A. A. VOLOTOVICH, T. V. GERASIMOVICH,
A. A. KUDRYASHOV, V. L. KORNEICHIK*

ACCELERATION OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF VACCINIUM CORYMBOSUM SHOOTS IN VITRO USING OF EMPLACEMENT OF ILLUMINATION ON THE BASIS OF LIGHT-EMITTING DIODES

Summary

The results of trials of the created pre-production model of a light-emitting diode lamp as well as comparative analysis of efficiency of use of light installations with different type of lamps for growth and development stimulation of *Vaccinium corymbosum* L. shoots *in vitro* are presented in this article. Authentic influence of used lamps type on variability of traits «shoot height» (at $P < 0.01$) and «reproduction factor» (at $P < 0.05$) is established.

УДК 579.66.D77

М. М. ДЖАФАРОВ

РАЗВИТИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ВИДА *LACTOBACILLUS FERMENTUM* НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ

Азербайджанский Институт Стандартов, Баку, e-mail: az_standartlar_institutu@mail.ru

(Поступила в редакцию 06.09.2010)

Введение. Несмотря на производство большого количества кисломолочных продуктов, изготовление новых видов данной продукции не потеряло своей значимости, и до настоящего времени научные поиски в этой области продолжают [2].

В производстве кисломолочных продуктов (сыра, творога, простокваши и т.д.) предпочтение отдается штаммам бактерий, устойчивых к высокой температуре. В связи с этим изучение физиологических и биохимических свойств новых штаммов очень важно для получения из них практически пригодных ассоциативных культур [4].

В производстве кисломолочных продуктов, полученных в результате молочнокислого и спиртового брожения, также широко применяются чистые культуры молочнокислых бактерий, и каждый продукт изготавливается с помощью определенных микроорганизмов. Поэтому для культивирования различных штаммов молочнокислых бактерий и увеличения возможности применения важную роль играет изучение их физиологических свойств. В связи с этим для нормального роста и развития бактерий особое внимание уделяется источникам углерода [3].

Способность усваивать сахара в качестве источников энергии и углерода изменяется в зависимости от вида, иногда от штаммов бактерий, а также от условий их обитания [1].

Поэтому основной целью исследования является изучение влияния некоторых субстратов на развитие штаммов молочнокислых бактерий вида *Lactobacillus fermentum*, используемых в различных агроклиматических областях Азербайджанской Республики и выделенных из состава спонтанных кисломолочных продуктов.

Материалы и методы исследования. Влияние сахаров, спиртов, источников азота, кислотности среды и температуры на развитие штаммов молочнокислых бактерий вида *Lactobacillus fermentum*, используемых на территории Азербайджанской Республики и выделенных из спонтанных молочнокислых продуктов, было изучено на жидких питательных средах из виноградного отвара. Увеличение биомассы в данной среде измерено в зеленом световом фильтре №4 (длина волны 500–560 нм) фотоэлектрокалориметра марки «KF77», и количество биомассы определено на основе построенной калибровочной кривой после инкубирования 48 ч.

Использованные в качестве источника углерода и энергии сахара (глюкоза, галактоза, лактоза, мальтоза, сахароза) и спирты (дульсит, этанол, глицерин, инозит, манит и сорбит) были добавлены в среду каждый в количестве 2 %.

В качестве источника неорганического азота брали соли NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, в качестве органического азота – мочевины, аспарагин и пептон. Количество источников азота (кроме пептона), добавленное в питательную среду, высчитано по количеству азота в их составе, и это число составило 0,03 %, а пептон был добавлен в питательную среду в количестве 0,3 %.

Для создания первичной кислотности (рН 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) в питательных средах после стерилизации были использованы растворы 0,1 н. HCl и 0,1 н. NaOH. Для определения влияния температуры на рост микроорганизмов культуры, засеянные в жидкие питательные среды, инкубировали в термостате при 20, 25, 30, 35, 40 °C [5, 7].

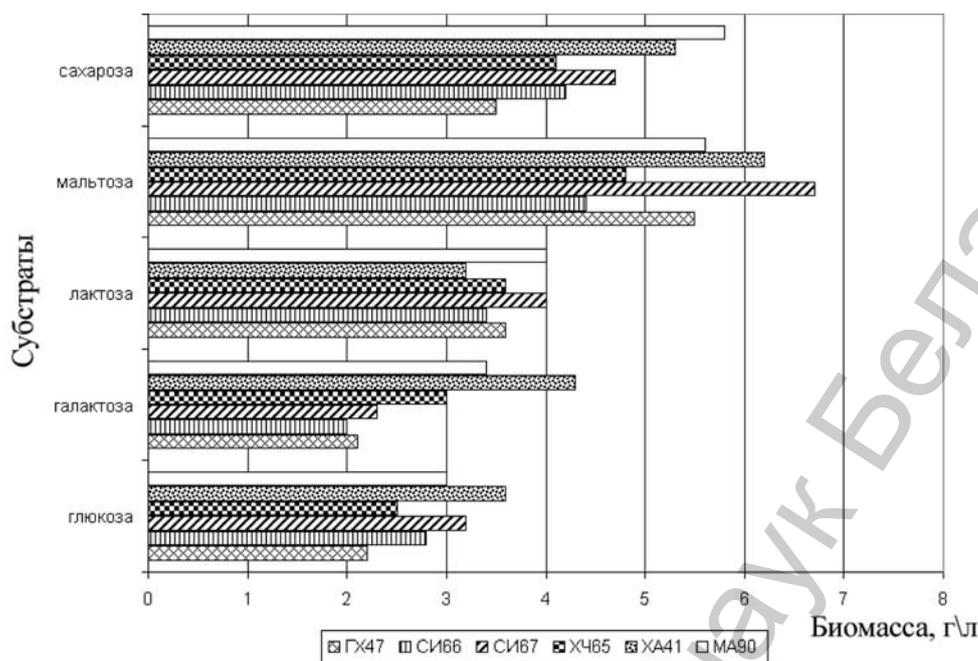


Рис. 1. Влияние сахаров на рост штаммов молочнокислых бактерий *L. fermentum*

Все опыты исследований повторены 5 раз, и результаты были статистически обработаны [6].

