Уфимский федеральный исследовательский центр
Российской академии наук
Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

EcoBioTech-2021
Ufa, October 4-7, 2019

ЭкоБиоТех 2021

Материалы
VII Всероссийской конференции
с международным участием,
Уфа, 4–7 октября 2021 г.

ЗДРАВНИЦА
Травника Гордеева

биомедхим
Создано природой, сделано нами!

ISBN 978 5 6047532 0 0
9 785604 753200

Уфа – 2021

УДК 57:574:60
ББК 20.1:28.080:28.087
Э 40

Экобиотех 2021. Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, г. Уфа 4-7 октября 2021 г. Уфа: УИБ УФИЦ РАН, 2021. 220 с. [Электронный ресурс: http://ib.anrb.ru/ebt2021/ecobiotech2021.pdf]

ISBN 978-5-6047532-0-0

Всероссийская конференция с международным участием "ЭкоБиотех" проводится на базе Уфимского Института биологии каждые 2 года, начиная с 2009. Она всегда пользовалась популярностью среди ученых нашей страны и зарубежных участников благодаря высокому уровню докладов, актуальности рассматриваемых вопросов и широкой области обсуждаемых проблем.

Тематика представленных в этом сборнике материалов посвящена рассмотрению фундаментальных вопросов и практических задач экологии и генетики микроорганизмов природных и техногенных сообществ; сельскохозяйственной и экологической биотехнологии растений и микроорганизмов; устойчивости растений к действию абиотических и биотических факторов окружающей среды, антропогенных нагрузок и изменения климата; дендроэкологии, лесоведения и лесовосстановления; экологических проблем почвоведения: мониторингу биологического разнообразия и динамики растительности в условиях комплексного влияния природных и антропогенных нагрузок.

Вся ответственность за достоверность предоставленных в сборнике материалов несут авторы соответствующих статей. Статьи публикуются без корректуры с сохранением авторской орфографии и пунктуации. Иллюстрации предоставлены авторами статей.

© Оформление: УИБ УФИЦ РАН, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ 3

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ 8

ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И СПОСОБНОСТИ К МАЦЕРАЦИИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS VELEZENSIS*
Д.Л. Басалаева, К.А. Роденко, М.И. Никельшпарг, С.С. Евстигнеева, Е.В. Глинская 8

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ *BACILLUS ATROPHAEUS* ВКПМ–11474 ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ЛИСТОВОГО САЛАТА В УСЛОВИЯХ КАПЕЛЬНОГО ОРОШЕНИЯ
Д.Г. Баубекова 12

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ БЕЛОГО ФОСФОРА
А.З. Миндубаев, Й.А. Акосах, Э.В. Бабынин, Е.К. Бадеева, С.Т. Минзанова 15

ФОРМИРОВАНИЕ АРХИТЕКТУРЫ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ И КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ У ИНОКУЛИРОВАННЫХ АЦК-УТИЛИЗИРУЮЩИМИ РИЗОБАКТЕРИЯМИ ПРОРОСТКОВ ТОМАТОВ
А.И. Шапошников, Д.С. Сырова, П.С. Ульянич, А.А. Белимов 19

АДАПТАЦИОННЫЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ К УСЛОВИЯМ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ЭКОСИСТЕМ
И.Б. Ившина 21

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PROTEGENS* ДА1.2 НА РОСТ И УРОВЕНЬ СТРЕССА РАСТЕНИЙ СВЕКЛЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ПОЧВЕ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ГЕРБИЦИДОМ НАНОМЕТ
А.А. Кенджиева, Д.В. Четверикова, М.Д. Бакаева, С.П. Четвериков 26

РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ КОИНОКУЛЯЦИИ IN VITRO КАРТОФЕЛЯ РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ
О.В. Ткаченко, Г.Л. Бурыгин, М.А. Григорян, Н.В. Евсеева, К.Ю. Каргаполова 30

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОКСОАНИОНОВ СЕЛЕНА БАКТЕРИЯМИ РОДА *AZOSPIRILLUM*
А.В. Тугарова, А.А. Владимирова, П.В. Мамченкова, А.А. Камнев 33

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АУКСИНПРОДУЦРИРУЮЩЕГО ГЕРБИЦИДТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PROTEGENS* ДА1.2
Г.Г. Худайгулов, Д.В. Четверикова, С.П. Четвериков 37

ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРИНА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ
О.М. Цивилева, Д.Н. Ибрагимова, О.В. Кофтин 40

НЕЙТРАЛИЗАТОР ПЕСТИЦИДНОГО СТРЕССА «АГРОБИОЛОГ»
С.П. Четвериков 44

МИКРОБНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИХ ПАВ И ГЕРБИЦИДОВ
Д.А. Шарипов, С.П. Четвериков 46

ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ СООБЩЕСТВ.....50

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ ОБРАБОТКИ ПОЧВ
Г.Р. Ильбулова, И.Н. Семенова, Я.Т. Суюндуков, Р.Ф. Хасанова, М.Б. Суюндукова, Х.М. Сафин.....50

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ РИЗОСФЕРЫ *ELYTRIGIA REPENS*
Ю.А. Маркова, Л.А. Беловежец, И.С. Петрушин, М.С. Карепова, Л.Е. Макарова, А.А. Левчук, И.В. Злобин, Ю.В. Зайцева 55

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЗОСПИРИЛЛ В КОМПЛЕКСНОЙ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ
А.Ю. Муратова, А.Д. Бондаренкова, Е.В. Дубровская, Н.Н. Позднякова, Л.В. Панченко, С.Н. Голубев, И.Ю. Сунгурцева, О.В. Турковская.....59

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПЕРОКСИДАЗЫ АСКОМИЦЕТОВ: КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И УЧАСТИЕ В КАТАБОЛИЗМЕ ПОЛЛЮТАНТОВ
Н.Н. Позднякова, С.А. Баландина, О.В. Турковская 64

ШТАММОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МОРФОЛОГИЯ *NEOLENTINUS LEPIDEUS* (FR.) REDHEAD & GINNS 1985 В ЭКОСИСТЕМАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ
Н.Ю. Шабанова, О.Б. Вайшля, С.И. Гашков, Н.Н. Кудашова 69

ВОДОРОСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ ПОЧВ ГОРНОЙ ТУНДРЫ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЕПРОДУКТАМИ (ГОРА КАСКАМА, МУРМАНСКАЯ ОБЛАСТЬ)
Р.Р. Шалыгина, В.В. Редькина, В.А. Мязин 73

МОНИТОРИНГ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ДИНАМИКИ РАСТИТЕЛЬНОСТИ В УСЛОВИЯХ КОМПЛЕКСНОГО ВЛИЯНИЯ АНТРОПОГЕННЫХ НАГРУЗОК И ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА.....77

КЛИМАТИЧЕСКИЕ ГРАДИЕНТЫ В РАЗНООБРАЗИИ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЕ ЭКОСИСТЕМ ВЫСОТНЫХ ПОЯСОВ ГОР ЮЖНОЙ СИБИРИ
М.В. Бочарников 77

ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РЕЛЬЕФА НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЛЕСНЫХ СООБЩЕСТВ ГОРНО-ЛЕСНОЙ ЗОНЫ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
С.Н. Жигунова.....83

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕВЫПАСА НА РАЗНОТРАВНО-ЗЛАКОВЫЕ СТЕПИ В ГОСУДАРСТВЕННОМ ПРИРОДНОМ ЗАПОВЕДНИКЕ «ДАУРСКИЙ» (ЮЖНАЯ ДАУРИЯ).
Л.И. Сараева, Т.Е. Ткачук 88

АНАЛИЗ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА *HEDYSARUM ARGYROPHYLLUM* LEDEB. НА ЮЖНОМ УРАЛЕ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ
Ю.А. Федорова, А.А. Мулдашев, А.Г. Кутуева 92

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ 96

ВКЛАД ЭНДОГЕННЫХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ В РЕГУЛЯЦИЮ ВЫЗЫВАЕМЫХ ЦИТОКИНИНОМ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНОМ ПЕРЕСТРОЕК В ПРОТЕОМЕ И ТИРОЗИНОВОМ ФОСФОПРОТЕОМЕ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ
А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова 96

РОЛЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *SCHIZAPHIS GRAMINUM* (ROND.)
В.Ю. Алексеев, С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, А.Р. Касимова, И.В. Максимов 100

ОСНОВНЫЕ ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В РАСТЕНИЯХ
Ч.Р. Аллагулова 105

КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ NaCl–ЗАСОЛЕНИЯ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *TRITICUM AESTIVUM* L.
А.К. Арисова, О.З. Еремченко, В.А. Семенова 110

ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФУНГИЦИДОВ НА СОСТОЯНИЕ ТЮЛЬПАНОВ В СРЕЗКЕ
О.О. Белошапкина, О.Ф. Панфилова 114

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ *TRITICUM AESTIVUM* L. И *SECALE CEREALE* L.
К.И. Боталова 119

РОЛЬ ФИТОГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ РАСТЕНИЯМИ И ПАТОГЕНАМИ, НАСЕКОМЫМИ-ВРЕДИТЕЛЯМИ, ВИРУСАМИ
С.В. Веселова, Т.В. Нужная, Г.Ф. Бурханова, С.Д. Румянцев, А.Р. Касимова, И.В. Максимов 124

ЭФФЕКТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ПРИ КО-ИНОКУЛЯЦИИ РИЗОБАКТЕРИЯМИ В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА *IN VITRO*
Н.В. Евсеева, О.В. Ткаченко, А.Ю. Денисова, Г.Л. Бурыгин, Н.Н. Позднякова 129

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ И СВОЙСТВА β-ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА
А.Н. Ершова 131

МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ФЛОЭМНЫХ ВОЛОКОН РАСТЕНИЙ ЛЬНА ПРИ ГРАВИТРОПИЗМЕ
Н.Н. Ибрагимова 135

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫНОСЛИВОСТИ *FUSARIUM EQUISETI* И *CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM* К ДЕЙСТВИЮ ХРОМА И МЕДИ
Н.А. Исламова, И.Л. Бухарина 139

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГЕНОТИПОВ *LINUM USITATISSIMUM* L. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА
К.П. Королев 145

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАДМИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ
Е.А. Лысенко, А.А. Клаус, А.В. Карташов, В.В. Кузнецов 148

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ В ИМПАКТНОМ ФИТОМОНИТОРИНГЕ ДОНБАССА
А.И. Сафонов, А.З. Глухов 150

УСТОЙЧИВОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТОПОЛЕЙ (*POPULUS* SSP.) К ЗАБОЛЕВАНИЯМ И КОМПЛЕКСУ ВРЕДИТЕЛЕЙ
Н.В. Синчук, В.П. Курченко 155

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ-ФИТОРЕМЕДИАНТОВ К ДЕЙСТВИЮ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ
Ю.М. Сотникова, Р.Г. Фархутдинов 161

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PROTEGENS* ДА1.2 НА УСТОЙЧИВОСТЬ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К ЗАСУХЕ ПРИ ОБРАБОТКЕ ГЕРБИЦИДОМ ЧИСТАЛАН
А.В. Феоктистова, М.Д. Тимергалин, Т.В. Рамеев, С.П. Четвериков 164

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ КАРТОФЕЛЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ СОВМЕСТНОЙ ОБРАБОТКИ *BACILLUS SUBTILIS* 26Д С САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТАМИ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ И ИНФИЦИРОВАНИЯ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*
Е.А. Черепанова, Л.Г. Яруллина, В.О. Цветков, А.В. Сорокань, Е.А. Заикина, Ж.Н. Калацкая, Н.В. Балюк 168

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТ НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ *TADCL2* И *TADCL4* В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБОМ *STAGONOSPORA NODORUM*
М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов 172

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕСОВЕДЕНИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЯ 176

МИКРОБИОМЫ ЗАЛЕЖНЫХ ПОЧВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЯНАО
Е.В. Абакумов, Е.Н. Моргун, А.О. Зверев 176

ДИНАМИКА ГОДИЧНОГО ПРИРОСТА ПОДРОСТА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕЖГОДОВЫХ ФЛУКТУАЦИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ
С.Ю. Бахтина 179

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ, И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ
Л.А. Беловежец, Ю.А. Маркова, М.С. Третьякова 183

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОРБЦИОННОЙ БИОРЕМЕДИАЦИЯ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛЛЮТАНТАМИ РАЗНЫХ КЛАССОВ
Г.К. Васильева, Е.Е. Михедова, Е.Р. Стрижакова 189

ОРГАНИЧЕСКОЕ ВЕЩЕСТВО ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО ЮЖНОГО ПРЕДУРАЛЬЯ ПРИ ВНЕСЕНИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ
Т.Т. Гарипов 193

ОЦЕНКА СРЕДООЧИЩАЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ТОПОЛЯ БАЛЬЗАМИЧЕСКОГО (*POPULUS BALSAMIFERA* L.) В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ
Р.Х. Гиниятуллин 197

КОНКУРЕНЦИЯ, ВЛИЯНИЕ ПЛОЩАДИ ПИТАНИЯ И ПЛЮСОВЫЕ ДЕРЕВЬЯ В КУЛЬТУРАХ СОСНЫ
М.В. Рогозин.....202

О ВОЗМОЖНОСТЯХ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПЛОДОВ И СЕМЯН ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОГО СКРИНИНГА
В.Е. Землянова, Т.М. Жавкина, А.В. Помогайбин, Л.М. Кавеленова, П.В. Родионова, С.А. Розно, Н.В. Янков, Н.Н. Потрахов 207

ДИНАМИКА РАСТИТЕЛЬНОСТИ И РАЗЛОЖЕНИЕ ВАЛЕЖА ЧЕРЕЗ 14 ЛЕТ ПОСЛЕ МАССОВОГО ВЕТРОВАЛА В ШИРОКОЛИСТВЕННОМ ЛЕСУ (ЗАПОВЕДНИК «КАЛУЖСКИЕ ЗАСЕКИ»)
Л.Г. Ханина, М.В. Бобровский, И.В. Жмайлов 212

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В ЕСТЕСТВЕННОМ И ИСКУССТВЕННОМ НАСАЖДЕНИЯХ, ВЫЯВЛЯЕМОЕ ISSR-МАРКЕРАМИ И ПРИ АНАЛИЗЕ SNP
Р.Ю. Янбаев 217

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ

ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И СПОСОБНОСТИ К МАЦЕРАЦИИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS VELEZENSIS*

Д.Л. Басалаева[1], К.А. Роденко[1], М.И. Никельшпарг[2], С.С. Евстигнеева[3], Е.В. Глинская[1]

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия, dbasalaewa@yandex.ru

[2] Гимназия № 3, Саратов, Россия, matveynikel@yandex.ru

[3] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия, stels20295@yandex.ru

Аннотация. Изучен спектр синтезируемых бактериями *Bacillus velezensis* 13 гидролитических экзоферментов, проведена оценка способности к мацерации стандартных тест-объектов: клубни картофеля и корнеплоды моркови и свеклы. Максимальная сахаролитическая активность наблюдалась по отношению к целлюлозе, свекловичному пектину и целлобиозе Исследуемый штамм способен использовать в качестве источника специфических субстратов Твин-40, Твин-85 и кукурузное масло. Штамм *B. velezensis* 13 мацерировал все исследуемые тест-объекты.

Ключевые слова: Bacillus velezensis, гидролитические экзоферменты, мацерация.

Бактерии рода *Bacillus* Cohn имеют огромное количество ферментных систем. У бацилл особенно развита система гидролитических экзоферментов, осуществляющих расщепление полисахаридов, белков и жирных кислот. Эти микроорганизмы синтезируют хитиназы, амилазы, протеазы, целлюлазы и ряд других ферментов.

Особое внимание исследователи уделяют изучению ферментов, представляющих интерес для внедрения в современные промышленные технологии, в сельское хозяйство, агрономию и деревоперерабатывающую промышленность [Сафронова, 2006].

Экстраклеточные гидролитические ферменты бактерий рода *Bacillus*, такие как протеазы, амилазы, пектиназы, целлюлазы и липазы – важный компонент, обеспечивающий пробиотические свойства данных бактерий, который способствует расщеплению субстратов и получению энергии и строительного материала для клеток [Осипова, 2003].

Липазы микробного происхождения являются промышленно важными ферментами и играют большое значение в различных отраслях промышленности и здравоохранения. В частности, они участвуют в процессах модификации и переэтерификации жиров и синтеза сложных эфиров, используются для удаления гидрофобных загрязнителей пресных вод, при производстве моющих средств, в качестве эмульгаторов применяются для улучшения усвояемости кормов [Неклюдов, 2002].

Одной из возможностей применения пектолитических ферментов является обработка мягких пород деревьев, используемых в промышленности, например, норвежской ели.

Бактерии вида *B. velezensis*, по литературным данным, обладают способностью к синтезу ряда ферментов, в частности, гидролитических экзоферментов.

В связи с этим, целью исследования являлось определение спектра синтезируемых бактериями *Bacillus velezensis* 13 гидролитических экзоферментов и оценка способности к мацерации стандартных тест-объектов.

Объектом исследования являлся штамм *B. velezensis* 13, выделенный нами с поверхности листьев ястребинки могучей *Hieracium robustum* Fr. s. L., 1848 в 2018 г. [Басалаева, 2019]. Определение ферментативной активности проводили методом высева исследуемого штамма на плотные дифференциально-диагностические питательные среды с источниками специфических субстратов. В качестве субстратов использовали: обезжиренное молоко - протеолитические ферменты, растворимый крахмал - амилолитические ферменты, порошковую целлюлозу - целлюлолитические ферменты, растворимую целлобиозу - β-глюканазные ферменты, Твин-40, Твин-60, Твин-85 и растительные масла (кукурузное, оливковое, подсолнечное) - липолитические ферменты, яблочный и свекловичный пектины - пектинолитические ферменты. Посев исследуемой культуры осуществляли уколом и инкубировали при 30 °С в течение 7 суток. Учет результатов проводили на 3, 5 и 7 сутки культивирования. О ферментативной активности судили по диаметру зон гидролиза субстрата. Для визуализации зон гидролиза крахмала, целлюлозы и целлобиозы использовали раствор Люголя, а для поверхностно-активных веществ и пектинов - 0,05 %-ный спиртовой раствор бромтимолового синего.

Оценку способности к мацерации исследуемого штамма *B. velezensis* 13 проводили по стандартной методике [Желдакова, 2006]. В стерильные чашки Петри раскладывали диски из фильтровальной бумаги, смачивали стерильным физиологическим раствором. На поверхность помещали диски стандартных тест-объектов диаметром 1 см и толщиной 0,5 см: клубни картофеля и корнеплоды моркови и свеклы. Исследуемую культуру петлей наносили на диски растительных тканей и инкубировали при 28 °С в течение 48-72 ч. Оценку фитопатогенного влияния проводили визуально и касанием петли.

Результаты определения ферментативной активности показали, что бактерии *B. velezensis* 13 обладают протеолитической, амилолитической, целлюлолитической, β-глюканазной, липолитической и пектинолитической активностями. В ходе 7-суточного культивирования наблюдалось увеличение продукции гидролитических экзоферментов (рис. 1).

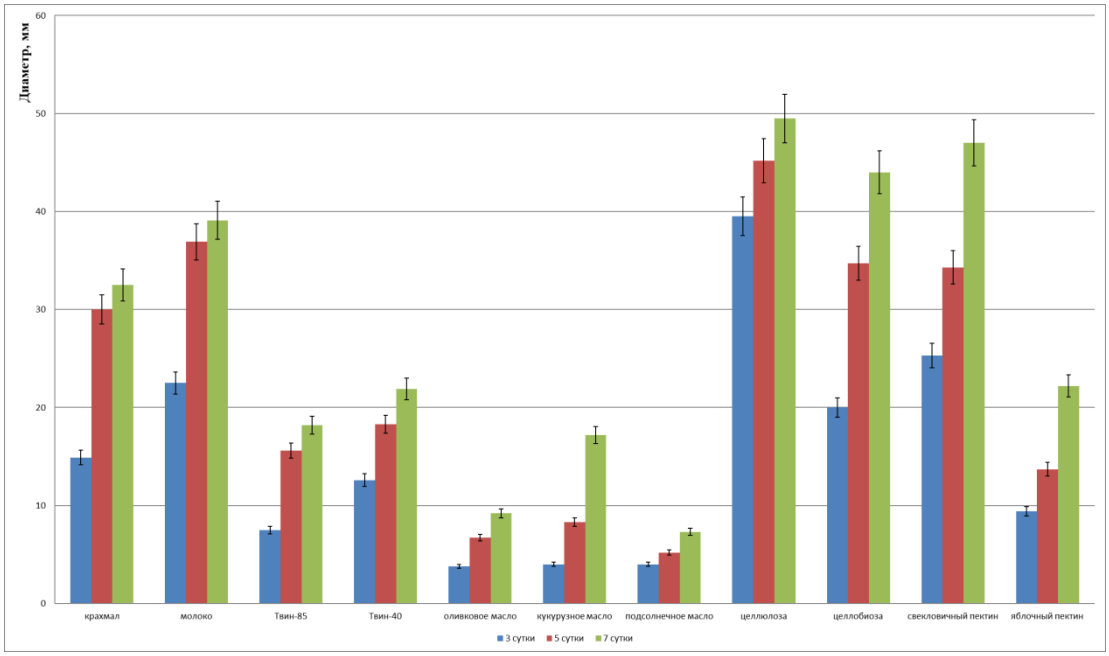


Рисунок 1. Динамика ферментативной активности штамма *B. velezensis* 13 в ходе 7 суточного культивирования

Максимальная сахаролитическая активность наблюдалась по отношению к целлюлозе, свекловичному пектину и целлобиозе (49, 47 и 44 мм соответственно). Амилолитическая активность была несколько ниже, зона гидролиза крахмала к 7 суткам достигала 39 мм. Зоны гидролиза яблочного пектина достигали только 22 мм.

Протеолитическую активность изучали по отношению к казеину, зона гидролиза которого составила 32,5 мм

Липолитическая активность исследуемого штамма проявлялась значительно слабее. Исследуемый штамм использовал в качестве источника специфических субстратов Твин-40, Твин-85 и кукурузное масло, но не использовал Твин-60 (рис. 2).

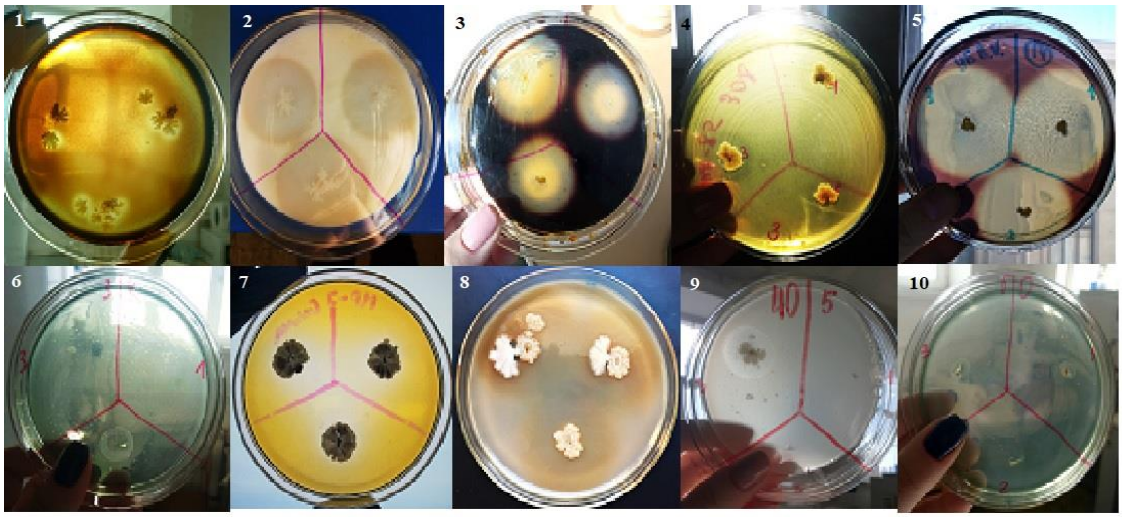


Рисунок 2 – ферментативная активность штамма *B. velezensis* 13 по отношению к различным источникам специфических субстратов: 1- целлюлоза, 2 – обезжиренное молоко, 3 – крахмал, 4 – Твин-85, 5 – целлобиоза, 6- кукурузное масло, 7 – яблочный пектин, 8 – свекловичный пектин, 9 – Твин-40, 10 – оливковое масло

В процессе определения способности к мацерирующей активности было установлено, что штамм *B. velezensis* 13 мацерировал все исследуемые тест-объекты.

Анализ полученных результатов позволяет констатировать, что бактерии штамма *B. velezensis* 13 обладают выраженной ферментативной активностью по отношению к полисахаридам, белкам и жирным кислотам и способны к мацерации растительных тканей, что позволяет использовать исследуемый штамм в качестве перспективного биотехнологического агента в различных отраслях производства.

Литература

Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М., Мишак Е.В. Бактерии рода *Bacillus* – активные продуценты гидролитических ферментов // Науковий вісник Ужгородського університету. 2006. Вып. 19. С. 155–159.

Осипова И.Г. Споровые пробиотики // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2003. №3. С. 113–119.

Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биохимическая переработка жиров и масел в новые липидные продукты с улучшенными биохимическими и физико-химическими свойствами // Прикл. биохим. микробиол. 2002. Т. 38. С. 469–481.

Басалаева Д.Л., Шестакова А.С., Никельшпарг М.И., Глинская Е.В. Антагонистические свойства бактерий *Bacillus velezensis*. Саратов: Амирит, 2019. – 242 с.

Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы. – Минск: БГУ, 2006. – 89 с.

ESTIMATION OF ENZYMATIVE ACTIVITY AND ABILITY FOR MACERATION OF *BACILLUS VELEZENSIS* BACTERIA

D.L. Basalaeva[1], K.A. Rodenko[1], M.I. Nikelshparg[2], S.S. Evstigneeva[3], E.V. Glinskaya[1]

[1] Saratov State University, Saratov, Russia, dbasalaewa@yandex.ru

[2] Gymnasium No. 3, Saratov, Russia, matveynikel@yandex.ru

[3] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia, stels20295@yandex.ru

Annotation. The spectrum of hydrolytic exoenzymes synthesized by the bacteria *Bacillus velezensis* was studied, and the maceration ability of standard test objects was assessed: potato tubers and carrot and beet root crops. The maximum saccharolytic activity was observed in relation to cellulose, beet pectin and cellobiose. The investigated strain is capable of using Tween-40, Tween-85 and corn oil as a source of specific substrates. The *B. velezensis* 13 strain macerated all the test objects under study.

Key words: Bacillus velezensis, hydrolytic exoenzymes, maceration.

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ *BACILLUS ATROPHAEUS* ВКПМ–11474 ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ЛИСТОВОГО САЛАТА В УСЛОВИЯХ КАПЕЛЬНОГО ОРОШЕНИЯ

Д.Г. Баубекова

Волжско–Каспийский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ»), suslig.zenia@mail.ru

Аннотация. Капельное орошение в условиях аридного климата является эффективным агротехническим приемом ведения земледелия. Однако его использование вызывает ряд неблагоприятных последствий, которые возможно избежать путем применения биологических средств защиты растений. Данные средства защиты основываются на внедрении в биотехнологический процесс микроорганизмов и их метаболитов. Разработано биологическое средство защиты растений на основе *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В–11474 и изучено его влияние на микоценоз исследуемых почв при выращивании листового салата в условиях капельного орошения.

Ключевые слова: беспестицидные технологии; биотехнология; капельное орошение; биологическое средство; микроорганизмы рода Bacillus.

Территория Астраханской области относится к аридной зоне – зоне сухого климата с недостаточным атмосферным увлажнением при высокой температуре воздуха. Данный климат в основном свойственен полупустыням и пустыням [Бармин и др., 2009]. Вегетация растений в таких условиях затруднена и земледелие возможно только при искусственном орошении. Поэтому капельное орошение является эффективным агротехническим приемом ведения земледелия в условиях с засушливым климатом при частых резких перепадах температур [Авдеев и др., 2003].

Капельное орошение при вегетации растений вызывает ряд неблагоприятных последствий. Во–первых, в данных условиях более активно развиваются возбудители заболеваний. Во–вторых, из–за постоянной высокой влажности создаются благоприятные условия для распространения фитопатогенов. При массовом размножении фитопатогенов зачастую происходит гибель всего урожая, после чего почва считается «загрязненной» и требует «очищения». Поэтому периодическое опрыскивание вегетирующих растений средствами защиты является неотъемлемой частью используемых агробиотехнологий. Своевременное применение данных средств заметно снижает заболеваемость растений, повышает их урожайность и качество получаемой продукции, а также заметно улучшает фитосанитарное состояние возделываемых почв [Байрамбеков и др., 2012].

Целью проведенных исследований являлось изучение влияния биологического средства защиты растений на основе *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В–11474 на микоценоз почв при выращивании листового салата в условиях капельного орошения. Для достижения поставленной в работе цели были использованы микробиологические и агрономические методы исследований.

Бактериальный штамм *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В–11474 взят за основу для изучаемого биологического средства защиты растений. Используемый штамм был выделен из почв Астраханской области путем многоступенчатого отбора и обладает биологическими активностями (фунгистатической, хитинолитической, миколитической, ростостимулирующей).

В ходе апробации исследуемые почвы обрабатывались биологическим средством с титром клеток и спор 10^8 КОЕ/мл тройной обработкой (опрыскивание дна борозды + двойной пролив под корень растений). Постановку полевого опыта осуществляли по общепринятой методике полевых и вегетационных опытов на полях стратегического партнера в Камызякском районе Астраханской области [Доспехов, 1985].

Пробы почв отбирали по общепринятым методикам методом случайных проб [Зенова, 2002]. Образцы почв отбирали в двух почвенных горизонтах 0–20 см (A_1) и

20–40 см (A_2). Выделение микромицетов проводили глубинным методом на плотные питательные среды [Нетрусов, 2005]. Для выделения микромицетов использовали ряд специфических питательных сред: крахамало–аммиачный агар – амилолитиков; агар Чапека – сахарозолитиков; агар Сабуро – глюкозолитиков и бобовый агар – органотрофов [Дзержинская, 2008]. Определение родовой принадлежности микромицетов осуществляли сопоставлением микроскопических и макроскопических признаков исследуемой культуры с признаками известных и ранее описанных микромицетов [Еремеева, 2007]. Фитотоксичность выделенных почвенных микромицетов определяли в эксперименте во влажных камерах на семенах горчицы белой (сорт «Рапсодия») [Зенова и др., 2002].

В ходе проведенных испытаний установлено, что опрыскивание дна борозды и двойной пролив под корень растений (тройная обработка средством) эффективно воздействует на уменьшение численности микромицетов в исследуемой почве при выращивании листового салата в условиях капельного орошения (рис. 1).

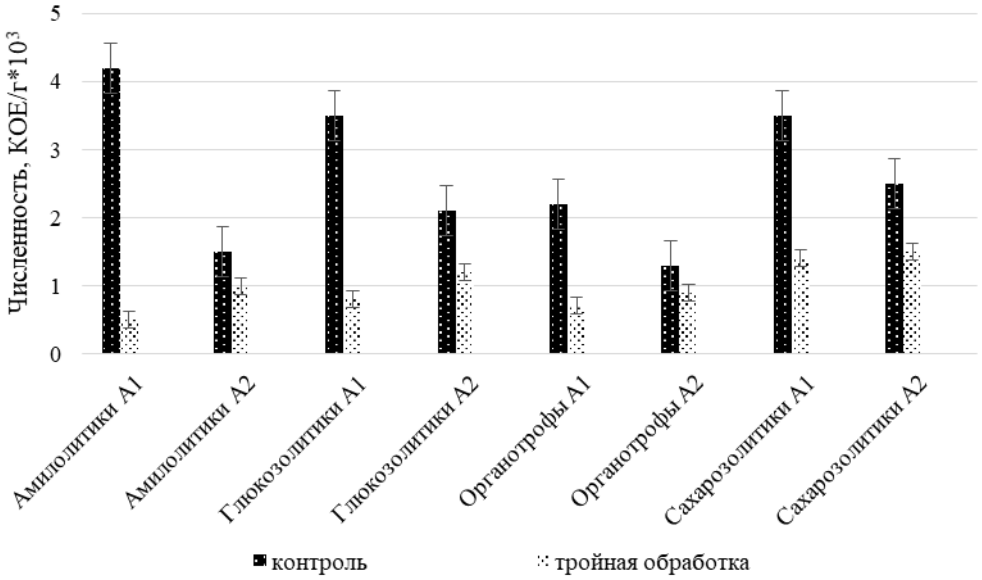


Рисунок 1. Численность микромицетов в исследуемой почве

В опытной почве отмечалось снижение численности всех трофических групп микромицетов: амилолитиков (в 3,8 раз); глюкозолитиков (в 2,8 раз), сахарозолитиков (в 2,0 раза) и органотрофов (в 2,0 раза), как в верхнем (почвенный горизонт A_1: 0-20 см), так и нижнем (почвенный горизонт A_2: 20–40 см) горизонтах исследуемой почвы. При этом наибольшее снижение регистрировалось для микромицетов, усваивающих минеральные формы азота (амилолитики).

В необработанной средством почве (контроль) большая численность микромицетов наблюдалась в верхних слоях почвы. В варианте обработки почвы средством, наоборот, в нижних слоях. Анализ полученных данных указывает на воздействие используемого средства на микоценоз исследуемых почв, выраженном в уменьшении численности микромицетов в верхнем горизонте опытной почвы.

Установлено, что выделенные из опытных почв микромицеты не фитотоксичны и не угнетали проращивание семян тест–растения. Однако в необработанной средством почве (контроль) обнаружены микромицеты, угнетающие рост тест–растения: представители родов *Alternaria* и *Fusarium*. Данные виды микромицетов являются потенциальными возбудителями таких заболеваний сельскохозяйственных культур, как альтернариоз и фузариоз. Ежегодно в Астраханской области регистрируются случаи заболевания культур этими грибными болезнями, в большинстве своем ведущие к значительным потерям урожая [Байрамбеков, 2007]. Снижение развития выделенных

микромицетов родов *Alternaria* и *Fusarium* в опытной почве после использования средства в целом положительно влияет на уменьшение распространения данных заболеваний среди возделываемых растений особенно в условиях капельного орошения, когда создаются благоприятные для их развития условия.

Таким образом, в результате проведенных исследований определено, что опрыскивание дна борозды и двойной пролив под корень растений (тройная обработка) средством оказывает значительное влияние на снижение численности микромицетов в опытных почвах в условиях капельного орошения. В целом использование биологического средства на основе штамма *Bacillus atrophaeus* ВКПМ B–11474 положительно действует на фитосанитарное состояние и оздоровление почв Астраханской области за счет общего снижения численности микромицетов, а также за счет уменьшения численности микромицетов, угнетающих рост растений, что немало важно при ведении земледелия с использованием капельного орошения.

Литература

Авдеев Ю.И., Жилкин А.А., Шляхов В.А. Рекомендации по возделыванию сельскохозяйственных культур при капельном орошении. - М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2003. – 46 с.

Байрамбеков Ш.Б., Валеева З.Б., Дубровин Н.К., Долженко О.А., Полякова Е.В., Шляхов В.А. Защита овощных культур и картофеля от болезней в Астраханской области. - Астрахань: Новая линия, 2007. – 136 с.

Байрамбеков Ш.Б., Валеева З.Б., Дубровин Н.К., Полякова Е.В., Корнева О.Г. Научно обоснованные аргументы для фитосанитарной оптимизации орошаемых агроценозов овощебахчевых культур // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. 2012. № 4 (13). С. 16–18.

Бармин А.Н., Колчин Е.А., Шуваев Н.С. Экстремальные температуры воздуха и распределение их по территории Астраханской области. - Астрахань: Издательство Сорокин Роман Васильевич, 2009. – С. 20–23.

Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов. - Астрахань: Изд–во АГТУ, 2008. – 348 с.

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). - М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

Еремеева С.В. Идентификация плесневых грибов. Гифомицеты. - Астрахань: Изд–во АГТУ, 2007. – 76 с.

Зенова Г.М. Практикум по биологии почв микробиологии. – М.: Изд–во МГУ, 2002. – 120 с.

Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

PERSPECTIVITY OF USE OF BIOLOGICAL PLANT PROTECTION PRODUCT BASED ON *BACILLUS ATROPHAEUS* ACIM B-11474 WHEN GROWING LEAF SALAD UNDER DROP IRRIGATION

D.G. Baubekova

Volzhsko–Caspian branch of FSBI «VNIRO» (FSBSI «CaspNIRKh»), suslig.zenia@mail.ru

Annotation. Drip irrigation in an arid climate is an effective agricultural technique. However, its use causes a number of adverse consequences that can be avoided by using biological plant protection products. These remedies are based on the introduction of microorganisms and their metabolites into the biotechnological process. A biological plant protection product based on *Bacillus atrophaeus* ACIM B–11474 has been developed and its effect on the mycocenosis of the studied soils has been studied when growing lettuce under drip irrigation conditions.

Keywords: non–pesticidal technology; biotechnology; drip irrigation; biological plant protection product; microorganisms of the genus Bacillus

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ БЕЛОГО ФОСФОРА

А.З. Миндубаев[1], Й.А. Акосах[3], Э.В. Бабынин[3], Е.К. Бадеева[2], С.Т. Минзанова[2]

[1]Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН, 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 261.
[2]Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия.
[3]ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия. mindubaev-az@yandex.ru

Аннотация. Нами впервые произведены посевы микроорганизмов в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорного голодания. Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора. Самая высокая концентрация превышает ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз!

Ключевые слова: биодеградация, белый фосфор, *Aspergillus niger* AM1.

Биодеградация является одним из наиболее важных методов обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, в том числе очень токсичными [1]. Главное преимущество биодеградации заключается в том, что при ее использовании в окружающую среду не вносятся новые химические загрязняющие агенты.

Это является весомым фундаментальным аргументом в пользу возможности биодеградации даже самых опасных веществ, таких, как объект нашего исследования белый фосфор [2].

Нами впервые произведены посевы микроорганизмов в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора [3]. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорного голодания. Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот этого элемента. Самая высокая концентрация превышает ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз, а в водах хозяйственно-бытового назначения – в сто миллионов раз [4]!

Для генетической идентификации гриба, метаболизирующего белый фосфор и отнесенного к виду Aspergillus niger, была определена нуклеотидная последовательность его регионов ITS1 и ITS2. Сравнение полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank с помощью системы BLAST, позволяет идентифицировать данный микроорганизм, как новый штамм вида A. niger. Ему был присвоен номер AM1. Нуклеотидная последовательность штамма опубликована в базе данных GenBank (KT805426).

Посев A. niger AM1 в среду, содержащую сразу два источника фосфора (фосфат и белый фосфор) продемонстрировал, что P4 не проявляет токсические свойства по отношению к этому микроорганизму. В присутствии белого фосфора он растет с такой же скоростью, как в его отсутствии. Это единственный пример отсутствия выраженной токсичности белого фосфора для живого организма.

В опытном спектре 31P ЯМР, снятом с водной фазы, проявились сигналы в области 0.3, 3.7 и 6.2 ppm, соответствующие фосфиту и гипофосфиту. Таким образом, он соответствует соединениям, которые, предположительно, являются метаболитами белого фосфора, что является подтверждением предполагаемого нами метаболического пути [5].

Ниже мы приводим предполагаемую схему метаболизма белого фосфора (рис. 1).

Проведена оценка генотоксичности белого фосфора при помощи SOS-lux теста, которая продемонстрировала ее наличие [6]. Этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у белого фосфора. Указанное вещество проявляет слабую мутагенную активность.

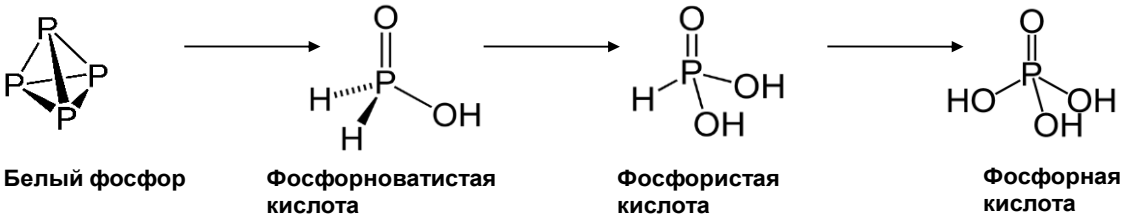


Рис.1. Метаболический путь белого фосфора. Предположительно, окисление происходит при помощи ферментов оксигеназ.

Конфокальная микроскопия показала, что белый фосфор в исследуемой концентрации (0.2%) оказывает на жизнеспособность мицелия гриба незначительное влияние. Можно было предположить, что в присутствии этого токсичного вещества пропорциональное количество мертвых клеток должно быть выше по сравнению с контролем. Было установлено, что соотношение живых и отмерших клеток грибов мало зависит от наличия белого фосфора в среде. Таким образом, белый фосфор в концентрации 0.2% оказывает незначительное влияние на выживаемость мицелия аспергилла, что является поразительным результатом [7].

При воздействии белого фосфора наблюдается изменение электронной плотности и толщины клеточной стенки. Также значительно увеличивается число митохондрий в клетках гиф [7]. Кроме, того, на поверхности клеточной стенки появляется дополнительный волокнистый слой, состоящий из протеогликанов – поверхность гифов становится ворсистой, чего не наблюдается в контроле. Данные признаки наверняка связаны с защитой от внешних воздействий – клеточная стенка служит барьером, а митохондрии осуществляют энергетический обмен, поддерживают метаболическую активность.

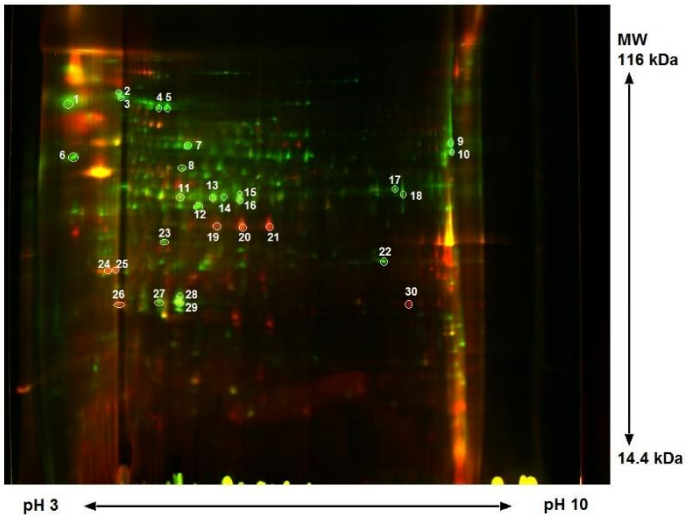


Рис. 2. Электрофореграмма белкового профиля*A. niger* AM1

Исследования протеома, описанные в работе [7], продемонстрировали четкие различия белкового профиля при росте аспергилла в отсутствии и в присутствии белого фосфора (рис. 2). Белковый профиль в свою очередь определяется экспрессией генов, следовательно, есть основания говорить об ответе на загрязнение белым фосфором на этом уровне. Результаты филогенетического анализа *A. niger* AM1 по секвенсам области ITS представлены на рисунке 3. На рисунке представлены штаммы, выделенные в разных странах мира.

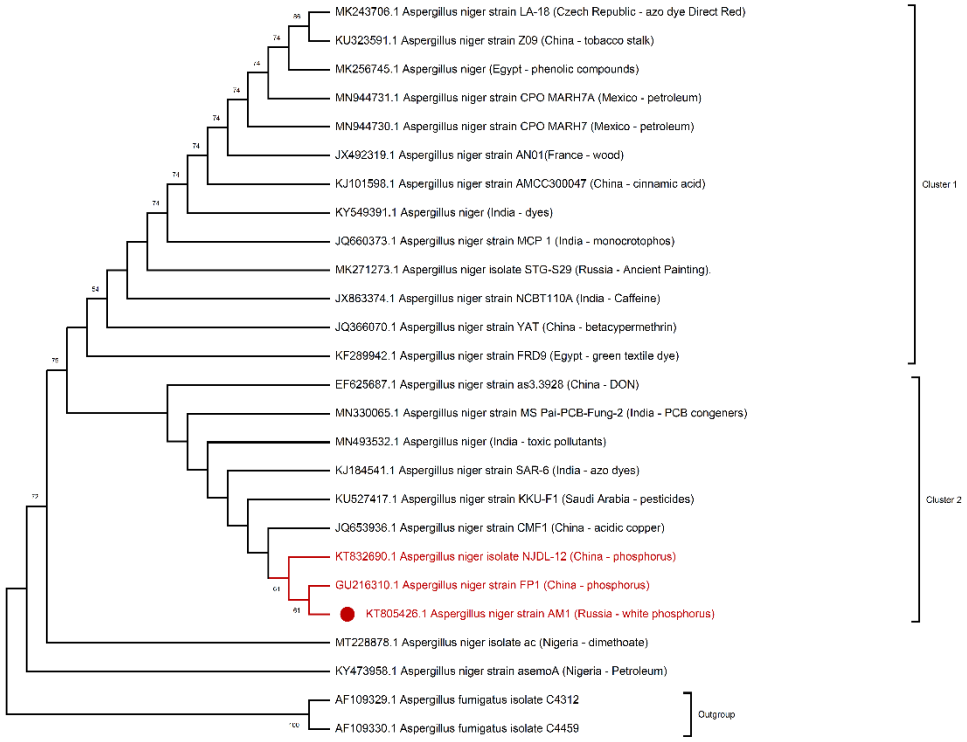


Рис. 3. Филогенетическое дерево *Aspergillus niger*. Представлены штаммы из базы NCBI, способные к биодеградации различных соединений, указанных на ветвях дерева. Эволюционная история выделенного из технического белого фосфора штамма *Aspergillus niger* воспроизведена с использованием метода UPGMA. Показано наиболее достоверное филогенетическое дерево с суммой длин ветвей = 0.11183919. Длины ветвей соответствуют количеству замен на 100 пар нуклеотидов. Процент повторов на дереве, в котором ассоциированные таксоны сгруппированы вместе с помощью теста строгой выборки (1000 повторов), показан рядом с ветвями. Эволюционные расстояния (степени родства) были рассчитаны с использованием метода максимальной вероятности и выражены в единицах количества замен оснований на участке. Этот анализ включал 26 нуклеотидных последовательностей. Все неоднозначные позиции удалены (опция парного удаления) для каждой пары последовательностей. Всего в итоговом наборе данных содержится 475 позиций. Эволюционный анализ был проведен в MEGA 7.

Для сравнения использовались представленные в базе штаммы *A. niger*, для которых известна способность к биодеградации веществ разнообразных классов. На рисунке 3 показаны штаммы и вещества, которые они разлагают. Как видно, в наибольшем родстве со штаммом AM1 состоят штаммы из Китая, которые способны к растворению фосфатных минералов [6]. Они имеют 64% сходства по гену ITS. Вдобавок, осуществлен анализ 2 основных кластеров. Каждый кластер указывает на вероятного общего предка. Из этого следует предположение, что штаммы из одного кластера могут быть сходны по характеристикам. Внешняя группа ("Outgroup") – штаммы другого вида *Aspergillus fumigatus* (они выполняют роль контроля). Чем больше мы знаем о веществах, которые разлагают эти микромицеты, тем лучше будем понимать результаты данного анализа. Однако следует иметь ввиду, что сравнительный анализ по областям ITS не достаточен для понимания полной картины родственных связей и свойств штамма. Для полного подтверждения нужно секвенировать полный геном штамма AM1. Это исследование нами запланировано.

Таким образом, можно предполагать, что штамм AM1 относится к кластеру, эволюционно возникшему на территории Китая и специализировавшемуся на биодеструкции фосфорных соединений. Возможно, белый фосфор, из которого он выделен, был доставлен в нашу страну из Китая, и штамм завезен вместе с ним.

Чем больше мы знаем о свойствах этих микромицетов, тем лучше будем понимать результаты данного анализа. Например, такое свойство черных аспергиллов, как патогенность, четко связано с принадлежностью штамма к определенным кластерам. А оно имеет прямое отношение к практическому применению культур микроорганизмов.

Литература

1. Миндубаев А.З. Микроорганизмы деструкторы и их роль в очистке природных сред (обзор) // Живые и биокосные системы. 2020. № 31. С. 1-20.

2. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Валидов Ш.З., Яхваров Д.Г. Биодеградация белого фосфора // Природа. 2017. № 5. С. 29-43.

3. Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордоаньи Д.М., Болормаа Ч., Кагиров Р.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. О разложении белого фосфора осадком сточных вод // Учен.зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т.153. № 2. С.110-119.

4. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Яхваров Д.Г. Микробиологическая деградация белого фосфора // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22. № 1. С. 33-37. DOI: 10.18412/1816-0395-2018-1-33-37

5. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д. Генотоксичность и цитогенетическое действие белого фосфора // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т.9. №1. С. 81-94. DOI: http://dx.doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-81-94

6. Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G., Daminova A.G., Grigoryeva T.V., Romanova Y.D., Romanova V.A., Babaev V.M., Buzyurova D.N., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger* / // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol.56. No.2. P.194–201. DOI: 10.1134/S0003683820020118

7. Миндубаев А.З., Федосимова С.В., Григорьева Т.В., Романова В.А., Бабаев В.М., Бузюрова Д.Н., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Караева Ю.В. Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба*Aspergillusniger//* Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т.11. №1. С. 69-79. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-1-69-79

STUDY OF WHITE PHOSPHORUS BIOLOGICAL TRANSFORMATION

A.Z. Mindubaev[1], Y.A. Akosah[3], E.V. Babynin[3], E.K. Badeeva[2], S.T. Minzanova[2]

[1] Institute of Power Engineering and Advanced Technologies.FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, POB 261, 2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111. Republic of Tatarstan. Russia.

[2] Institute of Organic and Physical Chemistry named after A.E. Arbuzov. Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Arbuzov St., 8. Kazan, 420088. Republic of Tatarstan. Russia.

[3] Kazan (Volga Region) Federal University. University St., 18. Kazan, 420008. Republic of Tatarstan. Russia. mindubaev-az@yandex.ru

Abstract. Us for the first time different taxonomic groups of microorganisms are inoculated on culture medium containing white phosphorus as the single source of phosphorus. The increase of cultures resistance resulting from directed selection is demonstrated. Carried out search for the white phosphorus metabolites. The highest concentration corresponds to 5000 times excess of MPC of white phosphorus in wastewater.

Key words: biodegradation, white phosphorus, *Aspergillus niger* AM1

ФОРМИРОВАНИЕ АРХИТЕКТУРЫ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ И КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ У ИНОКУЛИРОВАННЫХ АЦК-УТИЛИЗИРУЮЩИМИ РИЗОБАКТЕРИЯМИ ПРОРОСТКОВ ТОМАТОВ

А.И. Шапошников, Д.С. Сырова, П.С. Ульянич, А.А. Белимов

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия, belimov@rambler.ru

Аннотация. Изучена роль АЦК дезаминазы ризобактерий и стрессового фитогормона этилена в формировании архитектуры корневой системы и корневых волосков у растений томатов. Рост-стимулирующая бактерия *Variovorax paradoxus* удлиняла основной корень и корневые волоски, а также увеличивала количество корневых волосков. Фитопатогенная бактерия *Pseudomonas brassicacearum* укорачивала корни, увеличивая длину и количество корневых волосков, при этом мутант по АЦК дезаминазе оказывал более негативный эффект.

Ключевые слова: АЦК дезаминаза, корень, ризосфера, симбиоз, томаты.

Вопросы о роли ризосферных бактерий в развитии и функционировании корневой системы растений являются весьма актуальными и привлекают пристальное внимание исследователей различных стран [Vacheron et al., 2013; Shibata and Sugimoto, 2019]. Целью исследований было раскрытие механизмов образования и эффективного функционирования симбиозов растений с микроорганизмами на примере изучения роли АЦК дезаминазы ризобактерий и стрессового фитогормона этилена в формировании архитектуры корневой системы и корневых волосков у растений томатов. Следует отметить, что в большинстве работ наблюдаемые эффекты были представлены в форме качественных данных (рисунков и микрофотографий). Недостаточное внимание уделено и ризобактериям, содержащим фермент АЦК дезаминазу. В этом отношении интересна работа Контесто с соавторами [Contesto et al., 2008], которые использовали различные виды бактерий (*Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Pseudomonas putida* UW4, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K, *Mesorhizobium loti* MAFF303099) и их мутанты по гену АЦК дезаминазы для инокуляции арабидопсиса. АЦК дезаминаза не влияла на удлинение корней и их количество, при этом все штаммы и их мутанты удлиняли корневые волоски.

Исследования проводились по разработанной ранее методике агаровой гнотобиотической системы [Belimov et al., 2007] с томатами сорта Микротом. Объектом изучения были штаммы ризосферных бактерий, обладающие активностью АЦК дезаминазы: рост-стимулирующий штамм *Variovorax paradoxus* 5C-2, фитопатогенный для томатов штамм *Pseudomonas brassicacearum* Am3 и его мутант с пониженной активностью АЦК дезаминазы T8-1. В качестве вариантов сравнения использовали химические регуляторы фитогормона этилена: ингибитор перцепции этилена ионы Ag^{+}, ингибитор растительного фермента АЦК-синтетазы ионы Co^{2+} и аминокислоту АЦК.

Установлено, что рост-стимулирующий штамм *V. paradoxus* 5C-2 вызывал удлинение основного корня и корневых волосков, а также увеличивал количество корневых волосков, особенно при относительно высокой (10E6 кл./мл) плотности вносимого инокулюма. Фитопатогенный штамм *Ps. brassicacearum* Am3 вызывал укорочение основного и боковых корней, при этом увеличивая длину и количество корневых волосков на единицу длины корня. Такой эффект штамма *Ps. brassicacearum Am3* на корневые волоски мог быть связан с ингибированием растяжения клеток корня, а не со стимулированием образования новых волосков. На количество боковых корней бактерии не влияли. Напротив, ингибитор перцепции этилена (Ag^{+}) стимулировал образование боковых корней, а обработка 10 мкМ АЦК снижала количество боковых корней. Ионы серебра подавляли развитие корневых волосков, в то время как ионы кобальта способствовали их удлинению. Результаты показали важную роль

фитогормона этилена в формировании изучаемых компонентов корневой системы. Длина боковых корней, длина и количество корневых волосков у растений, инокулированных мутантом *Ps. brassicacearum* T8-1, была меньше, чем у инокулированных диким типом. Это указывало на участие бактериальной АЦК дезаминазы в удлинении боковых корней и образовании корневых волосков.

Таким образом, нами впервые проведена количественная оценка влияния контрастных (рост-стимулирующих и фитопатогенных) ризосферных бактерий, содержащих АЦК дезаминазу, в сравнении с химическими регуляторами перцепции и биосинтеза этилена на длину и количество корней и корневых волосков у томатов. Бактериальная АЦК дезаминаза улучшает формирование компонентов корневой системы. Эти результаты послужат основой для изучения роли АЦК-утилизирующих ризобактерий в адаптации растений к недостатку влаги.

Работа выполнена при поддержк Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzeas N., Davies W.J. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato // Journal of Experimental Botany. 2007. V. 58. P. 1485–1495. doi: 10.1093/jxb/erm010.

Contesto C., Desbrosses G., Lefoulon C., Béna G., Borel F., Galland M., Gamet L., Varoquaux F., Touraine B. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria // Plant Science. 2008. V. 175. No 1–2. P. 178–189. doi:10.1016/j.plantsci.2008.01.020.

Shibata M., Sugimoto K. A gene regulatory network for root hair development // Journal of Plant Research. 2019. V. 132. P. 301–309. doi: 10.1007/s10265-019-01100-2.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning // Frontiers in Plant Science. 2013. V. 4. P. 356. doi: 10.3389/fpls.2013.00356.

FORMATION OF ARCHITECTURE OF THE ROOT SYSTEM AND ROOT HAIRS IN TOMATO SEEDLINGS INOCULATED WITH ACC-UTILIZING RHIZOBACTERIA

A.I. Shaposhnikov, D.S. Syrov, P.S. Ulyanich, A.A. Belimov

Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology", St. Petersburg, Russia, belimov@rambler.ru

Annotation. The role of ACC deaminase of rhizobacteria and stress phytohormone ethylene in the formation of architecture of the root system and root hairs in tomato plants has been studied. The growth-promoting bacterium *Variovorax paradoxus* lengthened the basal root and root hairs and also increased the number of root hairs. The phytopathogenic bacterium *Pseudomonas brassicacearum* shortened the roots, increasing the length and number of root hairs, while the ACC deaminase mutant had a more negative effect.

Key words: ACC deaminase, root, rhizosphere, symbiosis, tomatoes.

АДАПТАЦИОННЫЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ К УСЛОВИЯМ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ЭКОСИСТЕМ

И.Б. Ившина

Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия, ivshina@iegm.ru
Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Перспективными агентами биоремедиации являются актинобактерии рода *Rhodococcus*, характеризующиеся чрезвычайной экологической пластичностью и способностью к окислительной трансформации широкого спектра углеводородных соединений. Кроме того, родококки синтезируют гликолипидные биосурфактанты с высокой эмульгирующей, солюбилизирующей и нефтеотмывающей активностью. В мире наблюдается устойчивое повышение интереса к родококкам как модельным микроорганизмам при исследовании процессов биодеградации сложных углеводородных субстратов и выявлении разнообразных метаболических путей бактериальной трансформации углеводородов и нефтепродуктов, а также как к базовым объектам биотехнологии. Представлена информация, полученная в последние годы изучения этих перспективных для экобиотехнологии актиномицетов и реализуемых ими адаптационных механизмах выживания в экстремальных условиях окружающей среды. Приводятся сведения об адаптивных клеточных модификациях родококков под влиянием углеводородов, их производных и тяжелых металлов.

Ключевые слова: Rhodococcus, нефтяные углеводороды, механизмы защиты и адаптации, биодеградация

Проблема загрязнения почв нефтяными углеводородами и тяжелыми металлами становится все более острой для крупных ресурсодобывающих регионов, в том числе и Пермского края. Возрастающее увеличение нефтедобычи и нефтепереработки сопровождаются повышением масштабов и ростом объемов аварийных нефтяных загрязнений и образующихся отходов, вызывающих нарастание экологической угрозы, уменьшение площадей хозяйственных угодий, снижение плодородия почв и ухудшение здоровья населения. Негативное воздействие на природу оказывают места долговременного складирования твердых и жидких нефтесодержащих отходов, сопровождающегося эмиссией летучих фракций и миграцией нефтепродуктов и сопутствующих металлов в сопряженный ландшафт. В крае стоит проблема ликвидации уже накопленных и вновь образуемых нефтесодержащих отходов. В рамках Пермского НОЦ мирового уровня “Рациональное недропользование” предусмотрено создание природоподобных технологий разработки недр и сопутствующих технологий для ликвидации накопленного экологического ущерба, обеспечивающих ответ на один из “Больших вызовов” – возрастание антропогенных нагрузок на окружающую среду до масштабов, угрожающих воспроизводству природных ресурсов, и связанный с их неэффективным использованием рост рисков для жизни и здоровья граждан.

Экологически чистым и экономически целесообразным способом ликвидации нефтяных загрязнений считается биоремедиация с использованием микроорганизмов с высокой активностью оксигеназного ферментного комплекса. Среди них особое место занимают актинобактерии рода *Rhodococcus,* способные к разложению углеводородов и их производных в силу своих особенностей и, прежде всего, наличия своеобразных защитных приспособлений и соответствующих ферментных систем для деградации этих сложных, предельно восстановленных, гидрофобных, поэтому труднодоступных, субстратов.

В ходе проведения многолетних территориально ориентированных исследований разнообразия *Rhodococcus* в биоценозах антропогенно нагруженных почвенных и водных экосистем нами собран фактический материал в виде многих чистых

непатогенных культур и их характеристик. Получено экспериментальное подтверждение тому, что специфической чертой углеводородокисляющих бактериоценозов почв районов нефтедобычи является стабильная численность *Rhodococcus*, не подверженная резким сезонным колебаниям. Средний уровень родококков экологически значимых видов *R. erythropolis, R. globerulus, R. opacus, R. rhodochrous, R. ruber* в сильнозагрязнённой (до 10 вес. %) нефтепродуктами почве составляет 10^4−10^5 клеток/г почвы, что подтверждает их ведущую роль в процессах естественной биодеградации нефтяных углеводородов.

Выделенные штаммы характеризуются выраженной эмульгирующей способностью и полезной биодеструктивной активностью не только в отношении алифатических и ароматических углеводородов, нефтепродуктов, но и других трудноразлагаемых и токсичных поллютантов – гетероциклов, оксигенированных и галогенированных соединений, нитроароматики, хлорорганических пестицидов. Они устойчивы к высоким (100−250 мМ и более) концентрациям токсичных металлов и металлоидов, органических растворителей (от 20 до 80 об. %), активны в широком диапазоне экстремальных температур (4−15 или 40°C и выше) и кислотности (pH 2,0−6,0), способны расти при высокой (2−6%) концентрации солей.

Данные штаммы *Rhodococcus* составляют ядро Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, http://www.iegmcol.ru), признанной Уникальной научной установкой (реестровый номер УНУ www.ckp-rf.ru/usu/73559), имеющей статус высокоэффективного ЦКП (направление “Науки о жизни”, CKP_480868) и входящей в Национальный реестр объектов научной инфраструктуры Российской Федерации (Ившина, 2012; Catalogue of Strains, 2021). Коллекционные штаммы родококков разных видов весьма перспективны для использования в биотехнологических процессах биодеградации высокотоксичных поллютантов и биоремедиации загрязненных территорий (рис. 1).

Родококки − сравнительно молодой объект биотехнологии, метаболический потенциал их в области биодеструкции и инактивации комплексных загрязнений экосистем, устойчивости к стрессам ещё далеко не исчерпан. Несмотря на постоянно растущее количество новых научных разработок на основе *Rhodococcus*, остаётся ряд фундаментальных вопросов, требующих детального изучения, в том числе особенностей биологической организации и функционирования родококков, механизмов их защиты и адаптации к условиям усиливающегося антропогенного влияния. Решение этих вопросов важно для понимания природных процессов, молекулярных механизмов генетических процессов, задействованных в катаболизме антропогенных экополлютантов экстремотолерантными *Rhodococcus*, а также для оценки возможности длительной биотехнологической эксплуатации представителей данной группы актинобактерий, в частности для биодеградации ксенобиотиков и биоремедиации загрязненных экосистем.

Приводятся конкретные примеры доминирующих оборонительных стратегий *Rhodococcus* по преодолению негативного, в том числе комбинированного, воздействия углеводородов и их производных, а также токсичных металлических загрязнителей − тяжелых металлов.

Под действием экотоксикантов родококки, стремясь к тому, чтобы вязкость их мембран оставалась на относительно постоянном уровне (в жидкостно-кристаллическом состоянии), варьируют жирнокислотный состав уникальных мембранных липидов. По сути, липиды – одна из немногих групп сложных органических веществ, состав которых может быть адекватно отрегулирован бактериальной клеткой в ответ на неоптимальные условия роста путём изменения структуры и относительного количества мембранных жирных кислот (Denich et al., 2003). В определении текучести и проницаемости клеточной мембраны *Rhodococcus*

ключевая роль принадлежит составу жирных кислот, длина и степень насыщенности углеводородных цепей которых может изменяться в зависимости от органического субстрата.

РЕГИОНАЛЬНАЯ ПРОФИЛИРОВАННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ

АЛКАНОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Rhodococcus ruber[1] **(Kruse 1896) Goodfellow and Alderson 1977**[2]

ИЭГМ[3] **231**[4]

Номер в других коллекциях: ВКПМ АС-1899

<- И.Б. Ившина, ОЭГМ 29-1Б-1[5]. **Источник выделения**: родниковая вода[6], нефтедобывающее предприятие, Пермский край, Россия[7]. **Таксономия/описание**: (245, 343)[9]. Демонстрирует положительный результат ПЦР с праймерами, специфичными для вида *Rhodococcus ruber* (245)[9]; анализ последовательности гена 16S рРНК (номер доступа GenBank KF155234); сиквенс полного генома размещён в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank под номерами с CCSD01000001 по CCSD01000115 (343)[9]. **Свойства**: использует пропан и *н*-бутан в качестве единственного источника углерода; продуцирует биосурфактанты при росте на *н*-алканах (C_{12}–C_{17}) (248, 254, 327, 347, 348)[9]; деградирует высокопористые керамические материалы (237)[9]; деградирует парацетамол (265)[9]; образует холестеролоксидазу; устойчив к ионам Cd^{2}+, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, VO^{2+}, VO_3^-, VO_4^{3-}, аккумулирует молибден и никель (286, 329)[9]; обладает высокой степенью адгезии по отношению к жидким углеводородам (*н*-гексадекан) (317, 320)[9]; агент биоремедиации нефтезагрязнённых почв (324); использует *н*-гексадекан в качестве единственного источника углерода (327)[9]; устойчив к 1-бутанолу, этанолу (341, 349)[9]; продуцирует гликолипидный биосурфактант с иммуномодулирующими свойствами. (Среда 5 или 8, 11, 28°C)[8]

Среда: 5, 8, 11

Литературные источники: 237, 245, 248, 253, 254, 257, 258, 261, 263, 264, 265, 271, 277, 286, 294, 317, 320, 324, 327, 329, 341, 343, 347, 348, 349

http://www.iegmcol.ru/strains/rhodoc/ruber/r_ruber231.html

Рис. 1. Перевод страницы каталожной информации о штамме *R. ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (реестровый номер УНУ 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC, http://www.iegmcol.ru) [1] – валидное родовое/видовое название бактерии; [2] – авторы, впервые описавшие вид, дата валидации; [3] – акроним коллекции; [4] – номер штамма в коллекции; [5] – физическое лицо или организация, откуда был приобретён штамм; инвентарный номер штамма при приобретении; [6] – субстрат выделения; [7] – географическое положение места выделения штамма; [8] – питательная среда, температура культивирования, методы консервации и хранения; [9] – ссылки на публикации, в которых использовался штамм

В ответ на воздействие экотоксикантов родококки способны переходить в специфические покоящиеся (“жизнеспособные, но некультивируемые”, viable but nonculturable, VBNC) формы, а также накапливать запасные вещества в цитоплазме в виде гранул (как резервуары углерода и химической энергии) в значительных количествах, например, триацилглицерины, сложные эфиры воска, полигидроксиалканоаты. Накопленные нейтральные липиды могут не только служить основой для биосинтеза миколовых кислот и таким образом участвовать в регуляции

текучести (и растяжении) мембран, но и функционировать как источник эндогенной (метаболической) воды (Alvarez et al., 2004; Goordial et al., 2016). Недаром родококки способны переносить последствия почвенной засухи (обезвоживание) и противодействовать высоким температурам на протяжении длительного времени (Urbano et al., 2013; Röttig et al., 2016; Alvarez, Steinbüchel, 2019).

В формировании устойчивости *Rhodococcus* к негативному воздействию загрязнителей участвуют протон- и натрий-зависимые эффлюксные насосы – специфические системы выведения (эффлюкса) токсичных соединений из клетки (Коршунова и др., 2016). Существуют эффлюксные насосы, активные в отношении одного вещества или класса веществ, и так называемые эффлюксные насосы множественной устойчивости к антибиотикам разного действия (Multidrug Resistance, MDR). Функционирование эффлюксных насосов (MDR) может иметь также решающее значение для выживания родококков в естественных условиях сосуществования с микроорганизмами, продуцирующими антибиотики (например, *Streptomyces* spp.) (de Carvalho et al., 2014). Родококки при росте на углеводородах отличаются повышенной устойчивостью к широкому спектру антибиотических веществ (аминогликозидам, линкозамидам, макролидам и др.). Этот эффект, по-видимому, обусловлен снижением ионной проницаемости наружных клеточных мембран для гидрофильных молекул антибиотиков (Ившина и др., 1997; Куюкина и др., 2000).

К числу наиболее часто обнаруживаемых клеточных модификаций, возникающих на ранних стадиях развития неспецифических реакций *Rhodococcus* на повреждение, относится изменение электрокинетических характеристик, в частности смещение дзета-потенциала в область более отрицательных значений; переход родококков от одиночного состояния к многоклеточному существованию, сопровождающийся морфологической аномалией и изменением средних размеров вегетативных клеток, относительной площади и рельефа клеточной поверхности; формирование сцепленных клеточных ансамблей.

Все вышеперечисленные взаимодополняющие стратегии позволяют *Rhodococcus* эффективно реагировать на стрессы от воздействия экополлютантов, сохранять целостность клеток, их метаболическую активность и взаимосвязи с внешней средой. Новые знания о различных стрессах у родококков и компенсаторных реакциях бактериальных клеток на изменение градиентов среды необходимы для того, чтобы целенаправленно применить их для анализа результатов прикладных биотехнологических исследований *Rhodococcus*, используемых в разработках по биоремедиации биотопов, загрязнённых стойкими экотоксикантами, или биотрансформации сложных гидрофобных соединений для получения целевых метаболитов.

Исследования выполнены при поддержке Госзадания АААА-А19-119112290010-7 Минобрнауки РФ и РФФИ (грант 20-44-596001).

Литература

Ившина И.Б. Состояние и проблемы развития специализированных центров микробиологических ресурсов в России. Обзор // Микробиология. 2012. Т. 81. № 5. С. 551−560.

Ившина И.Б., Куюкина М.С. Селективное выделение пропанокисляющих родококков с использованием антибиотических веществ // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 494–500.

Коршунова И.О., Писцова О.Н., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние органических растворителей на жизнеспособность и морфофункциональные свойства родококков // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 1−9.

Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова М.И., Чумаков О.Б. Влияние состава клеточных липидов на формирование неспецифической антибиотикорезистентности алканотрофных родококков // Микробиология. 2000. Т. 69. № 1. С. 62−69.

Alvarez H.M., Silva R.A., Cesari A.C., Zamit A.L., Peressutti S.R., Reichelt R., Keller U., Malkus U., Rasch C., Maskow T., Mayer F., Steinbüchel A. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress // FEMS Microbiology Ecology. 2004. Vol. 50. P. 75–86.

Alvarez H., Steinbüchel A. Biology of triacylglycerol accumulation by *Rhodococcus*. In: H.M. Alvarez (ed.). Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs 16. Springer Nature. Switzerland AG. 2019. P. 299−332.

Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms [Электронный ресурс] URL: http://www.iegmcol/strains/index.html (дата обращения 19.05.2021).

de Carvalho C.C.C.R., Costa S.S., Fernandes P., Couto I., Viveiros M. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* // Frontiers in Physiology. 2014. Vol. 5: 133.

Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes // Journal of Microbiological Methods. 2003. Vol. 52. P. 149−182.

Goordial J., Raymond-Bouchard I., Zolotarov Y., de Bethencourt L., Ronholm J., Shapiro N., Woyke T., Stromvik M., Greer C.W., Bakermans C., Whyte L. Cold adaptive traits revealed by comparative genomic analysis of the eurypsychrophile *Rhodococcus* sp. JG3 isolated from high elevation McMurdo Dry Valley permafrost, Antarctica // FEMS Microbiology Ecology. 2016. Vol. 92. No. 2: fiv154.

Röttig A., Hauschild P., Madkour M.H., Al-Ansari A.M., Almakishah N.H., Steinbüchel A. Analysis and optimization of triacylglycerol synthesis in novel oleaginous *Rhodococcus* and *Streptomyces* strains isolated from desert soil // Journal of Biotechnology. 2016. Vol. 225. P. 48–56.

Urbano S.B., Albarracín V.H., Ordoñez O.F., Farías M.E., Alvarez H.M. Lipid storage in high-altitude Andean Lakes extremophiles and its mobilization under stress conditions in *Rhodococcus* sp. A5, a UV-resistant actinobacterium // Extremophiles. 2013. Vol. 17. No. 2. P. 217–227.

ADAPTATIONS OF HYDROCARBON-OXIDISING *RHODOCOCCUS* TO ANTHROPOGENIC POLLUTION OF ECOSYSTEMS

I.B. Ivshina

Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru
Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Promising bioremediation agents are actinobacteria of the genus *Rhodococcus* characterized by extreme ecological versatility and the ability to oxidize a wide range of hydrocarbon compounds. In addition, rhodococci synthesize glycolipid biosurfactants with high emulsifying, solubilizing and oil-washing activities. In the world, there is a steady growing interest in rhodococci as model microorganisms to study the biodegradation processes of complex hydrocarbon substrates and to identify various metabolic pathways of bacterial transformation of hydrocarbons and petroleum products, as well as the basic objects of biotechnology. The information acquired in the recent years on these ecobiotechnology promising actinomycetes and the adaptive mechanisms of their survival in extreme environments is presented. The data on the adaptive cellular modifications of rhodococci exposed to hydrocarbons, their derivatives and heavy metals are given.

Keywords: Rhodococcus, petroleum hydrocarbons, protection and adaptation mechanisms, biodegradation.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PROTEGENS* ДА1.2 НА РОСТ И УРОВЕНЬ СТРЕССА РАСТЕНИЙ СВЕКЛЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ПОЧВЕ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ГЕРБИЦИДОМ НАНОМЕТ

А.А. Кенджиева, Д.В. Четверикова, М.Д. Бакаева, С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия, chelab007@yandex.ru

Аннотация. В работе представлены результаты, показывающие наличие антидотного эффекта от внесения штамма бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2 на растения свеклы в условиях стресса, вызванного остаточными количествами гербицида Наномет в почве при исходном содержании 0,1 и 0,5 мг/кг. Положительное действие исследуемых бактерий на состояние растений выражалось в стремительном к уровню контрольных значений снижении содержания маркера стресса МДА и увеличении сырого веса листьев растений до 62,3%.

Ключевые слова: гербицидный стресс, свекла, *Pseudomonas protegens*, Наномет

Важным элементом в современных системах интенсивного ведения сельского хозяйства является применение гербицидов для борьбы с сорной растительностью. Однако при не соблюдении регламентов применения гербициды имеют свойство накапливаться в почве и оказывать негативное воздействие на культивируемые растения [Кутузова, 2006; Злотников, 2009]. Известно, что разложение многих гербицидов в почве носит в основном микробиологический характер [Kanissery, 2001; Ясаков, 2014].

Поэтому целью представленной работы было оценить влияние остаточных в почве количеств гербицида Наномет без обработки и с обработкой гербицидтолерантными бактериями *Pseudomonas protegens* ДА1.2 на уровень стресса растений свеклы.

В ходе эксперимента семена свеклы сорта Каскад F1 высевались в почву, загрязненную гербицидом Наномет в концентрациях 0,1 мг/кг (рекомендованная доза обработки) и 0,5 мг/кг (повышенная доза), через 3, 90, 180, 270 и 360 суток с момента загрязнения (опытная группа). Половина растений опытной группы обрабатывалась суспензией гербицидтолерантных ростстимулирующих бактерий *P. protegens* ДА1.2 [Четвериков, 2021]. Контрольная группа растений высевалась одновременно с опытной в туже почву, но без загрязнения гербицидом и бактериальной обработки.

Сырой вес листьев определяли сразу после их отделения от растения через 14 суток после бактериальной обработки.

Малоновый диальдегид (МДА) определяли спектрофотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой [Рогожин, 1998; Кузнецов, 2009].

Для полученных результатов рассчитаны средние статистические значения и стандартная ошибка среднего.

По полученным данным (табл. 1) установлено, что внесение штамма бактерии *P. protegens* ДА1.2 в незагрязненную почву перед посевом растений положительно сказалось в дальнейшем на изменении веса растений по сравнению с чистым контролем, а именно привело к увеличению их веса на 27,6 %. Также можно отметить положительную динамику увеличения веса листьев в варианте с загрязнением гербицидом в концентрации 0,1 мг/кг после бактериальной обработки, относительно варианта без внесения бактерий наблюдали прирост на 34,4 %. Здесь же можно отметить вероятную деструкцию гербицида штаммом ДА1.2.

В вариантах с загрязнением гербицидом в концентрации 0,5 мг/кг (преднамеренной передозировкой) как без бактериальной обработки, так и с ней, наблюдали снижение ростовых характеристик свеклы по сравнению с загрязнением

меньшей концентрацией гербицида на 47,4 % и 22 % соответственно. Однако и при таком уровне загрязнения почвы гербицидом бактериальная обработка положительно сказалась на сыром весе листьев растений, наблюдали их увеличение на 62,3 % относительно варианта без бактериальной обработки и на 19 % по сравнению с чистым контролем.

Таблица 1. Сырой вес листьев растений свеклы через 14 суток роста в зависимости от времени, прошедшего с момента загрязнения почвы гербицидом Нанамет, его концентрации и наличия бактериальной обработки штаммом *P. protegens* ДА1.2.

Вариант опыта	Время с момента загрязнения почвы, сут	Сырой вес листьев, г/растение
Контроль		0,105±0,004
Обработка *P. protegens* ДА1.2		0,134±0,006
Загрязнение 0,1 мг/кг Нанамет	3	0,015±0,001
	90	0,042±0,002
	180	0,068±0,004
	270	0,114±0,005
	360	-
Загрязнение 0,1 мг/кг Нанамет + обработка *P. protegens* ДА1.2	3	0,024±0,003
	90	0,052±0,003
	180	0,079±0,002
	270	0,153±0,004
	360	-
Загрязнение 0,5 мг/кг Нанамет	3	0,011±0,001
	90	0,022±0,001
	180	0,033±0,002
	270	0,055±0,005
	360	0,077±0,005
Загрязнение 0,5 мг/кг Нанамет + обработка *P. protegens* ДА1.2	3	0,019±0,002
	90	0,028±0,003
	180	0,059±0,003
	270	0,093±0,004
	360	0,125±0,006

Примечание: n=9, где n – количество повторностей; «-» – в данный промежуток времени не измеряли, т.к. показатель вышел на уровень контрольных значений

Контроль содержания МДА в листьях растений является важным показателем ответной реакции на стресс, степени сопротивления этому воздействию. Так окислительный стресс возникает, когда растение подвергается воздействию внешних факторов окружающей среды. Когда возникает окислительный стресс, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот приводит к повышению концентрации липидов, и из-за воздействия свободных радикалов на липиды образуются различные химические соединения, включая МДА. Кроме того, прочность клеточных мембран напрямую связана с его выработкой как продукта разложения ненасыщенных жирных кислот мембран: чем меньше выделение, тем более прочной может быть клеточная мембрана [Хамидреза, 2020].

Значения содержания МДА в листьях растений свеклы представлены в табл. 2. По полученным данным установлено, что бактериальная обработка приводила к снижению содержания МДА в листьях по сравнению с чистым контролем на 11,3 %. Также можно отметить положительную динамику снижения уровня МДА в вариантах с загрязнением гербицидом с концентрацией 0,1 мг/кг при наличии бактериальной обработки,

снижение доходило до 37,8 % по сравнению с вариантом без бактериальной обработки. Концентрация МДА в вариантах при загрязнении гербицидом в концентрации 0,5 мг/кг с бактериальной обработкой были ниже на 94,5 %, чем без обработки при той же концентрации загрязнения, но выше на 182,9 % по сравнению с чистым контролем.

Таблица 2. Содержание МДА в листьях растений свеклы через 14 суток роста в зависимости от времени, прошедшего с момента загрязнения почвы гербицидом Наномет, его концентрации и наличия бактериальной обработки штаммом *P. protegens* ДА1.2.

Вариант опыта	Время с момента загрязнения почвы, сут	Содержание МДА, мкмоль/г
Контроль		1,70±0,21
Обработка *P. protegens* ДА1.2		1,53±0,16
Загрязнение 0,1 мг/кг Наномет	3	17,32±1,04
	90	10,53±0,66
	180	6,93±0,53
	270	7,76±0,56
	360	3,21±0,18
Загрязнение 0,1 мг/кг Наномет + обработка *P. protegens* ДА1.2	3	9,91±0,32
	90	7,56±0,28
	180	5,71±0,31
	270	5,46±0,40
	360	2,33±0,15
Загрязнение 0,5 мг/кг Наномет	3	17,61±0,67
	90	15,56±0,45
	180	12,40±0,70
	270	12,25±0,47
	360	9,34±0,30
Загрязнение 0,5 мг/кг Наномет + обработка *P. protegens* ДА1.2	3	9,15±0,34
	90	10,52±0,29
	180	9,78±0,40
	270	7,52±0,27
	360	4,80±0,22

Примечание: n=4, где n – количество повторностей

Таким образом, представлены результаты, показывающие наличие антидотного эффекта от внесения штамма бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2 на растения свеклы в условиях стресса, вызванного остаточными количествами гербицида Наномет в почве. Положительное действие исследуемых бактерий на состояние растений выражалось в стремительном к уровню контрольных значений снижении содержания маркера стресса МДА и увеличении сырого веса листьев растений.

Литература

Злотников А.К., Злотников К.М. Борьба с пестицидным стрессом – важный резерв повышения продуктивности пшеницы // Земледелие. 2009. № 4. С. 30–31.

Кузнецов М.Н., Прудников П.С. Особенности перекисного окисления липидов мембран в листьях яблони в условиях техногенного загрязнения // Сельскохозяйственная биотехнология. 2009. № 5. С. 69–72.

Кутузова Р.С., Воробьев Н.И., Круглов Ю.В. Структура микробного комплекса ризосферы пшеницы в условиях гербицидного стресса // Почвоведение. 2006. № 2. С. 220–227.

Патент РФ № 2112241. Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Кершенгольц Б.М. Способ определения концентрации малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. 1998 г.

Хамидреза Б., Белопухов С.Л. Влияние биоудобрений на рост и развитие базилика (*Ocium bacilicum* L.) // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. Москва: РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева. 2020. № 2. Ст. 10. С. 156-163.

Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д., Кенджиева А.А., Стариков С.Н., Султангазин З.Р. Перспективный штамм бактерий *Pseudomonas protegens* для стимуляции роста сельскохозяйственных злаков, устойчивый к гербицидам // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 87-94.

Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Сагитова А.И., Маркушева Т.В. Новый штамм-деструктор хлорфеноксиалкановых гербицидов *Rhodococcus* sp. MT10 // Естественные и технические науки. 2014. № 1 (69). С. 46-49.

Kanissery R.G., Sims G.K. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil // Applied and Environmental Soil Science. 2011. V. 2011. Article ID 843450.

EFFECT OF BACTERIA *PSEUDOMONAS PROTEGENS* DA1.2 ON GROWTH AND STRESS LEVEL OF BEET PLANTS WHEN GROWING IN SOIL CONTAMINATED WITH HERBICIDE NANOMET

A.A. Kenjieva, D.V. Chetverikova, M.D. Bakaeva, S.P. Chetverikov

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, UFA, Russia, chelab007@yandex.ru

Annotation. The work presents the results showing the presence of an antidote effect from the introduction of the bacterial strain *Pseudomonas protegens* DA1.2 on beet plants under stress conditions caused by residual amounts of the herbicide Nanomet in the soil at the initial content of 0.1 and 0.5 mg / kg. The positive effect of the studied bacteria on the state of plants was expressed in a rapid decrease in the content of the stress marker MDA and an increase in the wet weight of plant leaves up to 62.3% to the level of control values.

Key words: herbicide stress, beet, *Pseudomonas protegens*, Nanomet

РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ КОИНОКУЛЯЦИИ IN VITRO КАРТОФЕЛЯ РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

О.В. Ткаченко[1], Г.Л. Бурыгин[1,2], М.А. Григорян[1], Н.В. Евсеева[2], К.Ю. Каргаполова[1]

[1] Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия, oktkachenko@yandex.ru

[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия, burygingl@gmail.com

Аннотация. Рост-стимулирующие ризосферные бактерии (PGPR) разных таксономических групп исследовали на способность оптимизировать морфогенетические процессы у микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* в чистых и смешанных культурах. Наибольший рост-стимулирующий эффект продемонстрировала комбинация штаммов *Azospirillum baldoniorum* Sp245 + *Kocuria rosea* T1Ks19. Результаты могут быть использованы для повышения эффективности микроклонального размножения картофеля.

Ключевые слова: культура тканей растений *in vitro,* картофель, рост-стимулирующие ризосферные бактерии, коинокуляция.

Ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений (PGPR), снабжают растения минеральными и органическими питательными веществами, в первую очередь доступным азотом и фитогормонами [Bashan et al., 2014], а также участвуют в конкурентном биорегулировании микробных ассоциаций в почве [Beneduzi et al., 2012] и индуцируют системную устойчивость растений к абиотическим и биотическим факторам внешней среды. Кроме того, PGPR способны оптимизировать морфогенетические процессы растений в культуре *in vitro* [Каляева с соавт., 2001], повышая тем самым эффективность агробиотехнологий, основанных на применении методов клеточной селекции и генной инженерии растений.

Одним из хорошо изученных объектов в исследовании ассоциативных симбиозов являются бактерии рода *Azospirillum*. Нашими исследованиями было показано, что азоспириллы активизируют развитие корневой системы микроклонов картофеля *in vitro*, стимулируют адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствуют увеличению урожая мини клубней [Tkachenko et al., 2015; Kargapolova et al., 2020].

В настоящее время для бактериальной инокуляции все больше внимания уделяется смешанным культурам. Совместная инокуляция растений ассоциативными бактериями разных родов рассматривается как одна из самых передовых технологий в сельском хозяйстве [Remans et al. 2008]. При инокуляции смешанными культурами важно учитывать совместимость бактериальных культур и эффекты их совместного действия на растение.

Целью исследования являлось изучение ответных реакций микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* при коинокуляции ассоциативными рост-стимулирующими бактериями разных таксономических групп.

Коллекционные штаммы *Azospirillum baldoniorum* Sp245, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Enterobacter ludwigii* K7 и *Kocuria rosea* T1Ks19 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (http://collection.ibppm.ru) были использованы для инокуляции картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский. Растения культивировали в стерильных условиях (контроль), инокулировали штаммами *A. baldoniorum* Sp245 и/или *K. rosea* T1Ks19 при черенковании, а на 14 сутки культивирования штаммами *O. cytisi* IPA7.2 и/или *E. ludwigii* K7. Инокуляцию микрорастений *in vitro* проводили суспензиями бактерий в концентрации 10^6 кл/мл.

Анализ результатов показал, что при инокуляции чистыми культурами два из четырех штаммов *E. ludwigii* K7 и *K. rosea* T1Ks19 и четыре пары штаммов:

A. baldoniorum Sp245 с *E. ludwigii* K7 и с *K. rosea* T1Ks19, а также *K. rosea* T1Ks19 с *E. ludwigii* K7 и *O. cytisi* IPA7.2 стимулировали рост стебля в длину (максимально – штамм *E. ludwigii* K7 в 1,7 раза по сравнению с контролем, минимально – его комбинация с *A. baldoniorum* Sp245 на 23%). При этом достоверное увеличение сырой массы побега и листьев отмечено только при коинокуляции *A. baldoniorum* Sp245 с *E. ludwigii* K7 и с *K. rosea* T1Ks19 (соответственно в 1,7 и 2,2 раза для побегов и в 1,6 и 2,0 раза для листьев), а также сырой массы листьев в варианте с инокуляцией штаммом *E. ludwigii* K7 в 1,6 раза. Для комбинации *A. baldoniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19 также отмечено достоверное повышение сухой массы побегов и листьев по сравнению с контролем соответственно в 2,4 и 2,3 раза. Сухая масса побега также была увеличена в варианте коинокуляции штаммами *O. cytisi* IPA7.2 с *E. ludwigii* K7 в 2,0 раза, а сухая масса листьев – в варианте с чистой культурой *O. cytisi* IPA7.2 в 1,9 раза. Количество узлов на побеге увеличивалось только в одном варианте коинокуляции: *A. brasilense* Sp245 с *K. rosea* T1Ks19 (на 22%).

Кроме того, в варианте *A. baldoniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19, а также при инокуляции чистыми культурами *A. baldoniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 существенно увеличивалось количество корней на побеге соответственно на 53, 43 и 32%. Во всех вариантах инокуляции по сравнению с контролем корни были короче, особенно в варианте *A. baldoniorum* Sp245 с *K. rosea* T1Ks19, отличавшемся максимальным количеством корней.

Существенное снижение сырой массы корней установлено только в вариантах с инокуляцией чистыми штаммами *E. ludwigii* K7 и с *K. rosea* T1Ks19, с коинокуляцией этими же штаммами, а также при коинокуляции штаммами *K. rosea* T1Ks19 + *O. cytisi* IPA7.2. Сухая масса корней в большинстве вариантов от контроля не отличалась, и только при коинокуляции штаммами *A. baldoniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 увеличивалась.

Содержание фотосинтетических пигментов в большинстве опытных вариантов было ниже контроля или на уровне с ним. Для культуры *in vitro* данный показатель не имеет существенного значения, так как в условиях культивирования на питательной среде у растений преобладает гетеротрофный тип питания.

Таким образом, из всех изученных комбинаций инокуляции наибольший рост-стимулирующий эффект по 7 изученным признакам микрорастений картофеля продемонстрировал вариант с коинокуляцией штаммами *A. baldoniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19. В данной комбинации установлено увеличение длины побега, количества узлов, массы побегов и листьев, а также значительное увеличение количества корней на побегах, при этом корни были существенно короче, чем в контроле, а масса не отличалась от контрольного варианта.

Результаты могут быть использованы для повышения эффективности микроклонального размножения картофеля.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116.

Литература

Каляева М.А., Захарченко Н.С., Доронина Н.В., Рукавцова Е.Б., Иванова Е.Г., Алексеева В.В., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция роста и морфогенеза растений in vitro ассоциативными метилотрофными бактериями // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 595–599.

Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) // Plant Soil. 2014. V. 378. P. 1–33.

Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia M.D. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet. Mol. Biol. 2012. V. 35. P. 1044–1105.

Remans R., Ramaekers L., Schelkens S., Hernandez G., Garcia A., Reyes J.L., Mendez N., Toscano V., Mulling M., Galvez L., Vanderleyden J. Effect of Rhizobium–Azospirillum coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting Phaseolus vulgaris L. genotypes cultivated across different environments in Cuba // Plant Soil. 2008. V. 312(1-2). P. 25-37.

Kargapolova, K.Y., Burygin, G.L., Tkachenko, O.V., Evseeva N.V., Pukhalskiy Y.V., Belimov A.A. Effectiveness of inoculation of in vitro-grown potato microplants with rhizosphere bacteria of the genus Azospirillum // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2020. V. 141. P. 351–359. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01791-9

Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria Azospirillum // Agron. Sustain. Develop. 2015. V. 35. P. 1167–1174.

PLANT-MICROBIAL ASSOCIATIONS DURING IN VITRO COINOCULATION OF POTATOES WITH GROWTH-PROMOTING BACTERIA

O.V. Tkachenko[1], G.L. Burygin[1,2], M.A. Grigorian[1], N.V. Evseeva[2], K.Yu. Kargapolova[1]

[1] Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia, oktkachenko@yandex.ru

[2] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, burygingl@gmail.com

Abstract. Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of different taxonomic groups were tested for the ability to optimize morphogenetic processes in potato micro-plants under *in vitro* and *ex vitro* conditions in pure culture and during coinoculation The combination of strains *A. baldoniorum* Sp245 + *K. rosea* T1Ks19 had the greatest growth-promoting effect The results can be used to improve the efficiency of microclonal propagation of potato.

Keywords: *in vitro* plant tissue culture, potato, plant-growth-promoting rhizobacteria, coinoculation

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОКСОАНИОНОВ СЕЛЕНА БАКТЕРИЯМИ РОДА *AZOSPIRILLUM*

А.В. Тугарова, А.А. Владимирова, П.В. Мамченкова, А.А. Камнев

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия, tugarova_anna@mail.ru

Аннотация: Рассмотрено восстановление оксоанионов селена (селенит-ионов) бактериями рода *Azospirillum*. Предложен оригинальный метод биосинтеза наночастиц селена с экстраклеточной локализацией, гомогенных по размеру. Синтезированные наночастицы были охарактеризованы различными методами: просвечивающей электронной микроскопии, динамического рассеяния света, спектроскопии комбинационного рассеяния, ИК-фурье-спектроскопии. Обсуждаются возможные механизмы бактериального восстановления селенита.

Ключевые слова: зеленая химия, оксоанионы селена, восстановление селенита, *Azospirillum*, ризобактерии

Бактерии играют одну из основных ролей в биогеохимическом цикле селена [Nancharaiah & Lens, 2015]. Они способны восстанавливать хорошо растворимые в воде и вследствие этого достаточно токсичные оксоанионы селена до нерастворимых и соответственно нетоксичных веществ – элементарного селена и селенидов, часто – с формированием наночастиц, что представляет интерес для различных областей биотехнологии и в последнее время всё больше привлекает внимание исследователей [Tugarova & Kamnev, 2017; Ojeda *et al.*, 2020].

Восстановление оксоанионов селена бактериями с образованием наночастиц селена (Se-НЧ) относится к зеленой химии (green chemistry). Такой синтез не требует дополнительных компонентов, что дает возможность использования этих Se-НЧ без дополнительной очистки в медицине и животноводстве, например, в качестве биодобавок для предотвращения селенодефицита. Было показано, что биологически синтезированные Se-НЧ отличаются от наночастиц, полученных другими способами по структуре и свойствам [Oremland et al., 2004]. Свойства наночастиц, полученных с помощью разных бактерий, также могут различаться. Восстановление селенит-ионов может идти по разным механизмам и отличаться у различных микроорганизмов: так называемые Painter-type reactions, или реакции с участием тиоловых групп; участие системы тиоредоксин-тиоредоксинредуктаза; сидерофор-опосредованное восстановление; сульфид-опосредованное восстановление; диссимиляционное восстановление [Zannoni et al., 2007]. Точные механизмы этих преобразований до конца еще не изучены. Поэтому необходимо изучение механизмов образования наночастиц, связанных с «зеленым синтезом», что даст возможность управлять восстановлением селенит-ионов при использовании бактерий в качестве “клеточных фабрик” для получения Se-НЧ, а также приведет к лучшему пониманию биогеохимического цикла селена и роли бактерий в нем.

В данной работе представлены результаты наших экспериментов по изучению восстановления оксоанионов селена, а именно селенитов (степень окисления селена +4, SeO_3^{2-}), бактериями рода *Azospirillum*. Исследования были проведены как по разработке биотехнологических приемов бактериального синтеза Se-НЧ, так и по изучению механизмов восстановления. Основные результаты были получены при использовании наиболее изученных типовых штаммов азоспирилл: *A. brasilense* Sp7 и *A. baldaniorum* Sp245, ранее известного как *A. brasilense* Sp245 [Ferreira et al., 2020]. Они отличаются занимаемой ими экологической нишей: *A. brasilense* Sp7 –

штамм-эпифит, способный колонизировать только внешнюю поверхность корня, не проникая внутрь последнего; *A. baldaniorum* Sp245 – штамм-эндофит, способный проникать внутрь корневых волосков [Schloter & Hartmann, 1998]. Эти штаммы относятся к группе ризобактерий, стимулирующих рост растений (англ. аббревиатура – PGPR, plant-growth-promoting rhizobacteria), и представляют интерес как микробные удобрения для агробиотехнологии (Cassan et al., 2020). Также в работу был взят *A. thiophilum* BV-S, выделенный из сероводородного источника Северного Кавказа [Lavrinenko et al., 2010]. Данный штамм показал наибольшую устойчивость к токсическому действию селенит-ионов и был способен выдерживать концентрацию до 15 мМ Na_2SeO_3.

Нами предложена схема для получения экстраклеточных, гомогенных по размеру Se-НЧ, включающая следующие этапы: (1) выращивание бактериальных культур до поздней логарифмической фазы роста (18 ч); (2) добавление к отмытым клеткам Na_2SeO_3 до конечных концентраций 10–50 мМ и (3) инкубация в течение 24 ч с последующим отделением Se-НЧ от бактериальных клеток [Tugarova et al., 2020]. Размер синтезированных Se-НЧ уменьшался при увеличении начальной концентрации Na_2SeO_3 для всех исследуемых штаммов. Так, для штамма *A. baldaniorum* Sp245 (данные просвечивающей электронной микроскопии, ПЭМ) он составил: ~80 нм – для 10 мМ (наиболее гомогенные); ~47–50 нм – для 25 мМ; ~30 нм – для 50 мМ. При этом размеры Se-НЧ, определенные методом динамического рассеяния света (ДРС), были схожими, но бóльшими, чем определенные с помощью ПЭМ. Это объясняется тем, что методом ДРС измеряется не истинный, а гидродинамический диаметр Se-НЧ. Также данным методом определен дзета-потенциал Se-НЧ, который составил от –18,5 до –23,7 мВ. Методом ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях определено, что в составе Se-НЧ, полученных с помощью *A. brasilense* Sp7, присутствуют белки массой 96 и 25 кДа.

Синтезированные Se-НЧ были охарактеризованы с использованием методов колебательной спектроскопии. ИК-фурье-спектроскопия показала присутствие белков, полисахаридов и липидов в составе Se-НЧ. С использованием спектроскопии комбинационного рассеяния, чувствительной к различным аллотропным модификациям селена, установлено, что элементарный селен в наночастицах находился в аморфной модификации [Tugarova et al., 2018, 2020; Kamnev et al., 2017].

При изучении механизмов восстановления нами установлено следующее: (1) перенос селенит-ионов в бактериальную клетку происходит без участия протон-зависимого транспорта; вынос зародышей Se-НЧ из клетки проходит с участием протон-зависимого транспорта; (2) в трансформации селенит-ионов у азоспирилл участвует система денитрификации; (3) редокс-система глутатиона не играет существенной роли в восстановлении селенит-ионов. На основе проведенной работы мы предполагаем, что восстановление селенит-ионов азоспириллами может включать следующие стадии: (1) транспорт SeO_3^{2-} внутрь клеток; (2) внутриклеточное восстановление с включением селенит-ионов в систему денитрификации; (3) вынос зародышей Se-НЧ из бактериальных клеток посредством протон-зависимого транспорта; (4) внеклеточная сборка Se-НЧ вблизи поверхности клеток с участием биологических макромолекул.

В работе также проверялась способность к восстановлению селенат-ионов (степень окисления селена +6, SeO_4^{2-}) бактериями рода *Azospirillum*. Данная

способность распространена среди бактерий гораздо меньше, чем восстановление селенит-ионов, и в основном встречается среди анаэробов, которые способны использовать селенаты в качестве конечных акцепторов электронов при анаэробном дыхании [Oremland et al., 1994]. К восстановлению селенат-ионов в исследуемых условиях культивирования (аэробные и статичные) не были способны ни *A. brasilense* Sp7, ни *A. baldaniorum* Sp245. Однако *A. thiophilum* BV-S показал способность к восстановлению селенат-ионов в статичных условиях культивирования, что, вероятно, связано с особенностями его серного метаболизма [Lavrinenko et al., 2010]. Обнаруженный феномен требует дальнейших исследований.

Биотехнологические методы получения наночастиц различных элементов с участием биологических объектов (микроорганизмов, растений, животных и/или ферментов, полученных из них) являются экологически безопасной альтернативой химическому синтезу и в настоящее время активно развиваются. Бактериально синтезированные наночастицы потенциально интересны для различных биотехнологических и медицинских применений. Сами процессы бактериального восстановления оксоанионов селена могут быть использованы при фиторемедиации с участием ризосферных и почвенных бактерий для очистки загрязненных селеном почв или водоносных горизонтов.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 16-08-01302-а).

Литература

Ferreira N.d.S., Sant'Anna F.H., Reis V.M., Ambrosini A., Volpiano C.G., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.d.O., Passaglia L.M.P., de Souza E.M., Hartmann A., Cassan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. Vol. 70 (12). P. 6203–6212.

Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., de Carlan C.L.N., Donadio F., Torres D., Rosas S., Pedrosa F.O., de Souza E., Zorita M.D., de-Bashan L., Mora V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond // Biol. Fertil. Soils**.** 2020. V. 56. P. 461–479.

Kamnev A.A. Mamchenkova P.V., Dyatlova Yu.A., Tugarova A.V. FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles // J. Mol. Struct. 2017. Vol. 1140. P. 106–112.

Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring // Int. J. Sys. Evol. Micr. 2010. Vol. 60(12). P. 2832–2837.

Nancharaiah Y.V., Lens P.N.L. Ecology and biotechnology of selenium respiring bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. Vol. 79. P. 61–80.

Ojeda J.J., Merroun M.L., Tugarova A.V., Lampis S., Kamnev A.A., Gardiner P. H. E. Developments in the study and applications of microbial transformations of selenium species // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. Vol. 40(8). P. 1250–1264.

Oremland R.S., Herbel M.J., Blum J.S., Langley S., Beveridge T.J.,Ajayan P.M., Sutto T., Ellis A.V., Curran S. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 70. – P. 52–60.

Tugarova A.V., Kamnev A.A. Proteins in microbial synthesis of selenium nanoparticles // Talanta. 2017. V. 174. P. 539–547.

Tugarova A.V., Mamchenkova P.V., Dyatlova Yu.A., Kamnev A.A. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. Vol. 192. P. 458–463.

Tugarova A.V., Mamchenkova P.V., Khanadeev V.A., Kamnev A.A. Selenite reduction by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense*, synthesis of extracellular selenium nanoparticles and their characterisation // New Biotechnol. 2020. Vol. 58. P. 17–24.

Zannoni D., Borsetti F., Harrison J.J., Turner R.J. The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te // Adv. Microb. Physiol. 2007. Vol. 53. P. 1–52.

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF THE REDUCTION OF SELENIUM OXOANIONS BY BACTERIA OF THE GENUS *AZOSPIRILLUM*

A.V. Tugarova, A.A. Vladimirova, P.V. Mamchenkova, A.A. Kamnev

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, tugarova_anna@mail.ru

Abstract. Reduction of selenium oxoanions (selenite ions) by bacteria of the genus *Azospirillum* is considered. An original method is proposed for biogenic synthesis of selenium nanoparticles homogeneous in size with extracellular localisation. The synthesised nanoparticles were characterised by transmission electron microscopy, dynamic light scattering, Raman and FTIR spectroscopic techniques. Possible mechanisms of selenite reduction by bacteria are discussed.

Key words: green chemistry, selenium oxoanions, selenite reduction, *Azospirillum*, rhizobacteria

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АУКСИНПРОДУЦРИРУЮЩЕГО ГЕРБИЦИДТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PROTEGENS* ДА1.2

Г.Г. Худайгулов, Д.В. Четверикова, С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия, chelab007@yandex.ru

Аннотация. Произведена оптимизация состава питательной среды и режимов для производства методом глубинного культивирования в лабораторных, пилотных и промышленных ферментационных установках штамма *Pseudomonas protegens* ДА1.2. Полученные препараты проявляли высокую фитогормональную активность, титр клеток составил до 28 млрд. КОЕ/мл культуральной жидкости.

Ключевые слова: оптимизация, *Pseudomonas*, культивирование, устойчивость к гербицидам

Современный тренд, затронувший все сферы деятельности человека – упор на экологичность. Однако, в такой области, как производство продукции пищевого назначения, а конкретно, зерновых культур, невозможно обойтись без химических средств защиты растений. С учетом того, что сорные растения обладают способностью адаптироваться к регламентированным дозам агрохимикатов (в частности, гербицидов), сельхозпроизводителям приходится повышать нормы их внесения. Это приводит к возникновению гербицидного стресса и увеличению сроков вегетации растения и, как следствие, снижение количества и качества урожая. Снизить негативное воздействие возможно с применением бактериальных препаратов [Худайгулов, Четвериков, 2021]. Известно, что PGP-бактерии способны к синтезу индолилуксусной кислоты, мобилизации фосфатов, подавлению фитопатогенов [Коршунова и др., 2020]. Именно такие препараты целесообразно применять в условиях рискованного земледелия. Нами раннее был выделен и описан штамм бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2 с такими характеристиками как: синтез индолилуксусной кислоты, способность к мобилизации фосфора из нерастворимых соединений, фиксация атмосферного азота, антагонизм в отношении микроскопических грибов родов *Alternaria, Bipolaris, Botrytis, Fusarium, Rhizoctonia* [Четвериков и др., 2021]. Учитывая комплекс полезных свойств данного штамма, создание на его основе препаратов для нивелирования пестицидного стресса является актуальной задачей.

Цель данной работы – определение оптимального состава питательной среды и условий промышленного культивирования для получения препарата - антистрессанта на основе штамма бактерий *P. protegens* ДА1.2 в ферментационных установках.

В своих исследованиях мы опирались на опыт получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения на основе псевдомонад [Логинов, Четвериков, 2003; Четвериков и др., 2006; Асабина и др., 2009].

На начальном этапе оптимизации условий культивирования на основе сред МПБ и Кинг Б были составлены различные варианты сред (таблица). Культивирование проводили в колбах на 250 мл со 100 мл среды на термостатируемой качалке ES-20/60 (Biosan, Латвия) в течение трех суток при температуре 28 °С и 160 об/мин. Исходный титр составлял $2*10^6$ КОЕ/мл.

Таблица. Зависимость титра бактерий *P. protegens* ДА1.2 от состава питательной среды

Вариант / Компонент	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Пептон	15	10	5	5	5	5	2	0,5	2	5	2	2	1	1,5	-	0,75	1	0,5
Дрожжевой экстракт	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	1,5	0,75	1	0,5
Глицерин	-	-	-	10	5	5	10	10	5	10	-	5	5	5	5	5	5	5
NaCl	3	3	3	-	3	3	-	-	-	1	3	3	2	2	2	2	2	2
K_2HPO_4	-	-	-	5	-	5	5	5	2	-	-	-	2	2	2	2	2	2
$MgSO_4*7H_2O$	-	-	-	1,5	-	1,5	1	1	1	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Титр, $*10^8$ КОЕ/мл	21	18	13	100	51	100	54	7	51	8	10	100	10	15	33	38	44	29

В качестве основы для дальнейших исследований был выбран вариант состава среды No. 12 как наиболее оптимальный с точки зрения соотношения стоимости питательной среды и конечного титра культуральной жидкости. Для масштабирования использовали ферментационные установки различного объёма производства ООО фирма “Проинтех” (г. Пущино). При культивировании в лабораторном ферментере ФА-10 объёмом 10 л при температуре 28 °С, оборотах мешалки – 200 об/мин, аэрации – 0,5 объема воздуха в 1 мин на 1 объем среды за 72 часа концентрация жизнеспособных клеток составила $2,8*10^{10}$ КОЕ/мл. Культивирование на установках объемом 100 л и 1000 л при тех же условиях позволило достичь титра $6,0*10^9$ КОЕ/мл и $4,5*10^9$ КОЕ/мл, соответственно. Все

Таким образом, для штамма бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2, обладающего способностью нивелировать гербицидный стресс у растений, подобран оптимальный состав среды, определены условия для промышленного культивирования на установках глубинной ферментации различного объема. Данная работа – основа для дальнейших исследований по кинетике роста *P. protegens* ДА1.2 и изучению возможности их непрерывного культивирования.

Литература

Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология. 2009. № 3. С. 67–71.

Коршунова Т.Ю., Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В., Четвериков С.П., Бакаева М.Д., Столярова Е.А., Четверикова Д.В., Логинов О.Н. Бактерии рода *Pseudomonas* для агробиотехнологии и природоохранной деятельности: монография. М.: Наука, 2020. – 247 с.

Логинов О.Н., Четвериков С.П. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 // Биотехнология. 2003. № 5. С. 22–25.

Худайгулов, Г.Г., Четвериков С.П. Бактерии для нивелирования гербицидного стресса у растений // Биомика. 2020. Т.12. С. 337–342.

Четвериков С.П., Асабина Е.А., Логинов О.Н. Оптимизация состав питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена» // Башкирский химический журнал. 2006. Т. 13. С. 10–13.

Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д., Кенджиева А.А., Стариков С.Н.,. Султангазин З.Р. Перспективный штамм бактерий *Pseudomonas protegens* для стимуляции роста сельскохозяйственных злаков, устойчивый к гербицидам // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. С. 87–94.

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR THE AUXIN-PRODUCING HERBICIDE-TOLERANT BACTERIAL STRAIN *PSEUDOMONAS PROTEGENS* DA1.2

G.G. Hkudaygulov, D.V. Chetverikova, S.P. Chetverikov

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, UFA, Russia, chelab007@yandex.ru

Annotation. The composition of the nutrient broth medium and parameters for production by cultivation in laboratory, pilot and industrial bioreactors of the strain *Pseudomonas protegens* DA1.2 were optimized. The obtained products show high phytohormonal activity, the cell titer was up to 28 billion CFU/ml.

Keywords: optimization, *Pseudomonas*, cultivation, herbicide resistance

ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРИНА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ

О.М. Цивилева[1], Д.Н. Ибрагимова[2], О.В. Кофтин[1]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов, tsivileva@ibppm.ru

[2] Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, ichem@info.sgu.ru

Аннотация. Известен широкий спектр биоактивности производных кумарина природного и синтетического происхождения как основы малотоксичных и высокоэффективных препаратов. Актуален синтез новых соединений и выяснение условий и продуктов их биотрансформации культурами съедобных и лекарственных грибов с целью поиска материалов для биотехнологий. Впервые для грибов на примере ряда культур ксилотрофных базидиомицетов показана возможность микосинтеза препаратов сельскохозяйственного назначения на основе кумаринов.

Ключевые слова: макромицеты, ксилотрофные грибы, природные вещества, производные кумарина, биотрансформация

Многочисленные и разнообразные свойства мицелиальных культур и плодовых тел грибов - макромицетов, полезные в биотехнологическом и биомедицинском плане (питательные, лигнинолитические, фармакологические, среди которых противоопухолевые, гипогликемические, гиполипидемические, гипотензивные, иммуномодулирующие, противогрибковые, бактерицидные, антиоксидантные, нейропротективные, гепатопротективные и другие), обусловлены уникальным сочетанием продуктов обмена веществ. Широкий спектр биологически активных грибных метаболитов представлен высокомолекулярными белковыми, углеводными, липидными субстанциями, а также низкомолекулярными соединениями как аминокислотной, моносахаридной, жирнокислотной природы, так и не принадлежащими к этим доминирующим в химическом составе грибной культуры группам соединений.

В лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН на протяжении последних двух десятилетий проводятся активные научные исследования перспективных микологических объектов поверхностного и погруженного культивирования с целью получения новой информации о биологически активных соединениях таких родов ксилотрофных базидиомицетов, как *Armillaria*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Pleurotus* и др. Фундаментальный аспект проблемы подкрепляется разработками в рамках концепции использования базидиальных культивируемых грибов как перспективного экологически чистого сырья для создания лечебно-профилактических препаратов.

Требуют углубленного изучения механизмы, регулирующие метаболизм грибных клеток под влиянием внешних факторов. Идентифицированные внеклеточные соединения, участвующие в адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды, по химической природе относятся к разным типам. Они представлены белками, углеводородами, органическими кислотами, нуклеотидами, аминокислотами, липопептидами, летучими соединениями [Николаев, 2004], однако большая часть таких соединений остается неидентифицированной. Остается актуальной проблема установления механизма действия, продуктов биотранформации, синтеза производных и комплексов с биогенными металлами, выделения из биологических объектов перспективных биорегуляторов, большинство из которых совершенно не исследовано в связи с жизнедеятельностью базидиомицетов. К таковым относятся растительные кумарины.

Интерес к производным кумарина обусловлен как их широким практическим применением, так и уникальной реакционной способностью хромен-2-оновой системы в структуре молекул, которая может проявлять свойства ароматического кольца, алкена или ненасыщенного лактона. Получено много доказательств широкого спектра биологического действия хромен-2-онов (кумаринов) природного и синтетического происхождения как основы малотоксичных и высокоэффективных лекарственных препаратов.

Кумарины распространены в растительном мире. Естественно предположить, что многие хромен-2-оны способны вовлекаться в биологические процессы, будучи структурно схожими с веществами фитопроисхождения. Однако практически отсутствуют работы, связанные с выявлением и исследованием действия соединений этого класса в отношении базидиомицетов. Одним из направлений наших исследований стало выявление антимикробных и ростостимулирующих свойств метаболитов грибных культур, полученных в условиях выращивания в присутствии соединений кумариновой природы и их комплексов с биогенными металлами(II), характеристика эффекта низкомолекулярных добавок и оценка перспектив биотехнологического использования. В качестве компонентов питательных сред грибов изучены синтезированные (каф. органической и биоорганической химии СГУ) производные кумарина.

Единичные работы указывают на антимикробную активность некоторых кумаринов (в частности, 3-оксикумаринов) [Ryzhenko et al., 1983]. Мы исследовали антибактериальную активность продуктов из мицелиальной биомассы в отношении бактериальных тест-систем, выбранных на основе Специализированной научной коллекции ИБФРМ РАН (WFCC номер 975, WDCM номер 1021)) Результаты определения чувствительности фитопатогенов к биоагентам грибного происхождения позволили заключить, что базидиомицеты рода *Ganoderma*, культивируемые в присутствии некоторых производных кумарина, могут служить перспективным источником антибактериальных агентов в отношении *Xanthomonas campestris, Pseudomonas fluorescens,. Micrococcus luteus, Pectobacterium atrosepticum*. Выявлена умеренная бактерицидная активность субстанций из *Ganoderma valesiacum*, особенно в присутствии 4-гидрокси-3-(3-оксо-1-(3-нитрофенил)-3-фенилпропил)-хромен-2-она. Получение внутриклеточных субстанций грибного происхождения при исключении азотсодержащего производного кумарина из питательных сред базидиомицетов приводит к резко сниженной способности подавлять изученные фитопатогенные бактерии. Необходимы дальнейшие исследования видоспецифических особенностей проявления антибактериального эффекта внутриклеточных биополимеров, полученных на основе культур разной систематической принадлежности.

Комплексообразующая способность хромен-2-она и его замещенных изучена мало. Имеющиеся в литературе данные о комплексах самого хромен-2-она ограничены практически несколькими работами. Что касается комплексов с каким-либо производным 4-гидроксикумарина, нами обнаружены только сведения о комплексе редкоземельного металла неодима(III) с 4-гидрокси-3-(1-(4-нитрофенил)3-оксобутил)-2H-хромен-2-оном (аценокумаролом) [Kostova et al., 2004]. Получение и исследование комплексов 3-замещенных 2H-хромен-2-онов с солями биогенных металлов позволило бы значительно расширить представление не только о реакционной способности представителей вышеупомянутого класса соединений, но и о возможности их практического применения, в том числе биологической активности в координированном состоянии.

Изучение биологической активности комплексов биометаллов(II) с лигандами – производными 4-гидроксикумарина мы проводили с использованием базидиомицетов

родов *Ganoderma*, *Grifola*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, имеющихся в коллекции лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН. Синтезировали комплексы Cu(II), Mn(II), Zn(II) с 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-оном и 4-гидрокси-3-(3-оксо-1-(3-нитрофенил)-3-фенилпропил)-хромен-2-оном. Выявили антибактериальную активность продуктов биотрансформации полученных комплексов базидиомицетами против ряда фитопатогенных бактерий. Более высокую в большинстве случаев эффективность соединения 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-он в виде комплексов с биогенными металлами (II) можно представить в порядке убывания: Cu>>Zn>Mn для большинства изученных базидиомицетов. Внеклеточные метаболиты *Laetiporus sulphureus, Lentinula edodes* способствовали формированию субстанций с более выраженной бактерицидной активностью. Лидером в отношении антибактериальной активности внеклеточных метаболитов оказался комплекс Cu (II) с 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-оном. Имеется возможность создания на данной основе новых биопрепаратов – факторов регуляции устойчивости растений к фитопатогенам.

Характеризация антибактериального действия метаболитов культур базидиомицетов, полученных в условиях выращивания в присутствии соединений кумариновой природы, и изучение биотрансформации синтетических кумаринов физико-химическими методами позволило выявить особенности состава биосубстанций с высокой антимикробной активностью у базидиомицетов. Показано, что 4-гидроксикумарины перспективны как биологически активные соединения в решении некоторых проблем культивирования высших грибов и защиты растений.

Свойства 3-замещенных (4-гидрокси)-2Н-хромен-2-онов не были описаны в периодической печати еще 6 лет назад, но к настоящему времени выявлен потенциал их биологической активности. Представляется, что он связан с наличием карбонильных групп различного характера (кетонной и лактонной), гетероциклической системы, способной к рециклизации [Kumargalieva et al., 2013], некоторыми другими факторами. В нашей работе при исследовании влияния систем, содержащих 4-гидроксикумариновый фрагмент, на плодоношение высших грибов оказалось, что роль индуктора способно играть вещество кумариновой природы. Эффект действия препаратов из класса антиоксидантов, к которым относят и кумарин-содержащие субстанции, может быть связан не только с их антиоксидантными свойствами, но также с их воздействием на различные сигнальные системы. Полиоксосоединения лактонной природы 2Н-хромен-2-онового ряда способны участвовать как в процессе антиоксидантной защиты, так и в индукции апоптоза, и, аналогично другим биологически активным соединениям, осуществлять указанные эффекты путем прямого взаимодействия с белками или при ингибировании их экспрессии. По-видимому, рассматриваемые производные кумарина оказывают воздействие на сигнальные системы грибных клеток, в том числе на молекулярные мишени путей апоптоза. При неблагоприятных условиях роста культур базидиомицетов возникают биохимические условия возникновения стадий морфогенеза, предшествующих плодоношению. Может происходить взаимодействие соединений-добавок с важнейшими биологически активными соединениями (как антиоксидантной природы, так и вызывающими окислительный стресс; с соединениями другой природы, принимающими участие в цитодифференцировке у высших грибов), что и стимулирует плодоношение.