Результаты и их обсуждение. При исследовании было обнаружено, что по отношению к сахарам (глюкозе, галактозе, лактозе, мальтозе, сахарозе), используемым в качестве источника углерода и энергии, штаммы вида *Lactobacillus fermentum*, используемые на территории Азербайджанской Республики и выделенные из молочнокислых продуктов, отличаются друг от друга.

У штаммов GX 47, SI 66, SI 67, XЧ 65 вида *L. fermentum* наблюдали наилучшую усвояемость мальтозы, хорошую усвояемость сахарозы, относительно слабую усвояемость глюкозы, галактозы и лактозы. Так, биомасса, образованная в среде с мальтозой и сахарозой, превышала биомассу при лактозе в 1,6 и 1,9 раз соответственно. Штамм MA90 *L. fermentum* лучше всего растет в сахарозе, затем – в мальтозе, хорошо развивается в лактозе, относительно слабо растет в глюкозе и галактозе. Наилучшим субстратом для этого штамма считается сахароза, затем мальтоза. Было обнаружено, что биомасса, образованная при сахарозе и мальтозе, превышает биомассу при глюкозе в 1,9 и 1,8 раза соответственно (рис. 1).

Характерная особенность гетероферментативных, а также гомоферментативных молочнокислых бактерий – приспособление к развитию в среде с высокой концентрацией этилового спирта. Согласно этому, было изучено влияние этанола, дульсита, глицерина, инозита и сорбита на развитие штаммов молочнокислых бактерий.

Штаммы GX 47, SI 66, SI 67 вида *L. fermentum* очень хорошо усвоили маннит и сорбит и очень слабо – этанол и глицерин. Биомасса при первых спиртах превышала биомассу при вторых в 2,9–13 раз.

Штамм XЧ 65, относящийся к этому виду, в одинаковой степени относительно хорошо усвоил дульсит, инозит, манит и сорбит и очень слабо – этанол и глицерин. Биомасса при первых спиртах превышала биомассу при вторых в 2,4–3,3 раза.

Штамм XА41 *L. fermentum* очень хорошо усвоил манит и сорбит, хорошо – инозит и дульсит, в средней степени – этанол и слабо усвоил глицерин. Максимальная биомасса образовалась в среде с маннитом и превышала биомассу при глицерине в 3,9 раза. Штамм MA90 вида *L. fermentum* хорошо усвоил манит и сорбит, в средней степени – дульсит и инозит и слабо – этанол и глицерин. Биомасса при первых спиртах превышала биомассу при этаноле и глицерине в 2,0–2,3 раза (рис. 2).

Одним из главных и необходимых питательных элементов для молочнокислых бактерий является источник азота. Этот источник, как и источник углерода, обеспечивает их рост. Так, боль-

шинство молочнокислых бактерий не обладают способностью синтезировать сложные органические формы азота и поэтому для их роста в такой среде необходим источник азота.

С этой точки зрения было изучено влияние органических (мочевины, пептона и аспарагина) и неорганических (нитрата натрия, нитрата аммония, сульфата аммония) соединений азота на штаммы молочнокислых бактерий вида *L. fermentum*.

Штаммы ГХ 47, СИ 66, СИ 67, ХЧ 65, ХА 41 и МА 90 *L. fermentum* не смогли усвоить в качестве источника азота NH_4NO_3 , однако хорошо усвоили $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Биомасса в среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ превысила биомассу в среде NaNO_3 в 2,7–13 раз.