Исследования биологически активных веществ грибного происхождения обладают не только фундаментально-научной, но и практической значимостью, способствуя развитию биотехнологии получения ценнейших продуктов из мицелиальной биомассы и культуральной среды. Исследование условий и продуктов

биотрансформации природных и синтетических кумаринов культурами высших грибов представляется своевременной и актуальной задачей поиска материалов для сельскохозяйственных и биомедицинских технологий. В нашей работе впервые для грибов на примере ряда культур ксилотрофных базидиомицетов разных экологических ниш изучен биосинтез и экзогенное действие важных биологически активных производных кумарина. Показано, что соединения, молекулы которых содержат катион биометалла и 4-гидрокси-кумариновый фрагмент, способны выступать в качестве эффекторов формирования защитных систем базидиомицетов при различных стрессовых воздействиях.

Литература

Николаев Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 387–397.

Kostova I.P., Malonov I.I., Radulova M.K. Stability of the complexes of some lanthanides with coumarin derivatives. I. Cerium(III)-4-methyl-7-hydroxycoumarin // Acta Pharm. 2004. Vol. 54. P. 37–47.

Kumargalieva (Ibragimova) D.N., Fedotova O.V., Mazhukina O.A. Mannich reaction in the row of substituted 4-hydroxy-2n-(pyron) chromen-2-ones // Izv. Saratov. Univ. Nov. Ser. Ser. Khim. Biol. Ekol. 2013. Vol. 13. P. 19–23.

Ryzhenko L.M., Shebaldova A.D., Khidekel' M.L. Ruthenium (IV) complexes with 3-hydroxy- and 3-carboxycoumarins // Russian Chemical Bulletin. 1983. Vol. 32. P. 183–184.

COUMARIN DERIVATIVES IN MEDICINAL MUSHROOMS AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

O.M. Tsivileva[1], D.N. Ibragimova[2], O.V. Koftin[1]

[1] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation. tsivileva@ibppm.ru

[2] N.G. Chernyshevskii National Research Saratov State University, Saratov, Russian Federation, ichem@info.sgu.ru

Abstract. Broad spectrum of bioactivity exhibited by the coumarin derivatives of natural and synthetic origin constitutes a basis for low-toxic and high-performance preparations. Novel compounds synthesis in parallel with the elucidation of both conditions and resultant products of their biotransformation mediated by the edible and medicinal mushroom cultures remains a challenge to find materials for biotechnologies. We evidenced for the first time with mushrooms exemplified by a series of xylotrophic basidiomycetes cultures, a feasibility of mycosynthesis of the agricultural-purposed agents based on coumarins.

Key words: macromycetes, xylotrophic mushrooms, natural compounds, coumarin derivatives, biotransformation

НЕЙТРАЛИЗАТОР ПЕСТИЦИДНОГО СТРЕССА «АГРОБИОЛОГ»

С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия, che-kov@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты нивелирования последствий гербицидного стресса у растений пшеницы под воздействием нейтрализатора пестицидного стресса «Агробиолог» на основе гербицидтолерантного штамма бактерий *Pseudomonas protegens* DA1.2.

Ключевые слова: пестицидный стресс, нивелирование стресса, «Агробиолог», *Pseudomonas*

Продуктивность сельскохозяйственных растений находится в прямой зависимости с применением мероприятий по их интегрированной защите от стрессовых воздействий: болезней, вредителей, засухи. Высокий спрос на повышение продуктивности сельского хозяйства сопровождается также широкомасштабным использованием пестицидов, не менее 35% из которых приходится на гербициды. Использование пестицидов порождает две проблемы: сокращение периода персистенции пестицидов в почве, ускорение их естественного разрушения и нивелирование негативного воздействия на растения. Поэтому актуальным становится поиск бактерий и разработка биопрепарата на их основе для нивелирования пестицидного стресса (PSMB) у сельскохозяйственных культур, а способность использования ими гербицидов в качестве источника питания может сделать их более ценными и конкурентоспособными. В научной литературе прослеживаются два направления исследований по уменьшению ущерба, наносимого применяемыми в настоящее время гербицидами: ускорение процесса их естественного разрушения и снижение негативного воздействия на культурные растения. Микробиологическая трансформация и детоксикация пестицидов представлена в литературе достаточно полно. Однако потенциал бактерий в смягчении пестицидного стресса у растений изучен недостаточно. Посвященные этому публикации единичны [Ahemad, Khan, 2010; Bourahla et al., 2018; Chennappa et al., 2018].

Целью работы было изучение влияния нейтрализатора пестицидного стресса «Агробиолог» на механизмы растительно-микробных взаимодействий, повышение продуктивности сельскохозяйственных культур и улучшение качества урожая в условиях пестицидного стресса.

Нейтрализатор пестицидного стресса «Агробиолог» представляет собой живые бактерии *Pseudomonas protegens* DA1.2 (45 млрд КОЕ/мл), выращенные на оптимизированных питательных средах с учетом ранее полученного опыта [Логинов, Четвериков, 2003; Асабина и др., 2009], и их метаболиты со следующими характерными свойствами [Четвериков и др., 2021]:

устойчивость к гербицидам;

устойчивость к засухе;

фиксация атмосферного азота;

подавление жизнедеятельности возбудителей болезней растений;

минерализация фосфора.

Обработка биопрепаратом «Агробиолог» уменьшала проявления гербицидного стресса у выращенных в условиях недостаточного увлажнения растений пшеницы, в частности уменьшала содержание маркеров стресса МДА, пролина, предотвращала ингибирование роста корней, нормализовала содержание хлорофилла. В то же время активизация роста корней после обработки растений пшеницы на фоне дефицита влаги и обработки гербицидами сопровождалась накоплением в них ауксинов и в ряде случаев цитокининов.

Взаимодействие растений и микробиоты в условиях стресса, вызванного неблагоприятными природными и антропогенными факторами, представляет особый интерес, в частности, в условиях комбинированного стресса «гербициды+засуха». Положительное влияние микроорганизмов сильнее проявляется при гербицидной обработке на фоне стресса, вызванного засухой, чем в условиях достаточного увлажнения. Нивелировать стрессовые воздействия на растения возможно с использованием бактериальных антистрессантов.

Обработка растений пшеницы бактериями нейтрализатора гербицидного стресса «Агробиолог» нивелировала негативное действие гербицидов как на фоне засухи, так и в отсутствии дефицита воды, что приводило к предотвращению окислительного стресса, восстановлению содержания хлорофилла *b* до уровня контроля и увеличению массы растений.

Применение биопрепарата «Агробиолог» совместно с химическими средствами защиты растений (в баковой смеси) позволяет значительно снизить стоимость обработок сельскохозяйственных культур, попутно сведя к минимуму депрессивное воздействие пестицидов на растения даже в условиях засухи. Прибавка урожая зерновых культур без остаточных количеств пестицидов в условиях Республики Башкортостан при урожайности 18-20 ц/га составляет 20-25%.

Исследование выполнено в рамках Гос. Задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

Литература

Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология. 2009. № 3. С. 67-71.

Логинов О.Н., Четвериков С.П. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 // Биотехнология. 2003. № 5. С. 22-25.

Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д., Кенджиева А.А., Стариков С.Н.,. Султангазин З.Р. Перспективный штамм бактерий *Pseudomonas protegens* для стимуляции роста сельскохозяйственных злаков, устойчивый к гербицидам // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 87-94.

Ahemad M, Khan M.S. Ameliorative effects of *Mesorhizobium* sp. MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress // Pesticide Biochemistry and Physiology. 2010. V.98. P. 183–190. DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.06.005

Bourahla M., Djebbar R, Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere // Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie. 2018. V. XXV. P. 74–83.

Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. *Azotobacter salinestris*: a novel pesticide-degrading and prominent biocontrol PGPR bacteria. In: Panpatte D, Jhala Y, Shelat H and Vyas R (Eds.), Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability. Singapore: Springer, 2018. V. 7. – P. 23–43.

NEUTRALIZER PESTICIDAL STRESS «AGROBIOLOG»

S.P. Chetverikov

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, UFA, Russia, che-kov@mail.ru

Annotation. The paper presents the results of leveling the effects of herbicidal stress in wheat plants under the influence of stress mitigating "Agrobiolog" based on the herbicide-tolerant strain of *Pseudomonas protegens* DA1.2 bacteria.

Key words*:* pesticide stress, stress mitigation, "Agrobiolog", *Pseudomonas*

МИКРОБНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИХ ПАВ И ГЕРБИЦИДОВ

Д.А. Шарипов, С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия, chelab007@yandex.ru

Аннотация. В работе представлены результаты микробной деструкции фторсодержащих ПАВ и некоторых галогенированных гербицидов на примере бактериального штамма DD4. В модельной системе изучена динамика роста штамма бактерий DD4 и показано, что культура активно накапливает биомассу при использовании в качестве источника углерода и энергии фторсодержащего пенообразователя типа AFFF и действующих веществ гербицидов Октапон, Дикамба, Флоракс. Полученные данные могут найти применение при разработке технологий ремедиации территорий с нарушенным экологическим статусом, образовавшихся при использовании фторсодержащих средств для тушения пожаров и нерегламентированном применении химических средств защиты растений.

Ключевые слова: фторсодержащие пенообразователи, галогенсодержащие гербициды, биодеструкция

Галогенированные поллютанты находятся во главе списка стойких органических загрязнителей, в котором особое место занимают перфторкарбоновые кислоты (в частности, перфтороктановая сульфоновая (ПФОС) и перфтороктановая кислоты (ПФОК), которые внесены в Приложение В Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязняющим веществам [Report of ..., 2009], обладающие свойствами поверхностно-активных веществ (ПАВ). Одна из основных сфер их использования – пенообразователи эффективных препаратов для оперативного тушения пожаров при горении нефтепродуктов и других видов легковоспламеняющихся жидкостей типа AFFF (Aqua Film Foming Foam). Исследования показывают, что эти ПАВ представляет значительную угрозу для окружающей среды и здоровья человека из-за их широкого распространения, необычайной стойкости, тенденции к биоаккумуляции и потенциальных токсикологических эффектов [Quinones et al. 2009; Espana et al. 2015; Tsuda et al. 2016].

Гонка за повышение продуктивности сельского хозяйства сопровождается широкомасштабным использованием пестицидов, и зачастую, в частности, нерегламентированным применением галогенсодержащих гербицидов, вызывая их накопление в почве и загрязнение окружающей среды.

Таким образом, токсичность и способность к накоплению фторсодержащих ПАВ и галогенированных гербицидов в объектах окружающей среды ведет к исследованию возможности минимизации их отрицательного воздействия путем микробной деградации. Ранее нами было показано, что некоторые бактерии рода *Pseudomonas* способны к биоразложению как перфторорганических кислот [Четвериков и др., 2017], так и галогенированных гербицидов [Четвериков и др., 2019]. Целью настоящей работы было оценить перспективы микробной деструкции фторсодержащих пенообразователей и ряда галогенированных гербицидов с помощью нового природного штамма бактерий.

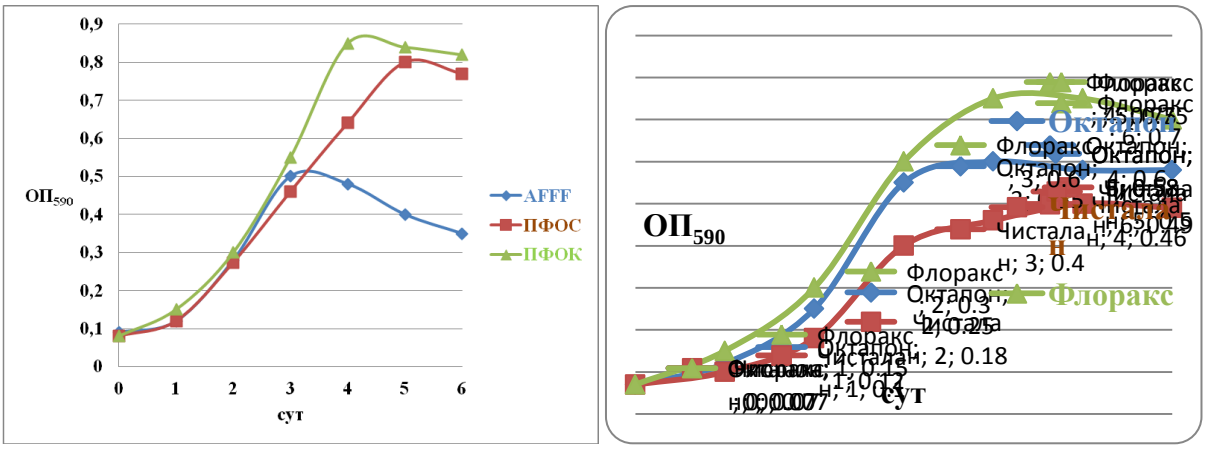
Объектом исследований был штамм DD4, выделенный из образца почвы с территории промышленного предприятия (Республика Башкортостан, Россия).

Динамику роста изучали в периодической культуре на синтетической среде Раймонда [Raymond, 1961] с фторсодержащим пенообразователем типа AFFF (1,0 г/л) и с галогенсодержащими гербицидами на основе 2,4-Д (Октапон экстра, 10 мл/л; Флоракс, 2,5 мл/л; Чисталан, 5 мл/л) в качестве единственного источника углерода и

энергии при 26ºС и 160 об./мин. Концентрация гербицидов в среде соответствовала их максимальному допустимому содержанию в используемых для опрыскивания рабочих растворах. Рост штамма оценивали по оптической плотности ($ОП_{590}$) клеточной суспензии на спектрофотометре СФ-56 (Россия). Данные были выражены в виде средних значений, рассчитанных с использованием MS Excel.

Первоначально по совокупности признаков была установлена принадлежность штамма DD4 к роду *Pseudomonas.*

Исследуемый штамм DD4 был способен к росту в минеральных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода как фторсодержащий пенообразователь типа AFFF, так и его основные компоненты - перфторкарбоновые кислоты (рис., а). Наибольший показатель оптической плотности культуральной жидкости приходился на 4 сут роста при культивировании на ПФОК (0,84 ОЕ) и на 5 сут - на ПФОС (0,80 ОЕ). Такая задержка в росте, вероятно, связана с более долгой адаптацией к серосодержащему субстрату, что подтверждает полученные нами ранее данные для штамма *Ensifer adhaerens* M1 при деструкции ПФОС и ПФОК [Четвериков, Логинов, 2019]. В среде с пенообразователем максимальное значение оптической плотности было ниже (0,49 ОЕ) и наблюдали его уже на 3 сут культивирования. Это связано с тем, что концентрат пенообразователя как коммерческий продукт содержит только до 6% фторированных ПАВ, и, вероятно, доступные для исследуемого штамма другие специализированные добавки (в большинстве случаев это коммерческая тайна производителя) типа углеводородных ПАВ.



а **б**

Рисунок. Динамика роста штамма DD4 при культивировании на среде с фторорганическими пенообразователями (а) и гербицидами (б) в периодической культуре.

Исследуемый штамм DD4 также проявлял способность к росту в минеральных средах с галогенсодержащими гербицидами (рис., б). Наилучшим субстратом из них был Флоракс, одним из действующих веществ которого является флорасулам. Флорасулам – фторсодержащий послевсходовый гербицид из семейства триазолопиримидинсульфонанилидов. Он входит в состав многих комбинированных препаратов и применяется для защиты от широколиственных сорняков пшеницы, ячменя, овса и ржи. Он не является стойким в почве, но может быть стойким в водных системах. Наибольший показатель оптической плотности культуральной жидкости при росте на нем приходился на 4 сут роста (0,76 ОЕ).

Несколько худший рост исследуемого штамма наблюдали при культивировании на хлорсодержащих гербицидах Октапоне и Чисталане. Способность данного микроорганизма к их использованию, очевидно, является следствием присутствия в составе обоих гербицидов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). 2,4-D представляет собой - умеренно стойкое химическое вещество с периодом полураспада от 20 до 312 дней в зависимости от условий окружающей среды [Ordaz-Guillén et al., 2014]. Из-за слабой адсорбции и высокой растворимости в воде 2,4-Д легко вымывается с полей и часто обнаруживается в поверхностных и подземных водах, что представляет существенную экологическую проблему и опасность для здоровья [Gaultier et al., 2008; Kearns et al., 2014]. Наибольший показатель оптической плотности культуральной жидкости штамма DD4 при культивировании на Октапоне составил 0,60 ОЕ на 4 сут, на Чисталане - 0,49 ОЕ на 5 сут. В дальнейшем деструкция гербицидов проходила менее активно, возможно из-за накопления продуктов преобразования 2,4-Д. А содержащийся в препарате Чисталан дополнительный компонент Дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты), не смотря на общие с 2,4-Д черты в структуре молекул, мог оказывать негативное влияние на активность бактерий, что косвенно и подтверждается более низкой скоростью их роста.

Таким образом, на примере бактериального штамма DD4 показана возможность микробной деструкции фторсодержащих ПАВ и действующих веществ галогенсодержащих гербицидов Октапон, Дикамба, Флоракс. Полученные данные могут найти применение при разработке технологий ремедиации территорий с нарушенным экологическим статусом, образовавшихся при использовании фторсодержащих средств для тушения пожаров и нерегламентированном применении химических средств защиты растений.

Исследование выполнено в рамках Гос. Задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

Литература

1. Четвериков С.П., Шарипов Д.А., Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н. Разложение перфтороктансульфоната штаммом *Pseudomonas plecoglossicida 2.4-D* // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 5. С. 477–483.

2. Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новый штамм *Ensifer adhaerens M1* способен к трансформации перфторкарбоновых кислот // Микробиология. 2019. Т. 88. №1. С. 116–119.

3. Четвериков С.П., Четверикова Д.В, Кенджиева А.А, Бакаева М.Д. Использование гербицидов в качестве питательного субстрата бактериями – стимуляторами роста сельскохозяйственных культур // Естественные и технические науки. 2019. № 11. С. 108–111. DOI:10.25633/ETN.2019.11.18

4. Espana V et al.. Treatment technologies for aqueous perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA): A critical review with an emphasis on field testing // Environmental technology& innovation. 2015. V. 4. P. 168–181.

5. Gaultier J., Farenhorst A., Cathcart J., Goddard T. Degradation of [carboxyl-14C] 2,4-D and [ring-U-14C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. P. 217–227. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.003

6. Kearns J.P., Wellborn L.S., Summers R.S., Knappe D.R.U. 2,4-D adsorption to biochars: Effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison

with commercial activated carbon literature data // Water Research. 2014. V. 62. P. 20–28. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.023

7. Ordaz-Guillén Y., Galíndez-Mayer C.J., Ruiz-Ordaz N., et. al. Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014. V. 21. P. 8765–8773. https://doi.org/10.1007/s11356-014-2809-8

8. Quinones O, Snyder S.. Occurrence of perfluoroalkyl carboxylates and sulfonates in drinking water utilities and related waters from the United States // Environmental science and technology. 2009. V. 43. P. 9089−9095.

9. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. P. 23–32.

10. Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its fourth meeting, 4-8 May // UNEP/POPS/COP.4/38. Geneva: Stockholm Convention Secretariat, 2009. P. 66–69.

11. Tsuda S. Differential toxicity between perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) // Journal of toxicology sciences. 2016. V. 41. P. 27−36.

MICROBIAL DESTRUCTION OF SOME HALOGEN-CONTAINING SURFACTANTS AND HERBICIDES

D.A. Sharipov, S.P. Chetverikov

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, UFA, Russia, chelab007@yandex.ru

Annotation. The paper presents the results of microbial destruction of fluorine-containing surfactants and some halogenated herbicides using the example of the bacterial strain DD4. In the model system, the dynamics of growth of the DD4 bacterial strain was studied and it was shown that the culture actively accumulates biomass when using a fluorine-containing foaming agent of the AFFF type and active substances of herbicides Octapon, Dicamba, Florax as a source of carbon and energy. The data obtained can find application in the development of technologies for remediation of territories with a disturbed ecological status, formed by the use of fluorine-containing agents for extinguishing fires and the unregulated use of chemical plant protection products.

Key words: fluorinated foaming agents, halogen-containing herbicides, biodestruction

ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ СООБЩЕСТВ

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ ОБРАБОТКИ ПОЧВ

Г.Р. Ильбулова[1], И.Н. Семенова[1], Я.Т. Суюндуков[1], Р.Ф. Хасанова[1], М.Б. Суюндукова[1], Х.М. Сафин[2]

[1] ГАНУ «Институт стратегических исследований РБ» Сибайский филиал, Сибай, Россия, ilbulova@mail.ru

[2] Академия наук Республики Башкортостан, Уфа, Россия

Аннотация. Изучено соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов почв при различных системах обработки в условиях Зауралья Республики Башкортостан. Применение технологии No-till привело к повышению общей численности микроорганизмов, численности аммонификаторов и амилолитиков. На численность педотрофных и олиготрофных микроорганизмов тип обработки почв влияния не оказывал. При традиционной обработке наблюдалось снижение показателей минерализации, педотрофности и сукцессии почв.

Ключевые слова: технология No-till, Башкирское Зауралье, микробные сообщества, прямой посев

Важная роль в формировании почвенного плодородия принадлежит биологическому фактору и, прежде всего, деятельности почвенной микробиоты. Роль микроорганизмов в почвообразовании заключается в формировании почвенной структуры, в образовании гумуса и в других важных процессах, происходящих в почвах. Почвенные микроорганизмы в процессе жизнедеятельности выделяют различные физиологически активные соединения, способствуют переводу элементов в подвижную форму и наоборот.

Антропогенные нагрузки на агроландшафты отрицательно влияют на свойства почв, ухудшают их агрохимические и биологические показатели. Почвенная биота очень чувствительна к изменениям экологического состояния почв, поэтому она может использоваться в качестве индикатора изменений в почве [Дридигер и др., 2017]. Для снижения антропогенного воздействия большое распространение в настоящее время получает технология возделывания сельскохозяйственных культур без обработки почвы (No-till) [Казеев и др., 2018]. Имеются данные, что традиционная обработка почв с отвальной вспашкой является не только ресурсоемким процессом, но и приводит к деградации почв, нанося непоправимый вред почвенной микрофлоре, усиливая водную эрозию, дефляцию, дегумификацию, аридизацию. И, напротив, технологии, направленные на минимизацию обработки почвы, такие, как система No-Till (нулевая обработка), при которой механическое воздействие на почву практически не оказывается, наряду с экономией ресурсов способствуют сохранению ее плодородия и снижению негативного воздействия на агроландшафты [Zhang et al., 2014]. В настоящее время недостаточно данных по структуре эколого-трофических групп почвенной биоты чернозема обыкновенного при использовании нулевой обработки в условиях Башкирского Зауралья.

Цель исследования: изучить влияние системы No-Till на эколого-трофические группы микробных сообществ почв Зауралья Республики Башкортостан.

Исследование проводили в СПК «Красная Башкирия», находящемся на юго-востоке Республики Башкортостан на территории Абзелиловского района в центральной части Башкирского Зауралья на восточных склонах Южного Урала. В данном хозяйстве технология No-till используется уже на протяжении более 10 лет.

Почвенный покров представлен черноземом обыкновенным среднемощным среднегумусным тяжелосуглинистым. В почву, где применялась технология No-Till, в предпосевной период методом мелкодисперсного распыления вносился гербицид Торнадо 540 в дозе 1,5 л/га.

Отбор образцов почв производился в летний период 2020 г. в соответствии с ГОСТ 17.4.3.01-83 из слоев 0-10, 10-20 и 20-30 см. Схема опыта включала системы обработки почвы: технология No-till, или нулевая (яровая пшеница по люцерне, яровая пшеница по кукурузе); классическая, или традиционная (яровая пшеница по пшенице). В качестве контроля была отобрана проба почвы на целине (пастбище), где доминирующей является разнотравно-типчаково-ковыльная растительность.

Культивирование микроорганизмов проводили общепринятыми методами. Аммонифицирующие микроорганизмы выявляли методом подсчета колоний на плотной питательной среде на мясопептонном агаре (МПА); микроорганизмы (в том числе актиномицеты), использующие минеральные формы азота, изучали на крахмало-аммиачном агаре (КАА); микроорганизмы (нитрификаторы, олигонитрофилы), участвующие в минерализации гумусовых веществ, определяли на «голодном» агаре (ГА); педотрофные микроорганизмы обнаруживались на почвенном агаре (ПА). Общую численность бактерий определяли методом учета бактерий в почве при помощи люминесцентной микроскопии по Звягинцеву и Кожевину с окрашиванием проб акридиновым оранжевым.

Функциональную структуру комплекса почвенных микроорганизмов определяли по соотношению численности разных физиологических групп. Для анализа структуры сообщества вычисляли коэффициент минерализации как отношение численности микроорганизмов, выросших на крахмало-аммиачном агаре (КАА), к численности микроорганизмов, выросших на мясо-пептонном агаре (МПА) (КАА/МПА); коэффициент олиготрофности как отношение численности микроорганизмов, выросших на голодном агаре (ГА), к численности микроорганизмов, выросших на МПА (ГА/МПА); коэффициент педотрофности как отношение численности микроорганизмов, выросших на почвенном агаре (ПА), к численности микроорганизмов, выросших на МПА (ПА/МПА) и коэффициент сукцессии как отношение общего количества бактерий (М), учитываемых люминесцентным методом с использованием флюорохромного красителя акридина оранжевого, к численности бактерий, выросших на МПА (М/МПА) [Семенова и др., 2011].

Эколого-трофические группы микроорганизмов являются индикаторами экологического состояния любой почвенной экосистемы, при этом выделить по значимости какую-либо группу невозможно, так как все биохимические процессы взаимосвязаны.

В таблице 1 представлены количественные характеристики микроорганизмов различных эколого-трофических групп.

Исследования общей численности бактерий выявили их наибольшую численность, превышающую контрольные показатели в 1,7 раза, в почвах варианта опыта «яровая пшеница по кукурузе» при нулевой технологии. В то же время в почвах варианта «яровая пшеница по люцерне» также с No-Till и в почвах варианта «яровая пшеница по яровой пшенице» при классической технологии обработки общее количество микроорганизмов не превышало контрольный уровень.

Важным компонентом почвенной микробиоты являются микроорганизмы-аммонификаторы, использующие органические формы азота и участвующие в деструкции растительных остатков и отмерших корней растений. Применение системы No-till способствовала увеличению количества микроорганизмов-аммонификаторов по сравнению, как с классической обработкой, так и с целиной в 1,2-1,4 раза.

Таблица 1. Количество микроорганизмов различных эколого-трофических групп

Варианты опыта	Общее количество микроорганизмов, млн/г почвы	Микроорганизмы на МПА, млн клеток/г почвы	Микроорганизмы на КАА, млн клеток/г почвы	Микроорганизмы на ГА, млн клеток/г почвы	Микроорганизмы на ПА, млн клеток/г почвы
Система No-till					
Яровая пшеница по люцерне	651,11±24,3	28,17±1,64	236,67±41,25	4,67±1,20	220,67±1,76
Яровая пшеница по кукурузе	1602,22±73,4	35,00±1,4	106,00±4,16	35,33±3,33	155,33±1,55
Классическая технология					
Яровая пшеница по яровой пшенице	760,00±20,6	29,66±2,52	142,67±21,82	28,00±1,99	154,00±4,35
Целина (контроль)					
	965,44±16,04	25,17±1,05	191,33±10,97	5,50±1,61	205,67±43,52

Анализ численности микроорганизмов, выращенных на КАА и использующих для построения собственных клеток минеральные формы азота, показал, что максимальными показателями характеризуются почвы под яровой пшеницей по люцерне при No-Till, а минимальными - почвы под яровой пшеницей по кукурузе при той же технологии. Количество амилотических микроорганизмов в почвах при классической технологии обработки были немного ниже, чем на целине. Эта группа микроорганизмов относится к активным иммобилизаторам легкодоступного углерода [Чевердин и др., 2007].

Наибольшая численность олиготрофных микроорганизмов, выращенных на питательной среде «голодный агар», отмечается в почвах варианта «яровая пшеница по кукурузе» при технологии No-till, наименьшая - под яровой пшеницей по люцерне при той же обработке. Классическая технология обработки не способствовала уменьшению их количества.

В почве под яровой пшеницей по люцерне обработка технологией No-till способствовала значительному росту численности педотрофных микроорганизмов. В почвах при классической технологии она была ниже по сравнению с целинной почвой. Численность педотрофных микроорганизмов в почве под яровой пшеницей, идущей по кукурузе в варианте обработки технологией No-till оказалась выше по сравнению с классической технологией, однако различие не было статистически значимым.

В мировой науке в качестве индикаторов, отражающих уровень биологической активности и экофизиологическое состояние микробного сообщества, наиболее часто используются соотношения между различными микробиологическими параметрами, выраженные в виде коэффициентов минерализации, олиготрофности, педотрофности и сукцессии [Ананьева и др., 2009].

Коэффициент минерализации отражает степень участия микрофлоры в процессе трансформации органического вещества почвы [Турусов, Дронов, 2014] и указывает на интенсивность микробиологического поглощения минерального азота [Завьялова и др., 2020]. Минерализационные процессы органического вещества в данных исследованиях максимально выражены в почвах варианта «яровая пшеница по люцерне» при использовании нулевой технологии (таблица 2). Коэффициент минерализации

минимален в почвах варианта «яровая пшеница по кукурузе» при No-till и варианта «яровая пшеница по яровой пшенице» при классической технологии, где основная доля гетеротрофных микроорганизмов представлена олиготрофной группой с коэффициентом олиготрофности, равным соответственно 1,01 и 0,94, что свидетельствует о недостаточной обеспеченности легкодоступным органическим веществом [Безкоравайная и др., 2016].

Таблица 2. Показатели микробиологической активности

Варианты опыта	Коэффициенты			
	минерализации	олиготрофности	педотрофности	сукцессии
Система No-till				
Яровая пшеница по люцерне	8,40	0,17	7,83	23,12
Яровая пшеница по кукурузе	3,03	1,01	4,44	45,78
Классическая технология				
Яровая пшеница по яровой пшенице	4,81	0,94	5,19	25,62
Целина				
	7,60	0,22	8,17	38,38

Коэффициент педотрофности, характеризующий развитие в почве автохтонной микрофлоры или «микрофлоры рассеяния», способной довольствоваться незначительным количеством питательных веществ, наибольшими значениями отмечался в почвах целины. Считается, что чем выше данный коэффициент, тем более агроэкосистема приближена к естественным ценозам и обладает большей устойчивостью к негативным воздействиям со стороны различных антропогенных вмешательств [Завьялова и др., 2020]. Результаты исследования выявили, что почвы яровой пшеницы по люцерне при технологии No-till, способствовали формированию микробоценозов, приближенных по составу к целинным почвам.

Высокими значениями коффициента сукцессии характеризовались почвы варианта «яровая пшеница по кукурузе» при использовании нулевой технологии и почвы целины, что свидетельствует о преобладании в них популяций К-отбора и о протекании поздних стадий микробных сукцессий. В остальных исследуемых вариантах почв (яровая пшеница по яровой пшенице при классической технологии и яровая пшеница по люцерне при No-till) отмечаются его низкие значения, что указывает на увеличение доли быстрорастущих популяций r-отбора, характерных для начальных этапов сукцессии [Семенова и др., 2011].

Таким образом, проведенными исследованиями не выявлено ухудшения состава микробного ценоза в результате длительного применения технологии No-till в сравнении с традиционной технологией обработки почвы в условиях Зауралья Республики Башкортостан. Применение технологии No-till привело к повышению общей численности микроорганизмов, численности аммонификаторов и амилолитиков. Классическая технология обработки почвы не способствовала уменьшению количества олиготрофных микроорганизмов, а на численность педотрофных микроорганизмов не оказывал влияние тип обработки почв. Применение традиционных приемов обработки почв привело к уменьшению коэффициентов минерализации, педотрофности и сукцессии.

Работа подготовлена за счет финансового обеспечения выполнения государственного задания ГАНУ «Институт стратегических исследований Республики Башкортостан» на 2021 год (руководитель темы – Я.Т. Суюндуков).

Литература

Ананьева Н.Д., Сусьян Е.А., Рыжова И.М., Бочарникова Е.О., Стольникова Е.В. Углерод микробной биомассы и микробное продуцирование двуокиси углерода дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов и коренных ельников южной тайги (Костромская область) // Почвоведение. 2009. № 9. С. 1108–1116.

Безкоровайная И.Н., Евграфова С.Ю., Климченко А.В., Захарченко Л.П. Биомасса и потенциальная активность почвенной биоты криогенных лесных экосистем Средней Сибири // Лесоведение. №2. 2016. С. 127–134.

Дридигер В.К., Годунова Е.И., Кащаев Е.А. и др. Влияние технологии возделывания на водно-физические свойства чернозема обыкновенного и урожайность полевых культур в первой ротации полевого севооборота // Бюллетень Ставропольского научно-исследовательского института сельского хозяйства. 2017. № 9. С. 79–95.

Завьялова Н.Е., Широких И.Г., Ямалтдинова В.Р. Микробиологическое состояние дерново-подзолистой почвы Предуралья при длительном применении органических и минеральных удобрений // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 1. С. 151–159.

Семенова И.Н., Ильбулова Г.Р., Суюндуков Я.Т. Изучение эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов в зоне влияния горнорудного производства // Фундаментальные исследования. 2011. №11. С. 410–414.

Турусов В.И., Дронова Н.В. Влияние основной обработки и агрохимикатов на микробиологический состав почвы // Модернизация агротехнологий в адаптивно-ландшафтном земледелии Центрального Черноземья: материалы Всероссийской научно-практической конференции. Каменная Степь, 18-19 июня 2014. С. 141–144.

Чевердин Ю.И., Титова Т.В., Беспалов В.А., Сапрыкин С.В., Гармашова Л.В., Чевердин А. Ю., Взаимосвязь микробиологических параметров и физических свойств черноземов сегрегационных // Живые и биокосные системы. 2017. № 21; URL: http://www.jbks.ru/archive/issue-21/article-2

Казеев К.Ш., Мокриков Г.В., Акименко Ю.В., Мясникова М.А., Колесников С.И. Экологическая оценка применения технологии No-Till в Ростовской области. Южный федеральный университет: отв. ред. К. Ш. Казеев. Ростов-на-Дону, Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2018. 332 с.

Zhang H., Lal R., Zhao X. Opportunities and Challenges of Soil Carbon Sequestration by Conservation Agriculture in China // Advances in Agronomy, 2014, V. 124, pp. 1–36. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00001-2

FEATURES OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE SOIL MICROBIOTA IN VARIOUS SOIL TREATMENT SYSTEMS

G.R. Ilbulova[1], I.N. Semenova[1], Ya.T. Suyundukov[1], R.F. Khasanova[1], M.B. Suyundukova[1], H.M. Safin[2]

[1]Institute for Strategic Studies of the Republic of Bashkortostan Sibay branch, Sibay, Russia, ilbulova@mail.ru
[2]Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia

Annotation. The ratio of ecological and trophic groups of soil microorganisms under various treatment systems in the conditions of the Trans-Urals of the Republic of Bashkortostan is studied. The use of No-till technology has led to an increase in the total number of microorganisms, the number of ammonifiers and amylolytics. The type of soil treatment did not affect the number of pedotrophic and oligotrophic microorganisms. With traditional processing, there was a decrease in the indicators of mineralization, pedotrophy and succession of soils.

Keywords: No-till technology, Bashkir Trans-Urals, microbial communities, direct seeding

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ РИЗОСФЕРЫ *ELYTRIGIA REPENS*

Ю.А. Маркова[1], Л.А. Беловежец[2], И.С. Петрушин[1], М.С. Карепова[1], Л.Е. Макарова[1], А.А. Левчук[2], И.В. Злобин[3], Ю.В. Зайцева[3]

[1] Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия, juliam06@mail.ru

[2] Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия, lyu-sya@yandex.ru

[3] Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия, zjv9@mail.ru

Аннотация. Нефтедеструктор *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D выделен из ризосферной почвы пырея (*Elytrigia repens*), произрастающего на нефтезагрязненной территории в районе пос. Тыреть Иркутской области. С помощью генетических и биохимических методов анализа выявлены кетоадипатный, фенилацетатный и 2-гидроксипентадиеноатный пути деструкции ароматических соединений. Благодаря синтезу сурфактантов и ауксинов, *R. qingshengii* VKM Ac-2784D оказывал благоприятное воздействие на растения, выращиваемые в условиях нефтяного загрязнения.

Ключевые слова: *Rhodococcus qingshengii*, нефтедеструкция, сурфактанты, защита растений

Штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D выделен из ризосферной почвы пырея (*Elytrigia repens*), произрастающего на нефтезагрязненной территории в районе пос. Тыреть Иркутской области. Размер его генома составляет 6251765 п.н., GC-состав 62,5% [Petrushin et al., 2021]. Геном депонирован в NCBI GenBank https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP064920. Аннотировано 5775 генов, в т.ч. 5716 кодирующих последовательностей, 3 рРНК, 53 тРНК, 3 некодирующих РНК. С помощью филогенетического анализа 390 штаммов родококков, представленных полными геномами в NCBI GenBank уточнено таксономическое положение исследуемого штамма. Наиболее близкие 20 штаммов представлены в виде филогенетического дерева на рис. 1.

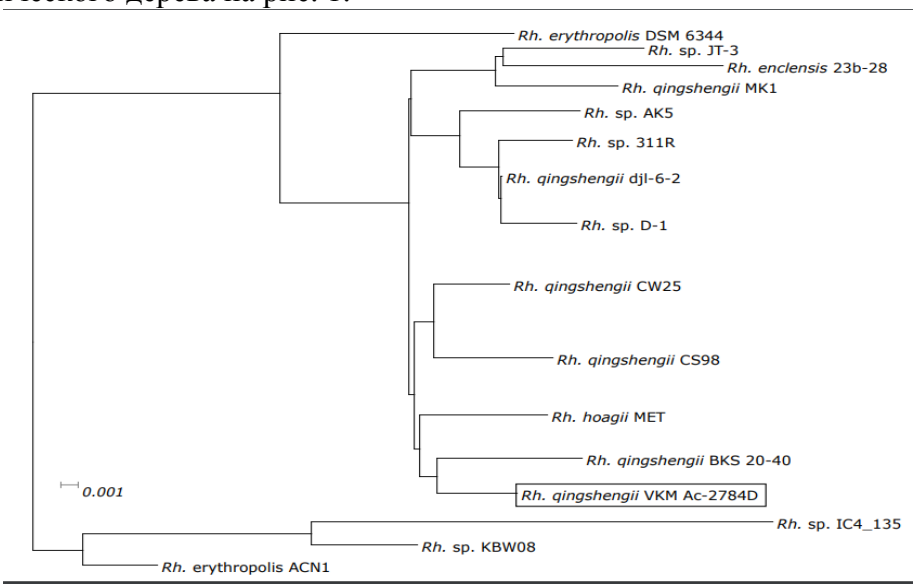


Рис. 1. Филогенетическое древо *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D построено с помощью PhyloPhlAn [Aniscar, 2020] по 400 ключевым генам методом максимального правдоподобия

Для выявления способности *R. qingshengii* VKM Ac-2784D разрушать углеводороды, бактерии выращивали на жидкой минеральной среде 8Е с добавлением 2 % нефти [Третьякова и др., 2015]. Установлено, что за два месяца культивирования ее количество снизилось на 40 % [Третьякова и др., 2015].

Для родококков описано 8 центральных путей деструкции ароматических соединений, каждый из которых кодируется своим набором генов [Yam, 2010]. При сравнении с аннотированным геномом *R. jostii* RHA1 нами обнаружены кластеры генов в *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, связанных с метаболическими путями разложения ПАУ: кетоадипатный, фенилацетатный и 2-гидроксипентадиеноатный. Функциональность кетоадипатного пути подтверждена экспериментально. Для этого *R. qingshengii* выращивали на среде 8Е, содержащей 10 % нефти в течение 8 недель. Еженедельно оценивали качественный и количественный состав интермедиатов с помощью ВЭЖХ. Обнаруженные соединения: салициловая кислота, пирокатехин, муконовая, коричная и протокатеховая кислоты свидетельствуют о наличии кетоадипатного пути деструкции ПАУ, основными интермедиатами которых служат катехол и протокатеховая кислота [Беловежец и др., 2017].

Изучение качественного состава биосурфактантов, синтезируемых *R. qingshengii* VKM Ac-2784D показало, что они являются сложными эфирами трегалозы и миколовых кислот (рис. 2). Содержание клеточно связанных биосурфактантов достигало 37 %, внеклеточных 1,523 г/л, что свидетельствует о высокой продукции данных соединений исследуемым штаммом родококка [Беловежец и др., 2021].

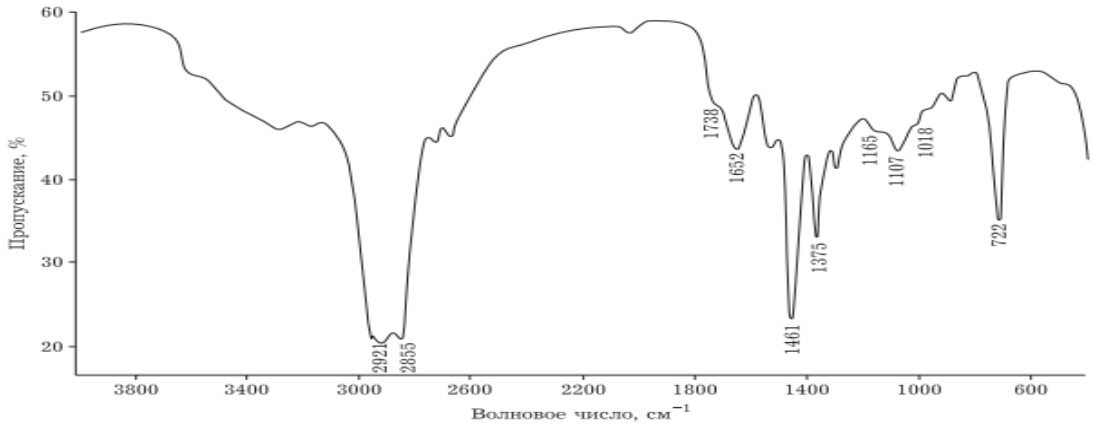


Рис. 2. ИК-спектр сурфактантов, продуцируемых *R. qingshengii* VKM Ac-2784D

R. qingshengii VKM Ac-2784D оказывал благоприятное воздействие на растения, выращиваемые в условиях нефтяного загрязнения. Корни таких растений отличались темным цветом, характерным для нефтяной пленки, и снижением количества боковых корешков. Предобработка семян взвесью микроорганизмов существенно улучшало развитие корневой системы (рис. 3). Мы предполагаем, что сурфактанты *R. qingshengii* VKM Ac-2784D удаляют нефтяную пленку с поверхности корней, оказывая благоприятное воздействие на растения. Дополнительным механизмом положительного воздействия *R. qingshengii* может быть синтез фитогормонов. С помощью метода Сальковского и биотестирования в среде культивирования родококка обнаружены ауксины [Tretyakova et al., 2019].

Важной особенностью некоторых штаммов родококков является наличие лактоназ, что делает их перспективными для борьбы с фитопатогенами, обладающими чувством кворума на основе ацилгомосерин-лактонов (АГЛ). В геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D была обнаружена последовательность, соответствующая гену QsdA и совпадающая с референсной последовательностью на 68 %. Лактоназная активность

штамма была подтверждена с помощью биосенсора *C. violaceum* CV026, вырабатывающего фиолетовый пигмент виолацеин в присутствии АГЛ и с использованием спектофотометрического метода.

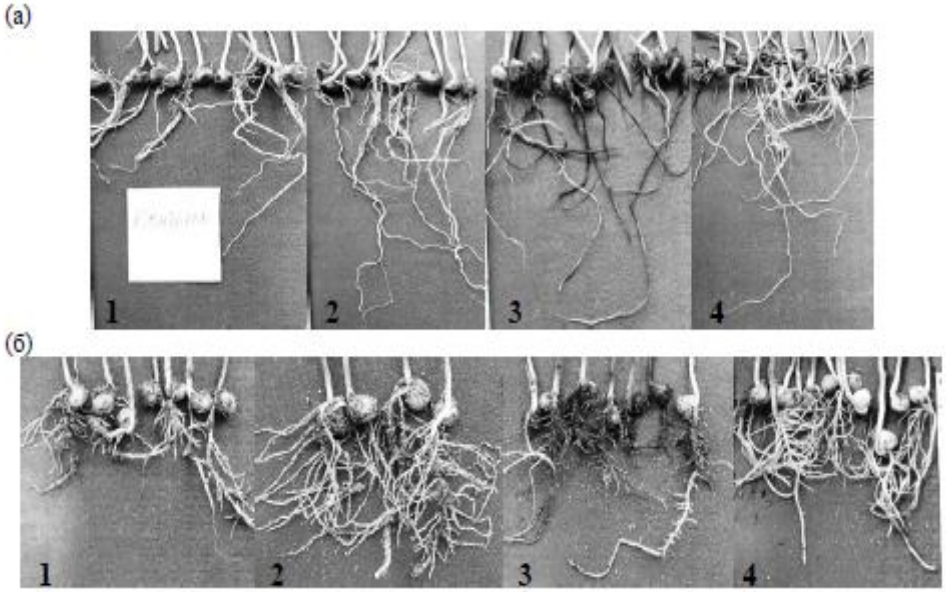


Рис. 3. Внешний вид корневой системы кукурузы (а) и гороха (б): 1. Контрольные растения; 2. Растения, из семян, обработанных суспензией *R. qingshengii* VKM Ac-2784D; 3. Растения, выросшие в присутствии 2% нефти; 4. Растения, из семян, обработанных суспензией *R. qingshengii* VKM Ac-2784D и выросшие в присутствии 2% нефти

Таким образом, штамм *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, выделенный нами из ризосферы *Elytrigia repens,* является не только перспективным деструктором углеводородов, включая ПАУ, но и способен защищать растения, выращиваемые в условиях нефтяного загрязнения.

Литература

Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семенова Н.В. Возможные пути деструкции ароматической составляющей нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов выделенными из эндо и ризосферы растений // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53, № 1. С. 76–81.

Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Ознобихина Л.П. Физико-химические свойства биосурфактантов, продуцируемых микроорганизмами-нефтедеструкторами // Химия в интересах устойчивого развития. 2021. №1. С. 21-26.

Третьякова М.С. Беловежец Л.А., Маркова Ю,А. Скрининг - бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти // Системы. Методы. Технологии. 2015. № 4. С.138-142.

Asnicar, F., Thomas, A.M., Beghini, F. et al. Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0. // Nat Commun. 2020. 11, 2500.

Petrushin I.S., Markova Y.A., Karepova M.S., Zaytseva Y.V., Belovezhets L.A. Complete Genome Sequence of *Rhodococcus qingshengii* Strain VKM Ac-2784D, Isolated from *Elytrigia repens* Rhizosphere // Microbiology Resource Announcements. 2021. Т. 10. №. 11.

Tretyakova M.S., Ivanova M.V., Belovezhets L.A., Markova Yu.A. Possible use of oil-degrading microorganisms for protection of plants growing under conditions of oil pollution // IOP Conference Series Earth and Environmental Science. 2019. 315. P. 1-6.

Yam K.C., van der Geize R., Eltis L.D. Catabolism of Aromatic Compounds and Steroids by Rhodococcus // In: Alvarez H. (eds) Biology of Rhodococcus. Microbiology Monographs, vol 16. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. P. 133-169.

GENETIC AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D, ISOLATED FROM RHIZOSPHERE OF ELYTRIGIA REPENS

Y.A. Markova[1], L.A. Belovezhets[2], I.S. Petrushin[1], M. S. Karepova[1], L.E. Makarova[1], A.A. Levchuk[2], I.V. Zlobin[3], Y.V. Zaytseva[3]

[1] Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, juliam06@mail.ru

[2] Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia, lyu-sya@yandex.ru

[3] Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia, zjv9@mail.ru

Annotation. Oil-degrading bacteria of specie *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D are isolated from rhizosphere of couch grass (*Elytrigia repens*), which grow at oil-polluted site near urban-type settlement Tyret (Irkutsk Region). We discovered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) catabolic pathways (ketoadipate, phenylacetic acid and 2-hydroxypentandienoate) of these bacteria using biochemical and bioinformatics methods. *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D can synthesize auxins and surfactants, which help to destruct some pollutants, reduce the negative impact of soil pollution and phytopathogens and synthesize the bioactive compounds.

Keywords: *Rhodococcus qingshengii*, oil degradation, biosurfactants, plant protection

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЗОСПИРИЛЛ В КОМПЛЕКСНОЙ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

А.Ю. Муратова, А.Д. Бондаренкова, Е.В. Дубровская, Н.Н. Позднякова, Л.В. Панченко, С.Н. Голубев, И.Ю. Сунгурцева, О.В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия, muratova_a@ibppm.ru

Аннотация. Гибкий метаболизм и высокая адаптивная способность бактерий рода *Azospirillum* позволили обнаружить у представителя вида *A. brasilense* деструктивную активность по отношению к нефтяным углеводородам и определить основные параметры ее проявления. Представлены результаты почвенных экспериментов по отработке приемов ремедиации нефтезагрязненной почвы с использованием штамма азоспирилл в свободном и иммобилизованном состоянии, в сочетании с растениями и грибами. Показана эффективность комплексной ремедиации с участием трех организмов.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, нефтяные углеводороды, биочар, растения, высшие грибы, биоремедиация.

Бактерии рода *Azospirillum* – природные ассоцианты многочисленных диких и культивируемых трав, злаков, продовольственных культур, произрастающих на почвах различных регионов по всему миру. Это свободноживущие грамотрицательные, подвижные азотфиксаторы, которые проявляют свойства, благоприятствующие росту растений. Азоспириллы обладают гибким метаболизмом, что позволяет им приспосабливаться и выживать как в конкурентной среде ризосферы, так и в различных климатических условиях – от тропических до арктических [Eckford et al., 2002; Reis and Baldani, 2015]. В неблагоприятных условиях, таких как высыхание и ограничение питательных веществ, азоспириллы могут превращаться в увеличенные цистоподобные формы [Мулюкин и др., 2009; RodrÃguez-Salazar et al., 2009; Ngumbi and Klopper, 2016]. Вероятно, указанные выше свойства позволяют азоспириллам выживать и в условиях антропогенного загрязнения окружающей среды, о чем свидетельствует ряд опубликованных данных о присутствии азоспирилл в нефтезагрязненных почвах [Eckford et al., 2002; Ojeda-Morales et al., 2016].

Проблема загрязнения природных и хозяйственных объектов нефтяными углеводородами продолжает оставаться актуальной. Среди многочисленных разработанных методов очистки почвы от углеводородов приоритетное место занимают биотехнологии – использование жизнедеятельности микроорганизмов, грибов и растений для восстановления нарушенных загрязнением природных объектов. В этом аспекте хорошо известные свойства азоспирилл как стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR) и выявленные, но значительно менее изученные их свойства как деструкторов углеводородов наряду с широкими адаптивными возможностями, делают представителей рода *Azospirillum* перспективными кандидатами как для самостоятельного использования, так и в сочетании с другими организмами в технологиях био- и фиторемедиации нефтезагрязненных почв.

Представленная работа посвящена изучению деструктивной активности штамма *Azospirillum brasilense* SR80 (IBPPM 24, Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН) по отношению к нефтяным углеводородам и апробации приемов его использования для ремедиации нефтезагрязненных почв как в качестве самостоятельного интродуцента, так и в сочетании с растениями и высшими грибами.

Использование метагеномного анализа для изучения таксономического разнообразия микроорганизмов ризосферной и неризосферной, нефтезагрязненной и незагрязненной почв показало, что как нефтяные углеводороды, так и присутствие растений оказывало стимулирующий эффект на разнообразие и обогащенность

микробных сообществ представителями класса *Alphaproteobacteria* и, в частности, представителями семейства *Rhodospirillaceae*, к которому относятся азоспириллы, что подтверждало обоснованность направления исследований

Нефтеокисляющая активность штамма *A. brasilense* SR80 была исследована ранее [Муратова и др., 2005; Бондаренкова и др., 2010]. Согласно полученным данным, этот штамм способен разрушать нефть в концентрации до 10 г/л, подвергая биодеградации практически все нефтяные фракции: парафины и нафтены, моно-, би- и полициклические ароматические углеводороды (МБЦА и ПАУ) и спирто-бензольные смолы (СБС). Общая убыль сырой нефти в среде после культивирования штамма составляла от 40 до 54%. Было установлено, что исследуемый микроорганизм не был способен к использованию сырой нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. С добавлением в качестве ко-субстрата карбоновых кислот – мажорных компонентов корневых экссудатов растений – янтарной, яблочной или щавелевой – сырая нефть подвергалась микробной деградации одинаково успешно, тогда как при использовании уксусной и фталевой кислот деструкции нефти не происходило. Установлено влияние температуры на деградацию нефти штаммом *A. brasilense* SR80: максимальная (40%) наблюдалась при 37°С, а минимальная (16-17%) – при 22 и 45°С соответственно.

Для отработки приемов использования азоспириллы в ремедиации нефтезагрязненной почвы исследовали влияние иммобилизации бактериальных клеток на биочаре, а также взаимодействия азоспириллы с растениями и грибами. Известно, что иммобилизация микроорганизмов на различных носителях может повышать их устойчивость к неблагоприятным воздействиям и одновременно служит основой для разработки метода биорекультивации. Есть данные, показывающие усиление деградации нефтяных углеводородов иммобилизованными микроорганизмами по сравнению со свободными клетками [Xua and Lu, 2010; Nunal et al., 2014]. В частности, активно ведутся работы по использованию для иммобилизации углеводородокисляющих микроорганизмов биочара – продукта пиролиза различных растительных остатков [Wang et al., 2018]. Для иммобилизации азоспириллы в нашей работе мы использовали 2-3 мм фракции двух видов биочара – коммерческого древесного и полученного в лабораторных условиях путем пиролиза соломы сорго веничного. Эксперименты показали, что максимальная сорбция клеток *A. brasilense* SR80 на носителе наблюдалась через 24 ч инкубации в питательной среде с древесным биочаром на качалке, достигая 53%. Численность иммобилизованных клеток микроорганизма составляла $9{,}3\times10^9$ КОЕ на 1 г сухого древесного биочара и $8{,}3\times10^9$ КОЕ на 1 г сухого биочара сорго. Иммобилизованные таким образом микроорганизмы использовали в дальнейших экспериментах. Сравнение деструктивной активности иммобилизованных и не иммобилизованных клеток *A. brasilense* SR80 по отношению к нефти выявило различный эффект от иммобилизации в зависимости от температуры культивирования в модельной системе (жидкой среде). При температуре 22 и 30°С иммобилизация клеток увеличивала деструкцию нефти на 13 и 3% соответственно, но при дальнейшем повышении температуры (38 и 45°С) эффект менялся на противоположный – иммобилизация клеток снижала микробную деградацию на 18 и 2% соответственно. Полученные данные позволяют прогнозировать использование как свободных, так и иммобилизованных клеток *A. brasilense* SR80 для биодеградации нефти в различных условиях.

Учитывая, что штамм *A. brasilense* SR80 обладает стимулирующим рост растений потенциалом, который связан с его способностью к азотфиксации и синтезу фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [Муратова и др., 2005], использование этого микроорганизма-деструктора может быть перспективным не

только как самостоятельного агента, но и в сочетании с растениями и (или) высшими грибами в вариантах биоремедиации.

В лабораторных вегетационных опытах было показано, что бактеризация сорго веничного (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) и ржи озимой (*Secale cereale* L.) стимулировала развитие проростков растений, увеличивая прирост побегов на 16 и 20%, а корней – на 32 и 70% соответственно. Кроме того, обработка азоспириллой оказывала стимулирующее действие на фотосинтетический аппарат растений и приводила к значительному увеличению содержания связанных форм минерального азота в ризосферной почве, что способствовало увеличению эффективности ее очистки от нефтяного загрязнения по сравнению с не бактеризованными растениями [Муратова и др., 2010]. Принимая во внимание известные положительные свойства биочара как структуратора почвы, способствующего росту растений, был исследован эффект применения иммобилизованного на биочаре *A. brasilense* SR80 с растениями и без них на очистку нефтезагрязненной почвы. Анализ результатов такого исследования показал, что выращивание растений сорго веничного и люцерны в нефтезагрязненной почве, предварительно обработанной иммобилизованной на биочаре азоспириллой (в концентрации 1% от сух. веса почвы), увеличивало деградацию загрязнителя на 5% по сравнению с использованием только иммобилизованных на биочаре бактерий или только растений (по 21% за 9 недель культивирования). Мониторинг микроорганизма-интродуцента с применением штаммо-специфичных праймеров показал, что на численность *A. brasilense* SR80 в почве стимулирующее влияние оказывал загрязнитель (сырая нефть), а также присутствие растения. На протяжении двухмесячного вегетационного эксперимента штамм *A. brasilense* SR80 демонстрировал высокую приживаемость как в чистой, так и в нефтезагрязненной почве. Таким образом была показана перспективность использования иммобилизованных бактерий *A. brasilense* SR80 для очистки почвы от нефтяного загрязнения с использованием растений.