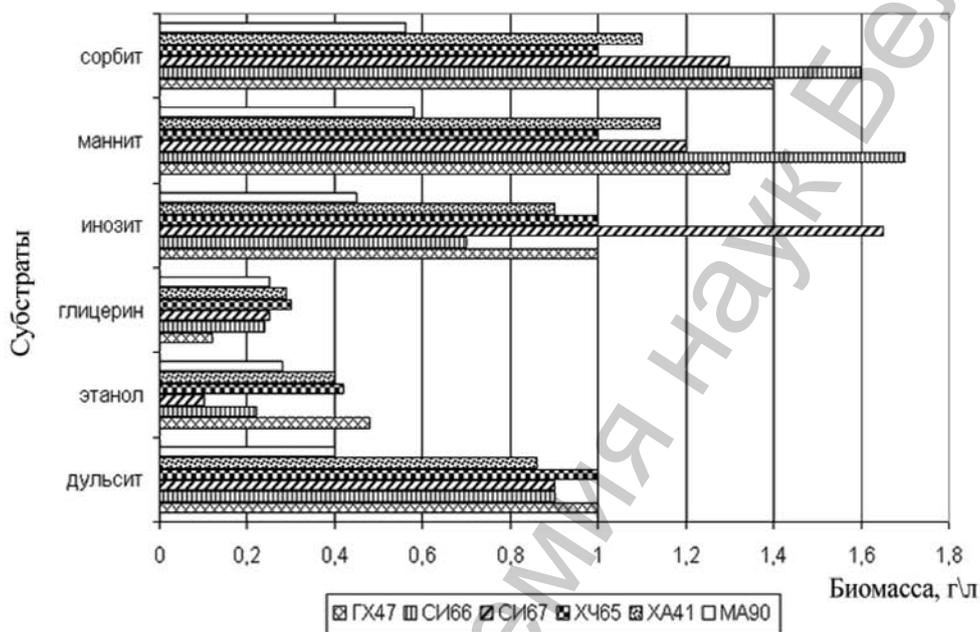


Рис. 2. Влияние спиртов на рост штаммов молочнокислых бактерий *L. fermentum*

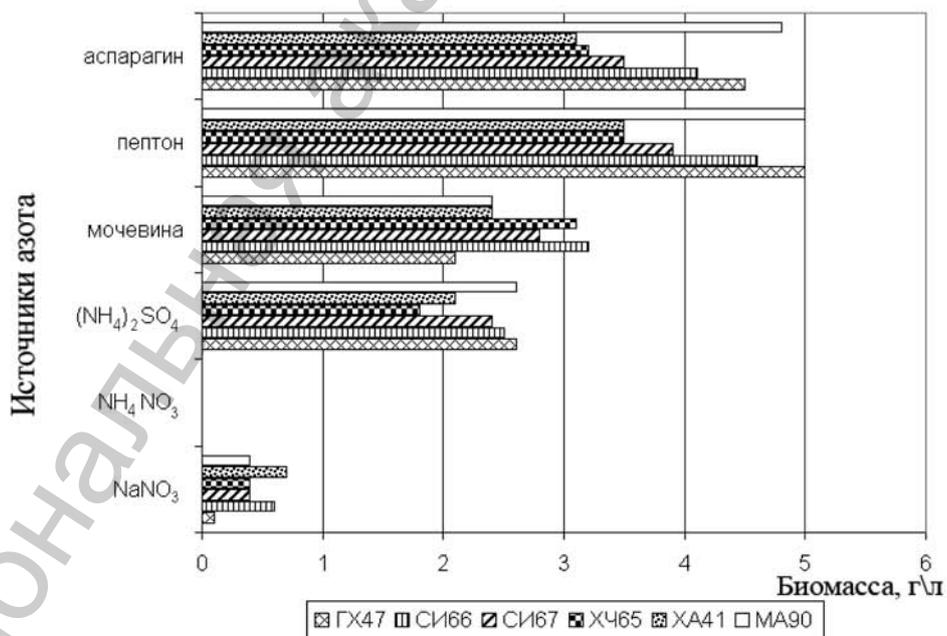


Рис. 3. Влияние источников азота на рост штаммов молочнокислых бактерий *L. fermentum*

Источники органического азота по сравнению с неорганическим очень хорошо усваиваются этими бактериальными штаммами. Биомасса, образованная этими штаммами в среде с пептоном, превысила биомассу в среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 1,6–1,9 раз. Из источников органического азота лучше всего был усвоен пептон. Биомасса, образованная в среде с пептоном, превысила биомассу при мочеvine в 1,4–2,3 раза, аспарагине – в 1,1 раза (рис. 3).

Известно, что температура – один из главных факторов, влияющих на рост и развитие микроорганизмов, в том числе и молочнокислых бактерий. Учитывая именно это, мы изучили влияние температурных факторов на рост и развитие штаммов бактерий вида *L. fermentum* и выявили, что эти штаммы очень слабо развиваются при 20 и 40 °С и хорошо – при 25–35 °С. Максимальная биомасса наблюдается при 35 °С. Так, биомасса, образованная бактериальными штаммами при 35 °С, превысила биомассу при 25 °С в 1,5–2,4 раза, а при 30 °С – в 1,2–1,5 раз (рис. 4).

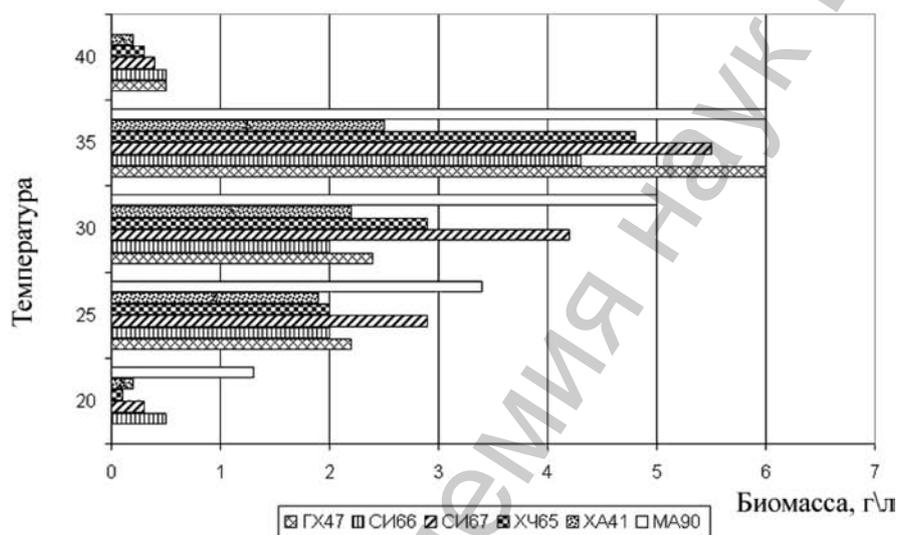


Рис. 4. Влияние температуры на рост штаммов молочнокислых бактерий *L. fermentum*

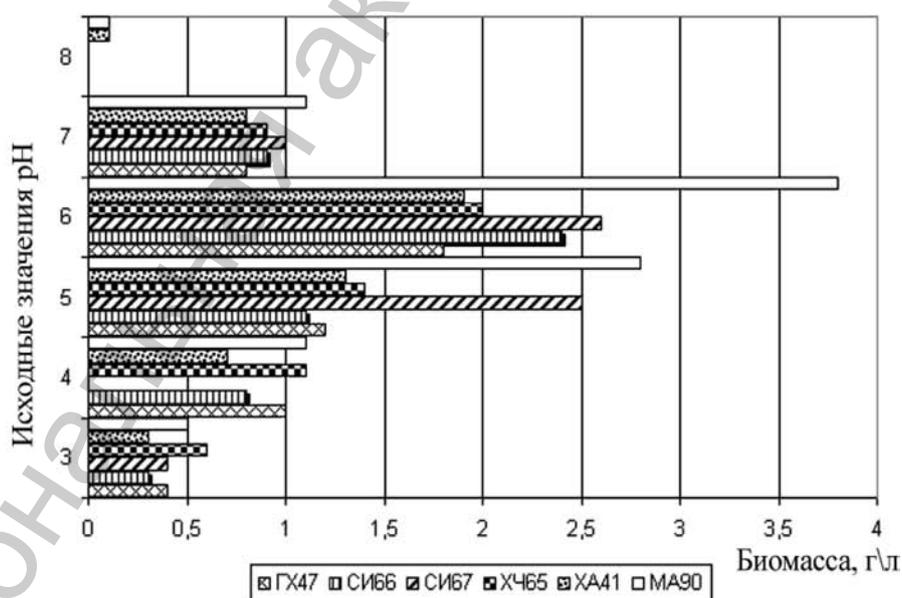


Рис. 5. Влияние pH на рост штаммов молочнокислых бактерий *L. fermentum*

Как видно из рисунка, штаммы вида *L. fermentum* хорошо развиваются при pH 4,0–7,0, при pH 3,0 рост незначителен, а при pH 8,0 рост отсутствует. Наибольшая биомасса – в среде с pH 5,0 и 6,0, а максимальная биомасса наблюдалась в среде с pH 6,0. Максимальная биомасса штаммов превышала биомассу сред с pH 4,0; 5,0 и 7,0 в 1,6–4,4; 1,1–2,4 и 2,0–3,8 раз соответственно (рис. 5).

Заключение. Для молочнокислых бактерий вида *L. fermentum* наилучшим источником углерода и энергии из сахаров является мальтоза и сахароза, из спиртов – сорбит и манит. Для этих бактериальных штаммов наилучший источник неорганического азота – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Они также хорошо усвоили источники органического азота (мочевину, пептон и аспарагин). Пептон, аспарагин и мочевина вызвали образование относительно большей биомассы.

Оптимальная температура для этих штаммов 35 °C, а оптимальная кислотность – pH 6,0.

Литература

1. Ганбаров Х. Г., Джафаров М. М. Микробиология лечебных и диетических кисломолочных продуктов. Баку, 2001.
2. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М., 1975.
3. Джафаров М. М., Ганбаров Х. Г., Касимзаде М. А. // Некоторые физиологические свойства микроорганизмов, выделенных из лечебной простокваши: I Кавказский симпозиум по медико-биологическим наукам. Тбилиси, 1999. С. 74–75.
4. Ганбаров Х. Г., Джафаров М. М., Гурбанова Ф. К. // Влияние моно- и дисахаридов на рост молочнокислых бактерий, выделенных из простокваш, используемых в агроклиматических областях Азербайджанской Республики: Науч. тр. Москов. пед. гос. ун-та. М., 2006. С. 422–431.
5. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. М., 2006.
6. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. П. // Практикум по микробиологии. М., 2004. С. 256.
7. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1998.

M. M. DJAFAROV

DEVELOPMENT OF LACTIC ACID BACTERIA OF DIFFERENT SUBSTRATES LACTOBACILLUS FERMENTUM STRAINS ON ENVIRONMENTS

Summary

For lactic acid bacteria *L. fermentum* strains the best source of carbon and energy from sugar are maltose and saccharose, from alcohols sorbit and mannit. For these bacteria strains the best source of inorganic nitrogen is $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. All strains also good assimilated sources of organic nitrogen (urea, peptone and asparagine). Peptone, asparagine and urea caused the formation of relatively greater biomass.

The optimal temperature for these strains is 35 °C, and the optimum acidity is pH 6,0.

РЕФЕРАТЫ

УДК 634.737:581.522.4:631.5

Павловский Н. Б., Дрозд О. В. **Оценка регенерационной способности зеленых черенков интродуцированных в Беларуси сортов голубики (*Vaccinium corymbosum*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 5–9.

Корнеобразующая способность зеленых черенков голубики разных сортов в среднем варьирует от 46 до 93 %. На основании полученных результатов 24 сорта голубики высокой и 3 сорта голубики полувысокой классифицированы на три группы: легкоукореняемые, среднеукореняемые и трудноукореняемые. Установлено, что чем больше облиственность зеленых черенков, тем выше их регенерационная способность.