Наряду с бактериальными и растительно-бактериальными взаимодействиями неотъемлемым компонентом почвенной экосистемы являются взаимодействия бактерий и грибов, имеющие, возможно, решающее значение не только для утилизации природных субстратов, но и деградации разного типа поллютантов [Bhatt et al., 2002]. В последние годы внимание к различным аспектам бактериально-грибных взаимодействий чрезвычайно возросло [De Boer, 2017], однако исследования, посвященные изучению не антагонизма, а кооперации бактерий и грибов для ремедиации загрязненной почвы крайне ограничены. В этой связи мы предприняли попытки создания бактериально-грибного консорциума с использованием бактерий *A. brasilense* SR80, с целью его применения в очистке среды от углеводородного загрязнения. Для первичной оценки характера взаимодействия в качестве грибного партнера были испытаны базидиомицеты (*Pleurotus ostreatus, Schizophyllum commune* и *Trametes versicolor*) и аскомицеты (*Fusarium oxysporum, Lecanicillium aphanocladii, Talaromyces sayulitensis, Trihoderma viride* и *Trihoderma harzianum*). В течение 7 сут грибы выращивали на агаризованной среде LB [Maniatis et al., 1982], предварительно засеянной *A. brasilense* SR80, после чего измеряли радиальный рост мицелия в присутствии и отсутствии нефти. Установлено, что на твердой среде без загрязнителя азоспирилла стимулировала рост *T. sayulitensis*, ингибировала рост *F. oxysporum* и исследованных базидиомицетов и не оказывала заметного влияния на рост *L. aphanocladii, T. viride* и *T. harzianum*. Аскомицеты *T. sayulitensis* и *T. virida,* в свою очередь, подавляли рост азоспириллы на среде без загрязнителя. В присутствии нефти наблюдался стимулирующий эффект бактерии на рост базидиомицетов *P. ostreatus* и *T. versicolor* и аскомицетов *T. viride* и *T. harzianum.* На основании полученных данных была сконструирована бинарная ассоциация *A. brasilense* SR80 – *Pleurotus ostreatus* для

испытания ее эффективности в деградации углеводородного загрязнения. При культивировании созданной ассоциации в жидкой питательной среде с добавлением углеводорода и без него было показано, что бактерия оказывала положительный эффект на рост гриба, увеличивая прирост его биомассы на 12 и на 98% в чистой среде и в среде с добавлением смеси ПАУ соответственно. При внесении в нефтезагрязненную почву иммобилизованного на биочаре *A. brasilense* SR80 и выращенного на ячменной соломе *P. ostreatus* (по 1% от сух. веса почвы) через 9 нед. культивирования очистка почвы составила 28% от исходной концентрации (15 г/кг), что заметно превышало эффективность использования только иммобилизованного микроорганизма (21%), но ухудшало показатели микоремедиации с использованием одного гриба (32%).

Использование бактериального (иммобилизованного на биочаре *A. brasilense* SR80) и грибного (иммобилизованного на ячменной соломе *P. ostreatus*) инокулянтов вместе с растениями сорго веничного (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) и люцерны желтой (*Medicago falcata* L.) обеспечили наиболее эффективное удаление нефтепродуктов из почвы за 9 недель – на 42 и 36% соответственно при их предварительном и одновременном с растениями внесении. Наблюдаемый эффект максимальной очистки почвы от нефтяного загрязнения при использовании комплексной ремедиации с участием отобранных организмов может объясняться синергетическим взаимодействием растений, грибов и бактерий, направленным на детоксикацию окружающей среды. Комплексное исследование ряда физиологических и биохимических показателей участвующих в этом эксперименте организмов (оценка роста, ферментативной активности, содержания фотосинтетических пигментов) доказывало синергетический характер их взаимодействий. Безусловно, в наблюдаемой деградации нефти наряду с интродуцированными организмами участвовала и аборигенная микрофлора и корневые экссудаты растений, содержащие существенный пул окислительных и антиоксидантных ферментов, а также имели место процессы сорбции-десорбции поллютанта на вносимых сорбентах (биочар и солома). Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют об эффективности использованного подхода, который, с одной стороны, моделирует сложные межорганизменные взаимодействия, а с другой, позволяет изучать и направлять их.

Работа выполнена при поддержке гранта № 18-29-05062 Российского фонда фундаментальных исследований (в части, касающейся исследований азоспириллы, деградации нефти, растительно-бактериальных взаимодействий и биоремедиации) и по теме № ГР 121031700141-7 (в части, касающейся исследования бинарных бактериально-грибных культур).

Литература

Bhatt M., Cajthaml T., Šašek V. Mycoremediation of PAH-contaminated soil // Folia Microbiologica. 2002. V. 47. P. 255–258.

De Boer W. Upscaling of fungal–bacterial interactions: from the lab to the field // Current Opinion in Microbiology. 2017. V. 37. P. 35–41.

Eckford R., Cook F.D., Saul D., Aislabie J., Foght J. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated antarctic soils // Applied and Environmental Microbiology. 2002. V. 68. No. 10. P. 5181–5185.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 545 p.

Ngumbi E., Kloepper J. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects // Applied Soil Ecology. 2016. V. 105. P. 109–125.

Ojeda-Morales M.E., Domínguez-Domínguez M., Hernández-Rivera M.A., Zavala-Cruz J. Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites // Water Air and Soil Pollution. 2015. V. 226. 401.

Reis V., Baldani V.L.D. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria // Handbook for *Azospirillum*. – Basel: Springer, 2015. V. 10. P. 978-983.

Rodríguez-Salazar J., Suárez R., Caballero-Mellado J., Iturriaga G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants // FEMS Microbiology Letters. 2009. V. 296. No. 1. P. 52–59.

Wang J., Xia K., Waigi M.G., Gao Y., Odinga E.S., Ling W., Liu J. Application of biochar to soils may result in plant contamination and human cancer risk due to exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons // Environment International. 2018. V. 121. P. 169–177.

Бондаренкова А.Д., Муратова А.Ю., Турковская О.В. Влияние нефти на ассоциативную ризобактерию *Azospirillum brasilense* // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2009. № 9. С. 5–10.

Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78, № 1. С. 42–51.

Муратова А.Ю., Бондаренкова А.Д., Панченко Л.В., Турковская О.В. Использование комплексной фиторемедиации для очистки почвы, загрязненной нефтешламом // Биотехнология. 2010. № 1. С. 77–84.

Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк Л.П., Макаров О.Е., Позднякова Л.И., Игнатов В.В. Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum*// Микробиология. 2005. Т.74, № 2. С. 248–254.

USE OF *AZOSPIRILLUM* FOR INTEGRATED REMEDIATION OF OIL-CONTAMINATED SOIL

A.Yu. Muratova, A.D. Bondarenkova, E.V. Dubrovskaya, N.N. Pozdnyakova, L.V. Panchenko, S.N. Golubev, I.Yu. Sungurtseva, O.V. Turkovskaya

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia, muratova_a@ibppm.ru

Annotation. Flexible metabolism and high adaptability of bacteria from the *Azospirillum* genus made it possible to detect degradative activity towards petroleum hydrocarbons and to determine the main parameters of its manifestation in a representative of the *A. brasilense* species. The results of soil experiments on the development of remediation approaches to oil-contaminated soil with using both of free and immobilized cells of azospirillum strain in combination with plants and fungi are presented. The efficiency of integrated remediation with the application of three organisms has been shown.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, petroleum hydrocarbons, biochar, plants, fungi, bioremediation

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПЕРОКСИДАЗЫ АСКОМИЦЕТОВ: КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И УЧАСТИЕ В КАТАБОЛИЗМЕ ПОЛЛЮТАНТОВ

Н.Н. Позднякова, С.А. Баландина, О.В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия, pozdnyakova_n@ibppm.ru

Аннотация. Выявлена способность аскомицетов *Geotrichum candidum, Cladosporium herbarum, Talaromyces sayulitensis, Fusarium oxysporum* и *Lecanicillium aphanocladii* продуцировать пероксидазы в присутствии поллютантов. Выделены и частично охарактеризованы пероксидазы из *F. oxysporum* и *L. aphanocladii*. Показана способность этих ферментов окислять фенольные и нефенольные ароматические соединения, включая полициклические ароматические углеводороды.

Ключевые слова: аскомицеты, пероксидазы, деградация, поллютанты

Аскомицеты, таксономически являющиеся одним из крупнейших отделов подцарства высших грибов, играют важную роль в наземных экосистемах. Они способны заселять различные экологические ниши, характеризуются высокой адаптивностью и широким спектром типов взаимоотношений с окружающими организмами, и вносят существенный вклад в биологические циклы углерода и азота [Мюллер, Леффлер 1995]. Благодаря внеклеточной неспецифической ферментной системе, эти грибы способны вовлекать в свой метаболизм, кроме природных соединений, широкий спектр поллютантов, с которыми они неизбежно сталкиваются в условиях глобального загрязнения окружающей среды. Аскомицеты участвуют в деградации и детоксикации широкого ряда соединений, в том числе недоступных или труднодоступных для бактерий, что вносит важный вклад в процессы самоочищения природных экосистем от опасных поллютантов.

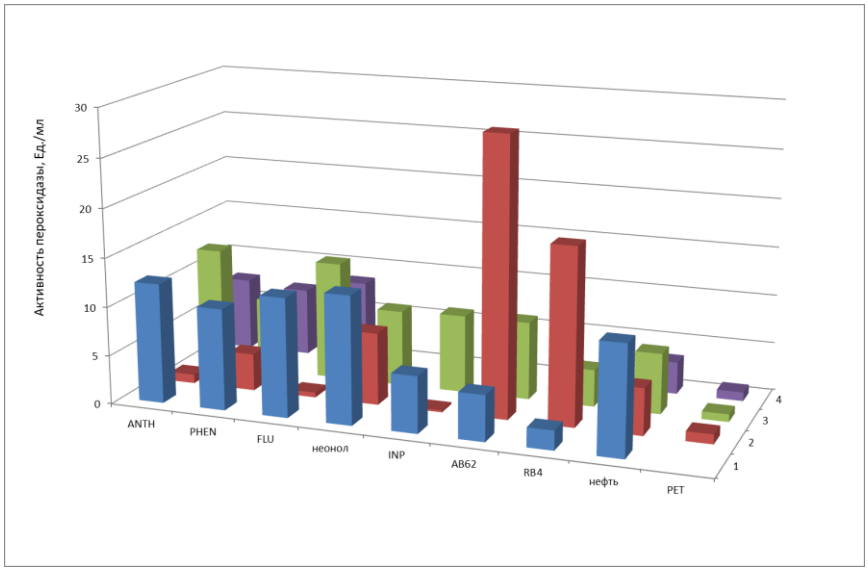
По данным ряда исследователей внеклеточная ферментная система аскомицетов может быть подобна лигнинолитической системе базидиомицетов, которая катализирует ключевые этапы деградации широкого спектра природных и неприродных ароматических соединений [Kadri et al., 2017]. У ряда аскомицетов обнаружены лакказы, Mn-пероксидазы и лигнин пероксидазы, входящие в состав этого комплекса. Лакказы отдельных представителей аскомицетов выделены и частично охарактеризованы. У *Fusarium oxysporum* идентифицированы гены, кодирующие лакказу [Canero, Roncero 2008]. Сведений о продукции аскомицетами лигнинолитических пероксидаз немного. Так, например, продукция лигнин пероксидазы и Mn-пероксидазы обнаружена у *Coniochaerta ligniaria* при росте на лигноцеллюлозных субстратах [Lopez et al., 2007]. *Fusarium solani* продуцировал лигнин пероксидазу и Mn-пероксидазу в ответ на окислительный стресс [Obruca et al., 2012] или в условиях лимита по углероду [Saparrat et al., 2000]. При культивировании еще двух штаммов *Fusarium* на растительных остатках выявлялась продукция Mn-пероксидазы [Huy et al., 2016].

Таким образом, до настоящего времени недостаточно сведений о внеклеточных пероксидазах аскомицетов. Основная часть исследователей только констатирует наличие этих ферментов по реакциям окисления тестовых субстратов. Вместе с тем пероксидазы могут вносить значительный вклад не только в начальную атаку молекул ароматических соединений, таких как ПАУ, но и катализировать более поздние этапы, приводящие в конечном итоге к их минерализации.

Целями представленного исследования были выявление активности пероксидаз в процессе деградации поллютантов аскомицетами, а также характеристика пероксидаз из отдельных представителей аскомицетов.

В работе использованы следующие штаммы из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WFCC975, WDCM1021): *Trichoderma viride* (IBPPM 668), *Trichoderma harzianum* (IBPPM 667) [1], *Geotrichum candidum* (IBPPM 663), *Cladosporium herbarum* (IBPPM 662)[2], *Talaromyces sayulitensis* (IBPPM 664)[3], *Fusarium oxysporum* (IBPPM 543) и *Lecanicillium aphanocladii* (IBPPM 542). Ранее нами было показано, что эти грибы проявляют деструктивную активность по отношению к широкому ряду поллютантов [Pozdnyakova et al., 2019; Турковская и др., 2019]. Грибы культивировали на богатой среде для базидиомицетов [Bezalel et al., 1997] при 24-26ºС и 130 об/мин в присутствии следующих поллютантов: антрацен, фенантрен, флуорен или антрахиноновые красители (Acid Blue 62, Reactive Blue 4) – и 50 мг/л; неонол или изононилфенол – 200 мг/л; нефть – 5 г/л; полиэтилентерефталат – 10 г/л. Активность пероксидаз определяли как описано ранее [Martinez et al., 1996].

Нами было обнаружено, что из 7 исследованных видов грибов только 4 продуцировали пероксидазы в процессе деградации поллютантов (рис. 1), при этом наибольшая активность была выявлена у *F. oxysporum* и *L. aphanocladii*. Представители родов *Trichoderma* и *Geotrichum* внеклеточные пероксидазы не продуцировали, несмотря на выявленную у них деградативную активность [Pozdnyakova et al., 2019; Турковская и др., 2019].



1 – *C. herbarum*
2 – *F. oxysporum*
3 – *L. aphanocladii*
4 – *T. sayulitensis*

Рис. 1. Продукция пероксидаз в присутствии поллютантов: ANTH – антрацен, PHEN – фенантрен, FLU – флуорен, неонол, INP – изононилфенол, AB62 – Acid Blue 62, RB 4 – Reactive Blue 4, нефть, PET – полиэтиленфталат

Для получения и исследования пероксидаз были выбраны *F. oxysporum* и *L. aphanocladii.* Активность ферментов, выявленная в присутствии поллютантов была невысокой, недостаточной для их выделения и очистки, поэтому на необходимо было подобрать условия культивирования грибов для максимальной активности пероксидазы. Одним из приемов увеличения продукции пероксидаз оказалось

[1] Авторы благодарят д.б.н., профессора В.А. Терехова (Институт проблем экологии и эволюции РАН) за предоставленные штаммы грибов *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma viride*.
[2] Авторы благодарят профессора Д.К. Варезе (Микотека Туринского университета, Турин, Италия) за предоставленные штаммы *Geotrichum candidum* и *Cladosporium herbarum*.
[3] Авторы благодарят д.б.н. А.В. Александрову (Кафедра микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова) за идентификацию гриба.

повышение температуры. Было обнаружено, что при культивировании грибов при 30ºС активность этих ферментов увеличивалась в 2-4 раза.

Для получения пероксидазы *F. oxysporum* нами была выбрана среда, предложенная ранее Ahuactzin-Pérez с соавт. [2016]. Электрофорез в неденатурирующих условиях показал присутствие двух форм пероксидазы, одна из которых доминировала в течение всего времени культивирования. Обнаружено, что в этих условиях происходило значительное смещение pH среды от 6,0 в начале эксперимента, до 8,0-8,2 через 21 сут. Мы предположили, что фермент может быть более стабильным при щелочных значениях pH. Грубый ферментный препарат диализовали против 50 мМ трис-HCl со значениями pH 6,0, 7,0 и 8,0. Показано, что при pH 8,0 пероксидаза сохраняла до 100% активности при хранении при +4°С в течение, как минимум, 20 сут. На основании этих данных все этапы очистки пероксидазы проводили при pH 8,0, что позволило нам избежать значительных потерь фермента.

Для очистки пероксидазы нами были использованы фракционирование сульфатом аммония и три типа хроматографии: ионообменная, гель-фильтрация и гидрофобная. Молекулярная масса пероксидазы, определенная методом гель-фильтрации, составляла 86 кДа.

Показано, что фермент проявлял каталитическую активность только в присутствии H_2O_2 и окислял фенольные (пирокатехин, гваякол, 2,6-диметоксифенол) и нефенольные (АБТС, 2,7-диаминофлуорен, *о*-дианизидин) субстраты. Определены оптимумы pH окисления этих субстратов (рис. 2). Обнаружено, что за исключением гваякола, оптимумы pH находятся в кислой области, что является характерным для грибных пероксидаз. Наименьшее значение pH – 2,5 было показано для окисления АБТС. Были определены основные каталитические константы для окисления H_2O_2, фенольного (2,6-диметоксифенол) и нефенольного (АБТС) субстратов.

А Б

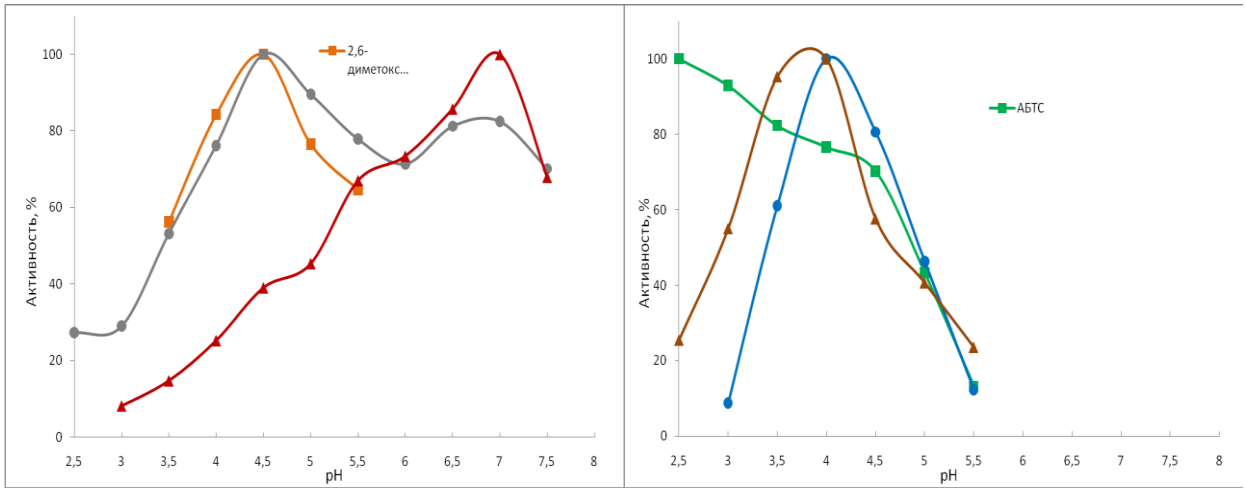


Рис. 2. Оптимумы pH для окисления фенольных (А: ■ – 2,6-диметоксифенол, ● – пирокатехин, ▲ – гваякол) и нефенольных (Б: ■ – АБТС , ● – 2,7-диаминофлуорен, ▲ – о-дианизидин)

Наибольшим сродством фермент обладал к АБТС, соответственно величина K_M для этого субстрата была самой низкой. Тогда как число оборотов было наибольшим для H_2O_2. Пероксидаза окисляла как нативные ПАУ, так и продукт окисления флуорена – 9-флуоренон. Наиболее доступными для пероксидазного окисления оказались флуорантен и флуорен. Кроме флуорена, для пероксидазы *Fusarium* был доступен еще один трехкольцевой ПАУ – фенантрен, тогда как его аналог, антрацен, почти не

окислялся. Это может быть связано с невысокой растворимостью антрацена. Использование ВЭЖХ позволило идентифицировать продукты окисления фенантрена – 9,10-фенантренхинон и флуорена – 9-флуоренон. 9-Флуоренон был общим продуктом деградации флуорена грибом и пероксидазного окисления этого ПАУ.

Для получения грубого ферментного препарата пероксидазы *L. aphanocladii* культивировали на этой среде до достижения максимума ферментативной активности. Фермент осаждали $(NH_4)_2SO_4$ и подвергали ионообменной хроматографии на колонке DEAE-Toyopearl. Частично очищенная пероксидаза проявляла каталитическую активность только в присутствии H_2O_2 и окисляла фенольный (2,6-диметоксифенол) и нефенольный (АБТС) субстраты при pH 4,0. При этом активность по отношению к 2,6-диметоксифенолу превышала таковую к АБТС в 1,5 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами была обнаружена продукция внеклеточных пероксидаз в присутствии поллютантов у представителей родов *Cladosporium, Talaromyces, Fusarium* и *Lecanicillium.* Пероксидазы из *F. oxysporum* и *L. aphanocladii* были выделены и частично охарактеризованы. Показана способность пероксидазы *F. oxysporum* окислять не только нативные ПАУ, но их метаболиты, что позволяет предположить участие этого фермента в их деградации.

Работа выполнена в рамках темы фундаментальных исследований ИБФРМ РАН № № 121031700141-7 (2021-2023 гг.) и при поддержке грантом РФФИ № 18-29-05062.

Литература

Ahuactzin-Pérez M., Tlecuitl-Beristaine S., García-Dávilae J., González-Pérezf M., Gutiérrez-Ruíz M., Sáncheza C. Degradation of di(2-ethylhexyl)phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling pathway based on quantum chemical modeling // Science of The Total Environment. 2016. Vol. 566-567. P. 1186-1193.

Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 2495-2501.

Cañero D., Roncero M. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum* // The American Phytopathological Society. 2008. Vol. 98. P. 509-518.

Huy N., Tien N. Huyen L., Quang H., Tung T., Luong, N., Park S.-M. Screening and production of manganese peroxidase from *Fusarium* sp. on residue materials // Mycobiology. 2017. Vol. 45. P. 52-56.

Kadri T., Rouissi T., Brar S.K., Cledon M., Sarma S., Verma M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review // J. Environ. Sci. 2017. Vol. 51. P. 52-74.

Lopez M., Vargas-Garcia M., Suarez-Estrella F., Nichols N., Dien B., Moreno J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaete lignaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment // Enzyme Microbial Technol. 2007. Vol. 40. P. 794-800.

Martinez M., Ruiz-Duenas F., Guillen F., Martinez A. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii* // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 237. P. 424-432.

Obruca S., Marova I., Matouskova P., Haronikova A., Lichnova A. Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552 // Folia Microbiol. 2012. Vol. 57. P. 221-227.

Pozdnyakova N., Varese G.C., Prigione V., Dubrovskaya E., Balandina S., Turkovskaya O. Degradative properties of two newly isolated strains of the ascomycetes *Fusarium*

oxysporum and *Lecanicillium aphanocladii* // International Microbiology. 2019. Vol. 22. P. 103-110.

Saparrat M., Martinez M., Tournier H., Cabello M., Arambarri A. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 16. P. 799-803.

Мюллер Э., Леффлер В. Микология // М.: Мир. – 1995. – 344 С.

Турковская О., Дубровская Е., Гринев В., Баландина С., Позднякова Н. Деструктивная активность и продукция внеклеточных пероксидаз у микромицетов с различной экологической стратегией // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. С. 65-75.

EXTRACELLULAR PEROXIDASES OF ASCOMYCETES: CATALYTIC PROPERTIES AND INVOLVEMENT IN CATABOLISM OF POLLUTANTS

N.N. Pozdnyakova, S.A. Balandina, O.V. Turkovskaya

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia, pozdnyakova_n@ibppm.ru

Annotation. The ability of ascomycetes *Geotrichum candidum*, *Cladosporium herbarum*, *Talaromyces sayulitensis*, *Fusarium oxysporum*, and *Lecanicillium aphanocladii* to produce peroxidases in the presence of pollutants was revealed. Peroxidases from *F. oxysporum* and *L. aphanocladii* have been isolated and partially characterized. The ability of these enzymes to oxidize phenolic and non-phenolic aromatic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons, has been shown.

Keywords: ascomycetes, peroxidases, degradation, pollutants

ШТАММОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МОРФОЛОГИЯ *NEOLENTINUS LEPIDEUS* (FR.) REDHEAD & GINNS 1985 В ЭКОСИСТЕМАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Н.Ю. Шабанова, О.Б. Вайшля, С.И. Гашков, Н.Н. Кудашова

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия, NYSh1001@yandex.ru

Аннотация. Выделены четыре штамма базидиомицета *Neolentinus lepideus* в культуру *in vitro*. Проведены исследования образцов в жидкой культуре, отобраны два наиболее перспективных для дальнейшего изучения штамма. Изучены особенности макро- и микроморфологических признаков *N. lepideus* в Томской области (ТО) в зависимости от субстратной приуроченности. В материалах приводится анализ 24 образцов вида *N. lepideus*, обнаруженных в Томской области (Западная Сибирь). Показано статистически значимое отличие экземпляров гриба по размерам спор и длине базидий, в зависимости от их трофической приуроченности к хвойным и лиственным породам древесины. Ширина базидий статистически значимого отличия не показала. Плодовые тела, собранные с *Pinus sibirica, Pinus sylvestris, Larix sibirica* не имеют статистически значимых различий в размерах микроморфологических структур. На основании полученных данных показано, что размер микроструктур зависит от трофической приуроченности вида.

Ключевые слова: *Neolentinus lepideus*, трофическая приуроченность, древесина, микропризнаки, Западная Сибирь

Для питания человек использует множество различных источников, в которых содержится белок, в том числе грибы. Помимо пищевых целей многие макромицеты используются в фармакологической промышленности. С каждым годом по всему миру все больше ученых проявляют интерес к разработкам препаратов на основе высших грибов. Важными этапами здесь являются: поиск и выделение высокопродуктивных штаммов из природной среды обитания, разработка субстратов для культивирования плодовых тел. Коллекция штаммов имеет практическое значение для изучения и подбора наиболее эффективных и продуктивных штаммов, на основе которых возможна разработка фармакологических препаратов. Для изучения новых микоцевтиков необходимо не только выделить макромицет в культуру *in vitro*, но и поддерживать рост в определенных условиях, которые, в свою очередь, у каждого штамма свои и могут отличаться: так, немаловажную роль играет субстратная приуроченность, температура и влажность. Существует множество неблагоприятных факторов, влияющих на распространение и встречаемость видов в природе. Одной из таких проблем сохранения биологического разнообразия является узкая трофическая приуроченность, поскольку сокращение площадей, занятых древесными растениями, приводит к уменьшению популяций макромицетов. Важными звеньями в их охране является выявление популяций редких видов в различных регионах, а также разработка оптимальных путей их сохранения в условиях культуры [Власенко, 2020]. *Neolentinus lepideus* – пилолистник чешуйчатый, один из самых популярных съедобных грибов в Китае и Японии, является близким «родственником» издавна известного своими лекарственными свойствами гриба шиитаке *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 1941. Под субстратной приуроченностью *Neolentinus lepideus* понимают принадлежность плодовых тел макромицета к тому или иному виду (роду) древесных растений [1]. По литературным данным, *N. lepideus* произрастает на древесине таких видов как, *Pinus sibirica, Pinus sylvestris, Larix sibirica, Populus tremula,* но основная трофическая приуроченность показана для хвойных пород [Moser, 1978; Самгина, 1985]. Изучение его штаммового разнообразия и трофической приуроченности является крайне интересной и практически важной тематикой при искусственном культивировании определенного вида грибов [Castillo et al., 2017; Теплякова, Косогова, 2014]. При подборе субстрата культивирования для получения плодовых тел необходимо знать,

какая древесина наиболее приемлема, поэтому для дальнейшего изучения в лабораторных условиях *N. lepideus* необходимо было выяснить, имеются ли отличия в макро- и микроморфологических особенностях штамма в зависимости от его субстратной приуроченности к той или иной древесной породе.

Исследования и сбор материала проводились микологами в Томской области (ТО), преимущественно в Томском районе (исключение – Колпашевский район), в период 2004 – 2020 гг [Миловидова и др., 1980; Петрова, Горбунова, 2001; Агафонова и др., 2007; Жуков, 1980]. На протяжении указанного периода времени велось выделение штаммов в культуру in vitro и отбор наиболее высокопродуктивных для дальнейших исследований (скорость роста, накопление биомассы, биологическая активность) лекарственных свойств. Микроморфометрические исследования проводились согласно общепринятой методике с использованием светового микроскопа «Micromed – 6» при увеличении 400× – 1000×. Для определения естественного цвета микроструктур препараты рассматривались в дистиллированной воде и в 3 – 5 %-ом растворе гидроксида калия (КОН). Гиалиновые структуры окрашивались органическим красителем сафранином. Исследуемые образцы *N. lepideus* хранятся в коллекционном фонде «Mycota» при музейном комплексе Томского государственного университета (акроним CCTR). Материал для изучения размера спор был обнаружен только в следующих образцах: 3296 CCTR, 1930 CCTR, 1946 CCTR, 6173 CCTR, 3427 CCTR, 3963 CCTR, 3132 CCTR. Полученные данные были обработаны с помощью пакета программы StatSoft STATISTICA 7.0 и представлены в виде средней арифметической с доверительным интервалом. Для сравнения нескольких групп полученных данных выбран однофакторный дисперсионный анализ (ANOWA), который показывает, есть ли статистически значимые различия между группами данных ($p<0,03$). Поскольку распределение выборок не исследовано дополнительно использовался непараметрический критерий статистической обработки Kruskal-Wallis test (KW-test).

Результаты и обсуждение

В Томской области *N. lepideus* нельзя отнести к часто встречаемым видам, его плодоношение зарегистрировано на валеже нескольких видов хвойных и лиственных пород деревьев*: Pinus sibirica, Pinus sylvestris, Larix sibirica, Populus tremula, Betula sp., Pópulus trémula* [Жуков, 1980]. Трижды нами было зарегистрировано плодоношение вида на крупномерных пнях березы. Среда обитания – встречается с середины мая до середины сентября на крупных пнях и на обработанной древесине (шпалы, столбы и т.п.), как правило, редко и не обильно – по одному экземпляру и небольшими группами. Молодые экземпляры съедобны.

Основным преимуществом *N. lepideus* от японского гриба шиитаке *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 1941, является более крупный размер плодовых тел. Нами было введено в культуру четыре штамма №12, №17, №18, №3132. На среде Мозера зафиксирована высокая скорость роста и выхода биомассы в жидкой культуре только для штамма №3132. Установлено, что основная трофическая приуроченность *N. lepideus* приходится на хвойные породы деревьев – 86,96%, 13,04% находок обнаружено на лиственных породах деревьев, а именно – березе и осине. Описание вида *N. lepideus* по внешним характеристикам [Жуков, 1980; Змитрович и др., 2004; Hansen, Knudsen, 1992]. В отличие от описания макроморфологических признаков в литературных данных, образцы, произрастающие на крупномерных пнях березы и осины, имели чисто-белый цвет всех частей плодового тела. Это - единственное внешнее отличие между экземплярами, произрастающими в естественных условиях на хвойных породах деревьев и берёзе. В результате статистической обработки

показателей было выявлено различие в размере спор и базидий между экземплярами, трофически приуроченными к хвойным и лиственным породам деревьев. Длина базидий у образцов с березы статистически значимо больше, чем длина базидий у хвойных пород. При исследовании длины и ширины спор было выявлено, что значения, полученные с образцов хвойных пород, и значения с лиственной породы имеют статистически значимое отличие друг от друга. При этом между собой образцы, полученные с хвойной древесины, не показали статистически значимого различия по параметрам измерений. Споры содержат крайне малое количество питательных веществ, которое может влиять на их выживаемость, считается, что чем крупнее споры, тем больше вероятность их выживания. На основании полученных результатов мы можем предположить, что споры *N. lepideus* наиболее жизнеспособны у образцов, которые произрастают на лиственных породах деревьев.

Заключение

Установлено, что размер микроморфометрических структур *N. lepideus* зависит от трофической приуроченности. Основываясь на данных официальных определителей, базидии вида описаны в диапазоне 4–7×26–38 мкм, споры 3.5–5×8–14 мкм [Hansen, Knudsen, 1992; Агеев, Бульонкова, 2021; Knudsen, 2008; Кудашова и др., 2013]. Все полученные морфометрические данные размера спор и базидий соответствуют указанному диапазону. В результате статистической обработки образцы с лиственной древесины показали значимое отличие (p=0) от экземпляров с хвойных пород по параметрам длины базидий, длине и ширине спор. Ширина базидий статистически значимого отличия не показала. Споры содержат крайне малое количество питательных веществ, которое может влиять на их выживаемость, считается, что чем крупнее споры, тем больше вероятность их выживания. Перспективным штаммом для получения большой биомассы в культуре и плодовых тел является образец №3132, выделенный из плодового тела с березы.

Литература

Власенко В. А. Субстратная специализация и распространение грибов рода *Trametes* на юго-востоке Западной Сибири // Самарский научный вестник. 2020. Т. 9, № 4. С. 39–42.

Moser M. M. Die Röhrlinge und Blätterpilze (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales) / M. M. Moser. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1978. 532 p.

Самгина Д. И. Флора споровых растений Казахстана: в 13 т. / Д. И. Самгина. Алма-Ата: Наука, 1985. Т. 13, кн. 2: Агариковые грибы. 272 с.

Castillo, T. A. Mycelial growth and antimicrobial activity of species of genus Lentinus (Agaricomycetes) from Brail / T. A. Castillo, J. R. G. Pereira, J. M. A. Alves, M. F. S. Teieira // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2017. № 19 (12). P. 1135–1143.

Теплякова Т. В., Косогова Т. А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014. С. 298.

Миловидова Л. С., Плац М. Ш., Толстова Н. Ю. Видовой состав базидиальных грибов Томского Приобья // Водоросли, грибы и лишайники юга Сибири. М., 1980. С. 183–211.

Петрова Н. В., Горбунова И. А. Макромицеты юга Западной Сибири / Н. В. Петрова, И. А. Горбунова; отв. ред. Н. В. Седельникова. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2001. С. 157.

Агафонова Н. Н., Кутафьева Н. П., Гашков С. И. Макромицеты Томской области (Западная Сибирь) // Новости систематики низших растений. 2007. Т. 41. С. 77–91.

Жуков А. М. Дереворазрушающие грибы Приобья // Водоросли, грибы и лишайники юга Сибири. М., 1980. С. 144–183.

Змитрович И. В., Малышева В. Ф., Малышева Е. Ф., Спирин В. А. Плевротоидные грибы Ленинградской области. СПб.:«ВИЗР», 2004. 124 с.

Hansen L., Knudsen H. Nordic Macromycetes / L. Hansen, H. Knudsen. Copenhagen: Nordsvamp, 1992. Vol. 2: *Polyporales*, *Doletales*, *Agaricales*, *Russulales*. 474 p.

Агеев Д. В., Бульонкова Т. М. Неолентинус мелкочешуйчатый (*Neolentinus lepideus*) – Грибы Сибири [Электронный ресурс] URL: https://mycology.su/neolentinus-lepideus.html (дата обращения: 24.02.2021).

Knudsen H. *Neolentinus*. In: Knudsen, H. & Vesterholt, J. (eds.): Funga Nordica, 2008. P. 73–76.

Кудашова Н. Н., Гашков С. И., Кутафьева Н. П. Предварительный список макромицетовТомской области: подотдел Pezizomycotina (Ascomycota) и класс Agaricomycetes (Basidiomycota) // Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова Томского государственного университета. 2013. № 107. С. 22–70.

STRAIN DIVERSITY AND MORPHOLOGY OF *NEOLENTINUS LEPIDEUS* (FR.) REDHEAD & GINNS 1985 IN ECOSYSTEMS OF THE TOMSK REGION

N.Y. Shabanova, O.B. Vaishlya, S.I. Gashkov, N.N. Kudashova

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia, NYSh1001@yandex.ru

Annotation: Four strains of the basidiomycete *Neolentinus lepideus* were isolated in plant tissue culture. Research of samples in liquid culture were carried out; two of the most promising strains for further study were selected. We showed the features of macro - and micromorphological features of *N. lepideus* in the Tomsk region (TO), depending on the substrate confinement. The date provides an analysis of 24 samples of the species *N. lepideus* found in the Tomsk region (Western Siberia). A statistically significant difference in the size of the spores and the length of the basidia is demonstrated, depending on their trophic association with coniferous and deciduous wood species. The width of the basidia did not show a statistically significant difference. Fruit bodies collected from *Pinus sibirica, Pinus sylvestris, Larix sibirica* have no statistically significant differences in the size of micromorphological structures. Based on the data obtained, it is shown that the size of the microstructure depends on the trophic confinement of the species.

Keywords: *Neolentinus lepideus*, trophic confinement, wood, micro-signs, Western Siberia.

ВОДОРОСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ ПОЧВ ГОРНОЙ ТУНДРЫ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЕПРОДУКТАМИ (ГОРА КАСКАМА, МУРМАНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Р.Р. Шалыгина, В.В. Редькина, В.А. Мязин

Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра Российской академии наук, Апатиты, Россия, regina_rinat@mail.ru

Аннотация. Представлены данные по видовому составу почвенных водорослей и цианобактерий при длительном нефтяном загрязнении почв северных высоких широт на примере горы Каскама Мурманской области. В почвах, загрязненных нефтяными углеводородами, выявлено 30 видов водорослей и цианобактерий. Здесь обнаружены представители всех основных, характерных для почв, классов микрофототрофов. Зеленые водоросли классов Chlorophyceae и Trebouxiophyceae вносят заметный вклад в общее разнообразие.

Ключевые слова: цианобактерии, водоросли, Субарктика, горная тундра, загрязнение нефтепродуктами

Актуальным направлением современной микробиологии является изучение распространения и свойств микроорганизмов экстремальных местообитаний. Мурманская область входит в состав сухопутной части Арктической зоны РФ и характеризуется уникальным сочетанием природных и антропогенных факторов – суровые климатические условия и интенсивное развитие промышленности. Неустойчивые к антропогенным воздействиям экосистемы Крайнего Севера характеризуются замедленными процессами энерго- и массообмена в основном вследствие низких температур. Загрязнение почвы нефтепродуктами приводит к изменению химических и физических свойств почв, а также численности и состава почвенных микроорганизмов, основная функция которой – деструкция органических веществ и обеспечение нормального существования биоценозов и экосистемы в целом. Ранее сотрудниками лаборатории экологии микроорганизмов ИППЭС КНЦ РАН проводились исследования, направленные на изучение влияния нефти и нефтепродуктов (НП) на состояние микробоценозов почв и активность почвенных ферментов [Мязин и др., 2014; Masloboev, Evdokimova, 2012], в частности, исследована структура грибного сообщества, показано, что в нефтезагрязненных почвах возрастает доля потенциально патогенных грибов [Евдокимова и др., 2015]. Однако, практически отсутствуют сведения о прокариотических и эукариотических фототрофных микроорганизмах в нефтезагрязненных почвах в условиях Кольской Субарктики. Целью настоящего исследования стало выявление биоразнообразия цианобактерий и водорослей в почве, подверженной длительному загрязнению нефтепродуктами, на примере горы Каскама (Мурманская область). Основными задачами работы являлись: определение содержания нефтепродуктов в нарушенных почвах, получение данных по биоразнообразию цианобактерий и водорослей, пополнение коллекции штаммов аборигенных микроорганизмов.

Гора Каскама (69.266667 N, 29.466667 E, 320 м н.у.м.) находится в Печенгском районе на северо-западе Мурманской области. В районе исследования выше 300 м горная тундра представлена кустарниково-лишайниковыми растительными сообществами со скальными обнажениями и каменисто-щебнистыми пятнами пучения. Почвы на естественных ненарушенных территориях представлены подбурами, оподзоленными подбурами и горными тундровыми примитивными щебнистыми

почвами [Мязин, 2019]. На данном участке ранее находилось одно из подразделений Министерства обороны. Впоследствии военная часть была расформирована, при этом в процессе вывода техники произошел разлив горюче-смазочных материалов (более 20 лет назад). В результате антропогенного воздействия произошла гибель растительного покрова и разрушение органогенного горизонта почв на вершине и участках различной площади на западном и юго-восточном склонах горы.

Для анализа отбирали почву из поверхностного слоя 0-10 см. Характеристика отобранной загрязненной почвы: по гранулометрическому составу почва песчаная, pH_{KCl} –4,6, содержание $C_{орг}$–13,1% [Мязин, 2019; Korneykova et al., 2020].

Концентрацию нефтепродуктов в почвенных образцах определяли согласно ПНДФ 16.1:2.2.22-98 (ПНД Ф. 16.1: 2.2. 22–98). Методика определения НП основана на их экстракции из изучаемого материала четыреххлористым углеродом (CCl_4), отделении НП от полярных углеводородов в колонке с оксидом алюминия и дальнейшем спектрофотометрическом определении содержания углеводородов нефти по интенсивности поглощения инфракрасного излучения на заданных длинах волн [Другов, Родин, 2007].

Для исследования таксономического состава цианобактериально-водорослевых ценозов использовали метод посева почвенного мелкозема или почвенной суспензии на агаризованную среду, а также культивирование в жидких питательных средах 3N-BBM и Z8 [Гайсина и др., 2008; Kotai, 1972]. Культивирование водорослей осуществлялось на световых установках, оснащенных фитолампами, при соотношении периодов свет/темнота 16/8 ч при комнатной температуре. Определение видов проводили в накопительных или чистых культурах. Чистые культуры получали путем многократного пересева на агаризованную среду по методу штриха, а также захватом отдельных клеток или колоний микроводорослей с помощью стеклянных капилляров и переносом их в питательную среду. Идентификацию осуществляли по культурально-морфологическим признакам с использованием микроскопа Olympus CX41, оснащенного камерой Jenoptik ProgRes, при увеличении ×1000 с масляной иммерсией по классическим определителям [Андреева, 1998; Komárek, Anagnostidis, 2005; Ettl, Gärtner, 2014 и др.]. Для уточнения названий видов водорослей и их систематической принадлежности использовали электронную базу данных Algaebase [Guiry, 2021].

В результате проведенных исследований обнаружено, что на склоне содержание НП достигало 86 г/кг почвы, что выше установленных для почв с низкой биогенностью ОДК (0,7 г/кг) в 123 раза [Пиковский и др., 2003].

В почвах, загрязненных нефтяными углеводородами, нами выявлено 30 видов водорослей и цианобактерий, относящихся к 4 отделам: 15 видов *Chlorophyta*, 6 видов *Cyanobacteria*, 5 видов *Ochrophyta*, 4 вида *Charophyta*. По числу видов преобладают водоросли из отдела *Chlorophyta* классов *Chlorophyceae* (6) и *Trebouxiophyceae* (8). Цианобактерии были представлены *Leptolyngbya* sp., *Microcoleus autumnalis* (Trev. ex Gom.) Strunecky et al., *Microcoleus vaginatus* Gomont ex Gomont, *Nostoc* sp., *Synechococcus* sp. Проведены молекулярно-генетические исследования некоторых штаммов. При сравнении последовательностей нуклеотидов с генетической базой данных выявлено, что штамм KAS-15 имеет наибольшее сходство (99.94%) с последовательностью гена 18S рРНК аутентичного штамма *Neocystis brevis* strain SAG 850-1 (GenBank: KM020044). Штамм KAS-35: наибольшее сходство (99.23%) с последовательностью гена 18S рРНК *Trebouxiophyceae* sp. SAG 2477 (GenBank:

KP081399), ближайший типовой штамм (94.97%) – *Parietochloris alveolaris* strain UTEX 836 (GenBank: EU878373).

Таким образом, альгоценозы нефтезагрязненных почв сохраняют зональный характер с преобладанием одноклеточных зеленых водорослей. Наряду с зелеными водорослями классов *Chlorophyceae* и *Trebouxiophyceae*, заметный вклад в общее разнообразие вносят цианобактерии. Поскольку в целом северные подзолистые почвы характеризуются низким разнообразием цианопрокариот, их заметная представленность в почве может сигнализировать о влиянии на нее антропогенных факторов, в частности, о нефтезагрязнении. Альгологически чистые культуры водорослей и цианобактерий из нефтезагрязненной почвы хранятся к коллекции штаммов Института проблем промышленной экологии Севера, ФИЦ КНЦ РАН (INEP). В настоящее время продолжаются работы по выделению монокультур и видовой идентификации, уточняются списки видов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ 20-74-00108.

Литература

Ettl, H. & Gärtner, G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. 2., ergänzte Auflage. Springer Berlin Heidelberg. 2014. – 773 p.

Komárek, J. et Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. et Schlager, M. (eds). Süsswasserflora von Mitteleuropa 19/2. – München: Elsevier, 2005. – 759 pp.

Korneykova, M.V., Myazin, V.A., Fokina, N.V. Restoration of Oil-Contaminated Soils in Mountain Tundra (Murmansk Region, Russia) // Springer Geography. 2020, Pages 187-198

Kótai, J. Instructions for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae. Norwegian Institute for Water Research, Publ. B-11/69. – Oslo: Blindern, 1972.

Masloboev, V.A., Evdokimova, G.A., Bioremediation of oil product contaminated soils in conditions of North Near-Polar Area / V.A. Masloboev // Proc. of the Murmansk state technical University. – 2012. – V.15. No 2. – P. 357-360.

Андреева, В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли. – М.: Наука, 1998. – 348 с.

Гайсина, Л.А., Фазлутдинова, А.И., Кабиров, Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152 с.

Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. – 270 с.

Евдокимова, Г.А., Корнейкова, М.В., Мозгова, Н.П., Мязин, В.А., Фокина, Н.В. Очищение почв от нефтепродуктов в Евро-Аарктическом регионе России. Материалы международной научной конференции «Роль почв в биосфере и жизни человека». – Москва, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 5-7 октября 2015 г.

Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектрометрии: ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. – М., 1998. – 15 с.

Мязин, В.А., Фокина, Н.В., Корнейкова, М.В. Деградация микробного и растительного сообществ горной тундры после загрязнения нефтепродуктами (на примере горы Каскама в долине реки Паз). Материалы докладов XXI

Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (посвященная 70-летию А.И. Таскаева). – Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 2014. – С. 231-235.

Мязин, В.А. Динамика содержания органического углерода и водорастворимых фосфатов в почве при очистке и восстановлении нефтезагрязненных территорий // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2019. – Т. 22. – № 1. – С. 90-100.

Пиковский, Ю.И., Геннадиев, А.Н., Чернянский, С.С., Сахаров, Г.Н. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. – 2003. – № 9. – С. 1132-1140.

ALGAE AND CYANOBACTERIA OF SOILS OF MOUNTAIN TUNDRA UNDER CONDITIONS OF PROLONGED POLLUTION OF OIL PRODUCTS (MOUNTAIN KASKAMA, MURMANSK REGION)

R.R. Shalygina, V.V. Redkina, V.A. Myazin

Institute for Problems of Industrial Ecology of the North, Kola Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Apatity, Russia, regina_rinat@mail.ru

Annotation. The data on the species composition of soil algae and cyanobacteria during long-term oil pollution of soils in the northern high latitudes are presented on the example of Mount Kaskama in the Murmansk region. In soils contaminated with petroleum hydrocarbons, 30 species of algae and cyanobacteria have been identified. Representatives of all the main, characteristic for soils, microphototroph classes were found here. Green algae of the classes Chlorophyceae and Trebouxiophyceae contribute significantly to the overall diversity.

Keywords: cyanobacteria, algae, Subarctic, mountain tundra, oil pollution

МОНИТОРИНГ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ДИНАМИКИ РАСТИТЕЛЬНОСТИ В УСЛОВИЯХ КОМПЛЕКСНОГО ВЛИЯНИЯ АНТРОПОГЕННЫХ НАГРУЗОК И ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА

КЛИМАТИЧЕСКИЕ ГРАДИЕНТЫ В РАЗНООБРАЗИИ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЕ ЭКОСИСТЕМ ВЫСОТНЫХ ПОЯСОВ ГОР ЮЖНОЙ СИБИРИ

М.В. Бочарников

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, maxim-msu-bg@mail.ru

Аннотация. Проведен анализ пространственной организации экосистем гор Южной Сибири в связи с градиентами климатических условий. Выявлены важнейшие биоклиматические показатели, с которыми связаны смены типов высотной поясности, высотно-поясных подразделений, а также типологических подразделений растительности (формации и комплексы формаций) как базового компонента экосистем. Предложена биоклиматическая схема, характеризующая пространственную организацию экосистем на региональном уровне.

Ключевые слова: растительный покров, высотная поясность, биоразнообразие, биоклимат, ординация

Выявление экологических градиентов в структуре разнообразия наземных экосистем и растительности как их базового компонента является фундаментальной проблемой биогеографии. Среди факторов, которые влияют на пространственную дифференциацию разнообразия, одну из ключевых ролей играет климат. Климатическое обоснование разнообразия и структуры растительного покрова является традиционным направлением ботанико-географических исследований, проводимых на разных пространственных уровнях с использованием показателей тепло- и влагообеспеченности [Rivas-Martinez et al., 2004]. Возможности более точного анализа возрастают в связи с появлением новых данных о факторах среды, представленных пространственными моделями, которые характеризуют дифференциацию эколого-географических условий. Одним из примеров служит глобальная модель Chelsa [Karger at al., 2017], содержащая информацию о пространственном распределении 19 биоклиматических переменных на основе разрешения 30´´ с осредненными за период 1979-2013 гг. значениями и являющаяся универсальной в решении задач регионального и планетарного уровней. Актуальность исследований возрастает на современном этапе в связи с необходимостью изучения не только пространственных закономерностей, но и временных тенденций, которые прослеживаются в структуре разнообразия в связи с изменением климата.

Обширная горная территория юга Сибири имеет длительную историю формирования, с которой связан высокий уровень разнообразия различных компонентов экосистем [Смирнов, 1975; Сочава, 1980; Малышев, 2002; Назимова и др., 2004]. Современная пространственная структура разнообразия подчинена высотно-поясным закономерностям, выраженным в условиях сложной орографии территории. Контрастные условия, связанные с дифференциацией климата [Поликарпов и др., 1986], находят выражение в высотно-поясной структуре экосистем изучаемой территории, которая характеризуется высоким уровнем типологического разнообразия растительности. В работе проводится оценка влияния климатического фактора на пространственную организацию высотной поясности в горах Южной Сибири. Базовыми региональными единицами анализа выступили типы высотной поясности Алтае-Саянской группы, положенные в основу выделения оробиомов как

совокупностей природных экосистем, сформированных в рамках высотно-поясных спектров [Огуреева, Бочарников, 2017].

Методологической основой работы выступает экосистемная концепция, в соответствии с которой разнообразие и пространственная структура экосистем на региональном уровне обусловлена климатом, что выражается через ключевые биоклиматические показатели [Holdridge, 1967]. В горах определенное типологическое разнообразие сообществ свойственно каждому высотному поясу, что отражает историю развития растительного покрова и комплекс поддерживающих его современных условий. Выявление разнообразия высотных поясов в связи с климатическими условиями основано на анализе геоботанических данных и климатических источников. Использованы оригинальные полные геоботанические описания растительных сообществ, выполненные в период с 2008 по 2015 гг. в различных горных регионах Южной Сибири на ключевых участках, охватывающих полные высотные спектры соответствующих типов поясности. Все описания сообществ выполнены на единой основе согласно традиционным методикам [Сукачёв, Зонн, 1964]. В анализе использовано 396 описаний на 4 обобщенных профилях, образуемых ими в виде последовательной смены по высотному градиенту (табл. 1).

Таблица 1. Геоботанические описания, выполненные в горах Южной Сибири

Регион исследований	Географическое положение	Количество описаний	Тип поясности растительности
Западный Саян	Хребты Кулумыс, Кедранский, Ойский, Ергаки	147	Альпийско-субальпийско-таежно-черневой
Западный Алтай	Тигирекский хребет	143	Альпийско-субальпийско-таежно-кустарниково-лесостепно-степной
Восточный Саян	Саянский хребет	52	Альпийско-субальпийско-таежный
Кузнецкий Алатау	Профиль Ивановские озера – Черное озеро	54	Альпийско-субальпийско-таежно-лесостепно-степной

Анализ климатической обусловленности разнообразия и структуры экосистем проведен на уровне полных высотно-поясных спектров растительности, слагающих конкретные типы поясности [Огуреева, 1991]. Растительный покров ключевых участков формируется в рамках высотных спектров Алтае-Саянской группы бореального класса и относится к Западно-Алтайскому, Западно-Восточносаянскому и Салаирско-Кузнецкому типам поясности. Общими чертами является господствующее положение горнотаежных темнохвойных и светлохвойных лесов, развитие высокогорий альпийского типа с субальпийским и альпийско-тундровым поясами.

В качестве климатических данных использованы показатели тепло- и влагообеспеченности (средние многолетние за год и каждый квартал, самого теплого (июль) и самого холодного (январь) месяцев), а также биоклиматические индексы, применяемые в сопряженном анализе растительности и климата [Rivas-Martinez et al., 2011; Бочарников, 2019]. Неметрическое многомерное шкалирование [Clarke, 1993] положено в основу выявления высотно-поясной дифференциации экосистем в связи с биоклиматическими показателями. Оценка связей проведена на основе корреляционных отношений. Дискриминантный анализ использован для определения роли климата (вклада биоклиматических показателей в разделение групп сообществ, формирующих отдельные высотно-поясные спектры) как фактора пространственной структуры растительного покрова. Достоверность различий высотных поясов

по выбранным биоклиматическим показателям определена с использованием критерия Краскела-Уоллеса.

Выявленные отношения растительного покрова с климатом положены в основу построения интегральной биоклиматической схемы (матрица, ячейки которой занимают высотно-поясные подразделения экосистем, формирующие разные типы поясности в составе Алтае-Саянской группы). Климатическое обоснование проведено с учетом различий по ключевым биоклиматическим показателям с наиболее тесными корреляционными отношениями с варьированием экосистемного разнообразия. Для аждого типа поясности определены формационные комплексы растительности, фоновые для высотно-поясных подразделений (табл. 2). Для первой и третьей осей NMS-ординации определены показатели с максимальными коррелятивными связями с сообществами: средняя многолетняя температура января и индекс континентальности (разность средних многолетних температур июля и января) [Rivas-Martinez et al., 2004].

Таблица 2. Типологическое разнообразие высотных поясов

	Высотные пояса	Типологическое разнообразие растительности				
		Фратрии классов формаций				
		Алтае-Саянская		Урало-Южносибирская		Заволжско-Казахстанская
I	Альпийско-тундровый	Альпийские луга	Высокогорные тундры			
II	Субальпийский	Субальпийские луга	Субальпийские редколесья			
III	Горнотаежный			Кедрово-пихтовые леса		
IIIa	Таежно-черневой			Березово- и осиново-кедрово-пихтовые леса		
IV	Подтаежный			Березово-сосновые леса	Березово-лиственничные леса	
V	Лесостепной			Березово-лиственничные леса		Разнотравно-дерновинно-злаковые степи, заросли кустарников, остепненные луга

Определенные для каждого высотного пояса доверительные интервалы в разных типах поясности характеризуют степень различий между слагающими их сообществами. Все они достоверно отличаются в ординационном пространстве по первой и третьей осям ординации (Wilks' Lambda = 0.06286, F = 40.623, p <0.000). По данным осям отражаются связи растительности с комплексом экологических условий. На основе близости ареалов сообществ высотных поясов, определенных по доверительным интервалам, отмечается высокая степень фитоценотического сходства соответствующих поясов в разных типах поясности. Наиболее близки альпийско-тундровый и субальпийский пояса. Сходство формирующих их сообществ обусловлено развитием в холодном климате при нивелировании климатических условий, характерном для высокогорий. Региональные различия нижележащих поясов выражены в большей степени. При этом ареалы разных подразделений, формирующихся в разных типах поясности, могут перекрываться. Например, ареал горнотаежного пояса Восточного Саяна расположен в пределах ареала субальпийских редколесий Западного Саяна, не пересекаясь с его горнотаежным поясом. Это характеризует более теплообеспеченные условия формирования горной тайги Западного Саяна, благодаря чему в нижней части пояса развиты таежно-черневые леса. Близкое положение

на схеме занимает ареал черневой тайги Западного Алтая, который пересекается с ареалом субальпийских редколесий региона, подчеркивая требования к повышенному увлажнению данных растительных комплексов. Обособленное положение на схеме занимают березово-сосновые подтаежные леса Западного Саяна. Они относятся к наиболее влагообеспеченному варианту подтайги гор Южной Сибири с участием крупнотравных типов сообществ с неморальными элементами [Дробушевская, Назимова, 2007]. Подтаежные леса регионов с более континентальным климатом формируют пересекающиеся ареалы. Лесостепные комплексы всех регионов на схеме накладываются друг на друга, отличаясь приуроченностью к условиям повышенной теплообеспеченности.

Оси ординационной схемы, отражая интегральные градиенты условий, характеризуют смену высотно-поясных подразделений по ключевым векторам факторов, которые определяют фитоценотическое разнообразие (рис. 1). Горизонтальная ось характеризует смену сообществ разных высотно-поясных подразделений с изменением теплообеспеченности холодного периода года и термического индекса (определяется на основе температур января). В соответствии с данными показателями выражена высотная смена комплексов сообществ, фоновых для лесостепного, подтаежного, горнотаежного и высокогорных поясов. Со значениями по вертикальной оси наиболее тесные связи находит индекс континентальности климата, показатели теплообеспеченности летнего периода, а также абсолютная высота. Типологическое разнообразие растительности отражается с учетом региональных различий в разных типах поясности.

Градиенты климатических показателей в связи с разнообразием экосистем гор Южной Сибири выражены в системе координат широтно-долготных и высотно-поясных градиентов. Они находят отражение в структуре высотной поясности, смене фоновых сообществ и их ключевых характеристик. Наиболее ярко и физиономично такие закономерности проявляются в поясе оробореальной лесостепи [Огуреева, 1980], в котором выражена пространственная организация растительного покрова (сочетания лесных, степных, луговых и кустарниковых сообществ) в связи с перераспределением тепла и влаги по горным склонам [Chytry et al., 2008]. Региональная специфика структуры высотно-поясных спектров растительности отражается в типах высотной поясности с различиями в развитии на определенной высотной амплитуде, фитоценотическом составе, что может быть обосновано через климатические условия.

Область повышенной теплообеспеченности занимают сообщества нижней части высотно-поясных спектров. Все они развиваются при средней многолетней годовой температуре, близкой к нулю градусов. Региональные различия выражены в степени континентальности и уровне увлажнения. Наиболее влагообеспеченными являются подтаежные леса Западного Саяна (количество осадков июля более 120-130 мм). По сравнению с другими типами поясности, они развиваются при максимальных амплитудах сезонных температур, что отражается наибольшими значениями индекса континентальности и наименьшими – термического индекса. Они относятся к гумидному географическому варианту подтаежных березово-сосновых лесов Южной Сибири [Дробушевская, Назимова, 2007]. Основу разнообразия составляют кустарниковые (*Caragana arborescens, Spiraea chamaedrifolia*) орляковые (*Pteridium pinetorum* ssp. *sibiricum*), разнотравно (*Lathyrus humilis, L. frolovii, Vicia sepium, Cruciata glabra* ssp. *krylovii*) – злаковые (*Calamagrostis arundinacea, Brachypodium pinnatum*) группы лесных ассоциаций. Они характеризуются высокой видовой насыщенностью сообществ (до 40 видов сосудистых растений и более на пробную площадь в 400 м^2), активным участием мезо-гигрофитных разнотравных и крупнотравных видов. В условиях высокой теплообеспеченности в нижней части высотных спектров

Западного Алтая и Кузнецкого Алатау формируются лесостепные комплексы (средняя многолетняя температура июля превышает 17° С). Различия выражены в уровне увлажнения (среднее многолетнее количество осадков июля на соответствующих высотах в Западно-Саянском типе в среднем на 20-30 мм выше, чем в Салаиро-Кузнецком). Такие условия способствуют развитию луговых степей и остепненных лугов (*Stipa pennata, Helictotrichon altaicum*), кустарниковых сообществ (*Caragana arborescens, Spiraea trilobata, Rosa acicularis*), что характерно для Западно-Алтайского типа поясности [Огуреева, 1980]. Они развиваются в сочетании с лиственничными и березово-сосновыми разнотравно-злаковыми лесами. В наименее увлажненном географическом варианте лесостепи, связанным с восточным макросклоном Кузнецкого Алатау, преобладают разнотравно-дерновиннозлаковые степи, где доминантами также выступают *Stipa pennata, Helictotrichon altaicum*, а среди разнотравья обильны ксерофитные виды (*Iris ruthenica, Filipendula stepposa, Schizonepeta multifida*). Леса представлены, преимущественно, сообществами лиственничной формации. Подтаежные леса Восточного Саяна развиваются в условиях наименьшей теплообеспеченности (средняя многолетняя годовая температура отрицательная, средняя многолетняя температура июля не превышает 15-16° С). Здесь преобладают осочково (*Carex macroura*) – злаковые (*Calamagrostis arundinacea, C. neglecta*), разнотравно-злаковые березово-сосновые леса с относительно небольшим типологическим разнообразием и меньшим флористическим богатством [Назимова и др., 1987].

Анализ климата как фактора пространственной структуры экосистем на региональном уровне позволил раскрыть закономерности их формирования в горах Южной Сибири, находящие интегральное выражение в высотно-поясной структуре и региональных особенностях фитоценотического разнообразия, которые отражены в разнообразии типов высотной поясности.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Пространственно-временная организация экосистем в условиях изменений окружающей среды» и при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1133.2020.5.

Литература

Бочарников М.В. Роль климата в пространственной организации растительного покрова Кодаро-Каларского оробиома // Сибирский экологический журнал. 2019. № 3. С. 239–252. https://doi.org/10.15372/SEJ20190301

Дробушевская О.В., Назимова Д.И. Климатические варианты светлохвойной низкогорной подтайги Южной Сибири // География и природные ресурсы. 2006. № 2. С. 21–27.

Малышев Л.И. Видообразование растений в горах Сибири // Сибирский экологический журнал. 2002. № 5. С. 531–540.

Назимова Д.И., Ермаков Н.Б., Андреева Н.М., Степанов Н.В. Концептуальная модель структурного биоразнообразия зональных классов лесных экосистем Северной Евразии // Сибирский экологический журнал. 2004. Т. 11, № 5. С. 745–756.

Назимова Д.И., Коротков И.А., Чередникова Ю.С. Основные высотно-поясные подразделения лесного покрова в горах Южной Сибири и их диагностические признаки // Чтения памяти В.Н. Сукачева. М.: Наука, 1987. С. 30–64.

Огуреева Г.Н. Ботаническая география Алтая. М.: Наука, 1980. 192 с.

Огуреева Г.Н. Ботанико-географическое районирование СССР. М.: изд-во Московского университета, 1991. 78 с.

Огуреева Г.Н., Бочарников М.В. Оробиомы как базовые единицы региональной оценки биоразнообразия горных территорий // Экосистемы: экология и динамика. 2017. Т. 1, № 2. С. 52–81.

Поликарпов Н.П., Чебакова Н.М., Назимова Д.И. Климат и горные леса Южной Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1986. 225 с.

Смирнов М.П. Почвы Западного Саяна. М.: Наука, 1970. 234 с.

Сочава В.Б. Географические аспекты сибирской тайги. Новосибирск: Наука, 1980. 256 с.

Сукачёв В.Н., Зонн С.В. Методические указания к изучению типов леса. М.: изд-во АН СССР, 1961. 144 с.

Chytrý M., Danihelka J., Kubešová S., Lustyk P., Ermakov N., Hájek M., Hajkova P., Kočí M., Otypková Z., Roleček J., Řezníčková M., Šmarda P., Valachovič M., Popov D., Pišút I. Diversity of forest vegetation across a strong gradient of climatic continentality: Western Sayan Mountains, southern Siberia // Plant Ecology. 2007. Vol. 196. P. 61–83.

Clarke K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure // Australian journal of ecology. 1993. Vol. 18. P. 117–143.

Holdridge L.R. Life zone ecology. San Jose: Tropical Science Center, 1967. 206 p.

Karger D.N., Conrad O., Böhner J., Kawohl T., Kreft H., Soria-Auza R.W., Zimmermann N.E., Linder H.P., Kessler M. Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas // Scientific Data. 2017. Vol. 4: 170122. https://doi.org/10.5061/dryad.kd1d4

Rivas-Martinez S., Penas A., Diaz T.E. Bioclimatic map of Europe, thermoclimatic belts. Cartographic Service. University of Leon, Spain, 2004.

Rivas-Martinez S., Rivas Saenz S., Penas A. World-wide bioclimatic classification system // Global Geobotany. 2011. Vol. 1(1). P. 1–634.

CLIMATIC GRADIENTS IN THE DIVERSITY AND SPATIAL STRUCTURE OF ECOSYSTEMS OF ALTITUDINAL BELTS IN THE SOUTH SIBERIAN MOUNTAINS

M.V. Bocharnikov

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, maxim-msu-bg@mail.ru

Annotation. The analysis of the spatial organization of ecosystems in the South Siberian mountains has been carried out in the connections with gradients of climatic conditions. The key bioclimatic parameters have been determined to explain the differentiation of types of altitudinal zonality, altitudinal belts and typological units of vegetation as a basic component of ecosystems. The proposed bioclimatic scheme reflects the spatial structure of ecosystems at the regional level.

Keywords: vegetation cover, altitudinal zonality, biodiversity, bioclimate, ordination

ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РЕЛЬЕФА НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЛЕСНЫХ СООБЩЕСТВ ГОРНО-ЛЕСНОЙ ЗОНЫ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

С.Н. Жигунова

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, Zigusvet@yandex.ru

Аннотация. Изучено влияние климатических характеристик и морфометрических показателей рельефа на распространение и пространственную приуроченность лесных сообществ уровня союза на Южном Урале. Установлено, что ведущими климатическими факторами в дифференциации союзов являются зимние температуры и количество летних и зимних осадков. Ведущими параметрами рельефа являются показатели, определяющие снос или накопление влаги и мелкозема (плановая и профильная кривизна, крутизна склона, LS-фактор, TWI).

Ключевые слова: лесные сообщества, ГИС-технологии, Bioclim, морфометрические показатели рельефа, Южный Урал.

В настоящее время в связи с влиянием природных и антропогенных факторов наблюдается значительное изменение состава, структуры и функций лесов. На лесные сообщества оказывают влияние изменение климата, участившиеся экстремальные погодные явления, промышленное загрязнение, массовые вспышки численности насекомых-вредителей, грибные и бактериальные болезни, а также нерациональное ведение лесного хозяйства [Palmer et al, 1997; Лукина и др., 2015]. В связи с этим, является актуальным изучение взаимодействия между уровнями биоразнообразия и биотическими и абиотическими компонентами экосистем. Этим проблемам посвящено большое количество отечественных и зарубежных публикаций [Восточноевропейские…, 2005; Крышень, 2006; Chapin et al. 2004; Shaffer, Gosselink, 2005 и др.] В Южно-Уральском регионе работ с использованием количественных характеристик рельефа и климата практически не проводилось. При таких исследованиях особый интерес представляют районы с высоким разнообразием лесной растительности на относительно небольшой территории, к которым относится горно-лесная зона Республики Башкортостан (РБ).

Для анализа состава, структуры, факторов формирования и тенденций изменения распространения лесных сообществ в условиях антропогенного воздействия и изменений климата необходим анализ связей климатических параметров и ландшафтных характеристик с единицами лесной растительности. Цель работы – анализ влияния климатических характеристик и морфометрических показателей рельефа на распространение и пространственную приуроченность лесных сообществ уровня союза на Южном Урале.

Исследования проводились на территории западного макросклона и центрально-возвышенной части ЮУ, ограниченной координатами 53°15' - 54°03' с.ш. и 56°40' - 58°00' в.д. и занимающей площадь около 9,5 тыс. км^2.

В качестве исходного материала были использованы 614 геоботанических описаний лесной растительности, выполненных сотрудниками лаборатории геоботаники и растительных ресурсов УИБ УФИЦ РАН на пробных площадях размером 400 м^2 и отклассифицированных по методике Браун-Бланке [Westhoff, Maarel, 1978; Миркин, Наумова, 2012]. Основные лесные сообщества на территории ЮУ относятся к девяти союзам эколого-флористической классификации [Мартыненко, 2013]:

Класс **CARPINO-FAGETEA** Jakucs ex Passarge 1968

Порядок QUERCETALIA PUBESCENTI-PETRAEAE Klika 1933

Союз Lathyro pisiformis-Quercion roboris Solomeshch et Grigoriev in Willner et al. 2015

Порядок CARPINETALIA BETULI P.Fukarek 1968

Союз Aconito lycoctoni-Tilion cordatae Solomeshch et Grigoriev in Willner et al. 2016

Класс **ALNO GLUTINOSAE-POPULETEA ALBAE** P. Fukarek et Fabijanić 1968

Порядок ALNO-FRAXINETALIA EXCELSIORIS Passarge 1968

Союз Alnion incanae Pawłowski, Sokołowski et Wallisch 1928

Класс **ASARO EUROPAEI-ABIETETEA SIBIRICAE** Ermakov, Mucina et Zhitlukhina in Willner et al. 2016

Порядок ABIETETALIA SIBIRICAE (Ermakov in Ermakov et al. 2000) Ermakov 2006

Союз Aconito septentrionalis-Piceion obovatae Solomeshch et al. ex Martynenko et al. 2008

Класс **BRACHYPODIO PINNATI-BETULETEA PENDULAE** Ermakov, Koroljuk et Latchinsky 1991

Порядок CHAMAECYTISO RUTHENICI-PINETALIA SYLVESTRIS Solomeshch et Ermakov in Ermakov et al. 2000

Союз Caragano fruticis-Pinion sylvestris Solomeshch et al. 2002

Союз Trollio europaea-Pinion sylvestris Fedorov ex Ermakov et al. 2000

Класс **VACCINIO-PICEETEA** Br.-Bl. in Br.-Bl., Siss. et Vlieger 1939

Порядок PINETALIA SYLVESTRIS Oberd. 1957

Союз Brachypodio pinnati-Pinion sylvestris Martynenko 2009 prov.

Союз Dicrano-Pinion (Libbert 1933) Matuszkiewicz 1962

Порядок PICEETALIA EXCELSAE Pawłowski, Sokołowski et Wallisch 1928

Союз Piceion excelsae Pawłowski, Sokołowski et Wallisch 1928

Для расчета морфометрических показателей рельефа и климатических характеристик была использована глобальная цифровая модель рельефа SRTM 1arc_V3 с пространственным разрешением одна угловая секунда, доступная на сайте «USGS» и растровые слои 19 биоклиматических переменных Bioclim с разрешением 30 угловых секунд, доступные на сайте глобальных климатических данных Chelsa [Karger et al., 2017]. Создавались растры 15 морфометрических показателей рельефа: высота над уровнем моря, индекс пересеченности, крутизна склона, индекс конвергенции/дивергенции [Watkins, 2015], топографический индекс влажности [Sørensen et al., 2006], LS-фактор [Kinnell, 2005]; плановая кривизна и профильная кривизна [Свидзинская, 2013], а также доля плоских и почти плоских поверхностей (до 4°), доли пологих (4-10°), покатых (10-20°), средней крутизны (20-30°), крутых и очень крутых (более 30°) склонов. Доли различной крутизны инсолируемых и неинсолируемых склонов рассчитывались отдельно. Расчеты проводились в программе QGIS 3.12.3 with GRASS 7.8.3 и в программе SAGA GIS 7.7.0 (модуль Basic Terrain Analysis). Для каждой гео-привязанной точки описаний лесных сообществ создавались полигоны размером 20х20 м, для которых оценивались значения характеристик с помощью модуля «Зональная статистика» в программе QGIS. Для выявления роли климатических и ландшафтных характеристик местообитаний в пространственной дифференциации лесных сообществ на УП в программе STATGRAPHICS Centurion XV Version 15.1.02 было проведено два иерархических кластерных анализа (метод Nearest Neighbor (Single Linkage), distance metric: Squared Euclidean). При проведении кластерного анализа использовались средние значения климатических характеристик и морфометрических показателей рельефа.

В таблице 1 приведены некоторые рассчитанные по слоям Bioclim средние показатели местообитаний лесных сообществ союзов ЮУ.

Таблица 1 Некоторые средние показатели климатических характеристик местообитаний лесных сообществ союзов Южного Урала

Союз,С,254	bio01	bio05	bio06	bio09	bio10	bio11	bio17	bio19
Aconito lycoctoni–Tilion cordatae	2,6	23,4	-16,9	-8,4	17,9	-13,4	87,7	96,6
Tilio cordatae-Pinenion sylvestris	1,9	22,6	-17,6	-9,1	17,1	-14,1	84,6	89,5
Lathyro pisiformis-Quercion roboris	1,2	21,8	-18,0	-9,5	16,3	-14,4	108,4	116,7
Trollio europaea-Pinion sylvestris	1,8	22,5	-17,7	-9,0	17,0	-14,0	71,2	76,6
Brachypodio pinnati-Pinion sylvestris	2,3	23,0	-17,1	-8,4	17,5	-13,5	76,9	83,5
Caragano fruticis-Pinion sylvestris	3,0	24,0	-16,6	-8,1	18,4	-13,0	73,4	80,3
Dicrano-Pinion	2,6	23,3	-16,8	-8,2	17,8	-13,3	73,1	79,2
Aconito septentrionalis-Piceion obovatae	0,8	21,3	-18,4	-9,8	15,8	-14,8	71,6	77,8
Piceion excelsae	0,1	20,4	-19,0	-10,4	15,0	-15,4	69,0	75,5
Oxycocco-Empetrion	-1,3	18,9	-20,3	-11,7	13,4	-16,6	73,1	80,9
Alnion incanae	1,6	22,1	-17,8	-9,1	16,7	-14,1	63,6	69,6

Примечание: Приведены параметры со статистически-значимыми различиями средних. bio 1 – среднегодовая температура; bio 5 – максимальная среднесуточная температура июля; bio 6 –минимальная среднесуточная температура января; bio 9 – средняя температура самого сухого квартала (январь-март); bio 10 – средняя температура лета; bio 11 – средняя температура зимы; bio 17 – количество осадков в самом сухом кварталае (январь-март); bio 19 – количество осадков за зимние месяцы

Результаты кластерного анализа местообитаний союзов лесной растительности горно-лесной зоны РБ по ландшафтным и климатическим характеристикам приведены на рис. 1.

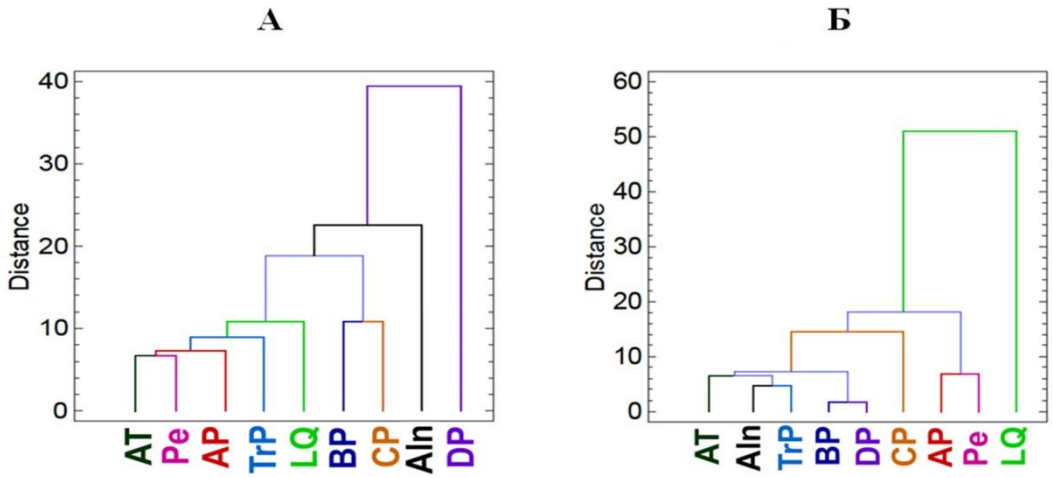


Рис. 1. Дендрограммы сходства/различия местообитаний сообществ союзов лесной растительности горно-лесной зоны Республики Башкортостан (А – по характеристикам рельефа, Б – по климатическим характеристикам)

Примечание: AT –союз Aconito septentrionalis-Tilion cordatae; Pe – союз Piceion excelsae; AP – союз Aconito septentrionalis-Piceion obovatae; Tr-P – Trollio europaea-Pinion sylvestris; LQ – Lathyro pisiformis-Quercion roboris; BP – союз Brachypodio pinnati-Pinion sylvestris; CP – союз Caragano fruticis-Pinion sylvestris; Aln – союз Alnion incanae; DP – Dicrano-Pinion

По рельефу выделяется четыре основных кластера (рис. 1А). Наиболее сильно от других союзов по наибольшим значениям индекса пересеченности, LS-фактора, плановой кривизны, крутизны склона и наименьшим значениям индекса TWI отделяется союз Dicrano-Pinion. В пределах следующего кластера по наименьшим

значениям индекса конвергенции и наибольшим значениям TWI отделяется союз Alnion incanae. Отдельную группу образуют союзы Caragano fruticis-Pinion sylvestris и Brachypodio pinnati-Pinion sylvestris. Они отличаются наибольшими значениями индекса пересеченности, LS-фактора, крутизны и инсолируемости склонов и наименьшими значениями TWI. В пределах оставшихся союзов по рельефу наиболее близки сообщества еловых лесов Piceion excelsae и Aconito septentrionalis-Piceion obovatae. Союз Aconito septentrionalis-Tilion cordatae отличается от ельников меньшей высотой над у.м. и меньшей крутизной склонов. Союз Lathyro pisiformis-Quercion roboris отличается от других союзов наибольшими значениями индекса конвергенции и приуроченностью к инсолируемым не сильно крутым склонам. Союз Trollio europaea-Pinion sylvestris отделился по наибольшим значениям индекса пересеченности, LS-фактора, крутизны склона и наименьшим значениям TWI.

По климату наибольшее различие имеет Lathyro pisiformis-Quercion roboris, который отделяется от других союзов наибольшими значениями зимних и летних осадков (рис. 1Б). Следующий кластер отделяет еловые леса двух союзов Piceion excelsae и Aconito septentrionalis-Piceion obovatae. Они отделяются от других союзов по более низким температурам летних и зимних месяцев. Следующий кластер отделяет союз Caragano fruticis-Pinion sylvestris. Этот союз отделяется от оставшихся по более высоким температурам летних и зимних месяцев и по меньшему количеству осадков летом. Союзы BP и DP, представляющие собой зеленомошные сосняки близки по климатическим показателям и отличаются от остальных союзов более высокой среднегодовой температурой и большим количеством летних осадков. Союз Aconito septentrionalis-Tilion cordatae отличается от союзов Alnion incanae и Trollio europaea-Pinion sylvestris более высокими летними температурами и большим годовым количеством осадков.

В целом для изучаемой территории характерно сильное различие среднегодовой температуры воздуха в местообитаниях разных союзов лесной растительности (до 4,2°C) и значительные различия по количеству среднегодовых осадков (до 265 мм/год). Это обуславливает на ЮУ большую роль в дифференциации местообитаний растительных сообществ температуры воздуха и количества осадков. При этом ведущими климатическими факторами в дифференциации сообществ на ЮУ являются зимние температуры и количество летних и зимних осадков. По результатам кластерного анализа по ландшафтным характеристикам установлено, что на ЮУ меньшую роль играют показатели крутизны и экспозиции склонов, а ведущими параметрами рельефа являются показатели, определяющие снос или накопление влаги и мелкозема (плановая и профильная кривизна, крутизна склона, LS-фактор, индекс влажности TWI).

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190060-6.

Литература

Chapin F.S. Callaghan T., Bergeron Y., Fukuda M., Johnstone J.F., Juday G., Zimov S.A. Global Change and the Boreal Forest: Thresholds, Shifting States or Gradual Change? // Ambio. 2004. V. 3, №. 6. P. 361–365.

Karger D.N., Conrad O., Böhner J., Kawohl T., Kreft H., Soria-Auza R.W., Zimmermann N.E., Linder H.P., Kessler M. Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas // Sci. Data, 2017, № 4. 20 p.

Kinnell P.I.A. Alternative Approaches for Determining the USLE-M Slope Length Factor for Grid Cells – текст электронный // 2005. Режим доступа: http://soil.scijournals.org/cgi/content/full/69/3/674

Palmer M.A. Ambrose R.F., Poff N.L. Ecological theory and community restoration ecology // Restoration Ecology. 1997. № 5. P. 291–300.

Shaffer G.P. Gosselink G.J. The Mississippi river alluvial plain // The world' largest wetlands. Ecology and conservation. - Campbridge: Univ. Press. 2005. – P. 272-315.

Sørensen R. Zinko U., Seibert J. On the calculation of the topographic wetness index: evaluation of different methods based on field observations // Hydrol. Earth Syst. Sci. 2006. № 10. P. 101–112.

Watkins R. Terrain metrics and landscape characterization from bathymetric data: SAGA GIS Methods and Command Sequences // Report prepared for the Ecospatial Information Team – Honolulu, HI, under NOAA contract number WE-133F-15-SE-0518. 2015. – 46 p.

Westhoff V. Maarel E. The Braun-Blanquet approach. Classification of plant communities / ed. R.H. Whittaker. – The Hague. 1978. – P. 287-399.

Восточноевропейские леса: история в голоцене и современность. Т. 2. / Отв. ред. О. В. Смирнова. – М.: Наука, 2004. – 575 с.

Крышень А.М. Растительные сообщества вырубок Карелии – М.: Наука, 2006. – 262 с.

Лукина Н.В., Исаев А.С., Крышень А.М., Онучин А.А., Сирин А.А., Гагарин Ю.Н., Барталев С.А. Приоритетные направления развития лесной науки как основы устойчивого управления лесами // Лесоведение. 2015. № 4. С. 243–254.

Мартыненко В. Б. Синтаксономия коренных зональных лесов Южно-Уральского региона и их горных аналогов // Разнообразие и динамика лесных экосистем России. Т. 2.: под редакцией А.И. Исаева. – М.: Тов-во научных изданий КМК. 2013. – С. 67–128.

Миркин Б.М., Наумова Л. Г. Современное состояние основных концепций науки о растительности. – Уфа: АН РБ, Гилем. 2012. – 488 с.

Свидзинская Д. Основные геоморфометрические параметры: теория – текст электронный // 2013. Режим доступа: https://gis-lab.info/qa/geomorphometric-parameters-theory.html

THE INFLUENCE OF CLIMATIC AND TOPOGRAPHIC PARAMETERS ON THE DISTRIBUTION OF FOREST COMMUNITIES OF THE MOUNTAIN-FOREST ZONE OF THE BASHKORTOSTAN REPUBLIC

S.N. Zhigunova

Ufa Institute of Biology, Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, Zigusvet@yandex.ru

Annotation. The influence of climatic characteristics and morphometric parameters of the relief on the distribution and spatial confinement of forest communities of the alliances level in the Southern Urals has been studied. It has been established that the leading climatic factors in the differentiation of alliances are winter temperatures and the amount of summer and winter precipitation. The leading parameters of the relief are indicators that determine the drift or accumulation of moisture and fine grained soil (plane and profile curvature, slope steepness, LS factor, TWI)

Keywords: forest communities, GIS technologies, Bioclim, topographic parameters, Southern Urals

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕВЫПАСА НА РАЗНОТРАВНО-ЗЛАКОВЫЕ СТЕПИ В ГОСУДАРСТВЕННОМ ПРИРОДНОМ ЗАПОВЕДНИКЕ «ДАУРСКИЙ» (ЮЖНАЯ ДАУРИЯ).

Л.И. Сараева[1], Т.Е. Ткачук[1,2]

[1] ФГБУ «Государственный природный заповедник «Даурский», Нижний Цасучей, Россия, bagul72@mail.ru

[2] ФГБОУ ВО «Забайкальский государственный университет», Чита, Россия, tetkachuk@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты изменений разнотравно-злаковой степной растительности в Государственном природном заповеднике «Даурский» (Южная Даурия) за период с 2012 по 2020 гг., под влиянием перевыпаса скота. На профиле выявлено обеднение видового состава и смены доминантов на устойчивые к выпасу виды (*Carex duriuscula, Cleistogenes squarrosa*), снижение в травостое его проективного покрытия, ветоши, высоты. Зарегистрировано разрушение дернин и слоя ветоши, приводящее к водной и ветровой эрозии почвы. Стадия пастбищной дигрессии оценена, как «сильное влияние выпаса» и «полусбой».

Ключевые слова: степь, фитоценозы, перевыпас, пастбищная дигрессия, Южная Даурия

Южные районы Забайкальского края характеризуются равнинными и увалистыми степными ландшафтами и биогеографически относятся к Южной Даурии [Малышев, Пешкова, 1984]. Степи здесь имеют горный характер, что проявляется в большом участии стержнекорневого разнотравья и мелкодерновинных злаков. Для данной территории традиционным является пастбищное содержание скота, местами круглогодичное. В последние годы в этих районах наблюдается рост поголовья сельскохозяйственных животных. В данных обстоятельствах в местах наибольшей концентрации поголовья домашнего скота отмечается прогрессирующая деградация степных сообществ. Возросшая пастбищная нагрузка начинает представлять собой проблему и для ООПТ. На территории Даурского заповедника и его охранной зоны нами ведется мониторинг растительности на ряде постоянных профилей и площадок. Некоторые профиля в охранной зоне заповедника, наблюдаемые нами длительное время, в последние годы оказались под влиянием выпаса.

Для района исследования при низкой пастбищной нагрузке характерны разнотравно-злаковые степи с содоминированием *Stipa krylovii* Roshev, *Festuca litvinovii* (Tzvelev) E. Alexeev, *Agropyron cristatum* (L.) Gaertner, *Koeleria cristata* (L.) Pers s. str., *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam, *Saussurea salicifolia* (L.) DC, *Serratula centauroides* L., *Bupleurum bicaule* Helm, *Stellera chamaejasme* L., *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Haplophyllum dahuricum* (L.) A. Juss и др. Почвы каштановые, легкого механического состава, каменисто-щебнистые по вершинам и слабокаменистые по склонам. Материал для исследования собран на геоботаническом профиле, расположенном от вершины г. Змеиная до вершины г. Куку-Ходан, состоящем из 30 площадок по 100 м², общей протяженностью 2100 м. Геоботанические описания растительности профиля проведены в 2012 и 2020 гг. по стандартной методике.

Цель работы – анализ изменений разнотравно-злаковой степной растительности в Государственном природном заповеднике «Даурский», за период с 2012 по 2020 гг., под влиянием увеличения выпаса скота.

В 2020 г. нами обнаружено сильное влияние выпаса скота со скотоводческой стоянки, находящейся в 1,8 км от г. Змеиная и в 4 км от г. Куку-Ходан, на состояние растительности трансекты. Особенно сильная пастбищная дигрессия наблюдалась на части профиля, расположенной в ложбине между сопками. Травостой сильно разрежен, видовой состав его обеднен, особенно видами разнотравья: *Stellera chamaejasme, Scutellaria baicalensis, Filifolium sibiricum* и др. Бывшие доминанты (*Stipa*

krylovii, Stipa grandis P. Smirnov, *Achnatherum sibiricum* (L.) Keng ex Tzvelev) замещаются устойчивыми к вытаптыванию низкорослыми видами: *Carex duriuscula, Cleistogenes squarrosa, Cymbaria dahurica* L., *Caragana microphylla* Lam (см. таблицу).

Таблица 1. Смена сообществ на профиле Змеиная – Куку-Ходан с 2012 г. по 2020 г.

№ площадки, местообитание	Растительные сообщества в 2012 г.	Растительные сообщества в 2020 г.
Т.5 нижняя часть ю-ю-в склона г.Змеиная; уклон 12°	*Stipa krylovii – Leymus chinensis – Artemisia scoparia*	*Cleistogenes squarrosa – Carex duriuscula*
Т.7 подножие ю-ю-в склона г.Змеиная, уклон 5°	*Stipa krylovii – Stipa grandis – Cleistogenes squarrosa–Bupleurum scorzonerifolium*	*Cleistogenes squarrosa – Stipa krylovii*
Т.19 ложбина в подножии северного склона г.Куку-Ходан	*Achnatherum sibiricum– Cleistogenes squarrosa – Serratula centauroides – Artemisia frigida*	*Carex duriuscula – Caragana microphylla*
Т. 20 подножие северного склона г.Куку-Ходан	*Achnatherum sibiricum – Cleistogenes squarrosa –Serratula centauroides*	*Carex duriuscula– Caragana microphylla*
Т. 26 нижняя часть северного склона г. Куку-Ходан	*Stipa krylovii – Leymus chinensis – Achnatherum sibiricum*	*Carex duriuscula – Leymus chinensis*
Т. 27 верхняя субгоризонтальная (1°) часть педимента северного склона г.Куку-Ходан	*Stipa krylovii – Leymus chinensis – Cleistogenes squarrosa*	*Carex duriuscula – Leymus chinensis – Cleistogenes squarrosa*

В 2020 г. в большинстве сообществ *Cleistogenes squarrosa* и *Carex duriuscula* вышли на позиции доминантов. Наиболее показательно доминирование последнего вида. Обычно осочка твердоватая присутствует в степных сообществах в крайне малом обилии и малозаметна, ее доминирующее положение указывает на глубокое преобразование сообществ. Ковыль и вострец, местами остаются еще в группе содоминирующих видов, но в очень угнетенном состоянии, описываемые дерновины ковыля сильно фрагментированы, а *Achnatherum sibiricum* выпал из травостоя полностью.

Травостой в значительной мере объеден скотом на высоте 5–10 см, даже степной кустарник *Caragana microphylla* имеет угнетенный вид и поврежденные на высоте около 20 см побеги. Чрезмерное объедание скотом приводит к тому, что растения не успевают сформировать генеративные побеги и обсемениться, что влияет на почвенный банк семян.

В ряде случаев, на площадках отмечено низкое проективное покрытие ветоши, которая выбита копытами животных, как и дернина. В результате развивается водная и ветровая эрозия, смытость почвы на склонах достигает 7–8 см, кое-где начинают формироваться промоины. В ложбине и в нижней части склонов скотом натоптаны тропы, одна из самых крупных имеет ширину 80 см и глубину 5 см. При описаниях на площадках профиля отмечен состав и количество экскрементов сельскохозяйственных животных, составившее 20–60 единиц экскрементов КРС и 1–8 – коней; покрытие поверхности почвы навозом достигает 2%.

Пространственная структура травостоя, с 2012 по 2020 гг., сильно изменилась. Сообщества стали очень однородными. Проективное покрытие травостоя снизилось в среднем в 3,7 раза, чаще всего в 2,5 раза (рис. 1).

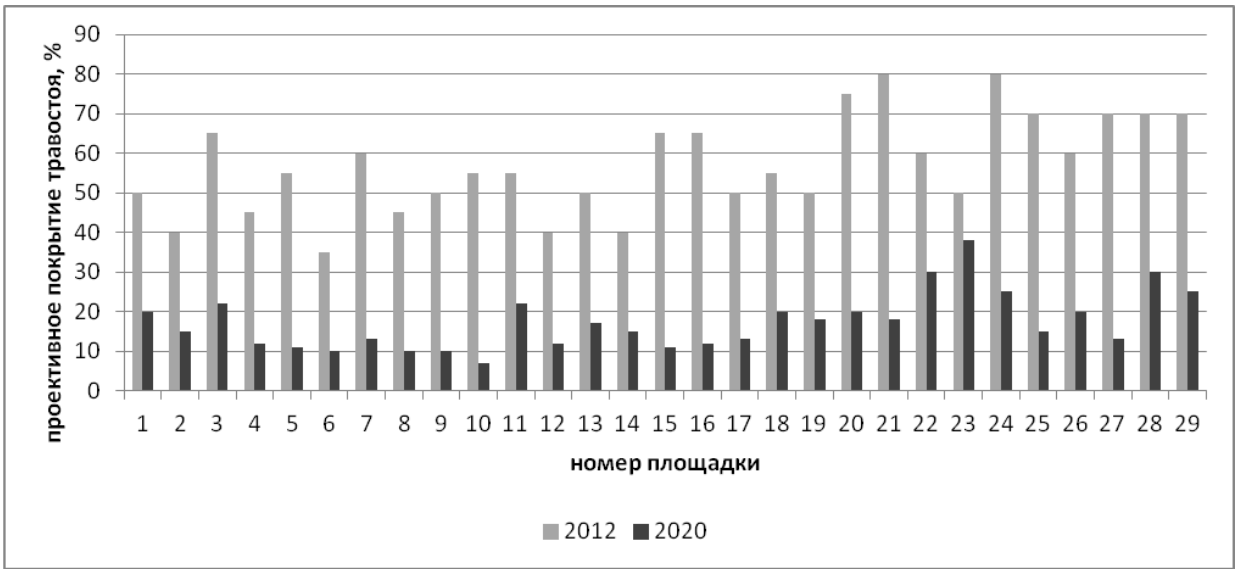


Рис. 1. Проективное покрытие травостоя на постоянных пробных площадях на профиле Змеиная – Куку-Ходан с 2012 г. по 2020 г.

Обращает на себя внимание наиболее сильное снижение проективного покрытия на площадках, расположенных в нижней части склонов и ложбине между сопками, где в 2012 году оно было наиболее высоким. Данный факт указывает именно на избирательное действие фактора, вызвавшего снижение: скот охотнее пасется в биотопах, где травостой богаче и поверхность почвы более пологая.

Высота травостоя так же снизилась в несколько раз (рис. 2). Два первых яруса, которые отмечались в 2012 г., отсутствуют за счет выпадения из травостоя разнотравья и генеративных побегов злаков и за счет уменьшения высоты вегетативных побегов злаков.

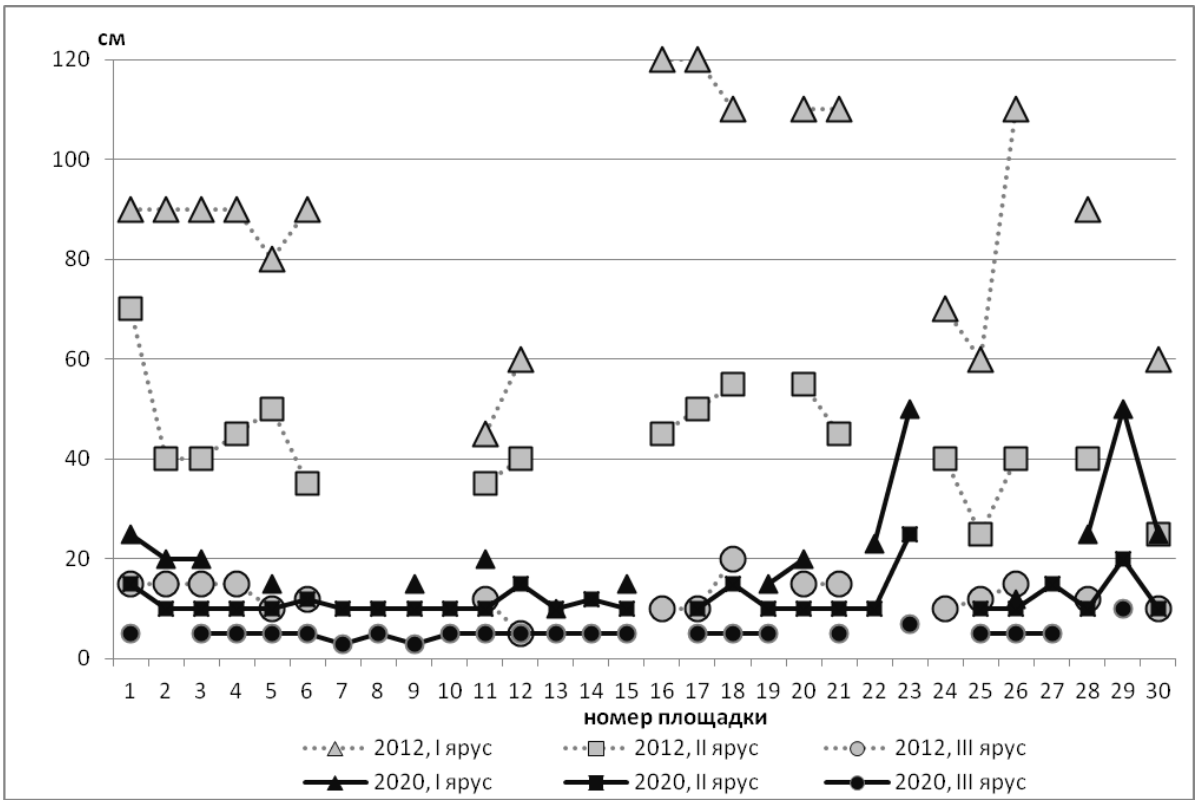


Рис. 2. Высота ярусов травостоя в сообществах на геоботаническом профиле в 2012 и 2020 гг

В 2020 году в травостое так же выделялись ярусы, но высота первого яруса, как правило, не превышала 20 см, при этом преобладающим оказывался второй или даже третий ярус. В некоторых случаях травостой был двухъярусным.

В целом растительность в пределах профиля стала очень однородной, как внутри фитоценозов, так и по профилю. Состояние травостоя и почвы в разных частях профиля позволяет оценить наблюдаемые стадии пастбищной дигрессии как «сильное влияние выпаса» и «полусбой» [Раменский и др., 1956].

Таким образом, в районе геоботанического профиля наблюдается пастбищная дигрессия, выражающаяся в снижении проективного покрытия и высоты травостоя, разрушении дернин, обеднении видового состава и доминировании устойчивых к выпасу многолетников.

Литература

Малышев Л.И., Пешкова Г.А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск, 1984. 266 с.

Раменский Л.Г., Цаценкин И.А., Чижиков О.Н., Антипин Н.А. Экологическая оценка кормовых угодий по растительному покрову. М., 1956. 472 с.

INFLUENCE OF OVERGASSING ON MULTIPLE-CEREAL STEPPES IN SOUTH DAURIA

L.I. Saraeva*[1], T.E. Tkachuk[1,2]

[1] FSBI "State Natural Reserve "Daursky", Nizhny Tsasuchey, Russia, bagul72@mail.ru

[2] Transbaikal State University, Chita, Russia, tetkachuk@yandex.ru

Annotation. The article presents the results of changes in vegetation, from 2012-2020, under the influence of overgrazing. The profile revealed a depletion of the species composition and the change of dominants to grazing-resistant species (*Carex duriuscula*, *Cleistogenes squarrosa*), a decrease in the grass stand of its projective cover, rags, and height. The destruction of the sod and the layer of rags, the erosion of the soil, leading to water and wind erosion were recorded. The stage of pasture digression was assessed as “strong influence of grazing” and “semi-slaughter”.

Keywords: steppe, phytocenoses, overgrazing, pasture digression, South Dauria.

АНАЛИЗ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА *HEDYSARUM ARGYROPHYLLUM* LEDEB. НА ЮЖНОМ УРАЛЕ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

Ю.А. Федорова, А.А. Мулдашев, А.Г. Кутуева

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия, y.fedorova383@gmail.com

Аннотация. В работе рассмотрено распространение эндемичного степного вида *Hedysarum argyrophyllum* Ledeb. Потенциальный ареал включает в себя южную оконечность Южного Урала, и доходит до юга Бугульмино-Белебеевской возвышенности. На западе потенциальный ареал совпадает с восточной частью ареала близкого вида *Hedysarum grandiflorum* Pall., однако дифференцируется с ним географически и экологически.

Ключевые слова: *Hedysarum argyrophyllum*, редкий вид, потенциальный ареал, MaxEnt

Для охраны редких и исчезающих видов необходимо понимать их требования к среде, а также факторы, лимитирующие их распространение. В работе рассматривается потенциальный ареал и лимитирующие факторы распространения копеечника серебристолистного *Hedysarum argyrophyllum* Ledeb. (Fabaceae), петрофитного вида, эндемичного для Южного Урала. Некоторые авторы рассматривают *H. argyrophyllum* как подвид или географическую расу *H. grandiflorum*, которая отличается от него некоторыми аспектами опушения и морфологии венчика, а также лилово-пурпурным цветом венчика [Федченко, 1948]. В этой работе *H. argyrophyllum* рассматривается как отдельный вид, близкородственный к *Hedysarum grandiflorum* Pall., который также встречается на Южном Урале.

H. argyrophyllum – многолетнее травянистое растение 25–40 см высотой с длинным стержневым корнем [Федченко, 1948]. Этот вид является редким для Южного Урала и включен в Красные книги Республики Башкортостан [Красная книга, 2011], Челябинской [Красная книга, 2017] и Оренбургской областей [Красная книга, 2019]. Целью работы являлся анализ потенциального ареала и основных факторов, влияющих на распространение *H. argyrophyllum.*

Модель потенциального ареала построена в программном обеспечении MaxEnt 3.4.1 [Phillips et al., 2021]. В качестве исходного материала для моделирования использованы данные о 81 местонахождении вида с точными геопривязками, взятых из гербарных этикеток Гербария УИБ УФИЦ РАН (UFA), а также данных GBIF [GBIF, 2021a] и публикаций [Абрамова и др., 2019]. Для предотвращения переобучения модели использованы локалитеты, расположенные не ближе чем в трех километрах друг от друга. Локалитеты близкого вида *H.grandiflorum* приведены по данным [GBIF, 2021b].

В качестве переменных среды использован набор из 19 биоклиматических переменных BIOCLIM [Nix, 1986; Booth et al., 2014] из базы данных CHELSA [Karger et al., 2017]. Для характеристики рельефа использованы переменные цифровой модели рельефа GMTED2010 [Danielson, Gesch, 2011]. Так как изучаемый вид является петрофитным, были также использованы данные о содержании крупных частиц почвы (> 2 мм) в поверхностном слое от 0 до 5 см [Poggio et al., 2021]. Разрешение всех слоев переменных составляло 30 угловых секунд. В качестве минимального порога пригодности использован порог Maximum test sensitivity plus specificity. В случае высокой корреляции двух переменных при моделировании (тест Пирсона > 0,7) в модели использовалась только одна экологически более значимая переменная.

Рассчитанная модель потенциального ареала *H. argyrophyllum* показана на рисунке 1. По степени пригодности условия местообитания разделены на три градации: с низкой (0,37 – 0,58), средней (0,58 – 0,79) и высокой пригодностью (0,79 – 1,00). Кроме потенциального ареала *H. argyrophyllum* на рисунке 1 приведены известные

местонахождения близкого вида *H. grandiflorum*. На рисунке видно, что два вида пространственно дифференцированы друг с другом. Вид с более широким географическим и экологическим ареалом, *H. grandiflorum*, встречается на территории Республики Башкортостан и Оренбургской области в местообитаниях, которые для *H. argyrophyllum* являются низкопригодными или непригодными, что свидетельствует о потенциальной большей засухоустойчивости *H. argyrophyllum* и его приуроченности к более каменистым склонам.

Рис. 1. Потенциальный ареал *Hedysarum argyrophyllum* Ledeb. и локалитеты близкого к нему вида *Hedysarum grandiflorum* Pall. на Южном Урале

Высоко- и среднепригодные условия местообитания *H. argyrophyllum* распространены на Южной оконечности Южного Урала, включая Предуралье, Зилаирское плато и Зауралье. Они также распространены южнее в Оренбургской области вплоть до территории Казахстана, где средне- и высокопригодные условия местообитания постепенно заменяются на низкопригодные. Вдобавок они встречаются в юго-западной части Челябинской области. Западнее, в Самарской и Саратовской областях также присутствуют низкопригодные условия местообитания этого вида, однако *H. argyrophyllum* на этих территориях замещается на вид *H. grandiflorum*. Северная граница потенциального ареала не выходит за пределы центральной части Республики Башкортостан.

Значительный вклад в модель потенциального ареала *H. argyrophyllum* (77%) имеют температурные характеристики, обусловливающие континентальный засушливый климат. Наиболее значимыми при построении модели являлись следующие переменные: температурная сезонность, минимальная температура наиболее холодного месяца и количество осадков в наиболее теплый квартал.

Наибольший процентный вклад в модель при этом внесла температурная сезонность, отражающая континентальность климата, характерную для степных ландшафтов вследствие отсутствия сглаживающих перепады температуры элементов ландшафта (крупные водоемы, леса и т.д.). Изотермальность, также, как и температурная сезонность, отражает континентальность климата.

В построение модели также имели вклад два фактора среды, характеризующих режим увлажнения: количество осадков в наиболее холодный и теплый кварталы. Больший вклад имело количество осадков в наиболее холодный квартал, которое определяет весеннюю влагообеспеченность почвы. Меньшая роль количества осадков в наиболее теплый квартал связана с биологическими особенностями вида, а именно корневой системы, которая позволяет достигать горизонтов сохранения влажности в грунте даже в условиях экстремальной засухи. Несмотря на произрастание рассматриваемого вида в петрофитных степях, вклад в модель каменистости верхнего слоя почвы составляет всего 3,7%.

Проведенное исследование показывает, что в целом по экологическим требованиям виды *H. argyrophyllum* и *H. grandiflorum* достаточно хорошо дифференцированы друг от друга. Вид *H. argyrophyllum* отличается приуроченностью к более ксерофитным и каменистым местообитаниям. Почти все его известные локалитеты попадают в области с высокой и средней пригодностью условий местообитания. Специфика местообитаний соответствует литературным данным об особенностях горно-лесостепных ландшафтов конца плейстоцена (распространение петрофитных степных ландшафтов с аридным климатом) [Крашенинников, 1937]. В настоящее время еще одним лимитирующим фактором распространения этого вида является выпас скота, который с одной стороны создает условия для возобновления этого вида, а с другой – растения поедаются животными и повреждаются их копытами.

Литература

Абрамова Л.М., Мустафина А.Н, Каримова О.А. Шигапов З.Х. Структура и состояние популяций трех редких видов рода Hedysarum (Fabaceae) на Южном Урале // Ботанический Журнал. 2019. Т. 104 (5). С. 729–740. https://doi.org/10.1134/S0006813619040021

Красная книга Оренбургской области: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. Изд. 2-е, доп. и перераб. Воронеж: ООО «МИР», 2019. – 488 с.

Красная книга Республики Башкортостан: в 2-х т. Т. 1. Растения и грибы. 2-е изд. доп. и перераб. /под ред. д-ра биол. наук, проф. Б.М. Миркина. Уфа: МедиаПринт, 2011. – 384 с.

Красная книга Челябинской области: животные, растения, грибы. Изд. 2-е, М. ООО «Реарт», 2017. – 504 с.

Крашенинников И. М. Анализ реликтовой флоры Южного Урала в связи с историей растительности и палеогеографией плейстоцена // Сов. ботаника, 1937. № 4. С. 10-35

Федченко Б.А. Копеечник – Hedysarum L. // Флора СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. Т. 13. С. 301–318.

Danielson J.J., Gesch D.B. Global multi-resolution terrain elevation data 2010 (GMTED2010). 2011. US Department of the Interior, US Geological Survey. 26 p. https://doi.org/10.5066/F7J38R2N

GBIF.org 2021a Hedysarum argyrophyllum Ledeb. 26 May 2021 URL: https://doi.org/10.15468/dl.qnuzwx

GBIF.org 2021b Hedysarum grangiflorum Pall. 29 July 2021 URL: https://doi.org/10.15468/dl.fmnj3p

Phillips S.J., Dudík M., Schapire R.E. [Internet] Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). URL: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/. Accessed on 2021-8-9.

Nix H.A. A Biogeographic Analysis of Australian Elapid Snakes. 1986. In: Longmore, R., Ed., Atlas of Elapid Snakes of Australia. Australian Flora and Fauna Series 7. Canberra: Australian Government Publishing Service. P. 4–15.

Booth T.H., Nix H.A., Busby J.R., Hutchinson M.F. BIOCLIM: the first species distribution modelling package, its early applications and relevance to most current MAXENT studies // Diversity and Distributions. 2014. V. 20 (1). P. 1–9. https://doi.org/10.1111/ddi.12144

Karger D.N. et al. Climatologies at high resolution for the Earth land surface areas // Scientific Data. 2017. V. 4 P. 170122. https://doi.org/10.1038/sdata.2017.122

Poggio L. et al. SoilGrids 2.0: producing soil information for the globe with quantified spatial uncertainty // Soil. 2021. V. 7(1). P. 217–240. https://doi.org/10.5194/soil-7-217-2021

ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION PATTERNS OF THE ENDEMIC SPECIES *HEDYSARUM ARGYROPHYLLUM* LEDEB. IN THE SOUTHERN URALS AND ADJACENT TERRITORIES

Y.A. Fedorova, A.A. Muldashev, A.G. Kutueva

Ufa Institute of biology UFRC RAS, Ufa, Russia, y.fedorova383@gmail.com

Annotation. The paper considers the distribution of the endemic steppe species *Hedysarum argyrophyllum* Ledeb. The species' potential range includes the southern tip of the Southern Urals and reaches the south of the Bugulmino-Belebeyevskaya Upland. In the west, the potential area coincides with the eastern part of the range of the closely related species *Hedysarum grandiflorum* Pall. However, the species differentiate geographically and ecologically

Keywords: *Hedysarum argyrophyllum*, rare species, potential range, MaxEnt

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

ВКЛАД ЭНДОГЕННЫХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ В РЕГУЛЯЦИЮ ВЫЗЫВАЕМЫХ ЦИТОКИНИНОМ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНОМ ПЕРЕСТРОЕК В ПРОТЕОМЕ И ТИРОЗИНОВОМ ФОСФОПРОТЕОМЕ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова

ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Россия, avalbaev@yahoo.com

Аннотация. С использованием брассиназола (БЗ), ингибитора синтеза брассиностероидов (БС), выявлен важный вклад эндогенных БС в регуляцию перестроек протеома и фосфопротеома побегов пшеницы, что свидетельствует о важной роли БС в контроле роста проростков пшеницы. Вместе с тем, БЗ оказал слабое влияние на вызываемые цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) изменения в протеоме и фосфопротеоме, что свидетельствует о наличии независимых от эндогенных БС путей реализации физиологических эффектов цитокининов на растения пшеницы.

Ключевые слова: брассиностероиды, брассиназол, цитокинины, протеом, тирозиновое фосфорилирование

Ранее нами были получены приоритетные сведения о том, что гормоны цитокинины, играющие фундаментальную роль в жизнедеятельности растений, могут служить гормональными интермедиатами в проявлении ростстимулирующего и антистрессового действия на растения 24-эпибрассинолида (ЭБ), яркого представителя фитогормонов брассиностероидов (БС) [Yuldashev et al., 2012; Shakirova et al., 2016], что указывает на активное влияние этих гормонов на метаболизм клеток, центральным звеном которого является синтез белка. Вместе с тем, поскольку регуляция физиологических программ в растительном организме происходит в тесной связи различных групп фитогормонов, то не исключено и обратное влияние брассиностероидов на контролируемые цитокининами физиологические процессы в растениях пшеницы. В связи с этим, цель данной работы: с использованием ингибитора биосинтеза брассиностероидов брассиназола (БЗ) выявить вклад эндогенных БС в реализацию вызываемых цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) физиологических эффектов на растения пшеницы, в частности изменений в протеоме и фосфопротеоме побегов проростков пшеницы.

Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев. Семена после стерилизации проращивали на светоплощадке в течение 3 суток (16 часовой световой день, 15 клк) при 22-24˚С. После отделения эндосперма 3-суточные проростки корнями помещали в стаканы с раствором 2%-ной сахарозы в смеси с 10 мкМ брассиназола на сутки. Затем 4-суточные проростки переносили на свежую смесь 2%-ной сахарозы с 10 мкМ БЗ с добавлением 0.04 мкМ БАП и инкубировали в смеси в течение 7 ч. Контролем служили не подвергнутые действию БАП и БЗ проростки.

Для анализа использовали побеги, которые отделяли от корней и фиксировали в жидком азоте. Экстракцию растворимых белков проводили с помощью буфера, содержащего: 50 мМ Hepes−KOH, pH 7.5; 1 мМ дитиотрейтол (ДТТ); 1 мМ фенилметилсульфонилфторид; 10 мМ ЭГТА; 0.1 мМ ортованадат натрия; 1 мМ теофиллин и 3% поливинилпирролидон. Гомогенат центрифугировали при 12000 g и 4°С в течение 10 мин. Белки супернатанта осаждали ледяным 80% ацетоном, промывали 3 раза ледяным ацетоном и растворяли в изофокусирующем буфере (8 М мочевина, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат), 30 мМ ДТТ, 0.3% амфолиты, pH 3–10, 20 мМ Трис-буфер солевой с Твином 20.

Белки разделяли методом двумерного электрофореза (2DE), количество нанесенного белка составляло 150 мкг [Федина и др., 2006]. Для визуализации полипептидов и их количественной оценки пластины геля окрашивали Кумасси G-250. Для выявления белков, фосфорилированных по тирозину, использовали иммуноблоттинг со специфичными к фосфотирозину антителами PY20 (“Amersham”, Англия), согласно [Федина и др., 2006].

Для идентификации белков из геля вырезали белковые пятна и проводили триптический гидролиз белка. Масс-спектры фрагментов белков получали на тандемном MALDI-TOF-TOF масс-спектрометре Ultraflex II («Bruker», Германия), оснащенном УФ-лазером, в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск белков осуществлялся в базах данных NCBI и UniProt (подбаза – растения). Регистрацию масс-спектров и идентификацию белков проводили в Междисциплинарном центре протеомных исследований при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Эксперименты проводили в двух–трех повторностях.

Эффективным инструментом в выяснении роли эндогенных БС в регуляции физиологических процессов в растениях является использование в опытах специфических ингибиторов их биосинтеза, в частности, брассиназола [Nagata et al., 2001]. Благодаря использованию ингибиторов биосинтеза БС, в том числе БЗ, получены убедительные доказательства необходимости этой уникальной группы фитогормонов для растений на протяжении всего онтогенеза [Nagata et al., 2001; Bajguz et al., 2020].

Характерным ответом растений на применение ингибиторов биосинтеза БС является резкое торможение роста растений, что неудивительно, поскольку БС хорошо известны прежде всего своим ростстимулирующим действием [Bajguz et al., 2020]. В наших экспериментах применение БЗ также способствовало ингибированию роста проростков пшеницы. Далее методом двумерного электрофореза мы провели анализ содержания растворимых белков побегов проростков пшеницы под влиянием обработки БАП в присутствии и отсутствии брассиназола в среде инкубирования проростков. Проведение 2DE в диапазоне pH 3-10 позволило на электрофореграммах выявить свыше сотни растворимых белков в побегах проростков. С помощью MALDI-TOF масс спектрометрии нам удалось идентифицировать ряд белков, содержание которых изменялось в ответ на обработку БАП в присутствии и отсутствие ингибитора биосинтеза БС.

Анализ интенсивности окраски белковых пятен показал, что у обработанных БЗ проростков пшеницы были выявлены значительные изменения в белковом спектре побегов. Предобработка ингибитором синтеза БС, тормозящая рост проростков, приводила к уменьшению содержания большинства белков, в частности, идентифицированных нами белков фотосинтеза (предшественник белка, входящего в состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II, малая и большая субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК), активаза РБФК, β-субъединица хлоропластного РБФК-связывающего белка, хлоропластная фруктозо-бисфосфат альдолаза), роста и энергетического обмена растений (актин, α- и β-субъединицы тубулина, β-субъединица митохондриальной АТФ-синтазы). Таким образом, торможение роста под влиянием ингибитора биосинтеза БС может являться следствием уменьшения количественного уровня, прежде всего, белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена растений. Вместе с тем, под влиянием БЗ наблюдалось увеличение содержания защитных белков (хлоропластный 2-цис-пероксиредоксин, глутатион-S-трансфераза, L-аскорбат пероксидаза, белок теплового шока эндоплазмин), что свидетельствует о стрессовой нагрузке на растения пшеницы в ходе обработки ингибитором биосинтеза БС.

В ходе опытов продемонстрировано стимулирующее влияние БАП на протеом побегов проростков пшеницы, что, в частности, сопровождается увеличением содержания белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена растений, что вносит важный вклад в реализацию ростстимулирующего действия этого фитогормона на проростки пшеницы [Авальбаев и др., 2010; Shakirova et al., 2012; Avalbaev et al., 2021]. Вместе с тем, обнаружено, что БЗ практичнски не повлиял на активирующий эффект БАП на протеом проростков, на что указывает лишь слабое уменьшение содержания белков, участвующих в фотосинтезе и регуляции роста и энергетического обмена растений.

Рост и развитие растений осуществляется через регуляцию активности задействованных в этом процессе белков. Регуляция активности полипептидов может происходить на уровне их посттрансляционных модификаций, в частности, фосфорилирования [Wang et al. 2014; Millar et al. 2019]. Фосфорилирование белков по остаткам тирозина менее изучено, чем по остаткам серина и треонина, но недавние исследования показали его важный вклад в регуляцию целого ряда процессов у растительных организмов [Каримова, 2010; Shankar et al., 2015; Sugano et al. 2018]. Поэтому далее представлялось интересным провести анализ действия БАП в присутствии и отсутствие брассиназола на уровень тирозинового фосфорилирования растворимых белков побегов проростков пшеницы.