Табл. 3. Библиогр. – 11 назв.

УДК 582.71:581.19

Башилов А. В. **Ингибирование накопления гидропероксидов в льняном масле экстрактами лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 10–13.

Установлено, что экстракты, полученные из листьев, соцветий, корней и корневищ лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.), оказывают ингибирующее действие на процесс пероксидного окисления масла льна. Наибольшую антиокислительную активность проявили экстрактивные вещества соцветий.

Изученные экстракты могут быть рекомендованы в качестве стабилизаторов, обеспечивающих пролонгацию сроков хранения масла льна и продуктов на его основе.

Ил. 1. Библиогр. – 7 назв.

УДК 635.92.05:582.579.2:581.522.4

Бородич Г. С. **Особенности сезонного развития сортов бородатых ирисов (Bearded irises) при интродукции в Центральном ботаническом саду НАН Беларусі** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 14–17.

Рассматриваются особенности сезонного развития 209 сортов бородатых ирисов, интродуцированных в Беларуси, как перспективных декоративных растений. Для каждого сорта определены сроки цветения и амплитуда их изменчивости, рассчитаны средние значения сроков зацветания.

Произведено распределение сортов бородатых ирисов на ранние, раннесредние, средние, среднепоздние и поздние, установлена продолжительность их цветения в пределах садовых групп.

Подтверждена зависимость сроков цветения бородатых ирисов от биологических особенностей сортов и погодно-климатических условий вегетационного периода.

Сорта бородатых ирисов разных сроков цветения рекомендованы для создания цветников с непрерывным и продолжительным декоративным эффектом.

Табл. 1. Ил. 2. Библиогр. – 7 назв.

УДК 582.572.42:635.92 (476)

Завадская Л. В. **Коллекционный фонд нарциссов (*Narcissus*) Центрального ботанического сада НАН Беларусі** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 18–23.

Рассматриваются результаты изучения нарциссов коллекции ЦБС НАН Беларусі с целью отбора наиболее перспективных для использования в промышленном цветоводстве республики. Согласно международной классификации, определена принадлежность 403 сортов коллекционного фонда к 11 садовым группам. По цветовым сочетаниям долей околоцветников и привенчиков сорта групп реструктурированы в подгруппы. Приводятся декоративные качества нарциссов. Указываются сроки начала фазы цветения и продолжительность периода декоративности сортов. Установлены биометрические параметры растений, включая высоту цветоносов и размер цветков. Уточнен возраст сортов, входящих в состав коллекции. Из числа изученных интродуцентов для широкой культуры в республике выделены трубчатые, крупнокорончатые, мелкокорончатые и разрезнокорончатые нарциссы, обладающие высокими декоративными качествами, универсальные по возможности использования.

Библиогр. – 14 назв.

УДК 635.92:582.931.4 (476)

Булыко С. Е. **Особенности прорастания семян видов рода *Syringa*** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 24–27.

В ходе исследований установлено, что виды секции волосистых сиреней в условиях Беларуси формируют семена высоких посевных качеств (всхожесть до 96 %). Период органического покоя у них отсутствует или очень короткий, тем не менее хранение семян в течение 1,5 лет только способствует увеличению всхожести.

У представителей подрода лигустрина также формируются качественные семена (всхожесть до 92 %). Быстрее и энергичнее всходят семена с. пекинской по сравнению с с. амурской, период прорастания у которой растянут до 60 дней. В этой связи предложен способ тепловой стратификации при 18–20 °С в течение 1 мес. Отмечена индивидуальная изменчивость в энергии и скорости прорастания семян различных популяций.

Табл. 4. Библиогр. – 14 назв.

УДК 581.143:577.175

Волынец А. П., Шуканов В. П., Гриб С. И. **Механизмы ингибирующего действия физиологически активных веществ на предуборочное прорастание зерновок тритикале** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 28–33.

Исследование состава и содержания индивидуальных компонентов фенольного комплекса генеративных органов тритикале, обработанного в фазе молочной спелости ФАВ, позволило выяснить механизмы ингибирующего действия этих веществ на прорастание зерновок в колосе. Установлено, что ингибирование прорастания их не связано с изменением общего содержания фенольных соединений, а вызвано перестройкой фенольного комплекса. При обработке тритикале α -НУК и эскулетином в колосе возрастала доля о-диоксифенолов, вызывающих ингибирование ферментных систем, ответственных за прорастание зерновок. Под влиянием салициловокислого калия повышалось содержание п-оксиполифенолов, индуцирующих инактивацию ауксина.

Табл. 2. Ил. 4. Библиогр. – 11 назв.

УДК 58:550.73

Сеговиа И. Ф. О., Оливейра В. Л., Гонзалвес М. С. А., Реск И. С., Сильва С. А. М., Сильвейра Д., Гаврилов А. В., Гаврилова Л. А., Канзаки Л. И. В. **Ботаническая характеристика, географическое распространение и фитохимический анализ растений *Manilkara huberi* (Ducke) Stanhl, автотронов штата Амапа, Бразилия** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 34–40.