Анализ тирозинового фосфопротеома в БЗ-обработанных проростках выявил существенное усиление уровня фосфорилирования белков по тирозину некоторых белков (среди которых и белки фотосинтеза, роста и энергетического обмена, защитные белки) и увеличению количества фосфотирозиновых белков в побегах проростков пшеницы. Это указывает на нарушения сигналлинга БС и его значение для нормального функционирования растений. При оценке тирозинового фосфорилирования белков в БАП-предобработанных проростках было обнаружено небольшое повышение числа фосфотирозиновых белков и уровня фосфорилирования по тирозину некоторых полипептидов, в частности, белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена. Можно предположить, что БАП-индуцированное небольшое увеличение уровня тирозинового фосфорилирования белков, непосредственно участвующих в интенсификации метаболизма клеток, может внести свой вклад в проявление рост-стимулирующего эффекта гормона [Shakirova et al., 2012; Avalbaev et al., 2021]. Присутствие ингибитора биосинтеза БС в среде с БАП практически не повлияло на вызываемые БАП сдвиги в тирозиновом фосфорилировании белков побегов.

Таким образом, в проведенных нами экспериментах показано ингибирующее влияние брассиназола на рост, протеом и тирозиновый фосфопротеом побегов проростков пшеницы, что свидетельствует о важном значении эндогенных БС в регуляции физиологических процессов, в частности, процессов фотосинтеза, роста и энергетического обмена растений. При этом подавление синтеза БС не оказало существенного влияния на вызываемые БАП перестройки в протеоме и фосфопротеоме побегов, что демонстрирует наличие независимых от эндогенных БС путей проявления физиологических эффектов цитокининов на растения.

Работа выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А21-121011990120-7) при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-04-00904_а, с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

Литература

Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Фатхутдинова Р.А., Урусов Ф.А., Сафутдинова Ю.В., Шакирова Ф.М. Влияние 24-эпибрассинолида на гормональный статус растений

пшеницы при действии хлорида натрия // Прикл. биохим. микробиол. 2010. Т. 46. С. 109-112.

Каримова Ф.Г. Тирозиновое фосфорилирование белков // Клеточная сигнализация. Казань: Фэн, 2010. С. 37-45.

Федина Е.О., Каримова Ф.Г., Тарчевский И.А. Влияние брассинолида на тирозиновое фосфорилирование белков листьев гороха // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 4. С. 525–532.

Avalbaev A., Allagulova Ch., Maslennikova D., Fedorova K., Shakirova F. Methyl jasmonate and cytokinin mitigate the salinity-induced oxidative injury in wheat seedlings // Journal of Plant Growth Regulation. 2021. V. 40. P. 1741-1752.

Bajguz A., Chmur M., Gruszka D. Comprehensive overview of the brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections // Front. Plant Sci. 2020. 11, 1034.

Millar A.H., Heazlewood J.L., Giglione C., Holdsworth M.J., Bachmair A., Schulze W.X. The scope, functions, and dynamics of posttranslational protein modifications // Annual Review of Plant Biology. 2019. V. 70. P. 119-151.

Nagata N., Asami T., Yoshida S. Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants (*Lepidium sativum*) // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 1006-1011.

Shakirova F., Allagulova Ch., Maslennikova D., Fedorova K., Yuldashev R., Lubyanova A., Bezrukova M., Avalbaev A. Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress // Plant Physiol. Biochem. 2016. V 108. P. 539-548.

Shakirova F., Avalbaev A., Bezrukova M., Fatkhutdinova R., Maslennikova D., Yuldashev R., Allagulova C., Lastochkina O. Hormonal intermediates in the protective action of exogenous phytohormones in wheat plants under salinity // Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants. Eds. Khan N., Nazar R., Iqbal N., Anjum N. Springer. 2012. P. 185-228.

Shankar A., Agrawal N., Sharma M., Pandey A., Pandey G.K. Role of protein tyrosine phosphatases in plants // Curr. Genomics. 2015. V. 16. P. 224-236.

Sugano S., Maeda S., Hayashi N., Kajiwara H., Inoue H., Jiang C.-J., Takatsuji H., Mori M. Tyrosine phosphorylation of a receptor-like cytoplasmic kinase, BSR1, plays a crucial role in resistance to multiple pathogens in rice // The Plant Journal. 2018. V. 96. P. 1137-1147.

Wang Y., Wang Y., Zhao Y.B., Chen D.M., Han Z.H., Zhang X.Z. Protein phosphorylation differs significantly among ontogenetic phases in *Malus* seedlings // Proteome Science. 2014. 12, 31.

CONTRIBUTION OF ENDOGENOUS BRASSINOSTEROIDS IN THE REGULATION OF CYTOKININ 6-BENZYLAMINOPURINE-INDUCED CHANGES IN THE PROTEOME AND TYROSINE PHOSPHOPROTEOME OF WHEAT PLANTS

A.M. Avalbaev, R.A. Yuldashev, Ch.R. Allagulova, F.M. Shakirova

IBG UFRC RAS, Ufa, Russia, avalbaev@yahoo.com

Abstract. With the use of brassinazole (BZ), an inhibitor of the synthesis of brassinosteroids (BRs), an important contribution of endogenous BRs to the regulation of proteome and phosphoproteome changes in wheat shoots was revealed which indicates an important role of BRs in controlling the growth of wheat seedlings. At the same time, BZ had a weak effect on the changes in the proteome and phosphoproteome caused by the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) which points on the presence of pathways independent of endogenous BRs in the realization of the physiological effects of cytokinins on wheat plants.

Keywords: brassinosteroids, brassinazole, cytokinins, proteome, tyrosine phosphorylation

РОЛЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *SCHIZAPHIS GRAMINUM* (ROND.)

В.Ю. Алексеев, С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, А.Р. Касимова, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, valentin-1994@yandex.ru

Аннотация. В работе изучены три штамма, три изолята *Bacillus* spp., шесть смесей и липопептид-богатые фракции штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11BM, продуцирующих липопептиды – сурфактин и итурин, соответственно. Показано, что бактериальные штаммы, изоляты и их смеси влияли на жизнеспособность *S. graminum* и индуцировали в растениях устойчивость к вредителю. Определенную роль в этих процессах играли метаболиты бактерий – липопептиды.

Ключевые слова: *Schizaphis graminum, Bacillus spp*., липопептиды, Cry-белки, системная индуцированная устойчивость.

Эффективным способом повышения устойчивости зерновых культур к тлям является применение биологических препаратов на основе эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus*, синтезирующих широкий спектр антибиотических веществ белково-пептидной природы. Благодаря этим веществам бактерии рода *Bacillus* обладают комплексной инсектицидной активностью, а также способностью индуцировать неспецифическую системную устойчивость растений к вредителям, формируя впоследствии долговременную, известную в научной литературе под термином прайминг, защиту растений [Rashid, Chung, 2017]. Одними из самых важных метаболитов бактерий рода *Bacillus* в защите растений от насекомых вредителей являются инсектотоксичные Cry-белки и липопептиды (ЛП) (сурфактины, фенгицины и итурины). Недавно была показана токсичность некоторых Cry-белков к тлям и инсектицидная активность липопептидов [Araújo, 2015, Maksimov et al., 2020]. Однако интерес ученых вызывает элиситорная роль этих метаболитов в запуске защитных сигнальных путей.

Усилить действие биопрепарата можно с помощью составления бактериальных композиций. Однако в мировой научной литературе практически отсутствуют сведения об эффекте комбинированного действия эндофитных штаммов бактерий на защитные системы растений против вредителей. Наша работа направлена на изучение молекулярно-биохимических механизмов действия различных сочетаний бактериальных метаболитов *Bacillus* spp. на защитную систему растений пшеницы при заселении обыкновенной злаковой тлей *Schizaphis graminum*.

В нашей работе были изучены 3 штамма, 3 изолята *Bacillus* spp., 6 смесей и липопептид-богатые фракции (ЛБФ) штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11BM, продуцирующих липопептиды – сурфактин и итурин, соответственно.

Материалы и методы

Опыты проводились на проростках средневосприимчивого сорта мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) – Салават Юлаев (СЮ). Бактерии выращивали на среде Луриа-Бертани (LB). Липопептид-богатую фракцию из среды культивирования *Bacillus* spp. получали путем очистки с помощью ряда стадий осаждения и экстракции 2M HCl, KOH и 80% этанолом [Maksimov et al., 2020]. Экспериментальные семена пшеницы перед посадкой обрабатывали суспензионной культурой бактерий *Bacillus* spp. полусухим способом в рост-стимулирующих концентрациях подобранных ранее [Алексеев и др., 2019]. В экспериментах с ЛБФ растения за сутки до заселения тлей

опрыскивали исследуемым метаболитом в рост-стимулирующей концентрации [Алексеев и др., 2019]. Для экспериментов проростки выращивали в изолированных пластиковых сосудах на водной культуре, нагрузка тлей на одно растение составляла 10 особей. Оценку афицидности бактериальных штаммов и ЛБФ, антибиоза и выносливости, и измерение биохимических параметров проводили, как описано ранее [Veselova et al., 2019, Maksimov et al., 2020]. Транскрипционная активность генов, кодирующих защитные белки, измерялась с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, как описано ранее [Veselova et al., 2019, Maksimov et al., 2020].

Результаты

Результаты анализа афицидной активности штаммов, изолятов и их смесей показали, что все бактерии и их композиции обладали высокой афицидной активностью (Таблица 1). Наибольшую афицидность показал штамм *B. thuringiensis* B-5351, продуцирующий инсектотоксичный белок Cry1Ia [Maksimov et al., 2020].

Таблица 1. Афицидность бактериальных штаммов, изолятов *Bacillus* spp., ЛБФ и их смесей по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* и опосредованное влияние бактерий и их метаболитов на жизнеспособность обыкновенной злаковой тли *S. graminum* и выносливость растений пшеницы заселенных тлей.

Вариант обработки	Прямое влияние	Выносливость растений	Опосредованное влияние	
	Смертность тли, % (афицидность)	Прирост 1-ого листа**	Плодови-тость, шт***	Смертность, %
Вода	-	81.8±6.2	36.8±3.9	6.9±1.7
Бактериальные штаммы и их смесь				
B. subtilis 26Д	66.7±6.9	114.7±7.3	20.6±2.2	31.5±2.2
B. subtilis 11BM	76.3±8.1	103.2±5.6	24.7±2.8	21.3±3.4
B. thuringiensis B-5351	82.5±7.6	102.7±5.7	15.0±1.2	38.7±4.1
B. subtilis 26Д + *B. subtilis* 11BM	69.0±9.4	120.5±6.8	23.7±1.9	27.2±2.6
B. thuringiensis B-5351 +*B. subtilis* 26Д	84.9±9.1	118.4±6.4	13.8±0.9	39.5±3.5
B. thuringiensis B-5351 +*B. subtilis* 11BM	80.4±6.4	103.3±6.2	24.1±2.2	25.3±2.9
Bacillus sp. Stl7	63.2±5.8	97.8±4.6	16.8±1.4	35.5±3.8
Bacillus sp. Ttl2	66.5±6.1	107.8±5.8	22.7±1.8	22.4±2.5
Bacillus sp. Stl7+ *Bacillus sp.* Ttl2	74.5±7.3	122.0±7.9	19.8±1.6	34.1±3.1
B. subtilis 26Д+ *Bacillus sp.* Stl7	68.0±4.9	102.6±5.9	11.2±0.7	47.2±5.2
B. thuringiensis B-5351 + *Bacillus sp.* Ttl2	71.4±5.3	117.5±8.1	21.4±1.5	28.6±3.2
Липопептид богатая фракция (ЛБФ) штаммов				
ЛБФ *B. subtilis* 26Д*	58.0±5.3	122.0±5.7	18.0±3.1	13.2±2.3
ЛБФ *B. subtilis* 11BM	52.1±6.2	98.1±6.2	17.3±3.3	12.4±2.6
ЛБФ *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11BM	61.5±7.8	110.2±5.1	16.3±1.2	15.3±3.1

Примечание: *Концентрация ЛБФ при прямом воздействии 25 мкг/мл, при опосредованном – рост-стимулирующая концентрация от 1.5 до 2.5 мкг/мл. **Прирост 1-ого листа, не обработанных бактериальными штаммами и не заселенных тлей растений, принят за 100%. ***Плодовитость - кол-во особей на 1 растение.

Афицидность по сравнению с действием отдельных штаммов и изолятов повышалась в трех смесях: *B. thuringiensis* B-5351+*B. subtilis* 26Д, *Bacillus* sp. Stl7+*Bacillus* sp. Ttl2, *B. subtilis* 26Д+*Bacillus* sp. Stl7 (Таблица 1). Наши результаты показали, что штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ обладали высокой афицидностью благодаря продукции ЛП, так как ЛБФ их обоих штаммов проявили высокий инсектицидный эффект по отношению к злаковой тле (Таблица 1).

Выносливость (толерантность) растений к тлям определяется как скорость возобновления и восстановления фотосинтетической активности и ростовых процессов. Бактерии, обладающие рост-стимулирующей активностью способны повышать толерантность растений к тлям [Rashid, Chung, 2017]. В наших экспериментах прирост 1-ого листа у пшеницы при заселении злаковой тлей повышался при обработке всеми исследованными штаммами и изолятами и их смесями (Таблица 1). Рост-стимулирующий эффект по сравнению с действием отдельных штаммов повышался во всех смесях кроме одной *B. subtilis* 26Д+*Bacillus* sp. Stl7 (Таблица 1). Наши результаты показали, что ЛБФ бактерий также повышали выносливость растений к вредителю (Таблица 1).

Кроме того, наши результаты показали, что бактериальные штаммы, изоляты и их композиции опосредованно влияли на плодовитость и смертность злаковой тли, кормившейся на обработанных растениях пшеницы (Таблица 1). Обработка растений бактериями и их композициями увеличивала смертность тлей с 6.9 до 47.2% относительно контрольных растений. Наибольший эффект среди штаммов и изолятов показали *B. thuringiensis* B-5351 (38.7%) и *Bacillus sp.* Stl7 (35.5%), среди смесей - *B. subtilis* 26Д+*B. thuringiensis* B-5351 (39.5%), *B. subtilis* 26Д+*Bacillus* sp. Stl7 (47.2%) (Таблица 1). ЛБФ также влияли опосредованно на смертность тлей, уменьшая их плодовитость (Таблица 1). Таким образом, при объединении штаммов синтезирующих разные группы метаболитов мы в некоторых случаях наблюдали аддитивный эффект как в отношении злаковой тли, так и в отношении растений пшеницы.

Опосредованный через растение механизм, способствующий формированию устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле, может быть связан с индукцией штаммами бацилл СИУ (системной индуцированной устойчивостью) против вредителя. Защитные реакции при развитии СИУ, обычно характеризуются ранним накоплением активных форм кислорода (АФК), в том числе пероксида водорода (H_2O_2), и изменением активности ферментов про-/антиоксидантной системы [Rashid, Chung, 2017]. Для исследований индукции СИУ у растений к тле были взяты три штамма, показавшие наибольшую афицидность и рост-стимулирующий эффект: *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* B-5351, и их композиции. Заселение контрольных растений пшеницы тлями приводило к уменьшению содержания H_2O_2, снижению активности пероксидазы (ПО) на начальных этапах инфицирования (рис. 1а, б) и сопровождалось низкой смертностью тлей. Предпосевная обработка семян пшеницы штаммами и их композициями приводила к резкому накоплению H_2O_2 в листьях пшеницы, заселенных *S. graminum* и повышению активности ПО, что, возможно, обусловливало устойчивость таких растений к вредителю. Наибольший эффект на генерацию H_2O_2 и активность ПО оказывали штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* B-5351 и их композиция (рис. 1а, б). Интересно, что обработка растений ЛБФ штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ привела к сходным результатам изменения редокс-статуса растений – увеличения содержания H_2O_2 и активности ПО и уменьшения активности каталазы (рис.1г, д, е), что может говорить о роли ЛП в индукции системной устойчивости и развитии защитных реакций у пшеницы к злаковой тле.

Еще одним показателем формирования системной устойчивости в растениях считается экспрессия генов PR-белков [Rashid, Chung, 2017].

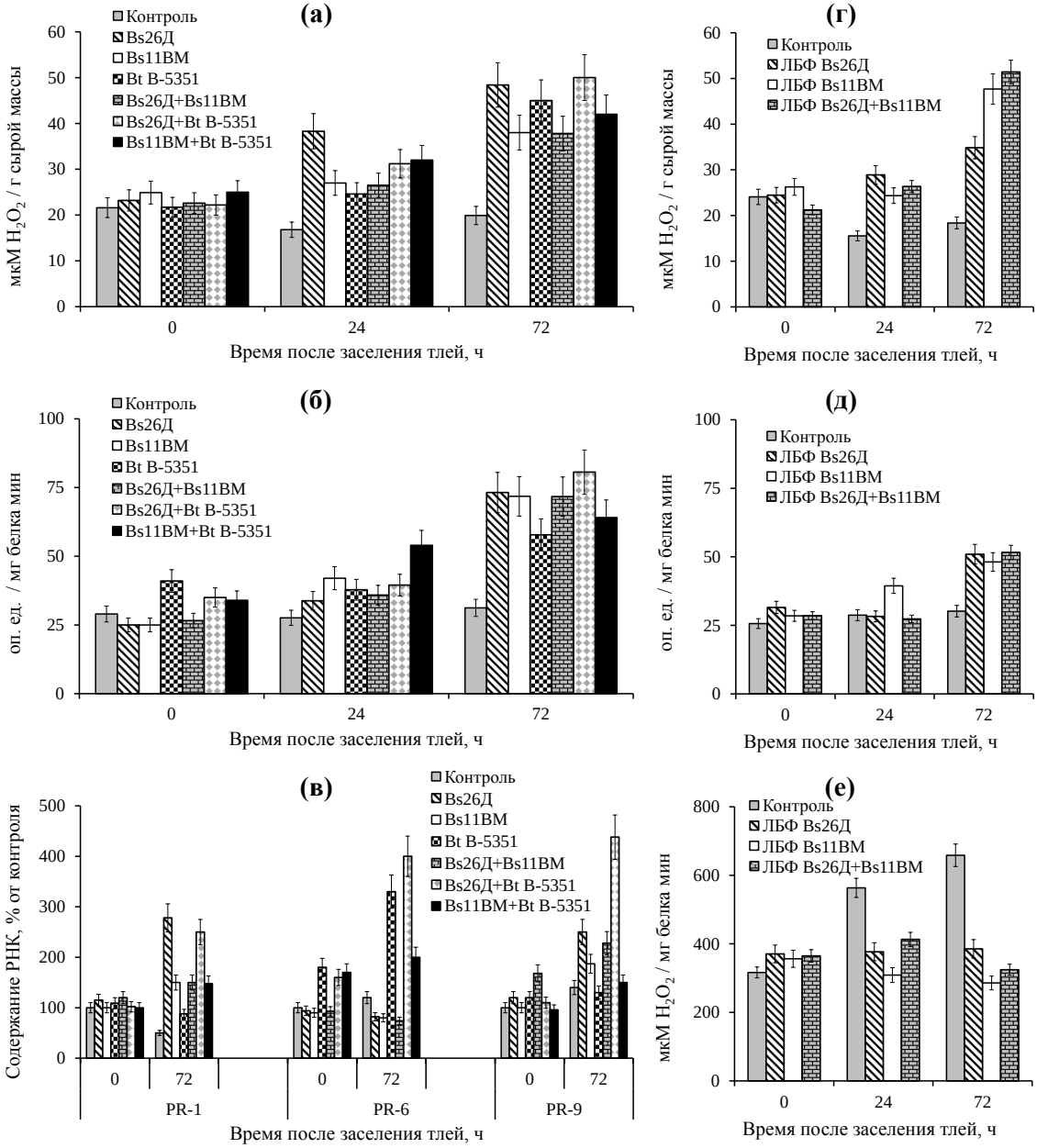


Рис. 1. Влияние бактериальных штаммов *Bacillus* spp. и их композиций на содержание перекиси водорода (а), активность пероксидазы (б) и на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки пшеницы (в), а также влияние липопептид-богатой фракции (ЛБФ) из среды культивирования штаммов штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11BM, индивидуально и в композиции на содержание перекиси водорода (г), активность пероксидазы (д) и каталазы (е) в заселенных *S. graminum* растениях пшеницы.

Нами была изучена экспрессия генов, кодирующих PR-белки, маркеры и регуляторы защитных сигнальных путей. Ген *PR-1* кодирует маркерный белок салицилатного сигнального пути, ген *PR-6* кодирует фермент ингибиторы протеиназ, а ген *PR-9* кодирует анионную пероксидазу, участвующую в генерации H_2O_2 [Rashid, Chung, 2017, Maksimov et al., 2020]. Наши результаты показали, что через 72 часа после заселения тлей штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11BM индуцировали в растениях экспрессию двух генов - *PR-1* и *PR-9*, однако реакция на первый штамм была гораздо сильнее, чем на второй (рис. 1в). Штамм *B. thuringiensis* B-5351 индуцировал

экспрессию генов *PR-6* и *PR-9* (рис. 1в). Аддитивный эффект в индукции СИУ проявила одна композиция *B. subtilis* 26Д+*B. thuringiensis* В-5351. В растениях обработанных этой смесью повышалась экспрессия всех трех генов - *PR-1*, *PR-6* и *PR-9* (рис. 1в).

Таким образом, изученные нами бактериальные штаммы и изоляты влияли на жизнеспособность *S. graminum* и индуцировали в растениях устойчивость к вредителю. Определенную роль в этих процессах играли метаболиты бактерий – липопептиды. Некоторые из бактериальных композиций проявили аддитивный эффект как при прямом, так и при опосредованном воздействии на злаковую тлю.

Литература

Алексеев В.Ю., Веселова С.В., Румянцев С.Д., Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Максимов И.В. Повышение толерантности растений пшеницы к злаковым тлям бактериями рода *Bacillus* и их метаболитами // Сборник материалов VI Всероссийской конференции с международным участием «Экобиотех». Уфа. 2019. С. 11-15.

Araújo, E.O. Rizobacteria in the control of pest insects in agriculture // Afr. J. Plant Sci. 2015. V. 9. P. 368–373.

Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V. et al. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene Btcry1Ia encoding Cry1Ia toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. // Biological Control. – 2020. – V. 144. – Art. 104242.

Rashid M.H., Chung Y.R. Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes // Front. Plant Sci. 2017. V. 8:1816.

Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Blagova D.K., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55(1). P. 41-47.

THE ROLE OF BACTERIA *BACILLUS* SPP. AND THEIR METABOLITES IN REGULATION OF THE DEFENSE RESPONSE OF WHEAT PLANTS AGAINST GREENBUG APHID *SCHIZAPHIS GRAMINUM* (ROND.)

Alekseev V.Yu., S.D. Rumyantsev, S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, A.R. Kasimova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, veselova75@rambler.ru

Abstract. Three strains, three isolates of *Bacillus* spp., six mixtures and lipopeptide-rich fractions of *B. subtilis* 26D and *B. subtilis* 11BM strains producing lipopeptides surfactin and iturin, respectively, were studied in the work. It was shown that bacterial strains, isolates and their mixtures influenced the viability of *S. graminum* and induced resistance to the pest in plants. A certain role in these processes was played by bacterial metabolites - lipopeptides.

Keywords: *Schizaphis graminum, Bacillus spp*., Lipopeptides, Cry proteins, induced systemic resistance.

ОСНОВНЫЕ ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В РАСТЕНИЯХ

Ч.Р. Аллагулова

ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Россия, allagulova-chulpan@rambler.ru

Аннотация. Оксид азота (NO) – сигнальная молекула, функционирующая во всех живых организмах, включая растения. Образование NO в растениях протекает по двум главным механизмам: окислительному и восстановительному. В первом случае NO генерируется при взаимодействии аргинина с кислородом, однако ферменты, катализирующие эту реакцию, в высших растениях пока не идентифицированы. Наиболее хорошо изученным является восстановительный нитрит-зависимый путь биосинтеза NO, осуществляемый с участием нитратредуктазы.

Ключевые слова: оксид азота, регуляция метаболизма, аргинин-зависимый путь, нитрит-зависимый путь, нитратредуктаза

Оксид азота (NO) принадлежит к числу важнейших сигнальных молекул, функционирующих во всех биологических объектах, включая растения, и является универсальным трансмиттером, участвующим в регуляции базовых процессов растительного метаболизма. NO – липофильная молекула, растворимая в воде и жирах, характеризующаяся наличием непарного электрона, который превращает NO в радикал с высокой реакционной способностью, свободно проникающий через клеточные мембраны и быстро взаимодействующий с другими биомолекулами [Карпец, Колупаев, 2017; Битюцкий, 2020]. Реализация NO-зависимого сигналинга осуществляется с участием его активных производных, в частности пероксинитрита ($ONOO^-$), S-нитрозоглутатиона (GSNO) и других S-нитрозотиолов, объединенных в класс активных форм азота (АФА) и характеризующихся чрезвычайно широким спектром физиологического действия [Kolbert et al., 2019; Битюцкий, 2020]. Выявлена важная роль NO-сигналинга в протекании ключевых процессов онтогенеза, охватывающих этапы прорастания, вегетативного роста, цветения, созревания, плодоношения и старения. NO принимает участие в регуляции клеточного цикла, дифференциации и роста пыльцевых трубок, морфогенеза, взаимодействия растений с симбионтами (Карпец и др., 2017; Kolbert et al., 2019; Hancock et al., 2020]. Особый интерес к NO вызван его участием в формировании устойчивости растений к разным по природе стрессовым факторам. В частности, о сигнальных функциях NO в растениях стало известно в конце 1990-х г.г. при изучении его роли в реакциях фитоиммунитета [Durner et al., 1998; Delledone et al., 1998; Del Castello et al., 2019]. Так в растениях картофеля при поражении *Phytophthora infestans* регистрировалось NO-индуцируемое повышение активности защитных генов, сопровождаемое поддержанием уровня хлорофилла в листьях [Del Castello et al., 2019]. Получен большой массив данных об участии NO в развитии устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам таким как засуха, засоление, осмотический стресс, нарушение температурного режима, УФ-облучение, воздействие ионов тяжелых металлов [Мамаева и др., 2015; Карпец, Колупаев, 2017; Hancock et al., 2020; Lau et al., 2021].

В основе молекулярных механизмов регуляторного действия оксида азота лежит его способность взаимодействовать с АФК, приводить к пост-трансляционным модификациям белков, обусловленными нитрованием тирозина, цистенина и некоторых других аминокислот. Кроме того, известно о взаимодействии NO с ионами металлов в составе металлопротеинов, например, с атомом железа фитоглобинов, а также с остатками жирных кислот с образованием нитро-жирных кислот [Mohn, 2019; Hancock et al., 2020]. При взаимодействии NO с супероксид радикалом (O^{2-}) происходит образование пероксинитрита ($ONOO^-$), выступающего в качестве нитрирующего агента в NO-индуцируемых пост-трансляционных модификациях белков. Передача нитрогруппы на белковые молекулы ферментов или факторов транскрипции индуцирует изменения их пространственной конфигурации, оказывая

влияние на протекание множественных метаболических процессов, а также на активность генетических программ, что лежит в основе NO-зависимой регуляции функционирования транскриптома и метаболома растительных организмов [Hancock et al., 2020; Costa-Boresta et al., 2021].

Об образовании оксида азота растениями стало известно еще в 70-х г.г., когда была выявлена его эмиссия бобовыми культурами, подвергнутыми обработке гербицидами [Klepper, 1979]. Однако пути его биосинтеза в растениях изучены далеко не полностью и остаются объектом пристального внимания и жарких дискуссий [Astier et al., 2018; Hancock et al., 2020]. В качестве основных рассматриваются два механизма продукции NO в растениях: (1) окислительный или аргинин-зависимый путь и (2) восстановительный или нитрат/нитрит-зависимый путь. В первом случае биосинтез NO осуществляется в присутствии кислорода, при котором происходит окисление L-аргинина с образованием цитруллина и высвобождением NO (Рис.1).

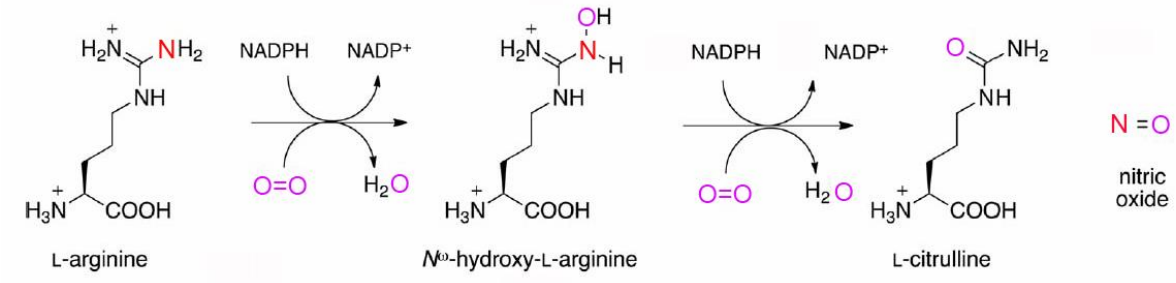


Рис. 1. Аргинин-зависимое образование оксида азота.

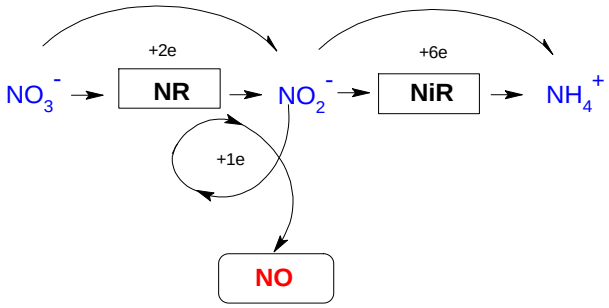


Рис.2. Схема образования оксида азота в ходе реакций ассимиляции азота.

Реакция хорошо изучена на примере животных, у которых она катализируется с участием специфических ферментов NO-синтаз (NOS), которые, однако в высших растениях пока не идентифицированы, о чем свидетельствуют данные крупномасштабного скрининга более чем 2000 просеквенированных растительных геномов [Jeandros et al., 2016]. Среди фотосинтезирующих организмов NOS-подобные последовательности выявлены у 15 одноклеточных зеленых водорослей [Jeandros et al., 2016], включая *Ostreococcus tauri*, для которой ранее было продемонстрировано наличие функционально активного NOS фермента, обладающего 45 %-ой гомологией с NOS-последовательностями млекопитающих [Мамаева, 2015]. Вместе с тем экспериментальные данные, в которых продукция NO в растительных объектах была показана по реакции образования цитруллина с использованием ингибиторов NOS-активности животных, указывают на функционирование аргинин-зависимого пути биосинтеза NO в растениях. Специфические ферменты аргинин-зависимого образования NO в растениях еще только предстоит идентифицировать [Prochazkova et al., 2014; Jeandroz et al., 2016; Kolbert et al., 2021].

Наиболее хорошо изученным является нитрат/нитрит-зависимое образование NO, в котором центральная роль отводится ферменту ассимиляторной нитратредуктазе (NR – Nitrate reductase; EC 1.7.1.1), принадлежащего к числу NAD(P)H-активируемых

молибдено-содержащих энзимов, широко распространенных среди растений, грибов и водорослей. NR обнаруживается как в цитозольной, так и в связанной с мембраной форме [Prochazkova et al., 2014]. Основная функция NR связана с процессом ассимиляции азота, в котором она катализирует первую стадию – реакцию двуэлектронного восстановления нитрата (NO_3^-) до нитрита (NO_2^-). Далее нитрит с участием другого ключевого фермента азотного обмена ассимиляторной нитритредуктазы (NiR) восстанавливается до аммония, необходимого для последующего синтеза аминокислот. Вместе с тем показано, что нитрит с участием NR может быть восстановлен до NO при одноэлектронном транспорте электронов (Рис. 2). В настоящее время NR-зависимый путь рассматривается в качестве доминирующего механизма продукции оксида азота в высших растениях [Astier et al., 2018; Mohn et al., 2019].

Несмотря на то, что трехмерная структурная модель нитратредуктазы была предложена еще в конце 1990-х г.г. [Campbell, 1999], исследования в этом направлении продолжаются и в настоящее время, благодаря чему раскрываются новые детали об особенностях строения и функционировании фермента, характеризующегося сложной многоуровневой субъединичной конформацией [Mohn et al., 2019]. Фермент является гомодимером, образованным из субъединиц с молекулярной массой 100-110 кДа и размером приблизительно 900 остатков. Каждая из субъединиц обладает мультидоменной структурой, в составе которой присутствует 3 кофактора: молибденовый кофактор или MoCo (molybdenum cofactor); цитохром b5 типа, содержащий гемовое железо (Heme-домен) и FAD-кофактор, который при взаимодействии с клеточным восстановителем NAD(P)H формирует FAD-домен (Рис. 3).

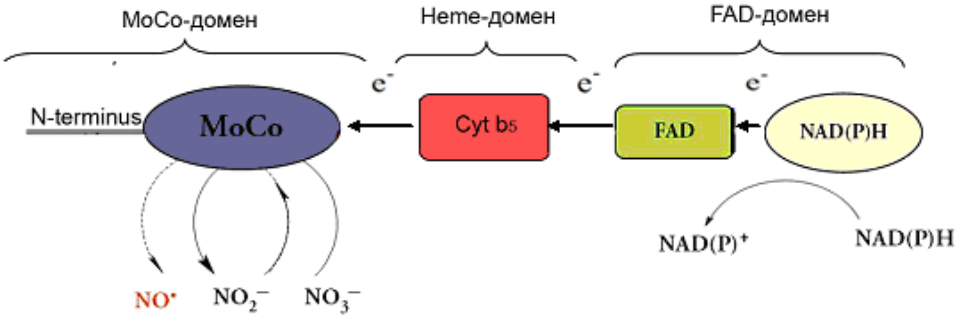


Рис. 3. Схематическое изображение доменной структуры мономерной субъединицы нитратредуктазы (NR). Фигурными скобками сверху обозначены три домена (MoCo-; Heme- и FAD-домены). Стрелками отмечено направление потока электронов от FAD-домена на MoCo-домен.

Таким образом, в каждой из субъединиц NR можно различить два активных центра. В первом из них происходит передача электронов от NAD(P)H через FAD на гемовое железо, откуда электроны поступают на второй активный центр фермента MoCo-домен, восстанавливая атом Mo. При этом NR функционирует как миниатюрная электрон-транспортная цепь, осуществляющая перенос электронов от клеточных восстановителей NADH или NADPH, через FAD- и цитохром b5 на атом молибдена в составе MoCo, при этом степень окисления Mo меняется с (+IV) до (+VI). Далее электроны используются для восстановления нитрата, а в реакции образования оксида азота происходит восстановление нитрита [Campbell, 1999; Chamizo-Ampudia et al., 2017; Mohn et al., 2019; Tejada-Jimenez et al., 2019].

На долю NO-образующей способности приходится не более 1 % ферментативной активности NR. Вместе с тем ее принципиально важная роль в продукции оксида азота была продемонстрирована с использованием NR-дефицитных мутантов,

характеризующихся нарушениями в биосинтезе NO [Prochazkova et al., 2014]. NR-зависимое образование NO было выявлено у разных видов фотосинтезирующих организмов, принадлежащих к разным филогенетическим группам, включая высшие растения [Maia, Moura, 2015; Astier et al., 2018; Tejada-Jimenes et al., 2019]. В модельном объекте *Arabidopsis thaliana* идентифицировано две изоформы фермента NR1 и NR2, кодируемые генами *NIA1* и *NIA2*. Трансгенные линии арабидопсиса с овер-экспрессией *NIA1* и *NIA2* генов и накоплением соответствующих белков характеризовались значительным повышением уровня NO продукции [Mohn et al., 2019]. Доказательством в пользу участия NR в реакциях образования оксида азота могут служить данные о способности растений к эмиссии NO при их выращивании на среде с нитратом, но не аммонием [Mohn et al., 2019; Costa-Boresta et al., 2021].

Участие NR в процессе восстановления NO_2 до NO может быть связано с ее способностью передавать электроны на другой фермент, именуемый как амидоксимредуктаза или митохондриальный амидоксим редуцирующий компонент mARC (mitochondrial Amidoxime Reducing Component), обладающий нитрит-восстанавливающей активностью с образованием NO. Поэтому растительная амидоксимредуктаза названа как NOFNiR (NO forming nitrite reductase), а сама двухкомпонентная NO-образующая система обозначается с использованием аббревиатуры NR:NOFNiR [Chamizo-Ampudia et al., 2016; Tejada-Jimenez et al., 2019]. Кроме того, потенциальной способностью восстанавливать нитрит до NO обладают такие молибдоэнзимы как сульфидоксидаза (SO), ксантиноксидоредуктаза (XOR) и альдегидоксидаза (AO), в связи с чем эти ферменты наряду с NR и mARC предложено объединить в самостоятельный класс NO-образующих ферментов «неспецифических нитритредуктаз» [Maia and Moura, 2015]. Образование NO выявлено в митохондриях, где происходит одноэлектронное восстановление нитрита с участием ЭТЦ митохондрий в условиях гипоксии, а также в хлоропластах, пероксисомах и в апопласте растений [Мамаева и др., 2015; Astier et al., 2018].

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что в растительных организмах функционируют множественные механизмы образования оксида азота, что не удивительно, учитывая широкий спектр регуляторного действия этой сигнальной молекулы. Последовательность биохимических реакций, при которых происходит образование NO, протекает по окислительному или восстановительному пути. При этом ключевые ферменты, катализирующие окислительное аргинин-зависмое образование NO в высших растениях, пока остаются объектом поиска. Наиболее хорошо изученным в высших растениях является нитрит-зависимая продукция NO, при которой центральную роль играет ключевой фермент азотного обмена ассимиляторная нитратредуктаза.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А21-121011990120-7 и при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00904.

Литература

Битюцкий Н. П. Микроэлементы высших растений. – Санкт-Петербург: Изд-во С-Петербургского ун-та, 2020. – 368 с.

Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. Функциональное взаимодействие оксида азота с активными формами кислорода и ионами кальция при формировании адаптивных реакций растений // Вестник Харьковского национального университета. 2017. Т. 2. С. 6-31. http://hdl.handle.net/123456789/1333

Мамаева А. С., Фоменков А. А., Носов А. В. и др. Регуляторная роль оксида азота у растений // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 459-459. DOI;10.7868/S0015330315040132

Astier J., Gross I., Durner J. Nitric oxide production in plants: an update // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 3401-3411. https://doi.org/10.1093/jxb/erx420

Campbell W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology // Annual rev. of plant biology. 1999. V. 50. P. 277-303.

Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas A., et al., Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis // Trends in Plant Science. 2017. V. 22. P. 163-174. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001

Costa-Broseta Á., Castillo M. C., León J. Post-translational modifications of nitrate reductases autoregulates nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 549. https://doi.org/10.3390/ijms22020549

Del Castello F., Nejamkin A., Cassia R., et al. The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends // Nitric Oxide. 2019. V. 85. P. 17-27.

Delledonne M., Xia Y., Dixon R., Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance // Nature. 1998. V. 394 (6693). P. 585-588.

Durner J., Wendehenne D., Klessig D. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose // PNAS. 1998. V. 95 (17). P. 10328-10333.

Hancock J. T., Veal D. Nitric oxide, other reactive signalling compounds, redox, and reductive stress // Journal of Experimental Botany. 2021. V. 72 (3). P. 819-829. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa331

Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK, Wendehenne D. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase–like proteins in the plant kingdom // Science Signaling. 2016. V. 9. (417). P. re2 https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403.

Klepper L. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO_2) emissions from herbicide-treated soybean plants // Atmospheric Environment.1979. V. 13 (4). P. 537-542.

Kolbert Zs., Lindermayr Ch., Loake G. The role of nitric oxide in plant biology: current insights and future perspectives // Journal of Experimental Botany. 2021. V. 72. P. 777–780. https://doi.org/10.1093/jxb/erab013.

Lau S. E., Hamdan M. F., Pua T. L., Saidi N. B., Tan B. C. Plant nitric oxide signaling under drought stress // Plants. 2021. V. 10 (2). P. 360. https://doi.org/10.3390/plants10020360

Maia L. B., Moura J. J. G. Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases // JBIC. 2015. V. 20. P. 403-433. https://doi.org/10.1007/s00775-014-1234-2

Mohn M. A., Thaqi B., Fischer-Schrader K. Isoform-specific NO synthesis by Arabidopsis thaliana nitrate reductase // Plants. 2019. V. 8. P. 67. https://doi.org/10.3390/plants8030067

Prochazkova D., Haisel D., Pavlikova D. Nitric oxide biosynthesis in plants-the short overview // Plant, Soil and Environment. 2014. V. 60. P. 129-134.

Tejada-Jimenez M., Llamas A., Galván A., Fernández, E. Role of nitrate reductase in NO production in photosynthetic eukaryotes // Plants. 2019. V. 8. P. 56. https://doi.org/10.3390/plants8030056

THE MAIN PATHWAYS OF NITROGEN OXIDE GENERATION IN PLANTS

C.R. Allagulova

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, allagulova-chulpan@rambler.ru

Abstract. Nitric oxide is a signaling molecule that functions in all living forms, including plants. NO generation in plants occurs by two main mechanisms: oxidative and reductive. In the first case, NO is produced in the reaction of arginine with oxygen. However, enzymes catalyzing this process in higher plants have not yet been identified. The best studied route of NO biosynthesis is the reductive nitrite-dependent pathway where nitrate reductase a key enzyme of nitrogen fixation plays a central role.

Key words: nitric oxide, regulation of metabolism, arginine-dependent pathway, nitrite-dependent pathway, nitrate reductase

КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ NaCl–ЗАСОЛЕНИЯ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *TRITICUM AESTIVUM* L.

А.К. Арисова, О.З. Еремченко, В.А. Семенова

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия, nast483@bk.ru

Аннотация. Окислительный стресс растений в условиях комбинированного воздействия засоления и щелочности изучен недостаточно. Активность пероксидаз в листьях пшеницы исследовали в двухфакторном опыте: засоление NaCl (30, 70, 110, 150 мМ) и щелочность (7, 8, 9, 10 pH). В начальной стадии стресса активность ферментов в большей степени связана с засолением (22-30%), влияние щелочности увеличивалось с 7-8% до 23%; взаимодействием факторов обусловлено 31-32% факторной нагрузки общей дисперсии показателя.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., солевой и щелочной стресс, пероксидазная активность

Актуальность проблемы устойчивости растений к совместному воздействию засоления и щелочности обусловлена тем, что эти факторы часто сочетаются в засоленных почвах. Ответная реакция растений на воздействие щелочных солей остается недостаточно изученной [Javid et al., 2012; Latef, Tran, 2016].

Цель наших исследований – изучить в условиях двухфакторного опыта изменение пероксидазной активности в листьях пшеницы при сочетании NaCl-засоления (30, 70, 110, 150 мМ) и щелочности (7, 8, 9, 10 pH) корневой среды. Растения выращивали в течение 6 дней на вермикулите, затем на 7-й день в корневую среду вносили растворы солей с различным уровнем щелочности. Пероксидазную активность (по А.Н. Бояркину) и содержание свободных ионов натрия (на пламенном фотометре) изучали через 1, 4 и 24 ч после стресс-воздействия. Морфометрические измерения проводили через 1 сутки и через 2 суток после внесения стресс-растворов в 30-кратной повторности. Результаты исследований обработаны двухфакторным дисперсионным анализом с оценкой относительного влияния факторов на изучаемый показатель по критерию Фишера с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0,05$).

Оба исследуемых нами фактора корневой среды влияют на ионный гомеостаз растений. Известно, что при высокой концентрации солей нарушается баланс ионов и водный обмен в растительных клетках и тканях. В литературе имеются сведения, что токсическое действие на растения оказывают не столько анионы солей, сколько катионы Na^+ [Blumwald, 2000; Blumwald et al., 2000; Davenport and Tester, 2000; Demidchik et al., 2002], которые поступают в растительные клетки по электрохимическому градиенту. Нарушения в транспорте ионов в условиях сильнощелочной среды связывают с изменением структуры мембран клеток корня [Yang et al., 2009; Guo et al., 2015].

Через час после внесения в корневую среду солевых и щелочных растворов содержание свободных ионов натрия в листьях пшеницы в вариантах опыта колебалось в пределах 36–58 мг/100г сухой массы. Обработка результатов исследований двухфакторным дисперсионным анализом показала, что в этот период на содержание Na^+ в большей мере повлиял фактор засоления корневой среды – 12 % от общей дисперсии показателя. Значимого влияния щелочности не установлено; от взаимодействия NaCl-засоления и щелочности зависело лишь 2% общей дисперсии содержания этого иона (Рис. 1-А).

Спустя 4 часа после стресс-воздействия уровень содержания Na^+ в листьях в вариантах опыта составлял от 36 до 115 мг/100 г сухой массы. Наибольшее накопление Na^+ отмечено в варианте pH 9+150 Мм NaCl. В факторной структуре общей

дисперсии этого показателя влияние засоления возросло до 19%, при этом от щелочности зависело уже 29% факторной нагрузки. Взаимодействием NaCl-засоления и щелочности определялось 11% изменчивости содержания Na^+ в листьях (Рис.1-В). Таким образом, общая нагрузка стресс-факторов на накопление засоляющего иона составила 59%.

А **В**

Рис.1. Факторная структура общей дисперсии содержания свободных ионов натрия в листьях пшеницы: А – через 1 ч, В – через 4 ч после стресс-воздействия

При засолении корневой среды из-за нарушения проницаемости мембран в клетках растений накапливается избыток засоляющих ионов, что сопровождается развитием окислительного стресса. Для устранения избытка активных форм кислорода мобилизуется система антиоксидантной защиты растений, в которой ферменты, в том числе, пероксидазы играют важнейшую роль [Колупаев, Карпец, 2019].

Изучение морфометрических показателей при действии засоления и щелочности показали, что в первые сутки взаимодействие NaCl-засоления и щелочности составило 5% факторной структуры общей дисперсии показателя высоты, а содержание NaCl – 5% структуры дисперсии показателя массы. Затем еще через сутки после стресс-воздействия суммарная доля вклада засоления и щелочности возросла до 12% и 16% соответственно.

Нами установлено, что при комбинированном стрессе в 1-й ч наблюдений у пшеницы в листьях пероксидазная активность сильно колебалась. Наибольшие показатели пероксидазной активности были в вариантах pH 8+30 мМ NaCl и pH 9+30 мМ NaCl (на 19% выше, чем в нейтральном незасоленном варианте), по-видимому, в этих условиях растения наиболее эффективно использовали ферментативные компоненты защиты. Пониженная активность ферментов в вариантах с более высоким засолением (и/или высоким pH) может быть связана как с общим угнетением растений, так и с выбором иного адаптивного механизма.

Спустя 4 часа после стресс-воздействия наибольшая активность пероксидаз отмечена на варианте pH 9+70 мМ NaCl – на 46% выше, чем у растений в варианте с нейтральной незасоленной средой. Через сутки отмечен наибольший уровень пероксидазной активности у растений был в варианте pH 9+30 мМ NaCl – на 57% выше, чем у растений в нейтральном незасоленном варианте опыта.

Во все три срока наблюдений на активность ферментов влияло NaCl-засоление, при этом его действие усиливалось с 22% до 30% от факторной нагрузки общей дисперсии активности пероксидаз (Рис. 2). Влияние щелочности по сравнению с засолением оказалось более слабым; в первые два срока наблюдений этот фактор определял 7-8% от общей дисперсии, но через сутки его влияние возросло до 23%, возможно, из-за усиления процессов разрушения клеточных мембран в условиях щелочной среды [Guo et al., 2015].

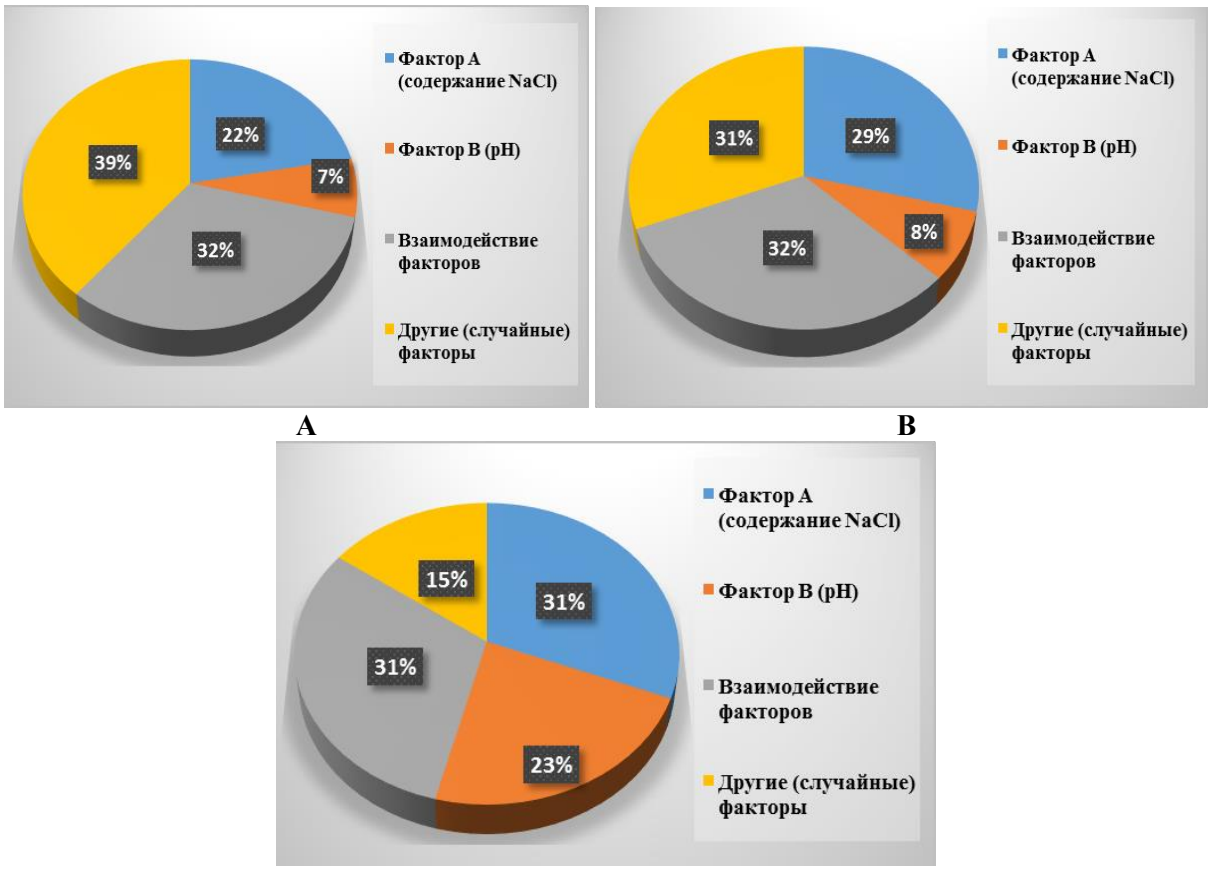


Рис.2. Факторная структура общей дисперсии пероксидазной активности в листьях пшеницы: А – через 1 ч, В – через 4 ч, С – через 24 ч после стресс-воздействия

В течение всего периода наблюдений оказалось устойчивым влияние взаимодействия NaCl-засоления и щелочности – 31–32% в факторной нагрузке общей дисперсии показателя активности пероксидаз.

В целом следует отметить, что в эксперименте влияние изучаемых факторов было весьма значительным; на долю случайных факторов в первые часы приходилось 31-39% факторной нагрузки, а через сутки на их влияние – лишь 15%.

Заключение.

В начале стресса, вызванного комбинированным воздействием NaCl-засоления и щелочности корневой среды, уровень накопления свободных ионов натрия в листьях зависел от концентрации соли в корневой среде. Затем, по-видимому, транспорт ионов в растениях был нарушен из-за щелочной реакции среды, поэтому через 4 часа стрессового состояния влияние pH было в 2 раза выше, по сравнению с засолением.

Активность пероксидаз в начальной стадии стресса также в большей степени связана с засолением, но через сутки влияние обоих факторов на активность ферментов становилось относительно равным. Определенную часть общего влияния на изменчивость активности пероксидаз, а также на показатели роста оказало взаимодействие NaCl-засоления и щелочности корневой среды.

Литература

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. - Киев: Логос, 2019. − 277 с.

Blumwald, E. Sodium transport and salt tolerance in plants // Curr Opin Cell Biol. 2000. V. 12 (4). P. 431–434.

Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P Sodium transport in plant cells // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V.1465, P. 140–151.

Davenport, R.J., Tester, M.A. Weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat // Plant Physiol. 2000. V. 122, P. 823–834.

Demidchik V., Davenport R.J., Tester M. Nonselective cation channels in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V.53. P.67–107.

Guo R, Yang Z., Li F., Yan C., Zhong X., Liu Q., Xia X., Li H. Zhao L. Comparative metabolic reponses and adaptive strategies of wheat (Triticum aestivum) to salt and alkali stress // BMC Plant Biology. 2015. 15 (170).

Javid M. A., Ford R. A., Nicolas M. E. Tolerance responses of Brassica juncea to salinity, alkalinity and alkaline salinity // Functional Plant Biology. 2012. V. 39 (8). P. 699–707.

Latef A.A., Tran L.S. Impacts of Priming with Silicon on the Growth and Tolerance of Maize Plants to Alkaline Stress // Frontiers in plant science. 2016. V.7. P. 243−246.

Yang C, Xu HH, Wang L, Liu J, Shi DC, Wang D. Comparative effects of salt-stress and alkaline-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants // Photosynthetica. 2009. V. 47, Issue 1. P. 79−86.

COMBINED EFFECT OF NACL-SALINIZATION AND ALKALINITY OF ROOT MEDIUM ON PEROXIDASE ACTIVITY OF *TRITICUM AESTIVUM* L.

A.K. Arisova, O.Z. Eremchenko, V.A. Semenova

Perm State University, Perm, Russia, nast483@bk.ru

Abstract. Oxidative stress response of plants under combined influence of saline and alkaline conditions has not been sufficiently studied. Using a two-way ANOVA test we analyzed peroxidase activity in wheat leaves after exposure of plants to NaCl-salinization (30, 70, 110, 150 mM) and alkaline conditions (7.0, 8.0, 9.0, 10.0 pH). In the early stage of stress response peroxidase activity was mostly associated with salt stress (22-30 %). Effect of alkaline stress increased from 7-8 % to 23 %. The combined effect of two factors accounted for 31-32 % of the variance in the data.

Keywords: *Peroxidase activity*, *Triticum aestivum* L., salt and alkaline stress

ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФУНГИЦИДОВ НА СОСТОЯНИЕ ТЮЛЬПАНОВ В СРЕЗКЕ

О.О. Белошапкина, О.Ф. Панфилова

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева», 127550 Москва Тимирязевская улица, 49. panfilova.of@yandex.ru

Аннотация. Изучались последействия применения биофунгицидов на физиологическое состояние и сохранение декоративных качеств тюльпанов в срезке. Ключевые события старения лепестков происходят раньше видимых признаков старения. При полном развитии цветка наблюдалось резкое снижение индекса стабильности мембран до 42%. Установлено благоприятное действие препаратов Инбио-Фит+Биофит-1.0М+Биофит-2.0 (консорциум микроорганизмов) и Фитоспорин-М, Ж (Bacillus subtilis) на послеуборочное состояние тюльпанов.

Ключевые слова: апоптоз, биофунгициды, индекс стабильности мембран, программированная клеточная гибель, тюльпаны, срезка цветов

Одна из главных задач современного промышленного цветоводства состоит во внедрении экологически чистых технологий, в частности, за счет использования биологических препаратов для защиты растений от болезней. В условиях защищенного грунта показана эффективность ряда биопрепаратов: Фитоспорин- М, Ж, Бинорам, Ж, Трихоцин, СП, Фитолавин, ВКР, комбинации препаратов Инбиофит+Биофит-1.0+Биофит-2.0 (консорциум микроорганизмов), сопоставимая по результатам с химическим препаратом Максим КС против комплекса микозов луковиц тюльпана. В отличие от эталонного фунгицида Максим КС, испытываемые биопрепараты положительно влияли на товарное качество продукции и биометрические показатели тюльпанов [Белошапкина и др., 2018].

Важным коммерческим свойством цветочной продукции является ее долговечность, определяемая жизнью в вазе. Активно развиваемым направлением современной биологии является физиология послеуборочного периода срезки цветов. Молекулярная биология позволила установить характерные перестройки в функционировании генов при старении. Однако, изучение генной регуляции недостаточно для воссоздания картины старения, для этого необходимы знания изменений в физиологических процессах и их структурной организации. В первую очередь интерес вызывают проблемы гормональной регуляции этих процессов. Внимание исследователей направлено на баланс ауксинов, этилена и абсцизовой кислоты. Активно изучается роль этилена как триггера включения программы старения органов растений. В исследованиях используются ингибитор синтеза этилена – тиосульфата серебра [Пильщикова, Панфилова, 2016], ингибитор чувствительности к этилену – 1-метилциклопропена [Панфилова, Пильщикова, 2014]. Фитогормоны выступают в качестве внеклеточных индукторов апоптоза. Морфология гибели клеток у растений и животных состоит в конденсации хроматина, фрагментации ядра, олигонуклеотидной деградации ДНК, сжатии протопласта, его дроблении на везикулы, разрыве плазмодесм. У животных апоптозные везикулы фагоцитируются соседними клетками и фагоцитами. У растений везикулы протопласта разрушаются гидролазами самих везикул [Панфилова, Пильщикова, 2016]. Сохранение целостности мембран может играть ведущую роль в долговечности срезанных цветов.

Объекты и методы

Целью настоящей работы явилось изучение сортовых особенностей и влияния средств и способов защиты от микозов, поражающих растения в период выгонки в защищенном грунте, на физиологические особенности старения и утраты

декоративных качеств тюльпанов. В исследованиях использованы перспективные выгоночные голландские сорта тюльпана (*Tulipa*) из класса Триумф группы среднецветущих: Стронг Голд (Strong Gold) и Династия (Dynastya). Срезку проводили в фазе зеленого и начала окрашивания бутона. Доставка цветов в лабораторию осуществлялась в течение одного дня.

Исследование проводили в лаборатории с естественным рассеянным светом. Температура воздуха составляла 18-20°С, влажность – 63-65 %. Развитие цветка разделено на 6 стадий от плотного неокрашенного бутона до 3 - 4 стадии полного развития цветка и 5-6 стадии утраты декоративных качеств. Функциональную жизнь цветка тюльпана определяет опадение околоцветника.

Биометрические параметры, содержание фотосинтетических пигментов в листьях, показатели водного обмена листьев и цветков определяли общепринятыми методами. Изучение газообмена листьев проводили с помощью инфракрасного газоанализатора LI–COR 6400RX.