Исследовали морфологические характеристики и географическое распространение растений *Manilkara huberi* (Ducke), являющихся представителями сем. Sapotaceae, произрастающих в бразильском штате Амапа. В экстрактах кожуры этих растений впервые обнаружены ацетаты альфа- и бетаамирина, которые являются важными компонентами некоторых лекарственных препаратов. Комплекс мер по защите от уничтожения вида *Manilkara huberi*, активное искусственное размножение этих растений в штате Амапа будет способствовать широкому использованию целебных свойств экстрактов этих растений в производстве лекарственных препаратов. Этот путь более перспективен, чем применение громоздких и дорогостоящих приборов и оборудования, используемых для искусственного синтеза ацетатов α - и β -амирина в заводских условиях. Проведенные исследования *Manilkara huberi* (Ducke), произрастающего в джунглях Амазонки, показали существенные отличия его по морфологическим и биохимическим показателям от другого вида *Manilkara*, произрастающего в других штатах Бразилии, который известен как «*Maçaranduba*».

Табл. 3. Ил. 4. Библиогр. – 22 назв.

УДК 575.222.73: [633.11 + 633.14] + [633.11]

Ермишина Н. М., Кременевская Е. М., Гукасян О. Н., Лемеш В. А. **Повышение завязываемости семян при получении отдаленных гибридов озимых гексаплоидных тритикале (*Triticale Thcherm.*) с пшеницей (*Triticum aestivum*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 41–44.

Приведены данные по завязываемости семян у отдаленных гибридов при скрещивании гексаплоидных тритикале и мягкой пшеницы. Показано, что для повышения завязываемости семян при гибридизации тритикале и мягкой пшеницы предпочтительнее использовать в качестве материнской формы межсортовые гибриды тритикале F1 по сравнению с сортами тритикале. Установлено, что при получении беккроссов ВС1 анеуплоидия женского гаметофита в меньшей степени отрицательно влияет на завязываемость семян по сравнению с анеуплоидией мужского гаметофита. Поэтому для повышения эффективности получения беккроссов ВС1 предлагается использовать в качестве материнской формы межвидовые гибриды, а в качестве опылителей – сорта тритикале.

Табл. 4. Библиогр. – 13 назв.

УДК 57.086.83:633.521

Орловская О. А., Сакович В. И., Гузенко Е. В. **Каллусогенез в культуре пыльников льна (*Linum usitatissimum*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 45–48.

Осуществлен подбор оптимальных условий культивирования пыльников в условиях *in vitro* сортов льна с целью использования явления гаплоидии в селекции этой культуры. Установлено, что предобработка бутонов пониженной температурой (+5 °С) в течение 48 ч перед посадкой на питательную среду способствует образованию каллуса при культивировании пыльников льна. Выявлена эффективная питательная среда для индукции каллусогенеза изученных генотипов льна – N6 с добавлением 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

Табл. 1. Ил. 1. Библиогр. – 12 назв.

УДК 636.2.082.22

Михайлова М. Е., Белая Е. В. **Полиморфные варианты генов соматотропинового каскада *bPit-1* и *bPrl* для ДНК-типирования признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской породы** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 49–53.

Тестированы полиморфные варианты гена гипофизарного фактора роста (*bPit-1*): *bPit-1-HinFI*, *bPit-1-StuI* и гена пролактина (*bPrl*) *bPrl-RsaI* у коров голштинской породы. Выявлена статистически значимая положительная корреляция генотипа *bPit-1-HinFI*^{BB} с признаками белкомолочности и жирномолочности. Показано, что животные, с генотипом *bPit-1-StuI*^{AC}, характеризуются более высокими показателями удоя и белкомолочности. Отмечено, что по признакам общего удоя, жирномолочности и белкомолочности более высокие показатели характерны для коров с генотипом *bPrl-RsaI*^{AA}.

Табл. 5. Библиогр.–7 назв.

УДК 575.1/2:612.017:504.05

Жорник Е. В., Баранова Л. А., Емельянова В. П., Волотовский И. Д. **Активация процессов перекисного окисления липидов и нарушение антиоксидантной защиты в лимфоцитах человека под влиянием углеродных нанотрубок** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 54–57.

Для оценки потенциальных негативных эффектов искусственных наноструктур изучено влияние многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) на систему антиоксидантной защиты в лимфоцитах человека, а также способность УНТ оказывать влияние на мембрану клеток и индуцировать перекисное окисление липидов.

Ил. 3. Библиогр. – 12 назв.

УДК 581.13:577.15

Щербakov Р. А., Доманская И. Н., Радюк М. С., Шалыго Н. В. **Влияние избыточного оводнения на рост, накопление активных форм кислорода и защитную систему зеленых проростков ячменя (*Hordeum vulgare*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 58–63.

Показано, что избыточное оводнение приводит к торможению роста проростков ячменя и накоплению в них активных форм кислорода (АФК). При этом активируется синтез стрессовых белков БТШ70 и в большей степени белков дегидринов (ДГ), истощаются уровни общего и восстановленного аскорбата, содержание восстановленного глутатиона (GSH) и общего пула глутатиона (GSH+GSSG) возрастает, в то время как уровень окисленного глутатиона (GSSG) остается практически неизменным. После прекращения действия стрессового фактора содержание АФК снижается до уровня контроля, количество стрессовых белков уменьшается. Однако содержание ДГ в листьях опытных растений остается достаточно высоким, что указывает на важную роль ДГ в процессе адаптации проростков ячменя к стрессу, вызванному избыточным оводнением. Установлено, что в постстрессовый период на фоне неизменного уровня GSSG, а также продолжающегося возрастания количества GSH и GSH+GSSG содержание общего и восстановленного аскорбата еще более снижается по сравнению с их количеством, зарегистрированным при действии стрессового фактора. Полученные результаты свидетельствуют об активной работе в условиях избыточного оводнения и в постстрессовый период аскорбат-глутатионового цикла, в котором происходит разрушение пероксида водорода, а также указывают на исключительно важную роль низкомолекулярного антиоксиданта GSH, уровень которого пополняется за счет восстановления его окисленной формы – GSSG.

Ил. 3. Библиогр. – 18 назв.

Леткевич Л. Л., Ганджа А. И., Лобанок Е. С., Никольская В. П., Василевич И. Б., Симоненко В. П. **Влияние условий криоконсервации на сохранность замороженно-оттаянных ооцитов крупного рогатого скота** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2010. № 2. С. 64–68.

Изучено влияние ряда криопротекторов (глицерина, этиленгликоля, 1,2-пропандиола, сахарозы), режимов насыщения и условий замораживания-оттаивания на структурно-функциональное состояние (сохранность) ооцитов коров. Показано, что ооциты крупного рогатого скота, криоконсервированные без предварительного дозревания *in vitro* с использованием в качестве криопротекторов этиленгликоля или 1,2-пропандиола и сахарозы, проявляют высокую сохранность, стабильность митохондрий, уровень АТФ, способность к оплодотворению и дроблению после оттаивания. Использование потенциал-чувствительного зонда Rd 123, отражающего состояние митохондрий, и определение внутриклеточного уровня АТФ являются ранними прогностическими критериями функционального состояния замороженно-оттаянных ооцитов и их способности к оплодотворению.

Табл. 2. Ил. 2. Библиогр. –13 назв.

УДК 632.95

Гончарик Р. Г., Доманский В. П. **Флуоресцентный биосенсор на основе зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 69–72.

Изучена возможность использования одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* для создания биосенсора на токсические соединения. Показано, что максимальную чувствительность сенсор имеет при обнаружении гербицидов – производных мочевины. Аммиак и ртуть обнаруживаются в концентрациях, сравнимых с ПДК, по кадмию чувствительность на порядок хуже.

Ил. 3. Библиогр. – 7 назв.

УДК 577.322.7

Щербин Д. Г., Лозникова С. Ж., Кульчицкий В. А. **Действие трипсина на внутримолекулярную динамику мембранных белков клеток ткани спинного мозга крыс** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 73–76.

Методом триптофановой флуоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) изучено действие сериновой протеазы трипсина в низких концентрациях 0,5–15 мкг/мл в активном состоянии и в условиях ингибирования активности контрикалом на медленную (миллисекундную) внутримолекулярную динамику белков ткани спинного мозга крыс.

Установлено, что под действием трипсина в концентрациях 3–15 мкг/мл значения τ_1 и τ_2 ТФКТ мембранных белков ткани спинного мозга крыс увеличиваются. Полученные результаты свидетельствуют о том, что трипсин индуцирует сдвиги медленной внутримолекулярной динамики белков ткани спинного мозга крыс в сторону ее ограничения.

Показано, что в отличие от трипсина в активном состоянии под действием ингибированной контрикалом протеазы в исследованных концентрациях значения τ_1 и τ_2 ТФКТ мембранных белков ткани спинного мозга крыс не изменяются. Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие сериновой протеазы на медленную внутримолекулярную динамику мембранных белков ткани спинного мозга крыс реализуется в результате протеолитической активности фермента, а не путем комплексования с белковыми структурами ткани спинного мозга крыс.

Ил. 2. Библиогр. – 17 назв.

УДК 577.12

Балаева–Тихомирова О. М., Данченко Е. О., Нарута Е. Е. **Влияние экстракта куколок дубового шелкопряда (*Antheaea pernyi*) на развитие стеатогепатоза при моделировании инсулинорезистентности у крыс** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 77–81.

Развитие стеатогепатоза при моделировании инсулинорезистентности в эксперименте на крысах привело к накоплению триацилглицеролов и холестерина в печени. Установлено, что нарушение обмена липидов сопровождалось изменением уровня гормонов, регулирующих энергетический обмен: увеличивалась концентрация инсулина и снижалась концентрация адипонектина. Применение экстракта куколок дубового шелкопряда в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела оказывало позитивное влияние на обмен липидов и инсулина. При этом выявлено снижение содержания холестерина в печени, триацилглицеролов и холестерина в сыворотке крови, повышение уровня холестерина ЛПВП, нормализация концентрации инсулина в крови до значений интактных животных. Данный эффект может быть обусловлен антиоксидантными свойствами экстракта куколок дубового шелкопряда.

Табл. 4. Библиогр. – 15 назв.

УДК 611.65.651-013.9:614.87/876]599.323.4

Конопля Е. Ф., Павленко В. С., Банецкая Н. В. **Влияние ионизирующей радиации на морфологию яичников крыс в условиях Полесского радиационно-экологического заповедника** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 82–86.

Изучены особенности структуры яичника у потомства крыс первого поколения (F_1), внутриутробное развитие которого как и содержание его родителей, проходило в условиях действия комплекса радиозоологических факторов зоны отчуждения Чернобыльской АЭС.

Выявлены морфофункциональные нарушения в тканях органа потомства F_1 в разные возрастные периоды. В яичнике животных в неполовозрелом возрасте (30 сут) уменьшается количество примордиальных фолликулов, наблюдаются полиовулярные фолликулы. В более отдаленный период (180 сут) выявляется дегенерация крупных фолликулов и образование кист.