Для характеристики вытягивания стебля использован показатель относительной длины (RLP), которую вычисляли по формуле:

RLP % = $\frac{Lt-L0}{L0}$ x 100 %, где Lt – длина стебля время t; L_0 – длина стебля время 0 [8].

Индекс стабильности мембран (MSI) листьев и лепестков определяли путем регистрации выхода электролитов из дисков тканей лепестков (0,1 г), помещенных в бидистиллят (10 мл) при комнатной температуре (C_1) и после 15 мин экспозиции при 100 °С (C_2). Электропроводность регистрировали с помощью кондуктометра Эксперт. Индекс стабильности мембран: MSI = (1 - C_1/ C_2) x 100 % [Ezhilmathi et al., 2007].

Результаты и их обсуждение

Измерение биометрических показателей срезки свидетельствовало о высоком качестве полученной продукции. По высоте побегов и размерам бутонов тюльпаны полностью соответствовали стандартам товарной продукции.

У сорта Стронг Голд в срезке цветы имели по 3 полностью развитых листа со средней площадью 78 см^2. Обработки путем протравливания луковиц и последующего полива при отрастании препаратами Максим КС и комбинацией биопрепаратов Инбиофит+Биофит-1.0+ Биофит-2.0 увеличивали среднюю площадь листьев на 12-15%. Цветки желтого цвета крупные с диаметром 4,8-5 см и длиной 6,7-7 см. Сорт Династия с розовыми лепестками цветков характеризовался несколько меньшей площадью листьев и выровненностью цветков с диаметром 3,3-3,5 см и длиной 5-5,5 см.

Для срезочной культуры большое значение имеют скрытые качества, определяющие сохранение декоративных свойств в послеуборочный период. Для тюльпанов, используемых в смешанных аранжировках, критическим является вытягивание и утрата геотропической реакции цветоносов. В наших опытах у всех изученных сортов длина стебля существенно увеличивалась в первые 4 дня жизни цветов в вазе, после 8-го дня к моменту полного окрашивания цветка вытягивание стеблей практически прекращалось. При этом сорт Стронг Голд характеризовался наименьшим вытягиванием, особенно в вариантах с обработкой препаратами Инбио-Фит+Биофит-1.0М+Биофит-2.0, Фитоспорин-М, Ж. Так, если в контроле вытягивание составляло 12 %, то в этих вариантах 9-10 %.

Листовой аппарат тюльпана составляет декоративные качества срезки, но представляет мощную транспирирующую поверхность. В отсутствии корней это может сокращать время жизни в вазе. У сорта Стронг Голд в срезке цветы имели по 3 полностью развитых листа с суммарной площадью 234±20,6 см^2. Обработки путем протравливания луковиц и последующего полива при отрастании препаратами Максим

КС или комбинацией биопрепаратов увеличивали площадь листьев на 12-15%. Облиственность срезки сорта Династия различалась по вариантам опыта. В контроле у срезки было 4 листа с суммарной площадью 240±18,5 $см^2$, в большинстве вариантов обработки по 5 листьев, и общая облиственность составляла 300-350 $см^2$ на побег, превосходя контроль на 30-50 %. Листья срезки тюльпана характеризуются высоким уровнем газообмена. Старение цветка сопровождалось снижением интенсивности фотосинтеза с 16,2 μmol CO_2·/(м²·с) при 3-ей стадии до 12,0 μmol CO_2·/(м²·с) при 5-ой стадии развития цветка. Интенсивность транспирации и устьичная проводимость листьев по мере развития цветка оставались на достаточно высоком уровне и составляли соответственно 0,43-0,58 mmol H_2O/(м²·с) и 0,35-0,46 mol H_2O/(м²·с). Интенсивность транспирации верхнего листа была существенно выше, чем у нижних листьев. Это может быть связано как меньшим развитием кутикулы, так и с лучшей влагообеспеченностью. Сохранение зеленой окраски листьев является одной из наиболее важных характеристик декоративных качеств срезанных цветов. Определение суммарного содержания хлорофиллов a и b в листьях срезанных тюльпанов показало его увеличение в течение первых 6 дней и снижение после 12 дней жизни в вазе. При этом в вариантах с обработкой Инбиофит+Биофит-1.0+Биофит-2.0 (консорциум микроорганизмов), и Фитоспорин-М, Ж (*Bacillus subtilis*) наблюдалось более медленное снижение содержания пигментов и сохранение интенсивной окраски листьев, что улучшило качество листьев срезанных тюльпанов. Во время жизни в вазе наблюдается возрастание проницаемости тканей листьев. Отмечается четкая дифференциация между ярусами: наибольшее повреждение мембран с индексом стабильности 42% происходит у нижних листьев. Верхний лист, как более молодой и занимающий особое положение в побеге – прилегает к цветку, характеризуется относительно невысоким и стабильным выходом электролитов. У этого листа индекс стабильности мембран составлял 62-68% и в вариантах с обработками биопрепаратами снижался плавно. Лист, прилегающий к цветку и обеспечивающий его пластическими веществами, вероятно, обладает большими адаптационными способностями в условиях водного дефицита, в данном случае связанного с отсутствием корней. Это может быть обусловлено более высоким содержанием белков и способностью матричного связывания воды. При этом надо отметить, что более интенсивный выход электролитов из нижних листьев не связан с их более высоким содержанием. Электропроводность раствора после повреждения тканей кипячением у верхних листьев составляет 420 -500 мкСм·$см^{-1}$, у нижних листьев – 275-310 мкСм·$см^{-1}$.

Цветки сорта Стронг Голд имеют ярко желтую окраску, которая достигает максимальной интенсивности на 7-8 день жизни в вазе. Цветки крупные. В некоторых вариантах с обработкой биопрепаратами длина цветка увеличена до 7,5 см, иногда это сопровождалось небольшим уменьшением диаметра (до 4,5-5 см). Изучение динамики выхода электролитов из тканей лепестков тюльпана подтвердило развиваемое представление о том, что ключевые события старения происходят на стадии полного открытия околоцветника до видимых признаков старения лепестков [Панфилова, Пильщикова, 2020, Doom, Woltering 2008]. Индекс стабильности мембран у обоих сортов тюльпана мало изменялся до 3-й стадии развития цветка (окрашенный бутон) и составлял 82 – 84 %. На 4-й стадии развития (установление циркадного ритма открывания цветка) происходило резкое увеличение выхода электролитов со снижением MSI до 42%. К 5-й стадии индекс стабильности снижался до 35%. У опадающих лепестков индекс стабильности мембран изменялся уже незначительно. Обращает на себя внимание различие динамики изменения стабильности мембран листьев и лепестков. По мере старения листа происходит ее плавное снижение, у лепестка – резкое, вероятно, связанное с включением блока программированной

клеточной гибели. Наблюдаемое при полном роспуске цветка уменьшение сырой и сухой массы и усиление дыхания свидетельствуют о высокой энергозависимости инициации старения. Тригером процесса старения лепестков, как и у других этилен нечувствительных видов, может выступать пороговый эффект биохимических процессов, связанных с мобилизацией питательных веществ [Пильщикова, Панфилова, 2016].

Существенную роль в этом играют активные формы кислорода (АФК) и антиоксидантные системы. Прогрессирующая дестабилизация мембран, проявляющаяся в резком снижении индекса стабильности, когда нет еще видимых признаков старения цветка, свидетельствует о том, что реализация программы старения начинается раньше. Одной из причин нарушения целостности мембран является установленное рядом авторов снижение содержания мембранного белка после полного открытия цветка, которое связано с усилением деградационных процессов и уменьшением синтеза de novo [Doom, Woltering, 2008]. Другая не менее важная причина – перекисное окисление липидов, к которому самое непосредственное отношение имеют генерация АФК и снижение антиоксидазной активности. Существенная задержка старения лепестков гладиолуса [Ferrante et al., 2003] и альтромерии [Пильщикова, Панфилова, 2016] под действием 5-сульфосалициловой кислоты, а также продление жизни в вазе геликонии фитостимуляторами [Sardinha et al., 2019] может быть следствием поддержания в более активном состоянии антиоксидантных ферментов, так и в возможном связывании активных форм кислорода. Значение поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза для продления жизни срезанных цветов *Eustoma grandiflorum Salisb.* показано также в опытах с обогащением воды газообразным водородом [Su et al., 2019]. Положительный эффект связан со снижением перекисного окисления липидов, повышенной активностью супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы и каталазы. В период старения возросший уровень АФК связан не только с повышенным образованием радикалов, но и с потерей компенсаторной функции антиоксидантных систем.

Лепестки у сорта Династия не отличались по стабильности мембран на соответствующих стадиях развития цветка от сорта Стронг Голд, но 4-я фаза, фактически переломная в развитии, происходила на 2-3 дня раньше. Сорт Династия характеризуется и меньшим временем сохранения декоративных качеств растений в вазе. Обработка биопрепаратами при выращивании тюльпанов достоверно не изменила время жизни цветов в вазе.

Заключение

Положительный эффект от препаратов Инбиофит+Биофит-1.0+Биофит-2.0 (консорциум микроорганизмов), Фитоспорин-М, Ж (*Bacillus subtilis*) и Фитолавин, ВРК (фитобактериомицин) при выращивании тюльпанов на срез проявлялся в более плавном снижении индекса стабильности мембран. Эти же препараты снижали вытягивание стеблей в первые 8 дней жизни в вазе, что обеспечивало лучшее сохранение декоративных качеств цветов.

Таким образом, определение индекса стабильности мембран служит надежным и достаточно просто регистрируемым показателем хода процессов развития и старения листьев и цветка. Его определение может иметь значение не только при изучении послеуборочной физиологии, но и для оценки качества цветочной продукции при хранении и транспортировке к потребителю.

Авторы признательны И.Н. Калембет и Л.Г. Серой за предоставление тюльпанов для исследований.

Литература

Белошапкина О.О., Калембет И.Н., Дрожжева А.И., Серая Л.Г. Эффективность биопрепаратов при выгонке тюльпанов в условиях защищенного грунта // Материалы междунар. научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в РФ» 11-13 сентября 2018 г., Краснодар, 2018. – Вып.18. – С. 533-537.

Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В. Жизнь в вазе срезанных цветов гвоздики садовой и альстромерии // Субтропическое и декоративное садоводство, 2014. – Вып. 51. – С. 248 -255.

Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В. Апоптоз и жизнь в вазе срезанных цветов // Сборник статей IX Международной научно-практической конференции. Под редакцией Б.Н. Герасимова. 27-28 декабря 2016 г. – Пенза: Приволжский дом знаний, 2016. – С. 82-85.

Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В. Антиоксидазные свойства декоративных растений // Субтропическое и декоративное садоводство, 2020. – Вып. 73. – С. 142-149.

Пильщикова Н.В., Панфилова О.Ф. Чувствительность к этилену и регуляция старения лепестков гвоздики и альстромерии. // Доклады ТСХА, 2016. – Вып. 288. – Ч. I. – С. 68-72.

Doom W.G., Woltering E.J. Physiology and molecular biology of petal senescence //Journal of Experimental Botany, 2008. – V. 59. – No 3. – P. 435 – 480.

Ezhilmathi K., Singh V. P., Arora A., Sairam R. K. Effect of 5-sulfosalicylic acid on antioxidant activity in relation to vase life of Gladiolus cut flowers // Plant Growth Regul., 2007. – Vol. 51.– P. 99-108.

Ferrante A., Tognoni F., Mensuali-Sodi A., Serra G. Treatment with Thidiazuron for Preventing Leaf Yellowing in Cut Tulips and Chrysanthemum. // Proc. XXVI IHC – Elegant Science in Floriculture. Eds. Th. Blom and R. Criley. Acta Hort., 2003. – Vol. 624. – P. 357-363.

Sardinha D., Rodrigues A., Ribeiro S., Ribamar N., Neto M., Reis F. Phytostimulants influence the vase life of *Heliconia psittacorum* CV Golden torch // Postharvest Biology and Technology, 2019. – V. 155. – P. 140 – 148.

Su J., Nie Y., Zhao G., Cheng D.,Wang R., Chen J., Zhang S., Shen W. Endogenous hydrogen gas delays petal senescence and extends the vase life of lisianthus cut flowers // Postharvest Biology and Technology, 2019. – Vol. 147. – P. 148-155.

THE EFFECT OF THE APPLICATION OF BIOFUNGICIDES ON THE STATE OF CUT TULIPS

O.O. Beloshapkina, O.F. Panfilova

Russian State Agricultural University — Timiryazev Moscow Agricultural Academy, 127550 Russia, Moscow, Timiryazevskaya street, 49. Panfilova.of@yandex.ru

Abstract. The aftereffect of the use of biofungicides on the physiological state and preservation of the decorative qualities of cut tulips was studied. Key events in petal aging occur before visible signs of aging appear. A sharp decrease in the membrane resistance index to 42% occurred with the full development of the flower. A favorable effect of the preparations Inbio-Fit + Biofit-1.0M + Biofit-2.0 (consortium of microorganisms) and Fitosporin-M, Zh (Bacillus subtilis) on the post-harvest state of tulips was noted.

Key words: apoptosis, biofungicides, membrane stability index, programmed cell death, tulips, cut flowers

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ *TRITICUM AESTIVUM* L. И *SECALE CEREALE* L.

К.И. Боталова

ФГОАУ ВО ПГНИУ, Пермь, botalova.ksyu@list.ru

Аннотация. Проблема устойчивости растений имеет природно-экологическое значение, т.к. адаптивная способность растений – один из основных факторов, определяющих ареалы распространения видов на планете и возможность их интродукции. Изучена активность антиоксидантных ферментов (каталаза, пероксидазы) в листьях пшеницы мягкой и ржи посевной в условиях кислотного и щелочного стресса, а также при выращивании на почве с разной реакцией среды.

Ключевые слова: кислотный и щелочной стресс, пероксидазы; каталаза; кислые и щелочные почвы

В последнее время среда обитания растений усложняется в связи с глобальными процессами на Земле (загрязнение, глобальное потепление и др.), вызванными антропогенным воздействием. Постоянно расширяется список культивируемых видов, а также форм и сортов растений, интродуцируемых в различные биотопы [Усманов и др., 2001;Кордюм и др., 2003; Трунова, 2007]. Распространенным последствием агрогенной и техногенной деятельности человека является изменение реакции почвенной среды. Однако сведений об окислительном стрессе, вызванном кислотностью или щелочностью корневой среды явно недостаточно [Borhannuddin B., et al., 2019].

Цель нашей работы – изучить изменение активности пероксидаз и каталазы в листьях *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. при щелочном и кислотном стрессах, а также в условиях относительно долговременной адаптации на кислых и щелочных почвах.

При изучении реакции на стрессовое воздействие отбор растительных проб провели через 0.5, 1, 2, 3, 4 и 24 ч после изменения pH корневой среды. При выращивании на почвах с разной pH пробы отбирались на 4-е и 8-е сутки после посадки. Биологическая и аналитическая повторность определений – трехкратная. Сравнение выборок провели дисперсионным методом; значимыми считали различия между сравниваемыми средними величинами с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0.05$).

В условиях щелочного стресса в листьях пшеницы пероксидазная активность повышалась в первые 4 часа наблюдений (рис. 1); через сутки она существенно снизилась относительно контрольного варианта. Тенденция к повышению активности ферментов в растениях первоначально прослежена и при кислотном стрессе, затем различия с растениями на контрольном варианте стали незначимыми.

В условиях кислотного стресса активность каталазы в листьях пшеницы в первые часы наблюдений (0.5, 1, 2, 3 и 4 ч) превышала контрольные значения, но через сутки она снизилась до контрольного уровня. При ощелачивании корневой среды в первый срок измерений наблюдалось существенное повышение активности каталазы в листьях пшеницы по сравнению с контрольным значением; через 1ч после стресс-воздействия активность оставалась повышенной. Через 2, 3 и 4 ч не выявлено значимых отличий от контрольного варианта, но через 24 ч активность фермента стала ниже контрольного уровня.

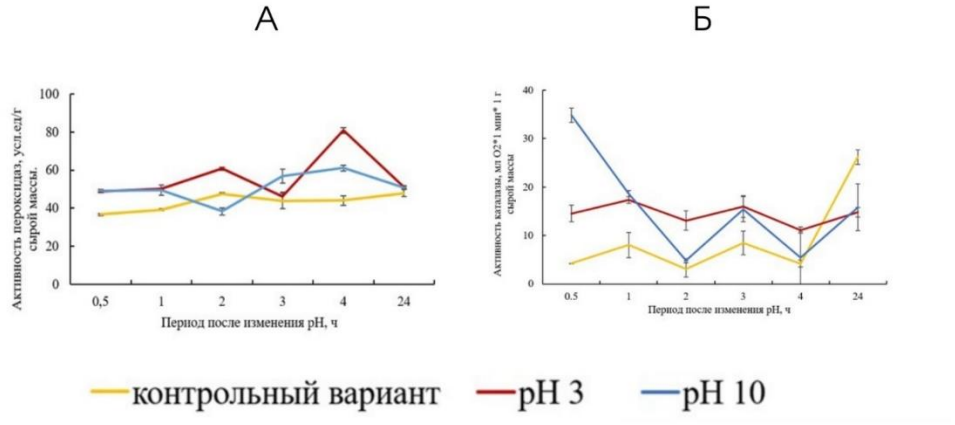


Рис.1. Динамика активности пероксидаз (А), условные единицы/1 г сырой массы и каталазы (Б), мл O_2*1 мин*1 г сырой массы в листьях пшеницы при кислотном и щелочном стрессе

В листьях ржи после внесения кислого и щелочного растворов в корневую среду прослежена общая тенденция к повышению активности пероксидаз (рис. 2). При кислотном стрессе во все сроки наблюдений была наибольшая активность ферментов. В условиях щелочной корневой среды в первые часы (0.5 и 1 ч) существенных различий с контрольным вариантом не выявлено, но позднее активность этого фермента резко возросла.

В условиях щелочного стресса в течение первых четырех часов наблюдений активность каталазы в листьях ржи существенно превышала контрольные значения, но через сутки активность фермента уменьшилась и стала несколько ниже, чем в контрольном варианте. В условиях кислой корневой среды не отмечено резкого усиления каталазной активности, лишь в последние сроки наблюдений она несколько превышала контрольные значения.

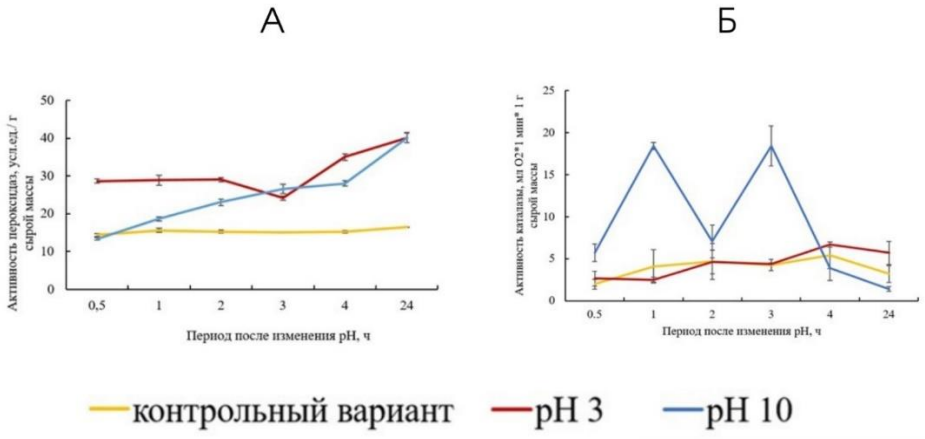


Рис.2. Динамика активности пероксидаз (А), условные единицы/1 г сырой массы и каталазы (Б), мл O_2*1 мин*1 г сырой массы в листьях ржи при кислотном и щелочном стрессе

Таким образом, изменение реакции корневой среды привело к развитию окислительного стресса в исследуемых растениях; прослежено усиление активности

антиоксидантных ферментов, направленное, по-видимому, на устранение избытка активных форм кислорода. Имеются сведения о том, что подкисление почвы способствовало активизации антиоксидантной защиты в корнях сои [Wang et al., 2014]. Под воздействием кислой реакции в корнях лотоса усилилась активность пероксидаз [Zelinovf et al., 2010]. Стресс, вызванный воздействием щелочных солей в течение 25 дней, сопровождался усилением активности ферментов антиоксидантной защиты – каталазы, супероксиддисмутазы, пероксидаз в листьях кукурузы [Latef, Tran, 2016].

В отдельных вариантах нашего эксперимента активность пероксидаз повышалась уже через 0.5 ч после изменения pH, возможно, настолько быстрая реакция связана с наличием запасного пула ферментов в мембранах и клеточных стенках. При воздействии стрессовых факторов пероксидазы клеточной стенки легко отделяются и участвуют в редокс-регуляции [Минибаева, Гордон, 2003].

Через сутки после стресс-воздействия у пшеницы этот показатель редокс-активности приблизился к контрольным значениям, в то время как в листьях ржи активность ферментов оставалась высокой. B. Borhannuddin и др. [2019] проследили повышенную активность ферментов антиоксидантной защиты в пшенице на третьи сутки после изменения pH корневой среды. Возможно, наблюдаемые нами колебания активности пероксидаз отразили каскадный характер развития окислительно-восстановительных процессов в растениях пшеницы, который проявляется не только в начальной стадии стресса, но и в последующем.

В ходе эксперимента по адаптации растений к кислым и щелочным почвам не отмечено повышения активности пероксидаз; она или понижена, или не отличалась от активности пероксидаз в листьях растений на нейтральной почве (рис. 3).

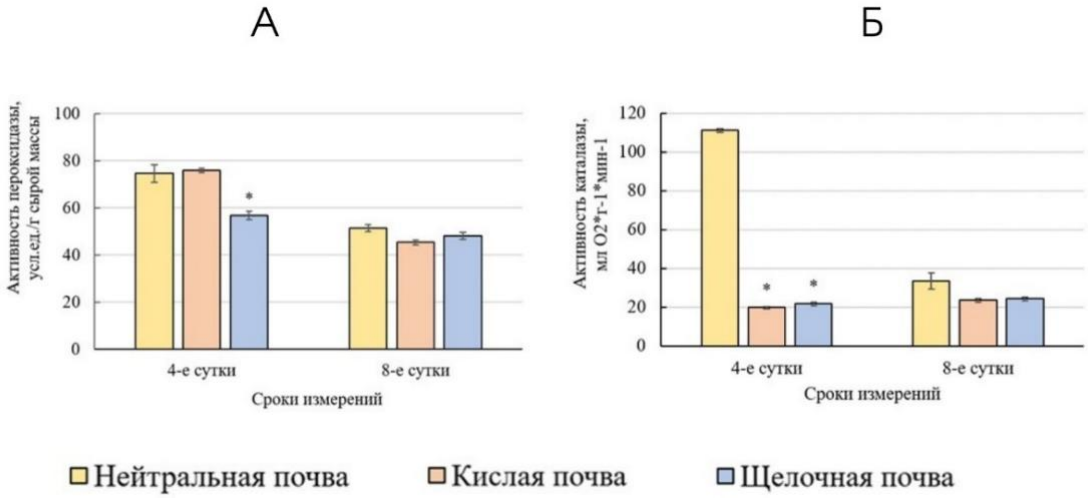


Рис.3. Активность пероксидаз (А), условные единицы/1 г сырой массы и каталазы (Б), мл O_2*1мин*1 г сырой массы в листьях пшеницы при выращивании на почвах с разной реакцией среды

Активность каталазы в листьях пшеницы на 4-е сутки в варианте с нейтральной почвой была очень высокой, но в растениях при выращивании на кислой и щелочной почвах она понижена более чем в 4 раза (рис. 3). На 8-е сутки активность фермента в контрольных растениях уменьшилась в несколько раз, но все же превышала каталазную активность в листьях ржи на кислой и щелочной почвах.

В листьях ржи, выращенной на почве с неблагоприятной реакцией среды, в оба срока наблюдений активность пероксидаз была ниже, чем у растений на нейтральной почве (рис. 4). Существенное подавление активности ферментов прослежено на 4-е сутки, при этом в вариантах с кислой и щелочной почвой значимых различий не выявлено. На 8-е сутки пероксидазная активность растений в вариантах опыта

отличалась в меньшей степени, но все же была пониженной у растений, выращенных при неблагоприятной реакции почвенной среды. Одновременно активность пероксидаз в листьях ржи на кислой почве была выше, чем в растениях на щелочной почве.

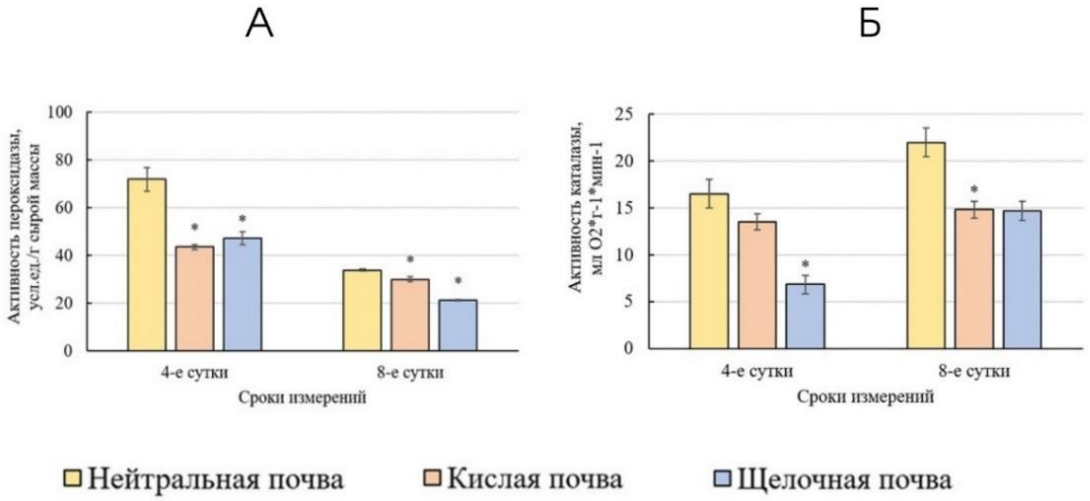


Рис.4. Активность пероксидаз и каталазы в листьях ржи при выращивании на почвах с разной реакцией среды: А - пероксидазная активность, условные единицы/1 г сырой массы; Б - каталазная активность, мл O_2*1мин*1 г сырой массы

Активность каталазы в листьях ржи, выращенной на щелочной почве, на 4-е сутки наблюдений была значительно ниже, чем у растений в вариантах с кислой и нейтральной почвой (рис. 4). На 8-е сутки активность каталазы в листьях контрольных растений несколько увеличилась и была выше на одну треть, чем у растений на кислой и щелочной почве.

Заключение

В динамике активности антиоксидантных ферментов при смене реакции корневой среды установлены существенные колебания, которые обусловлены, по-видимому, не только прямой и обратной зависимостью между этими ферментами, но и связью с другими показателями метаболической активности. У растений имеются также суточные и иные ритмы развития внутриклеточных процессов, которые отражаются в изменчивости физиолого-биохимических показателей.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что антиоксидантная система играет роль общего неспецифического механизма, позволяющего растению перенести стрессы разной природы, в том числе, вызванных неблагоприятной реакцией корневой среды. При резком подкислении и подщелачивании корневой среды злаки продемонстрировали повышение активности пероксидаз и каталазы.

Однако в листьях злаков, выращенных на кислой и щелочной почвах, активность пероксидаз и каталазы в листьях злаков была ниже или не отличалась от активности ферментов в растениях на нейтральной почве. На щелочной почве отмечена тенденция к большему снижению активности антиоксидантных ферментов, по сравнению с растениями на кислой почве. Ферментативная защита требует значительных расходов энергии, по-видимому, при постоянно действующем неблагоприятном факторе ведущую роль выполняют менее затратные механизмы защиты от сверхпродукции активных форм кислорода. В определенной степени снижение активности ферментов может быть обусловлено нарушениями pH-стата и баланса ионов в цитоплазме. Это понижение активности в листьях растений, выращенных на почвах с кислой и щелочной реакцией среды, следует рассматривать как негативное явление, т.к. оно

может сопровождаться снижением общей устойчивости растений к неблагоприятным факторам иной природы.

Литература

Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. - Киев: Наукова думка, 2003. – 277 с.

Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 459–464.

Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс: 64-е Тимиряз. чт. - М.: Наука, 2007. – 54 с.

Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений. - М.: Логос, 2001. – 224 с.

Borhannuddin B., Mirza H., Jubayer A.M., Shahadat Md.H., Bhuiyan T.F. and Masayuki F. Unraveling morphophysiological and biochemical responses of Triticum aestivum L. to extreme pH: Coordinated Actions of Antioxidant Defense and Glyoxalase Systems // Plants. 2019. V. 8. P. 6–24.

Latef A.A.A., Tran L.S. Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress // Frontiers in Plant Science. 2016. Vol. 7. P. 243–256.

Wang L., Zhou Q., Wang Q., Huang X. Combined effect of soil acidification and lead ion on antioxidant system in soybean roots // Journal of Chemical Ecology. 2014. V 31. P. 123–133.

Zelinovf V., Mistrik I., Paove-Balang P., Tamas L. Peroxidase activity against guaiacol, NADH, chlorogenic acid, ferulic acid and coniferyl alcohol in root tips of Lotus japonicus L. and corniculatus grown under low pH and aluminium stress // Biologia. 2010. V. 65. P. 279–283.

INFLUENCE OF ACIDITY AND ALKALINITY OF THE ROOT MEDIUM ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMS *TRITICUM AESTIVUM* L. AND *SECALE CEREALE* L.

K.I. Botalova

Perm State University, Perm, botalova.ksyu@list.ru

Annotation. The problem of plant resistance has nature and ecological importance, because the adaptive ability of plants is one of the main factors that determine the distribution areas of species on the planet and the possibility of their introduction. The activity of antioxidant enzymes (catalase, peroxidase) in the leaves of wheat and rye was studied under conditions of acid and alkaline stress, as well as when grown on soil with a different pH reaction of the environment.

Key words: acid and alkaline stress, peroxidases; catalase; acidic and alkaline soils

РОЛЬ ФИТОГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ РАСТЕНИЯМИ И ПАТОГЕНАМИ, НАСЕКОМЫМИ-ВРЕДИТЕЛЯМИ, ВИРУСАМИ

С.В. Веселова, Т.В. Нужная, Г.Ф. Бурханова, С.Д. Румянцев, А.Р. Касимова, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, veselova75@rambler.ru

Аннотация. Рассмотрена роль фитогормонов иммунитета – салициловой и жасмоновой кислот и этилена, а также фитогормонов роста – ауксинов, абсцизовой кислоты и цитокининов в регуляции взаимодействий между растениями и вредными организмами. Проанализировано значение кросс-токов гормональных сигнальных путей в регуляции защитных реакций в растениях. Показано, что штамм *Bacillus subtilis* 26Д модулировал уровень фитогормонов в растениях и индуцировал их устойчивость к различным вредным организмам.

Ключевые слова: фитогормоны, иммунитет растений, патогены, вредители, вирусы.

Во время своего роста и развития растения часто подвергаются заражению широким спектром патогенов и вредителей, включая вирусы, бактерии, грибы, оомицеты, нематоды и насекомых-вредителей [Shigenaga, Argueso, 2016, Zhao, Li, 2021]. Растительные патогены и вредители делятся на разные группы в зависимости от образа жизни, влияющего на их специализированные функции, участвующие в развитии взаимоотношений вредных организмов со своим растением-хозяином. По образу жизни растительные не вирусные патогены обычно делятся на некротрофов, биотрофов и гемибиотрофов. Насекомые вредители делятся в зависимости от ротового аппарата и типа питания на две группы – с грызущим и колюще-сосущим ротовым аппаратом. Вирусы растений могут вести четыре разных образа жизни: персистирующий, острый, хронический и эндогенный. Большинство вирусов растений, вызывающих заболевания сельскохозяйственных культур, переносятся векторами – насекомыми-вредителями, такими как тля, трипсы, цикадки и белокрылки и другими переносчиками, включающими клещей, нематод и грибы.

Для борьбы с патогенами и вредителями растения развили сложную многоступенчатую иммунную систему, которая упрощённо описывается «зиг-заг» моделью иммунной системы, предложенной Jones and Dangl в 2006 г. [Jones and Dangl, 2006]. Первая линия защиты растений заключается в восприятии ассоциированных с патогенами (PAMP, от pathogen-associated molecular patterns), повреждением (DAMP, от damage), насекомыми (HAMP, от herbivorous) или вирусами (VAMP от virus) молекулярных структур рецепторами распознавания (PRR, от pattern recognition receptors), что приводит к развитию базального иммунитета, известного как PAMP-триггерный иммунитет (PTI, от pattern triggered immunity) [Jones and Dangl, 2006]. Однако патоген может подавлять PTI с помощью эффекторов, что приводит к развитию чувствительности, запускаемой эффектором (ETS, от effector-triggered susceptibility). Вторая линия защиты растений называется иммунитетом, запускаемым эффектором (ETI, от effector-triggered immunity), и развивается, когда эффектор распознается продуктами эффекторно-специфических генов устойчивости, наиболее распространенными из которых являются так называемые нуклеотид-связывающие обогащенные лейциновыми повторами белки (NB-LRR) [Jones and Dangl, 2006].

Развитие PTI вызывает множественные клеточные ответы, включая генерацию активных форм кислорода (АФК) в апопласте за счет активации НАДФН-оксидаз, локализованных на плазмалемме, а также пероксидаз, активацию каскада кальций-зависимых или митоген-активируемых протеинкиназ, что впоследствии приводит к перепрограммированию транскриптома и протеома и синтезу защитных патоген-

индуцируемых белков (PR-белков, от pathogenesis related) [Robert-Seilaniantz et al., 2011]. Фитогормоны играют ключевую регулирующую роль в этих первичных иммунных ответах при активации PTI. Салициловая кислота (СК), жасмоновая кислота (ЖАК) и этилен считаются классическими растительными гормонами иммунитета [Shigenaga, Argueso, 2016]. Эти фитогормоны составляют центральную регуляторную сеть иммунитета растений и взаимодействуют с растительными гормонами, связанными с ростом, такими как цитокинины (ЦК), ауксины, абсцизовая кислота (АБК), брассиностероиды (БР) и гиббереллины (ГА) [Shigenaga, Argueso, 2016].

Классические фитогормоны иммунитета. Салициловая кислота (СК) - эндогенный регулятор роста фенольной природы, обнаруженный в различных органах многих растений. СК участвует в ответе растений на стрессы различной природы и считается ключевой сигнальной молекулой в иммунитете растений [Shigenaga, Argueso, 2016]. Впервые роль СК в защите растений была показана на табаке, пораженным вирусом табачной мозаики (TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV)), где было обнаружено накопление PR-1 белка. В дальнейшем было показано, что СК участвует в защите растений не только от вирусов, но также от биотрофных и гемибиотрофных патогенов и даже некоторых насекомых-вредителей, особенно с колюще-сосущим ротовым аппаратом [Erb et al., 2012]. В различных патоситемах СК необходима как для индукции гиперчувствительного ответа, так и для создания местной и системно-приобретенной устойчивости (СПУ), которая характеризуется увеличением экспрессии генов PR-белков [Shigenaga, Argueso, 2016]. В отличие от СК, жасмоновая кислота (ЖАК) - сигнальная молекула оксилипиновой природы и этилен – газообразный фитогормон, являются ключевыми регуляторами защиты растений от некротрофов и насекомых-вредителей с грызущим ротовым аппаратом [Shigenaga, Argueso, 2016]. Также, СК и ЖАК/этилен проявляют антагонизм в развитии защитных реакций против биотрофных и некротрофных патогенов. Кроме того, выдвигаются предположения о важности этилена в регуляции взаимодействия СК- и ЖАК-зависимых защитных реакций. Роль ЖАК и этилена в защите растений от вирусов неоднозначна, может быть как положительной, так и отрицательной и зависит от вида вируса, хотя чаще этилен ассоциируется с развитием вирусных симптомов [Zhao, Li, 2021]. В последнее время большое внимание исследователей привлекает факт влияния фитогормонов иммунитета СК и ЖАК на белки РНК-интерференции и микроРНК [Zhao, Li, 2021].

Фитогормоны роста и развития в иммунитете растений до недавнего времени рассматривались с позиции усиления агрессивности патогенов, а не возможности их участия в защите растений [Robert-Seilaniantz et al., 2011]. В последнее десятилетие появилось много доказательств участия таких фитогормонов (ЦК, ауксины, АБК и др.) в регуляции растительно-микробных взаимодействий, путем позитивного или негативного воздействия на уровень и активность компонентов сигнальных путей СК, ЖАК и этилена [Shigenaga, Argueso, 2016, Zhao, Li, 2021].

Индолилуксусная кислота (ауксин) является одним из главных ростовых фитогормонов, регулирующих апикальное доминирование, растяжение клеток, гравитропизм корня, образование сосудов и другие процессы. По данным литературы, ауксины способствуют восприимчивости растений к биотрофам и гемибиотрофам, играют положительную роль в образовании и росте галл и опухолей при инфицировании бактериями или галлообразующими насекомыми, а также в основном вызывают восприимчивость к вирусным инфекциям. Однако они способствуют развитию устойчивости растений к некротрофным патогенам, насекомым с грызущим ротовым аппаратом и некоторым вирусам [Erb et al., 2012, Shigenaga, Argueso, 2016, Zhao, Li, 2021]. При этом ауксины проявляют антагонизм с сигнальным путем СК и синергизм с сигнальным путем ЖАК. СК блокирует передачу ауксинового сигнала при

взаимодействии с биотрофными патогенами, а ауксины усиливают биосинтез и передачу сигналов ЖАК при защите от некротрофов и насекомых-вредителей [Shigenaga, Argueso, 2016, Erb et al., 2012].

АБК – растительный гормон терпеноидной природы, основными функциями которого являются торможение роста растений и регуляция газообмена, а также адаптация растений к абиотическим факторам среды. Современные знания о влиянии АБК на иммунитет растений недостаточны и противоречивы. В основном показано, что АБК влияет негативно на защиту растений от патогенов, но есть данные о позитивном участии АБК в регулировании растительно-микробных взаимодействий [Shigenaga, Argueso, 2016]. Напротив, в защите растений от насекомых-вредителей с грызущим и колюще-сосущим ротовым аппаратом АБК участвует в индукции защитных реакций синергично с ЖАК сигнальным путем [Erb et al., 2012]. Также АБК участвует в защите растений от вирусов через механизм накопления каллозы и ограничения перемещения вирусов, регулирует СК-сигнальный путь и влияет на биогенез микроРНК и малых интерферирующих РНК [Zhao, Li, 2021].

Цитокинины в течение долгого времени в патосистемах рассматривались как гормоны, продуцируемые патогенами и необходимые для их роста и развития. Хотя ЦК могут вызывать повышение чувствительности растений к биотрофам, гемибиотрофам и галлообразующим насекомым, они также могут индуцировать устойчивость к патогенам с некротрофным и биотрофным типом питания, к насекомым-вредителям с грызущим и колюще-сосущим ротовым аппаратом, а также к вирусам, при этом формирование устойчивости осуществляется через регуляцию СК-зависимых защитных реакций [Akhtar et al., 2020, Zhao, Li, 2021].

Таким образом, модуляция устойчивости к болезням с помощью фитогормонов роста - сложный процесс, вызывающий разнообразные регуляторные эффекты и требующий дальнейшего изучения.

Эффекторы вредных организмов. Активация сложных сигнальных сетей фитогормонов универсальный защитный ответ, используемый растениями. Поэтому неудивительно, что патогены, вирусы и насекомые-вредители развили способность манипулировать или разрушать сигнальные пути фитогормонов растений в свою пользу с помощью арсенала секретируемых эффекторных белков. Эффекторы обычно влияют на биосинтез, метаболизм и/или сигнальный путь гормона, но основной целью эффекторов являются транскрипционные факторы – модуляторы и регуляторы гормональных сигнальных путей [Kazan, Lyons, 2014].

Наши результаты показали, что эффектор SnTox3 патогенного гриба *Stagonospora nodorum*, поражающего пшеницу, манипулирует сигнальным путем этилена в растении, чтобы снизить содержание цитокининов и подавить СК-зависимые защитные реакции на ранней стадии инфицирования [Veselova et al., 2021].

Практическое применение фитогормонов в защите растений от патогенов, вирусов и вредителей. Изучать взаимоотношения растений с вредными организмами невозможно без участия микросимбионтов макроорганизмов (растений, насекомых и др.), которые составляют их микробиом. Микробиом растений и входящие в него эндофиты поддерживают рост и защищают макроорганизм от абиотических и биотических стрессовых факторов. Такие бактерии микробиома относят к стимулирующим рост растений бактериям (СРРБ), среди которых наиболее привлекательными для создания экологически чистых биопрепаратов являются бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* [Максимов и др., 2015]. СРРБ могут напрямую регулировать численность вредных организмов, а также влиять на защитные системы самого растения, запуская “системную индуцированную устойчивость” (СИУ) [Максимов и др., 2015]. СРРБ поддерживают рост и регулируют СИУ за счет

выработки различных метаболитов, в том числе гормональной и сигнальной природы, таких как СК, ЖАК, этилен, а также АБК, ЦК и ауксины. СРРБ запускают СИУ по ЖАК/этилен- и по СК-зависимым путям и такая устойчивость эффективна против широкого спектра патогенов, вредителей и даже вирусов [Максимов и др., 2015].

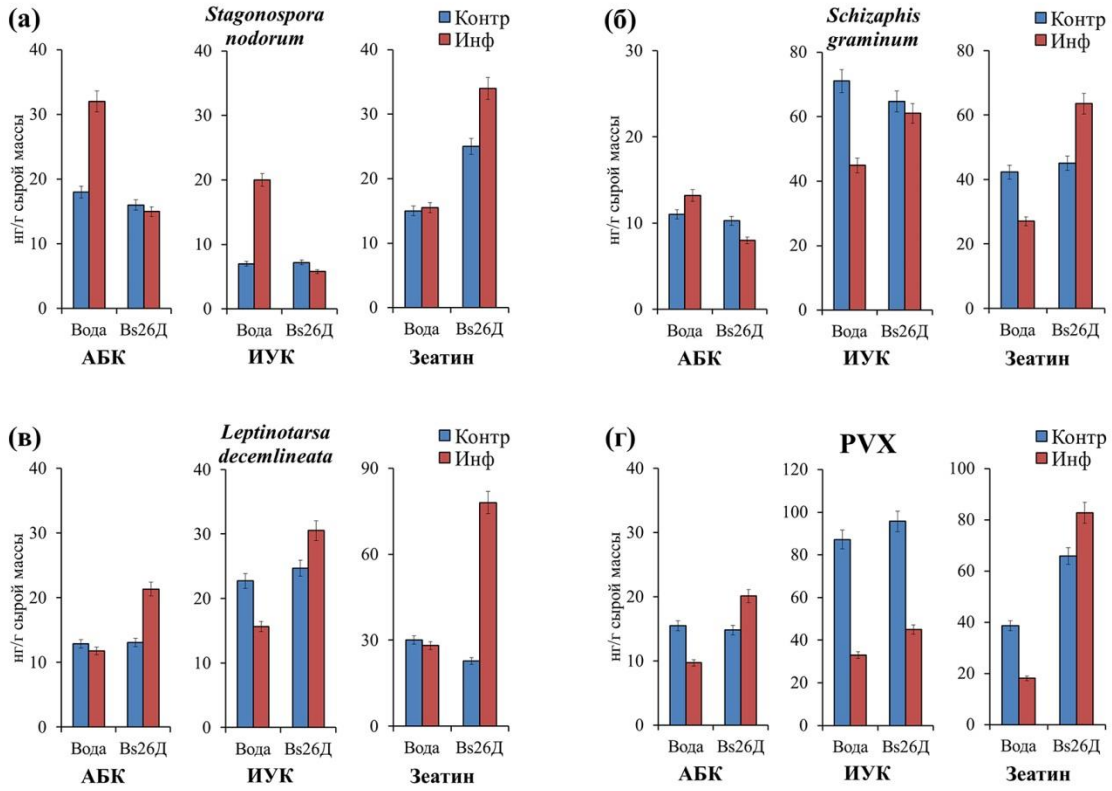


Рис. 1. Влияние бактерии *Bacillus subtilis* 26Д на содержание фитогормонов АБК, индолилуксусной кислоты (ИУК) и зеатина в листьях различных растений пораженных разными патогенами и вредителями: (а) – патосистема *Triticum aestivum* - *Stagonospora nodorum*, 1 день после инфицирования (дпи); (б) – патосистема *Triticum aestivum* – *Schizaphis graminum*, 3 дпи; (в) – патосистема *Solanum tuberosum* - *Leptinotarsa decemlineata*, 3 дпи; (г) – патосистема *Solanum lycopersicum* - *Potato virus X* (PVX), 7 дпи.

Наши результаты показали, что бактериальный штамм *Bacillus subtilis* 26Д индуцировал СИУ в различных патосистемах, модулировал уровень фитогормонов в пораженных растениях (рис. 1) и уменьшал степень повреждений, вызванных вредными организмами. Так в патосистеме *Triticum aestivum* - *Stagonospora nodorum* (пшеница – патогенный гриб септория) при совместимом взаимодействии штамм *B. subtilis* 26Д менял баланс фитогормонов в растениях в сторону увеличения содержания зеатина (рис. 1а) и запускал СИУ по СК-зависимому пути [Veselova et al., 2021]. В патосистемах *Triticum aestivum* – *Schizaphis graminum* (пшеница – обыкновенная злаковая тля) и *Solanum tuberosum* - *Leptinotarsa decemlineata* (картофель – колорадский жук) штамм *B. subtilis* 26Д сдвигал баланс фитогормонов в растениях в сторону увеличения содержания ауксинов и цитокининов (рис. 1б, в). В патосистеме *Solanum lycopersicum* - *Potato virus X* (томаты – вирус картофеля Х) штамм *B. subtilis* 26Д повышал содержание АБК и зеатина в пораженных растениях (рис. 1г).

Таким образом, фитогормоны играют важную роль в иммунитете растений, однако многие регуляторные механизмы с участием различных фитогормонов во взаимодействиях с вредными организмами еще не изучены. Будущие исследования должны быть сфокусированы на раскрытии механизмов кросс-токов между

различными гормональными сигнальными системами и на идентификации механизма действия эффекторов патогенов и вредителей на эти кросс-токи.

Работа выполнена в рамках госзадания, а также в рамках совместного международного гранта РНФ, проект № 19-46-02004 и Департамента науки и технологий (DST) правительства Индии, № C/1756/IFD/2019-21.

Литература

Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763–775.

Akhtar S.S., Mekureyaw M.F., Pandey C., Roitsch T. Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects // Front. Plant Sci. 2020. V. 10. 1777.

Erb M., Meldau S., Howe G.A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions // Trends in Plant Science. 2012. V. 17. P. 250–259.

Jones J.D.G., Dang J.L. The plant immune system // Nature. 2006. V. 444. P. 323–329.

Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors // Plant Cell. 2014. V.26. P. 2285–2309.

Robert-Seilaniantz A., Grantm M., Jones, J.D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism // Annu. Rev. Phytopathol. 2011. V.49. P. 317–343.

Shigenaga A., Argueso C. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens // Semin. Cell Dev. Biol. 2016. V.56. P.174–189.

Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Khusnutdinova E.K., Maksimov I.V. Ethylene-Cytokinin Interaction Determines Early Defense Response of Wheat against *Stagonospora nodorum* Berk. // Biomolecules 2021. V.11. P.174.

Zhao S., Li Y. Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections // PLoS Pathog. 2021. 17(2): e1009242.

THE ROLE OF PHYTHORMONES IN REGULATION OF INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND PATHOGENS, PESTS AND VIRUSES

S.V. Veselova, T.V. Nujnaya, G.F. Burkhanova, S.D. Rumyantsev, A.R. Kasimova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, veselova75@rambler.ru

Abstract. The role of phytohormones of immunity - salicylic and jasmonic acids and ethylene, as well as phytohormones of growth - auxins, abscisic acid and cytokinins in the regulation of interactions between plants and harmful organisms is considered. The significance of crosstalk of hormonal signaling pathways in the regulation of defense reactions in plants has been analyzed. It was shown that the *Bacillus subtilis* 26D modulated the level of phytohormones in plants and induced their resistance to various harmful organisms.

Key words: phytohormones, plant immunity, pathogens, pests, viruses

ЭФФЕКТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ПРИ КО-ИНОКУЛЯЦИИ РИЗОБАКТЕРИЯМИ В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Н.В. Евсеева[1], О.В. Ткаченко[2], А.Ю. Денисова[2], Г.Л. Бурыгин[1,2], Н.Н. Позднякова[1]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия, evseeva_n@ibppm.ru

[2] Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия, oktkachenko@yandex.ru

Аннотация. В данной работе были исследованы механизмы антиоксидантной защиты микроклонов картофеля к осмотическому стрессу при ко-инокуляции рост-стимулирующими ризобактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Установлено, что бактерии способствовали повышению в растениях активности каталазы при стрессе и снижению уровня малонового диальдегида при репарации, что приводило к более быстрому восстановлению растений после стресса.

Ключевые слова: культура тканей растений *in vitro*, картофель, осмотический стресс, рост-стимулирующие ризобактерии, ко-инокуляция

Засуха является ограничивающим фактором развития многих культурных растений. Использование рост-стимулирующих ризобактерий при дефиците воды может помочь растениям частично справиться с влиянием стресса за счет увеличения осмотического потенциала внутри клетки, снижения уровня малонового диальдегида, регулирования активности антиоксидантных ферментов и фитогормонального статуса макросимбионта, а также изменения морфологии корней [Kaushal, 2019; Arkhipova et al., 2020]. Для бактериальной инокуляции культурных растений все больше внимания уделяется ассоциациям микроорганизмов из разных таксонов, которые могли бы дополнить друг друга и оказать рост-стимулирующий и адаптационный эффекты на растение.

Цель работы – изучение влияния смешанной культуры бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 на физиолого-биохимические параметры микроклонов картофеля при осмотическом стрессе и репарации *in vitro*.

Были использованы микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L.*)* сорта Невский из коллекции микроклонов картофеля *in vitro* ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. В качестве инокулянтов были выбраны 2 штамма бактерий из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *A. baldaniorum* Sp245 (слабосолеустойчивый) и *O. cytisi* IPA7.2 (галотолерантный). Бактерии добавляли в среду Мурасиге-Скуга к культивируемым растениям в концентрации 10^6 кл/мл. Осмотический стресс создавали путем добавления в среду культивирования полиэтиленгликоля (М.м. 6000 Да) в концентрации 25 г/л, что соответствовало осмотическому давлению в среде выращивания –0,3 МПа. Оценивали физиолого-морфологические параметры растений, содержание малонового диальдегида, активность ферментов пероксидазы и каталазы в листьях на 7-ые сутки действия стресса и на 7-ые сутки репарации. Показано, что использование бактерий улучшало морфологические параметры микроклонов картофеля, достоверно увеличивая длину побега и количество корней. Ко-инокуляция приводила к повышению активности пероксидазы и каталазы в листьях, что коррелировало со снижением уровня малонового диальдегида, как продукта перекисного окисления липидов в растительных клетках и способствовало ослаблению окислительного стресса в растениях. Штамм *O. cytisi* IPA7.2, ранее выделенный нами из ризосферы картофеля [Burygin et al., 2018], оказывал более значительное протекторное действие на физиолого-биохимические процессы в растениях при стрессе и репарации по сравнению с штаммом *A. baldaniorum* Sp245, который был более эффективен в оптимальных условиях роста растений.

Полученные результаты расширяют представление об эффектах ко-инокуляции растений ризобактериями и антиоксидантной защиты растений в условиях осмотического стресса, а также позволяют рекомендовать использование рассмотренных нами бактерий в составе комбинированных биоудобрений.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116.

Литература

Arkhipova T. N., Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Vysotskaya L.B., Akhtyamova Z.A., Kudoyarova G. R. Rhizobacteria Inoculation Effects on Phytohormone Status of Potato Microclones Cultivated In Vitro under Osmotic Stress // Biomolecules. 2020. V. 10, №. 9. P. 1231. https://doi.org/10.3390/biom10091231

Burygin G.L., Kargapolova K.Yu., Kryuchkova Ye.V., Avdeeva E.S., Gogoleva N.E., Ponomaryova T.S., Tkachenko O.V. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35, No. 4. P. 55. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2633-x

Kaushal M. Microbes in cahoots with plants: MIST to hit the jackpot of agricultural productivity during drought // International journal of molecular sciences. 2019. Т. 20, №. 7. P. 1769. https://doi.org/10.3390/ijms20071769

EFFECTS OF ANTIOXIDANT DEFENSE OF PLANTS DURING CO-INOCULATION WITH RHIZOBACTERIA UNDER CONDITION OF OSMOTIC STRESS *IN VITRO*

N.V. Evseeva[1], O.V. Tkachenko[2], A.Yu. Denisova[2], G.L. Burygin[1,2], N.N. Pozdnyakova[1]

[1] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, evseeva_n@ibppm.ru
[2] Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia, oktkachenko@yandex.ru

Annotation. The mechanisms of antioxidant protection of potato microclones to osmotic stress during co-inoculation with growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 were investigated. It was found that bacteria promoted an increase in catalase activity under stress and a decrease in the level of malondialdehyde during repair, which led to a faster recovery of plants after stress.

Key words: *in vitro plant tissue culture, potato, osmotic stress*, plant-growth-promoting rhizobacteria, co-inoculation

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ И СВОЙСТВА β-ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

А.Н. Ершова

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет». г. Воронеж, Россия, aershova@vspu.ac.ru

Аннотация. Исследовали активность цитоплазмтической β-глюкозидазы растений гороха, расщепляющей специфический изосукцинимид-β-гликозид в условиях гипоксии (3-6 час) и CO_2-среды. Показано, что активность фермента возрастала, при этом K_m снижался с 0,90 при аэрации до 0,40 и 0,48 ммоль в газовых средах. Пероксид водорода подавлял активность β-глюкозидазы при гипоксии в меньшей степени, чем в условиях аэрации, что имеет важное значение для адаптации растений гороха к условиям дефицита кислорода.

Ключевые слова: β-глюкозидаза, гипоксия, пероксид водорода, растения гороха

Одной из наиболее важных групп веществ вторичного происхождения в растениях являются гликозиды. При этом природа агликона может значительно различаться. В форме гликозидов у растений встречаются фитогормоны, флавоноиды, предшественники лигнина, ксенобиотики [Li et al., 2017]. Для отдельных видов растений характерны специфические гликозиды. Так плюмериа-β-глюкозид, относящийся к иридоидным β-глюкозидам, присутствует только в растениях *Plumeria obtusa* [Erba, Kliebenstein, 2020] и разрушается специфической β-глюкозидазой. В растениях гороха был обнаружен специфический гликозид, который после выделения и очистки был идентифицирован как изосукцинимид-β-гликозид (ИС гликозид) и он не встречался у других бобовых растений [Zemlianukhin, Ershova, 1984]. Установлена важная роль гликозидов при акклиматизации растений к условиям водного и солевого стресса, низким температурам [Erba, Kliebenstein, 2020], что вероятно связано со скоростью метаболизации этих соединений в клетках растений под действием соответствующих β-глюкозидаз. Нами были разработаны способы выделения и очистки фермента β-глюкозидазы растений гороха, расщепляющей ИС-гликозид, и показано, что данный фермент может локализоваться не только в цитоплазме, но и связываться с веществами клеточной стенки и был способен расщеплять как арил-, так и алкил-гликозиды [Ершова, Баркалова, 2009]. Показано, что в зависимости от локализации β-глюкозидазы изменялись физико-химические и кинетические свойства фермента [Ershova, Barkalova**,** 2011**]**. Установлено, что при действии дефицита кислорода в клетках растений активируются свободнорадикальные процессы, что приводит к накоплению разных форм АФК [Ershova, Berdnikova, 2014; Ershova et al., 2011]. В связи с этим исследовали влияние кратковременной гипоксии и пероксида водорода, как одного из представителей АФК, на активность цитоплазматической β-глюкозидазы растений гороха.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 10-14 дневные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта «Рамонский 77», выращенные в лабораторных условиях методом гидропоники при 12-часовом фотопериоде. Надземную часть проростков помещали в затемненные вакуум-эксикаторы, через которые в течение 3-6 час пропускали воздух (контроль), азот или CO_2 из баллонов. Активность цитоплазматической β-глюкозидазы определяли, используя в качестве субстрата ИС-гликозид, который выделяли из растений гороха методом препаративной хроматографии. Активность β-глюкозидазы рассчитывали по количеству отщепившейся глюкозы, используя глюкооксидазный тест [Ершова, Баркалова, 2009]. За единицу активности β-гликозидазы (ФЕ) принимали то

количество фермента, которое катализировало расщепление 1 мкмоль ·субстрата за 1 минуту. Удельную активность фермента выражали в ФЕ на 1 мг белка. Белок определяли по Lowry. В работе использовали препараты фермента, которые получали при высаливании сульфатом аммония, пропусканием через колонки с G-25 и G-100, уравновешенные соответствующими буферами [Ershova, Barkalova, 2011]. Пероксид водорода вносился в среду инкубации фермента. Определение кинетических характеристик K_m и V_{max} β-гликозидазы проростков гороха проводили методом двойных обратных величин методом Лайунивера-Берка.

Результаты исследования и их обсуждение

Показано (табл.1), что в условиях кислородного стресса возрастала как общая, так и удельная активность фермента β-гликозидазы на 23% в первые часы действия гипоксии, и на 10% в условиях CO_2 –среды. Через 6 часов экспозиции активность фермента увеличивалась по сравнению с аэрируемыми растениями уже на 70% и 30 % соответственно. Происходили изменения и кинетических параметров β-гликозидазы, таких как K_m и V_{max}. Как видно из данных таблицы, при воздействии гипоксии величина K_m фермента снижалась и при 6 часовой экспозиции уменьшалась с 0,90 при аэрации до 0,40 и 0,48 ммоль в газовых средах соответственно. Это указывает на увеличение степени сродства фермента β-глюкозидазы к ИС-гликозиду в условиях дефицита кислорода. Такой характер изменения величины K_m фермента может быть обусловлен развитием приспособительных реакций растений к неблагоприятным внешним факторам. Вероятно, в стрессовых условиях (гипоксия и CO_2 –среда) происходят конформационные перестройки, связанные с изменениями активного центра фермента, что отражается на его работе.