Таким образом, комплекс радиозоологических факторов зоны отчуждения ЧАЭС оказывает угнетающее действие на структуру яичника потомства первого поколения.

Табл. 2. Ил. 1. Библиогр. – 20 назв.

УДК 616.591-081.23.08

Гурманчук И. Е., Петракова О. В., Хватова Л. А., Новиченко Е. Н., Харламова А. Н., Соколовская Е. В. **Культивирование эпидермальных кератиноцитов человека с использованием различных типов специализированных питательных сред** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 87–92.

Проведен сравнительный анализ результатов культивирования кератиноцитов кожи человека с использованием двух типов специализированных ростовых сред (MCDB 153 и DK SFM). Показано, что применение питательной среды MCDB 153 обеспечивает быстрое формирование отдельных пролиферирующих колоний клеток и высокую скорость их пролиферации по сравнению со средой DK SFM. Высокая скорость пролиферации клеток в среде MCDB 153 сопряжена с активной терминальной дифференцировкой клеток и откреплением их от поверхности культурального флакона. Использование питательной среды DK SFM обеспечивает равномерную адгезию большого количества клеток, позволяет избежать их быстрой дифференцировки.

Ил. 3. Библиогр. – 8 назв.

УДК 636.596:619:546.48

Никифоров М. Е., Тюлькова Е. Г. **Экспериментальная оценка накопления кадмия в организме сизого голубя (*Columba livia*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 93–97.

Использованием комплексного подхода к оценке уровня загрязнения организма птиц в системе «окружающая среда – вид индикатор» на сизых голубях путем скармливания им различных доз кадмия с кормом установлено, что наибольшие уровни накопления кадмия при всех его дозах в корме и наиболее резкий рост концентраций кадмия при этом обнаружены в почках птиц. Наибольшими коэффициентами накопления кадмия и их ростом по мере возрастания дозы элемента в корме характеризуются почки птиц; для печени и контурных перьев птиц наблюдается незначительный рост коэффициентов накопления кадмия по мере увеличения его содержания в корме. Отмечается наличие высокой корреляционной связи между содержанием кадмия в корме и печени, мышцах и новых перьях птиц, выросших в условиях эксперимента, между количеством кадмия в мышцах и печени, печени, почках и новых перьях, выросших в условиях эксперимента.

Табл. 5. Библиогр. – 9 назв.

УДК 574.587.063:556.53

Липинская Т. П. **Таксономическая и трофическая структура макрозообентоса акватории портов реки Припять** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 98–101.

Структуру сообщества макрозообентоса изучали на различных речных портах для оценки антропогенного воздействия. Сравнительный анализ ЕРТ и ЕРТ / Oligochaeta индексов в разных портах показал, что величина этих индексов была минимальной в порту г. Микашевичи. В трофической структуре макрозообентоса доминируют собиратели во всех портах (от 30,4 до 40,7 %) и это связано с упомянутыми выше индексами.

Порт г. Микашевичи также характеризуется низкой долей хищников от числа всех трофических групп.

Табл. 2. Ил. 1. Библиогр. – 4 назв.

УДК 597.58(476)

Ризевский В. К., Плюта М. В., Лещенко А. В., Ермолаева И. А. **Новый для фауны Беларуси вид рыб – пухлощекая рыба-игла (*Syngnathus abaster*)** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 102–105.

Приведены материалы по морфометрии впервые выявленного для фауны Беларуси вида рыб – пухлощекой рыбы-иглы *Syngnathus abaster* Risso, 1827.

Табл. 1. Ил. 1. Библиогр. – 11 назв.

УДК 581.17/19.012.4:58.036.5

Копылова Н. А. **Ультраструктурные и биохимические изменения в растительной клетке под влиянием низкотемпературного стресса** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 106–113.

В статье обсуждается влияние холодового стресса на структуру и метаболизм растительной клетки. Рассматриваются возможные механизмы защиты и адаптации к низким температурам на клеточном и молекулярном уровнях организации.

Библиогр. – 65 назв.

УДК 57.085:634.73

Кудряшова О. А., Волотович А. А., Герасимович Т. В., Кудряшов А. А., Корнейчик В. Л. **Ускорение роста и развития регенерантов *Vaccinium corymbosum in vitro* с использованием установки освещения на основе светодиодов** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 114–117.

Приведены результаты испытаний созданного опытного образца светодиодной лампы и сравнительного анализа эффективности использования световых установок с разным типом ламп для стимуляции роста и развития регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro*. Установлено достоверное влияние типа используемых для освещения ламп на изменчивость признаков «высота регенерантов» (при $P < 0,01$) и «коэффициент размножения» (при $P < 0,05$).

Табл. 3. Библиогр. – 6 назв.

УДК 579.66.D77

Джафаров М. М. **Развитие молочнокислых бактерий вида *Lactobacillus fermentum* на средах различных субстратов** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 118–122.

Для молочнокислых бактерий вида *L. fermentum* наилучшим источником углерода и энергии из сахаров является мальтоза и сахароза, из спиртов – сорбит и манит. Для этих бактериальных штаммов наилучший источник неорганического азота – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Они также хорошо усвоили источники органического азота (мочевину, пептон и аспарагин). Пептон, аспарагин и мочевина вызвали образование относительно большей биомассы.

Оптимальная температура для этих штаммов 35 °С, а оптимальная кислотность – pH 6,0.

Ил. 5. Библиогр. – 7 назв.