Таблица 1. Активность и кинетические характеристики высокоочищенной β-гликозидазы растений гороха в условиях разных газовых сред с использованием в качестве субстрата изосукцинимид-β-гликозида (ФЕ- мкмоль мин-1)

Экспо-зиция	Вариант	Активность, ФЕ	Удельная активность, ФЕ/ мг белка	%	Km, ммоль	Vmax, ФЕ/мин.
3 час	Воздух	133,2±6,0	4,50±0,18	100	0,91	66,67
	гипоксия	159,5±6,2	5,54±0,27	123	0,67	38,46
	CO_2-среда	146,5±7,0	4,95±0,21	110	0,77	50,00
6 час	Воздух	147,3±5,5	4,38±0,10	100	0,90	21,74
	гипоксия	225,3±8,3	7,51±0,30	171	0,40	16,67
	CO_2-среда	173,0±8,1	5,14±0,24	131	0,48	17,54

Как известно [Ershova, Berdnikova, 2014], при дефиците кислорода в клетках растений активируются свободнорадикальные процессы, что приводит к накоплению разных типов АФК. Пероксид водорода является наиболее стабильным продуктом, который легко проникает через мембраны и участвует в окислении сульфгидрильных и метионильных групп белков [Ershova et al., 2011]. Исследовали влияние пероксида водорода (0,1-2 мМ) на активность цитоплазматической β-глюкозидазы растений гороха, помещенных в условия разных газовых сред. Пероксид водорода, как показали наши исследования, ингибировал активность β-глюкозидазы проростков гороха как в условиях аэрации, так и при дефиците кислорода. Наиболее сильный ингибирующий эффект пероксид водорода оказывал на активность β-глюкозидазы проростков гороха, находящихся в условиях CO_2-среды. Активность фермента уменьшалась на 20 % уже при концентрации пероксида водорода в среде 0,1 мМ. При действии гипоксии

ингибирование активности β-глюкозидазы проростков было значительно меньшим. Падение активности на 20% происходило при концентрации пероксида 1,5 мМ. В условиях аэрации этот эффект достигался при концентрации пероксида 0,2 мМ. Как известно, при окислительном стрессе некоторые аминокислотные остатки в белках часто подвергаются карбонилированию. Карбонилирование белков является биомаркером окислительного разрушения белковых молекул [Fredriksson et al., 2005]. Можно предположить, что уменьшение степени ингибирования активности β-глюкозидазы проростков гороха пероксидом водорода при гипоксии связано с тем, что в молекулах фермента группы, чувствительные к действию пероксида, уже подверглись карбонилированию за счет окислительного стресса, развивающегося в условиях дефицита кислорода. В условиях CO_2-среды подобного эффекта действия пероксида на фермент не наблюдали, что подтверждает специфичность влияния этого компонента газовой среды на обменные процессы растений, включая метаболизм ИС-гликозида и активность расщепляющей его β-глюкозидазы.

Заключение

При исследовании активности высокоочищенной β-глюкозидазы, расщепляющей специфический для проростков гороха ИС-гликозид, было обнаружено увеличение активности фермента на 70% в условиях кратковременной гипоксии и на 30% при действии CO_2-среды. Одновременно отмечалось значительное, почти двукратное, снижение величины K_m, что свидетельствует об увеличение степени сродства фермента к ИС-гликозиду в условиях дефицита кислорода. Таким образом в наших опытах было показано, что активность β-гликозидазы, как и других ферментов, может меняться в условиях кислородного стресса. При этом повышение активности β-глюкозидазы, вероятно, имеет важное значение для процессов адаптации растений гороха к неблагоприятным факторам внешней среды, так как ускоряется расщепление ИС-гликозида, поставляющего глюкозу для дыхательного метаболизма клеток растений в условиях дефицита кислорода и повышенных концентраций диоксида углерода. Полученные результаты подтверждаются ранее проведенными нами исследованиями, показавшими, что при дефиците кислорода содержание ИС-гликозида в растениях гороха резко снижалось [Zemlianukhin., Ershova, 1984].

В опытах было показано, что на активность цитоплазматической β-глюкозидазы влиял пероксид водорода, относящийся к наиболее стабильным формам АФК, накопление которого в клетках растений в условиях дефицита кислорода отмечалось ранее [Ershova et al., 2011]. При этом было отмечено, что ингибирующий эффект пероксида водорода на активность β-глюкозидазы проростков гороха проявлялся в меньшей степени, чем в условиях аэрации. Предполагается, что уменьшение степени ингибирования активности β-глюкозидазы проростков гороха пероксидом водорода при гипоксии связано с тем, что в молекулах фермента группы, чувствительные к действию пероксида, уже подверглись карбонилированию, который развивается в условиях дефицита кислорода за счет сбоев в работе ЭТЦ –дыхания и сброса электронов на другие субстраты. В условиях CO_2-среды этот эффект был выражен в меньшей степени, что подтверждает специфичность влияния этого компонента газовой среды на обменные процессы растений.

Литература

Ершова А.Н., Баркалова О.Н. Выделение, хроматографическая очистка и свойства β-глюкозидазы растений гороха, подвергнутого воздействию гипоксии и CO_2 –среды //Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. №5. С. 714-721

Ershova A. N., Barkalova O**.** Identification of catalytically active groups of pea (*Pisum sativum* L.) β-glucosidase // Applied Biochemistry and Microbiology. 2011. Vol.47. №3. P. 234–238 DOI: 10.1134/S0003683811030057

Ershova A., Berdnikova O. Impact of hypoxia and CO_2 – media on free-radical in cell compartments of pea and soy plants // Abstract Book. Plant Biology Europe FESPB/ EPSO 2014 Congress. Dublin, Ireland. 2014. P. 59.

Ershova A. N., Popova N. V., Berdnikova O. S. Production of reactive oxygen species and antioxidant enzymes of pea and soybean plants under hypoxia and high CO2 concentration in medium // Russian Journal of Plant Physiology. 2011. Vol. 58. № 6. P. 982–990. DOI: 10.1134/S1021443711050074

Erba M., Kliebenstein D. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy // Plant Physiology. 2020. Vol. 184. P. 39–52. DOI:10.1104/pp.20.00433

Fredriksson Å., Ballesteros M., Dukan S., Nystro¨m Th. Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and Proteases of the heat shock regulon // Journal of Bacteriology. 2005. Vol. 187 №12. P.4207-4213. DOI:10.1128/JB.187.12.4207–4213.2005

Li P., Li Y., Wang B., Yu H., Li Q., Hou B. The *Arabidopsis*UGT87A2, a stress-inducible family 1 glycosyltransferase, is involved in the plant adaptation to abiotic stresses // Physiol Plantarum. 2017. Vol. 159. №4. P. 379-507. DOI: 10.1111/ppl.12520

Zemlianukhin A.A., Ershova A.N. Metabolism of Isosuccinimide-β-Glucoside in Pea Seedlings // Biochemie und Physiologie der Pflanzen. 1984. Vol.179. №8. P. 679–684. DOI:10.1016/S0015-3796(84)80024

IMPACT OF HYPOXIA AND HYDROGEN PEROXIDE ON ACTIVITY AND PROPERTIES OF β-GLUCOSIDASE OF PEA PLANTS

A.N. Ershova

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia, aershova@vspu.ac.ru

Abstract. Activity of cytoplasmic β-glucosidase of pea plants degrading specific isosuccinimide-β-glycoside under hypoxia (3-6h) and CO_2-media was investigated. It was shown that enzyme activity was growing while K_m was declining from 0.90 under aeration to 0.40 and 0.48 mmol in gas media. Hydrogen peroxide was suppressing β-glucosidase activity under hypoxia to a lesser extent than under aeration; this is essential to pea plants adaptation to oxygen deficit.

Key words: β-glucosidase, hypoxia, hydrogen peroxide, pea plants

МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ФЛОЭМНЫХ ВОЛОКОН РАСТЕНИЙ ЛЬНА ПРИ ГРАВИТРОПИЗМЕ

Н.Н. Ибрагимова

ФГБУН КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия, nibra@yandex.ru

Аннотация. Растения льна (*Linum usitatissimum* L.) были наклонены в фазу быстрого роста, и клеточная стенка (КС) флоэмных волокон с разных сторон стебля: верхней – тянущей (pul) и нижней – противоположной ей (opp), была выделена во время активного подъема растений. Были показаны статистически значимые отличия в содержании галактозы, глюкозы и маннозы легкогидролизуемой фракции КС волокон разных сторон стебля, что, вероятно, объясняется и модификациями полисахаридов, имеющих в своем составе эти моносахариды.

Ключевые слова: клеточная стенка, флоэмные волокна, гравитропизм, лен

Растения под воздействием разных абиотических и биотических факторов могут изменять свое положение в пространстве. Принято считать, что травянистые растения утратившую позицию восстанавливают, главным образом, благодаря ассиметричному росту стебля в зоне удлинения согнутого стебля. Однако ранее нами было показано, что это не всегда так применительно к травянистым растениям. Удаляя всю зону удлинения стебля, растение не менее успешно реализуют гравитропическую реакцию, восстанавливая свое положение [Ibragimova et al., 2017]. В этой же работе было показано, что флоэмные волокна льна, находящиеся на стадии дифференцирования и, имея вторичную и третичную (желатинозную) клеточную стенку (КС), способны менять свою морфологию в ходе этой реакции, в том числе и за счет модификаций КС. Было сделано предположение, что флоэмные волокна, имеющие развитую КС желатинозного типа, могут в качестве растительных мускулов играть ключевую роль в этом процессе [Ibragimova et al., 2017]. В дальнейшем транскриптомный анализ позволил выявить в гравистимулированных волокнах изменение в экспрессии генов белков КС, таких, как β-галактозидаза, фасцилинподобные арабиногалактановые белки, экспансины, экстенсины, ингибитор пектиновых метилэстераз и др., а также некоторые изоформы целлюлозосинтаз и их кофакторы [Gorshkov et al., 2017; Mokshina et al., 2018]. Недавно были получены интересные данные относительно отличий в КС флоэмных волокон контрольных растений льна и волокон с тянущей (pul) стороны стебля в ходе гравитропической реакции [Ibragimova et al., 2020]. В настоящем исследовании приводятся результаты оценки моносахаридного состава КС флоэмных волокон разных сторон (тянущей (pul) и противоположной ей (opp)) опытных (наклоненных) растений льна.

Растения льна (*Linum usitatissimum* L.) сорт Могилевский из коллекции Всероссийского института льна в Торжке) выращивали на открытом воздухе в ящиках со слоем почвы 50 см, на опытном участке Казанского института биохимии и биофизики при естественном дневном свете и ежедневном поливе. Эксперименты начинались через 30 дней после посева, когда растения находились в фазе быстрого роста и развития. Растения были наклонены горизонтально к почве с помощью металлической скрепки в области семядолей. Образцы для анализа были взяты через 2 дня после наклона, из нижней части стебля (выше на 3 см от семядолей) – 5 см-фрагменты, которые фиксировали в кипящем 96% спирте в течение 15 мин и делили продольно на opp и pul стороны. Так называемый peels с этих фрагментов служили источником флоэмных волокон. Для этого peels отмывали в фарфоровой ступке этанолом. Мембраны и внутриклеточное содержимое удаляли промывкой хлороформ-спиртом. Далее полученные образцы КС сушили при комнатной температуре до постоянного веса и для получения углеводных фракций и последующего моносахаридного анализа гомогенизировали в жидком азоте. Вновь высушивали,

взвешивали и гидролизовали в ТФУ [Fry, 1988]. После охлаждения образец высушили, разводили в 100 мкл в деионизированной воды и проводили моносахаридный анализ с помощью метода высокоэффективной анионообменной хроматографией на колонке CarboPac PA-1 (4 x 250мм, Dionex, США), используя импульсный амперометрический детектор PAD (Dionex). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения PeakNet. Оставшиеся осадки высушивали и проводили полный гидролиз в серной кислоте [Fry, 1988] с последующим моносахаридным анализом полученных фракций. Моносахаридный анализ проведен в 2-х аналитических повторах для 3-х независимых биологических повторов. Более подробная методика описана в статье [Ibragimova et al., 2020].

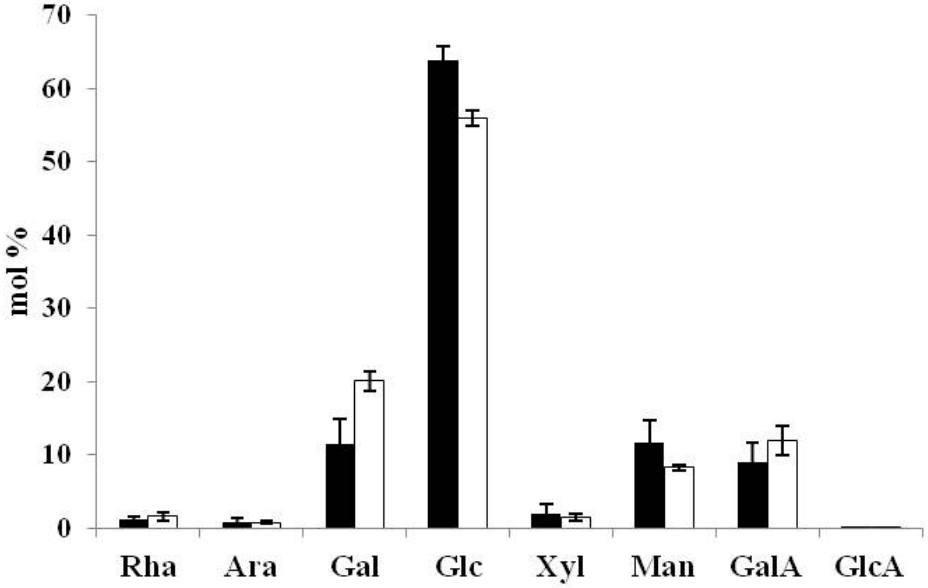


Рис. 1. Моносахаридный состав (mol%) ТФУ- фракции КС флоэмных волокон. Opp – черные столбики, pul – неокрашенные столбики.

Результаты моносахаридного анализа представлены на рисунках. Для оценки общего моносахаридного состава были проанализированы гидролизаты КС флоэмного волокна, полученные после обработки трифторуксусной кислотой (ТФУ) и гидролизаты, полученные после обработки ТФУ с последующей обработкой серной кислотой (ТФУ+H_2SO_4). Глюкоза была основным мономером как в ТФУ-фракции (рис.1), так и в сернокислых гидролизатах всех образцов (рис.2).

Наибольшая часть глюкозы высвобождалась после полного гидролиза предварительно обработанного остатка ТФУ серной кислотой (рис.2). Известно, что ТФУ гидролизует практически все нецеллюлозные полисахариды [Fry, 1988], что, собственно, мы и видим на диаграмме (рис.1). Однако глюкоза все же доминирует среди моносахаридов как результат, по всей видимости, гидролиза не только матриксных полисахаридов, но и аморфных участков целлюлозы. На диаграмме видно отличие в содержании глюкозы, а именно: доступной для гидролиза ТФУ некристаллической формы целлюлозы в pul меньше, чем в opp (opp – 63.9±1.9; pul – 56.0±1.0). Это сопровождается достоверным увеличением выхода галактозы и уменьшением маннозы в pul-образцах. Уменьшение некристаллической целлюлозы, вероятно, объясняется увеличением кристалличности целлюлозы в pul-образцах, что было показано ранее методами иммунохимии и ЯМР [Ibragimova et al., 2020]. Конечно, нельзя исключать, что изменения выхода глюкозы связаны с изменениями в матриксных полисахаридах, содержащих глюкозу, например таких, как ксилоглюкан

и каллоза. Тем более, присутствие этих полисахаридов показано в гравистимулированных растениях [Ibragimova et al., 2017; Ibragimova et al., 2020]. В pul-образцах также наблюдалось увеличение выхода галактозы, что может свидетельствовать о модификации галактозосодержащих полисахаридов в КС волокон разных сторон стебля. Ранее сообщалось, что рамногалактуронан I (RG-I) с галактановыми боковыми цепями играет особую роль в формировании и функционировании третичной клеточной стенки [Roach et al., 2011]. Используя для маркировки галактана моноклональные антитела LM5 [Jones et al., 1997], характерные для линейного тетрасахарида β-(1,4)-D-галактозы, было показано, что КС как контрольных, так и гравистимулированных растений (pul) хорошо метится антителом LM5. При этом КС в расширенных волокнах с тянущей стороны гравистимулированных растений всегда лучше метилась LM5 на протяжении большей части своей толщины, в то время как в клеточной стенке волокон контрольных растений метился, главным образом, внутренний слой третичной клеточной стенки [Ibragimova et al., 2020]. Такое распределение галактанов позволяет в некоторой степени объяснить полученный результат – увеличение выхода галактозы в ТФУ-фракции pul-образцов в данном исследовании. Отличие в содержании маннозы в ТФУ-фракции свидетельствует о реструктуризации, по всей видимости, маннозосодержащих полимеров, например, галактоманнанов.

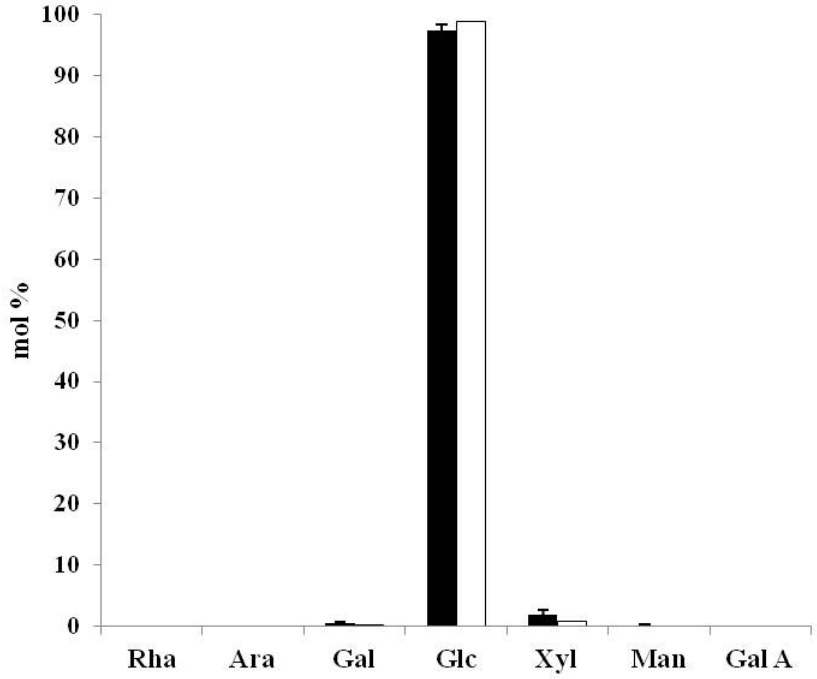


Рис. 2. Моносахаридный состав (mol%) фракции КС флоэмных волокон, полученной после последовательного гидролиза ТФУ и H_2SO_4. Opp - черные столбики и pul - неокрашенные столбики.

Моносахаридный анализ фракций, полученных после полного гидролиза серной кислотой, показал сильное доминирование целлюлозной глюкозы во всех образцах. Наличие минорных количеств галактозы и ксилозы в составе гидролизатов серной кислотой позволяет предположить, что мы в этой фракции обнаруживаем прочносвязанный с целлюлозой рамногалактуронан I, и что некоторая часть глюкозы может принадлежать фрагментам ксилоглюкана, связанного с целлюлозой. Доля целлюлозы в КС изолированных волокон обеих сторон стебля гравистимулированных растений льна методом последовательного кислотного гидролиза (ТФУ+H_2SO_4) были

сопоставимы и составляли около 90% от всего содержания полисахаридов клеточной стенки. В этой общей фракции достоверных отличий не наблюдали.

Таким образом, в данном исследовании в ходе гравитропической реакции были показаны статистически значимые отличия в содержании галактозы, глюкозы и маннозы легкогидролизуемой фракции КС волокон разных сторон стебля растений льна, что, вероятно, объясняется активным участием КС желатинозного типа в этом процессе. Важно отметить, что эти анализы были проведены на КС индивидуальных клеток. Однако отличие в содержании ТФУ-фракции моносахаридов нецеллюлозных полимеров надо подтверждать другими методами. Для выявления участия матриксных полисахаридов, содержащих глюкозу, галактозу и маннозу и возможной модификации архитектуры полисахаридов клеточной стенки в ходе гравитропической реакции планируется провезти сравнительный анализ их распределения в клеточной стенке в разных сторонах стебля с помощью методов иммуноцитохимии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РНФ 20-44-07005 (моносахаридный анализ) и при финансовой поддержке государственного задания ФИЦ "Казанский научный центр РАН"(обработка данных).

Литература

Fry, S.C. The Growing Plant Cell Wall: Chemical Metabolic Analysis; Longman Scientific & Technical: London. UK. 1988. P. 118–140.

Gorshkov O., Mokshina N., Ibragimova N., Ageeva M., Gogoleva N., Gorshkova T. Phloem fibres as motors of gravitropic behaviour of flax plants: level of transcriptome // Functional Plant Biol. 2017. T. 45(2). C. 203–214.

Ibragimova NN, Ageeva MV, Gorshkova TA. Development of gravitropic response: unusual behavior of flax phloem G-fibers // Protoplasma. 2017. V. 254. P.749–762.

Ibragimova N., Mokshina N., Ageeva M., Gurjanov O., Mikshina P. Rearrangement of the Cellulose-Enriched Cell Wall in Flax Phloem Fibers over the Course of the Gravitropic Reaction // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. C. 5322.

Jones L.; Seymour G.; Knox J.P. Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Wall Using a Monoclonal Antibody Specific to (1–4)-D-Galactan // Plant Physiol. 1997. V. 113. P. 1405–1412.

Mokshina N.; Gorshkov O.; Ibragimova N.; Pozhvanov G.; Gorshkova T. Screenplay of flax phloem fiber behavior during gravitropic reaction // Plant Signal. & Behavior. 2018. V. 13. 1486144. (3 pages).

Roach M.J.; Mokshina N.Y.; Snegireva A.V.; Badhan A.; Hobson N.; Deyholos M.K.; Gorshkova T.A. Development of cellulosic secondary walls in flax fibers requires – galactosidase // Plant Physiol. 2011. V. 156. P. 1351–1363.

MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF THE CELL WALL IN FLAX PHLOEM FIBERS DURING GRAVITROPISM

N.N. Ibragimova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS,
nibra@yandex.ru

Abstract. Flax plants (*Linum usitatissimum* L.) were tilted in the phase of rapid growth, and the cell wall (CW) of phloem fibers from different sides of the stem: the upper – pulling (pul) and the lower – opposite (opp), was isolated during the active lifting of plants. Statistically significant differences were shown in the content of galactose, glucose, and mannose in the easily hydrolyzable fraction of CW fibers located on the different sides of the stem, which is probably explained by modifications of polysaccharides containing these monosaccharides.

Key words: cell wall, phloem fibers, gravitropism, flax

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫНОСЛИВОСТИ *FUSARIUM EQUISETI* И *CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM* К ДЕЙСТВИЮ ХРОМА И МЕДИ

Н.А. Исламова, И.Л. Бухарина

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия,
islamovanadezhda@mail.ru, buharin@udmlink.ru

Аннотация. Одной из актуальных проблем настоящего времени является восстановление нарушенных земель, в том числе, загрязненных тяжелыми металлами в результате хозяйственной деятельности человека. Отсюда разработка биотехнологий, способных наиболее экономично и экологически безопасно восстановить нарушенные земли, является важной задачей. В этом плане использование полезных для растений микроорганизмов (особенно эндофитов), адаптированных к стрессовым условиям и способных повышать устойчивость растений, является весьма перспективным направлением.

Ключевые слова: металлрезистентность, эндофиты, микромицеты, устойчивость, инокуляция

В настоящее время в результате хозяйственной деятельности человека, в том числе добычи полезных ископаемых, сжигания ископаемого топлива и угля, а также использования удобрений и пестицидов в сельском хозяйстве, происходит накопление солей, в том числе тяжелых металлов (ТМ), в почве и нарушение ее структуры [Водяницкий, 2013; Bilal et al., 2020]. Загрязнение почвы также меняет состав и характер жизнедеятельности микробных сообществ, нарушает метаболизм и снижает рост и размножение растений [Трифонова, Забелина, 2017; Sharma et al., 2019].

Отсюда актуальным становится вопрос восстановления нарушенных земель, и наиболее перспективной в этом плане является фиторемедиация, благодаря своей простоте, экономичности и общему положительному воздействию на окружающую среду [Li et al., 2012]. Однако эффективность фиторемедиации во многом повышается благодаря взаимодействию растений с полезными для них микроорганизмами (особенно эндофитами), которые позволяют им изменять поглощение, подвижность и биодоступность ионов металлов [Ikram, 2018].

Известно, что некоторые эндофитные грибы, выделенные в средах с повышенным содержанием ТМ, обладают повышенной металлрезистентностью и способны повысить устойчивость к металлам растений-хозяев [Sharma et al., 2019].

Отсюда целью наших исследований являлось изучить пределы выносливости эндофитных грибов, выделенных из корневой системы древесных растений, произрастающих в условиях техногенного загрязнения, к действию меди и хрома.

В качестве объектов исследования нами были выбраны эндофитные грибы *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*, выделенные из корневой системы древесных насаждений, произрастающих на территории санитарно-защитной зоны промышленного предприятия «Ижсталь», являющегося одним из основных загрязнителей города Ижевска (Удмуртская Республика). Изоляты грибов были выделены ранее аспирантами Удмуртского государственного университета и в настоящее время хранятся в лаборатории «Экологические биотехнологии». Видовая принадлежность грибов установлена методами молекулярного анализа ДНК в лаборатории Лейбницкого института овощных и декоративных культур (г. Берлин) [Bukharina et al., 2016].

Fusarium equiseti – это широко встречающийся в природе корневой эндофит, продемонстрировавший высокую устойчивость в исследованиях с разными концентрациями солей тяжелых металлов [Akinkunmi, 2015]. *Cylindrocarpon magnusianum* также в предыдущих наших исследованиях показал высокую устойчивость к хлориду натрия и солям ТМ, и, кроме того, гриб встречается в местах

загрязнения почв нефтью, что может быть востребовано в восстановлении нефтезагрязненных земель [Sogonov, Velikanov, 2004].

Грибы культивировали на агаровой среде, состоящей из декстрозного бульона, агара-агара и дистиллированной воды, с внесением разных концентраций меди и хрома (биогенный и небиогенный химические элементы): Cu – 50; 100; 150 мг/л; Cr – 2,5; 5; 10 мг/л. Для эксперимента использовали соли $CuSO_4 \times 5H_2O$ и $K_2Cr_2O_7$ с пересчетом на моделируемые концентрации металлов. Также имелся контрольный вариант. Измеряли диаметр колоний мицелиальных грибов и скорость их роста. Особенности реакции грибов на условия стресса оценивались по содержанию малонового диальдегида (МДА), являющегося продуктом окисления липидов. Оценивали содержание МДА по степени накопления продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), определяя оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 532 нм (Жильцова, 2011). Для этого в пробирку с грибной биомассой добавляли 2 мл дистиллированной воды и 3 мл 10% ТХУ. Из получившегося гомогената отбирали пробу 2 мл и добавляли 0,5% ТБК. Стоит также отметить, что ряд исследований подтверждают зависимость концентрации МДА в мицелии гриба от содержания ТМ в субстрате, следовательно, данный показатель может служить биомаркером стрессовых условий, в которых оказываются эндофиты [Бухарина, 2016; Hou et al., 2020].

Результаты измерения диаметра и скорости роста колоний *Fusarium equiseti* представлены на рисунках 1-2, *Cylindrocarpon magnusianum* – на рисунках 3-4.

Результаты эксперимента показали, что содержание хрома в среде оказало влияние на рост *F. equiseti.* Диаметр колоний гриба при всех концентрациях металла был достоверно меньше по сравнению с контролем. При этом достоверных различий между самими вариантами не наблюдалось.

Скорость роста колоний *F. equiseti* в начале эксперимента отличалась от контроля в меньшую сторону лишь при концентрации хрома 2,5 мг/л. Далее гриб адаптировался, и скорость роста мицелия во всех вариантах до конца эксперимента не имела достоверных отличий от контроля.

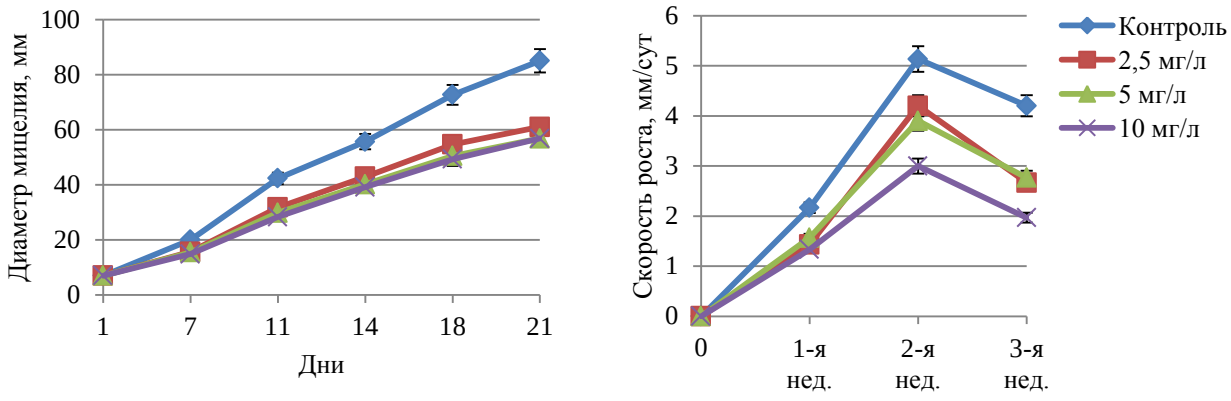
К меди *F. equiseti* проявил большую устойчивость. При концентрациях 50 и 100 мг/л диаметр колоний гриба в начале эксперимента превышал значения контроля. Далее от контроля отличался лишь вариант, выращенный на среде с медью в концентрации 150 мг/л, имея меньший размер колонии.

Скорость роста колоний *F. equiseti* при выращивании на среде с солями меди в начале эксперимента была достоверно выше контроля при концентрации 100 мг/л. К концу эксперимента скорость роста колоний гриба снизилась и при концентрациях меди 50 и 100 мг/л была достоверно меньше, чем у контроля.

На *C. magnusianum* содержание хрома в среде не оказало ингибирующего воздействия. Диаметр колоний гриба при всех концентрациях металла в среде достоверно от контроля не отличался. Не отличалась от контроля и скорость роста колоний гриба во всех вариантах опыта.

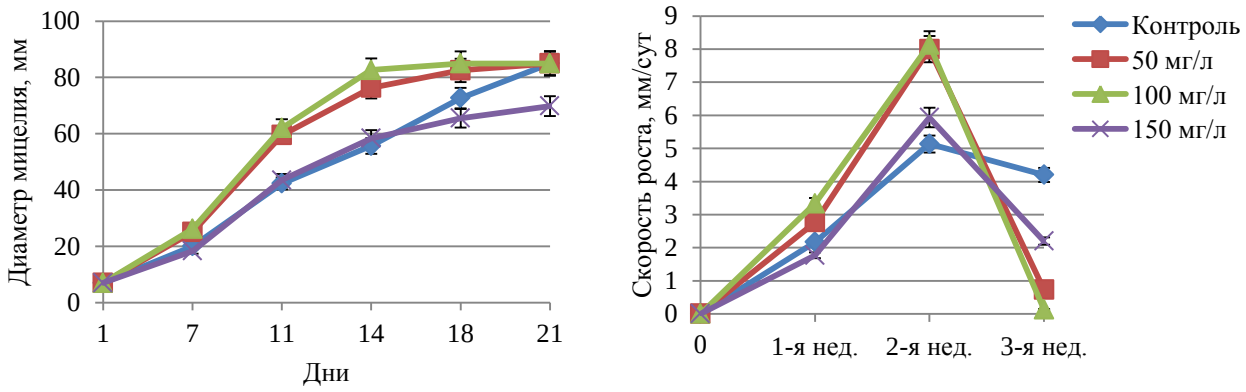
Медь же оказала ингибирующее воздействие на рост *C. magnusianum*. С увеличением концентрации металла в среде наблюдалось уменьшение диаметра колоний.

Скорость роста колоний при концентрации меди в среде 100 и 150 мг/л в начале эксперимента была существенно ниже, чем в контроле. Далее скорость роста колоний во всех опытных вариантах достигла своих максимальных значений и достоверно от контроля не отличалась.



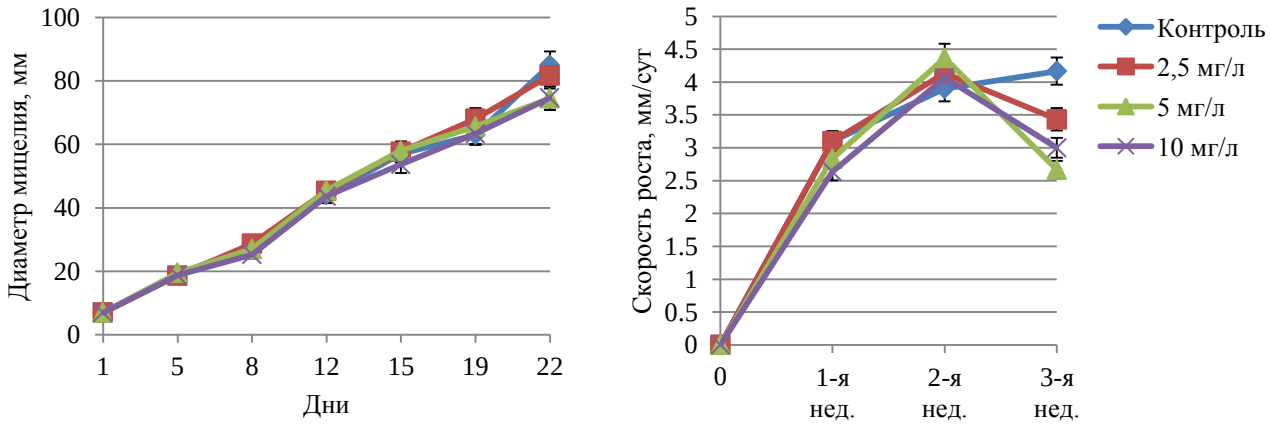
А **В**

Рисунок 1. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Fusarium equiseti* на субстратах с разной концентрацией хрома



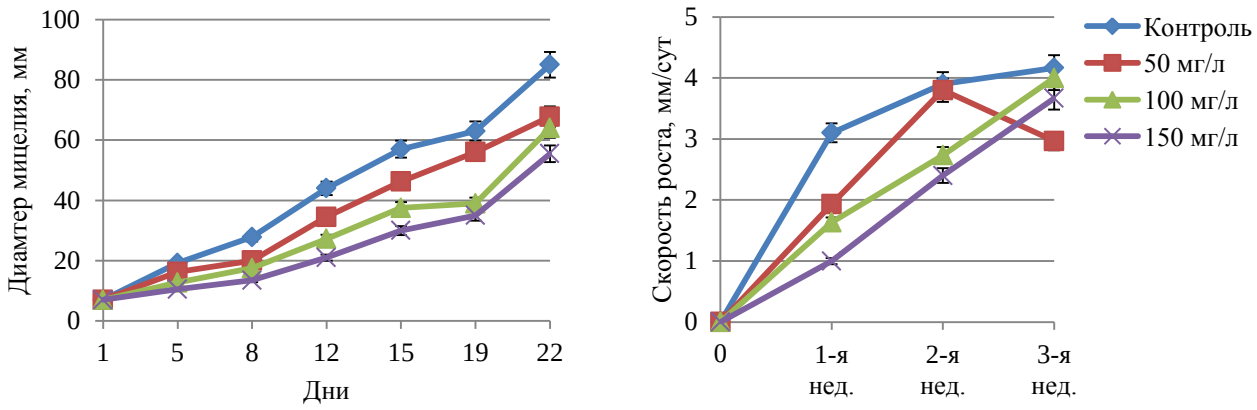
А **В**

Рисунок 2. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Fusarium equiseti* на субстратах с разной концентрацией меди



А **В**

Рисунок 3. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Cylindrocarpon magnusianum* на субстратах с разной концентрацией хрома



А **В**

Рисунок 4. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Cylindrocarpon magnusianum* на субстратах с разной концентрацией меди

Результаты определения содержания МДА в мицелии грибов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание малонового диальдегида в изолятах *F. equiseti* и *C. magnusianum*, мкмоль/1 г сырой массы

Содержание соли ТМ в среде	Содержание МДА в *Cylindrocarpon magnusianum*	Содержание МДА в *Fusarium equiseti*
Без ТМ (контроль)	2,034 ± 0,047	1,290 ± 0,071*
Cr 2,5 мг/л	6,092 ± 0,585↑	1,743 ± 0,071↑**
Cr 5мг/л	7,276 ± 1,115↑	1,760 ± 0,070↑
Cr 10мг/л	3,881 ± 0,054↑	1,142 ± 0,014
Cu 50мг/л	2,031 ± 0,021	2,227 ± 0,230
Cu 100мг/л	3,571 ± 0,431↑	6,368 ± 0,775↑
Cu 150мг/л	4,117 ± 0,291↑	8,076 ± 0,311↑
* Среднее значение показателя ± стандартное отклонение. ** Достоверное отличие от контроля: увеличение ↑ или уменьшение ↓ показателя (p <0,05).		

В эксперименте с хромом содержание МДА практически во всех опытных образцах *F. equiseti* и *C. magnusianum* превышало значения контроля. Лишь при самой высокой концентрации (10 мг/л) содержание МДА в мицелии *F. equiseti* не имело отличий от контроля. При этом скорость роста колонии *F. equiseti* при данной концентрации в течение всего эксперимента была наименьшей по сравнению с другими опытными образцами, хотя достоверной разницы с контролем не было. Остальные же варианты, несмотря на некоторое ингибирование роста, увеличивали свои размеры в диаметре. В мицелии *C. magnusianum* при самой высокой концентрации хрома содержание МДА было достоверно ниже, чем в других вариантах, но оставалось более высоким, чем в контроле.

Отсюда можно заключить, что содержание хрома в субстрате вызвало стрессовую реакцию у *F. equiseti*, однако организм, преодолев адаптационный период, возобновил ростовые процессы.

При самой низкой концентрации меди в субстрате (50 мг/л) содержание МДА в мицелиях *F. equiseti* и *C. magnusianum* не имело достоверных отличий от контроля. Данная концентрация не вызвала ингибирующего воздействия на рост культур. Далее по мере увеличения концентрации меди в субстрате содержание МДА в мицелии грибов постепенно увеличилось и достигло максимальных значений при концентрации 150 мг/л. Поскольку рост мицелия грибов при данной концентрации меди в субстрате продолжался, можно заключить, что синтез МДА сыграл роль в системе адаптивных реакций гриба.

Таким образом, результаты эксперимента показали, что *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* обладают высокой металлрезистентностью к хрому и меди. При этом *C. magnusianum* проявил большую устойчивость к хрому, *F. equiseti* – к меди. Проведенный анализ на содержание МДА в мицелии грибов позволяет предположить, что синтез МДА и увеличение его концентрации в мицелии является реакцией на увеличение концентрации ионов ТМ в субстрате. Данные результаты также показывают возможность использования эндофитов *F. equiseti* и *C. magnusianum* в технологиях биоремедиации почв, загрязненных солями ТМ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ «Аспиранты» № 19-316-90003.

Литература

Бухарина И.Л. Исследование пределов устойчивости *Rhodotorula mucilaginosa* к действию солей цинка и хрома / И.Л. Бухарина, Д.А. Вахрушева, Р.Г. Латыпова // Современные проблемы развития техники, экономики и общества: материалы Международной научно-практической заочной конференции, г. Казань, Научно-образовательный центр «ЗНАНИЕ», 2016. – С. 35-37.

Водяницкий Ю.Н. Загрязнение почв тяжелыми металлами и металлоидами и их экологическая опасность (аналитический обзор) // Почвоведение. - № 7. – 2013. – С. 872-881.

Жильцова Ю.В., Зависимость антиоксидантно-прооксидантного равновесия в макрофитах от уровня антропогенной нагрузки / Ю.В. Жильцова // Труды БГУ 2011, том 6, часть 2. – С. 47-54.

Трифонова Т.А., Забелина О.Н. Изменение биологической активности почвы городских рекреационных территорий в условиях загрязнения тяжелыми металлами и нефтепродуктами // Почвоведение. - № 4. – 2017. – С. 497-505.

Akinkunmi W.A. Factors affecting toxic lead (II) ion bioremediation by Fusarium equiseti isolated from the mangrove soil environment of southeast Borneo / W.A. Akinkunmi, A.A.S.A. Husaini, A. Zulkharnain, T.M. Guan, H.A. Roslan // MALAYSIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY. – Vol. 11, Issue: 2. – 2015. – P. 215-222.

Bilal S., Shahzad R., Imran M., Jan R., K. Min Kim, Lee In-J. Synergistic association of endophytic fungi enhances Glycine max L. resilience to combined abiotic stresses: Heavy metals, high temperature and drought stress // Industrial Crops & Products. – Vol. 143. – 2020.

Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K. and Islamova N. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment // International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR). – Vol. 7, Issue 4. – 2016. – P. 1386-1394.

Hou L., Yu J., Zhao L. and He X. Dark Septate Endophytes Improve the Growth and the Tolerance of Medicago sativa and Ammopiptanthus mongolicus Under Cadmium Stress // Frontiers in Microbiology. – Vol. 10. – 2020. – P. 1-17.

Ikram M. IAA producing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants grown on heavy metal contaminated soils

/ M. Ikram, N. Ali, G. Jan, F.G. Jan, et al. // PLoS ONE. – Vol. 13(11). – 2018. – URL: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208150

Li H.Y., Wei D.Q., Shen M., Zhou Z.P. Endophytes and their role in phytoremediation // Fungal Divers. – Vol. 54. – 2012. – P. 11-18.

Sharma V.K., Li X., Wu G., Bai W., Parmar S., White Jr J.F., Li H. Endophytic community of Pb-Zn hyperaccumulatorArabisalpina and its role in host plants metal tolerance // Plant Soil. – Vol. 437. – 2019. – P. 397–411.

Sogonov, M.V., Velikanov, L.L. Soil microfungi from alpine and subnival ecosystems of the Northwestern Caucasus / Sogonov, M.V., Velikanov, L.L. // Mikologiya i Fitopatologiya. – Vol. 38, Issue 3. – 2004 – P. 50-58.

STUDY OF ENDURANCE *FUSARIUM EQUISETI* AND *CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM* TO THE ACTION OF CHROME AND COPPER

N.A. Islamova, I.L. Bukharina

FSBEI HE "Udmurt State University", Izhevsk, Russia, islamovanadezhda@mail.ru, buharin@udmlink.ru

Abstract. One of the urgent problems of the present time is the restoration of disturbed lands, including those contaminated with heavy metals as a result of human economic activity. Hence, the development of biotechnologies capable of most economically and ecologically safe restoration of disturbed lands is an important task. In this regard, the use of microorganisms useful for plants (especially endophytes), adapted to stressful conditions and capable of increasing plant resistance, is a very promising direction.

Key words: metal resistance, endophytes, micromycetes, resistance, inoculation

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГЕНОТИПОВ *LINUM USITATISSIMUM* L. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

К.П. Королев

ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия,
corolev.konstantin2016@yandex.ru

Аннотация. В статье отражены результаты лабораторных исследований по изучению действия растворов NaCl на прорастание семян льна-долгунца и льна масличного. Выявлено, что скорость набухания и прорастания семян зависит как от особенностей генотипа, так и уровня стресс-нагрузки. Установлено негативное влияние трех концентраций (0,7%, 1,4%, 2,1%) хлорида натрия на изучаемые диагностические показатели.

Ключевые слова: лен, сорт, всхожесть, хлоридное засоление, устойчивость

Одним из стрессовых факторов, оказывающих негативное влияние на уровень реализации биологического потенциала растений является засоление почв. Избыточное содержание хлорида натрия может вызывать дисбаланс в почвенной среде, приводящий не только к дефициту микроэлементов, но и нарушению проницаемости мембран клетки, структуры хлоропластов и ряду других негативных последствий [Chachar, 2008]. Выявлена роль продолжительности действия солевого стресса на прорастание семян, обусловленной осмотическим эффектом ионов натрия и хлора [Muhammad, 2010]. Работы по солеустойчивости льна немногочисленны, и результаты в них отражают отрицательный эффект солевого стресса на всхожесть семян, морфометрические параметры проростков [Yaver, 2009], взаимосвязь концентрации воздействия и степенью устойчивости растений льна культурного [Kadkhodaie,2011]. В Тюменской области имеются сельскохозяйственные территории с различной степенью хлоридного засоления, что обуславливает проведение данных исследований с целью выявления ответных реакций генотипов льна и определение сортов устойчивых к стрессовому фактору данной природы.

Исследования проводили в 2018-2019 гг. в лаборатории микробиологических и биотехнологических исследований кафедры ботаники, биотехнологии и ландшафтной архитектуры Института биологии Тюменского государственного университета. В качестве объекта исследований использованы сорта льна –долгунца и льна масличного различного эколого-географического происхождения из генофонда института. Лабораторный опыт включал в себя проращивание семян в стерильных чашках Петри на дистиллированной воде (контроль) и растворах хлорида натрия NaCl в трех концентрациях 0,7%, 1,4% и 2,1% (опыт). Семена равномерно раскладывали в чашках на два слоя фильтровальной бумаги, добавляли воду либо раствор хлорида натрия и помещали в термостат ТС0-1/80 (Россия) на 7 суток при температуре 22 ^{0}С. Ежедневным подсчетом учитывали количество проросших семян. На третьи сутки устанавливали энергию прорастания (ЭП, %), на седьмые – лабораторную всхожесть семян (ЛВ, %). Повторность опытов – четырехкратная. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Г.Ф. Лакину [Лакин, 1980], достоверность различий устанавливали на основании t- критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

Солевой стресс-фактор может оказывать отрицательное воздействие на ранние стадии онтогенеза проростков, ингибируя процессы митотического цикла и тем самым замедляя развитие растений [Кудоярова, 2013; Ахиярова, 2017; Hanif, 1998; Yousufinia, 2013]. В результате исследований выявлена неравномерность прорастания семян льна как в контрольном, так и опытном варианте, при этом известно, что вначале количество поступающего в семена хлора при засолении незначительно и не превышает того, которое может поступать путем пассивной диффузии [Удовенко, 1979]. Высокой скоростью набухания (в течении первых 8 часов) характеризовались сорта льна-

долгунца Маяк, Грант, Томич; льна масличного Флиз, Бирюза, Легур, Северный, Кустанайский янтарь, Antares в условиях отсутствия хлорида натрия. При 0,7% и 1,4% концентрации у сортов масличной группы скорость набухания семени была на 2,3-4,5% выше долгунцового льна. Концентрация хлорида натрия (2,1%) вызывала незначительное снижение данного показателя по сравнению с контролем у двух групп изучаемых сортов льна. Растения в условиях засоления могут испытывать как дефицит воды, связанный со снижением водного потенциала засоленного почвенного раствора, так и токсическое действие самих ионов [Chen, 2005]. Семена льна – долгунца и льна масличного прорастали неравномерно. В контроле отмечали наибольшее количество проросших семян ($X_{ср}$ > 80,0%) на третьи-пятые сутки у сортов льна долгунца Грант, Томич, несколько ниже у сорта Томский-16. Сорта льна масличного более активно прорастали на вторые (Северный) и четвертые (Antares, Кустанайский янтарь, Флиз, Krokus) сутки. При концентрации хлорида натрия (0,7%) отмечено незначительное снижение скорости прорастания (1,2-4,8%) у сортов льна-долгунца (Маяк, Грант) и 2,9-6,6% у сортов льна масличного (Северный, Легур) соответственно. Высокая степень солевого стресса (2,1%) зачастую приводила к медленному прорастанию семян как у льна-долгунца, так и масличного, на протяжении от вторых до пятых учетных суток. В среднем, энергия прорастания (третьи учетные сутки) по сортам льна – долгунца в контрольном варианте была выше данного критерия у масличной группы, что может быть обусловлена условиями, в которых происходило формирование семян. Нами отмечено, что на шестые-седьмые сутки в контрольном варианте количество проросших семян было максимальным (>90%) у сортов Грант, Томский-16, Томич, по сравнению с масличной группой. Анализируя лабораторную всхожесть семян в опытных вариантах следует отметить тенденцию зависимости количества проросших семян от уровня солевого стресса. Высокой лабораторной всхожестью (на седьмые учетные сутки) отмечены сорта льна – долгунца (Грант, Маяк, Томич) и льна масличного (Кустанайский янтарь, Antares, Легур).

Таким образом, в условиях обычного и провокационного фона на хлоридное засоление различной степени выявлены межсортовые особенности по прорастанию семян. Установлено, что сорта льна-долгунца и льна масличного имеют схожие тенденции по формированию ответных реакций при действии стрессового фактора.

Литература

Ахиярова Г.Р., Шарипова Г.В., Веселов С.Ю., Веселов Д.С. Содержание гормонов в клетках зародыша и влияние перекиси водорода и абсцизовой кислоты на прорастание зерновок пшеницы и ячменя. - Уфа: ООО «Первая типография», 2017. – 280 с.

Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 155–165.

Лакин Г.Ф. Биометрия /Г.Ф. Лакин. М.: Высшая школа, 1980. – 295 с.

Удовенко Г.В. Механизмы адаптации растений к стрессам // Физиология и биохимия культурных растений. – 1979. –Т.11. – № 122. – С. 99 –107.

Chachar Q., Solangi A., Vernoef A. Influence of sodium chloride on seed germination and seedling root growth of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / Q. Chachar, A. Solangi, A. Vernoef //Pakistan Journal of Botany. – 2008.–V.40(1). – P.183-197.

Chen, Z. Screening plants for salt tolerance by measuring K+: case study for barley / Z. Chen, I. Newman, M. Zhou et al. // Plant Cell Environ. 2005. – V. 28. – P. 1230–1246.

Hanif M. Effects of salt on seed germination in contrasting cereal cultivars / M. Hanif, M. Davies // Pakistan Journal of Biological Sciences. –1998. – V.4. – P.280 – 282.

Kadkhodaie A., Bagheri M. Seed treatment during germination in linseed to overcome salt and drought stresses (*Linum usitatissimum* L.) / A. Kadkhodaie, M. Bagheri // International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineerig.–2011.–V.5.–N.1.–P.12-16.

Muhammad Z., Hussain F. Effect of NaCl salinity on the germination and seedling growth of some medical plants / Z. Muhammad, F. Hussain // Pakistan Journal of Botany.–2010.–V.42(2).– P.889-897.

Yaver S., Pasa C. Application of different NaCl concentrations on seed germination of flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivar / S. Yaver, C. Plasa // Agricultural Science and Technology.– 2009.– V.1.–N.3.–P.103-105.

Yousufinia M. The effect of NaCl on the growth and K+ content of barley (*Hordeum vulgare*. L.) cultivares / M. Yousufinia, A. Ghasemian, O. Safalian, etc. // Annals of Biological Research. – 2013. –V.4(1). – P.80-85.

THE STUDY OF STABILITY OF *LINUM USITATISSIMUM* L. GENOTYPES IN CONDITIONS OF SALT STRESS

K.P. Korolev

«University of Tyumen», Tyumen, Russia, corolev.konstantin2016@yandex.ru

Abstract. The article reflects the results of laboratory studies to study the effect of NaCl solutions on the germination of fiber flax and oil flax seeds. It was revealed that the rate of swelling and germination of seeds depends on both the characteristics of the genotype and the level of stress load. The negative influence of three concentrations (0.7%, 1.4%, 2.1%) of sodium chloride on the studied diagnostic parameters was established.

Key words: flax, variety, germination, chloride salinity, resistance

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАДМИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ

Е.А. Лысенко, А.А. Клаус, А.В. Карташов, В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений РАН, Москва, Россия, genlysenko@mail.ru

Аннотация. Доклад посвящен поиску механизмов воздействия тяжелого металла Cd на процессы в хлоропластах. Наши последние работы показали, что *in vivo* Cd в основном накапливается в тилакоидах, и его количество там достаточно для ингибирования ряда фотосинтетических белков. При этом происходит ингибирование акцепторной стороны фотосистемы 2 и ингибирование фотосистемы 1. Экспрессия генов в строме не нарушается.

Ключевые слова: кадмий, хлоропласты, тилакоилы, электрон-транспортная цепь, экспрессия генов

Кадмий является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов. Многие территории в мире загрязнены кадмием. Фотосинтез – важная мишень токсического действия Cd; ингибирование фотосинтеза лишает растения энергии для роста и осуществления механизмов защиты. Нарушения фотосинтеза продемонстрированы в многочисленных экспериментах с обработкой Cd *in vitro* и *in vivo*, однако, остается не ясным а) существует ли прямое ингибирование кадмием фотосинтетического аппарата *in vivo* и если да, то б) что именно ингибирует Cd.

Мы впервые показали, что внутри хлоропластов Cd в основном (80%) накапливается в тилакоидах. Это означает, что мишень прямого воздействия Cd следует искать в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [Lysenko et al. 2019]. Мы впервые показали, что количество Cd в тилакоидах сопоставимо с количествами Cu, Mn и Zn [Lysenko et al. 2019].

Это означает, что *in vivo* Cd может замещать Cu в пластоцианине, или Mn в марганцевом кластере водоокисляющего комплекса ФС2, или Zn в тилакоидных карбоангидразах и/или протеазах FtsH-типа. Количества Cd достаточно, чтобы заместить почти полностью один (любой) из этих эндогенных катионов в одном из этих белков, важных для фотосинтеза, или же заместить все эти катионы частично и ингибировать на 20-25% все эти белки.

Считается, что в ЭТЦ Cd ингибирует донорную сторону ФС2 и не ингибирует ФС1. Мы продемонстрировали ранее неизвестное нарушение: ингибирование акцепторной стороны ФС2 и ингибирование ФС1 [Lysenko et al. 2020]. Это нарушение было выявлено нами на модели 9-дневных растений ячменя. Многочисленные данные по ингибированию кадмием донорной стороны ФС2 получены на модельных двудольных растениях (шпинат, горох, A. thaliana); в единичной работе на кукурузе так же показано ингибирование активности ФС1 [Siedlecka, Baszynski 1993].

Нами впервые показано, что под действием Cd происходит существенное увеличение доли так называемых «закрытых» реакционных центров ФС2 [Lysenko et al. 2020]. «Закрытыми» называются такие ФС2, у которых лимитирован («закрыт») транспорт электронов на акцепторной стороне. Так же нами впервые показано, что под действием Cd квантовый выход ФС1 уменьшается сильнее, чем квантовый выход ФС2, что указывает на существование ингибирования ФС1, независимого от функционирования ФС2 [Lysenko et al. 2020].

Гены, кодирующие наиболее важные белки фотосинтетического аппарата, находятся в хлоропластах. Под действием высоких и даже летальных концентраций Cd *in vivo* уровень мРНК в хлоропластах не изменяется [Lysenko et al. 2015], вероятно, потому, что в строме слишком мало Cd [Lysenko et al. 2019]. Количество же фотосинтетических белков в тилакоидных мембранах уменьшается при воздействии *in vivo* [Lysenko et al. 2015].

Таким образом, мы показали, что можно ожидать существование прямого повреждающего действия Cd в хлоропластах *in vivo*, и искать его надо в электрон-транспортной цепи тилакоидных мембран. Обнаруженная нами тенденция к лимитированию транспорта электронов от ФС2 (на акцепторной стороне ФС2) и вокруг ФС1 не могут быть объяснены ингибированием Mn-кластера, который находится на донорной стороне ФС2; эти нарушения могут быть объяснены ингибированием звена ЭТЦ между ФС2 и ФС1, например Cu-содержащего переносчика электронов пластоцианина.

Работы выполнены в рамках госзадания (тема №121040800153-1) и поддержаны грантом РНФ (№14-14-00584).

Литература

Lysenko E.A., Klaus A.A., Kartashov A.V., Kusnetsov V.V. Distribution of Cd and other cations between the stroma and thylakoids: a quantitative approach to the search for Cd targets in chloroplasts // Photosynthesis Research. 2019. V. 139. P. 337-358.

Lysenko E.A., Klaus A.A., Kartashov A.V., Kusnetsov V.V. Specificity of Cd, Cu, and Fe effects on barley growth, metal contents in leaves and chloroplasts, and activities of photosystem I and photosystem II // Plant Physiology Biochemistry. 2020. V. 147. P. 191-204.

Lysenko E.A., Klaus A.A., Pshybytko N.L., Kusnetsov V.V. Cadmium accumulation in chloroplasts and its impact on chloroplastic processes in barley and maize // Photosynthesis Research. 2015. V. 125. P. 291-303.

Siedlecka A., Baszynski T. Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency // Physiologia Plantarum. 1993. V. 87. P 199-202.

NEW MECHANISMS OF CADMIUM TOXIC ACTION IN CHLOROPLASTS

E.A. Lysenko, A.A. Klaus, A.V. Kartashov, V.V. Kusnetsov

Institute of plant physiology RAS, Moscow, Russia, genlysenko@mail.ru

Summary. The report is devoted to the search for mechanisms of Cd action on processes in the chloroplasts. We have shown that *in vivo* Cd is accumulated in thylakoids mostly; the amount of Cd in thylakoids is sufficient for the inhibition of some photosynthetic proteins there. The accumulation leads to the inhibition of photosystem II at the acceptor side and inhibition of photosystem I. In the stroma, the process of gene expression is not influenced due to the low Cd content.

Key words: cadmium, chloroplasts, thylakoids, electron transport chain, gene expression

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ В ИМПАКТНОМ ФИТОМОНИТОРИНГЕ ДОНБАССА

А.И. Сафонов, А.З. Глухов

Донецкий национальный университет, г. Донецк, andrey_safonov@mail.ru

Аннотация. Показатель техногенной нагрузки на локальные природные системы Донбасса рассчитан по совокупному коэффициенту степени структурной трансформации растений-индикаторов: тератологические проявления, дефектность пыльцы, эмбрионального аппарата и общего габитуального состояния информативных для экологической экспертизы видов растений. Проведена расчетная оценка уровня техногенного загрязнения центральных объектов промышленности в регионе.

Ключевые слова: экологический мониторинг, фитоиндикация, Донбасс, промышленная ботаника.

Система количественного оценивания (квантификация) в экологических исследованиях отпирается на эмпирические данные о состоянии объекта экспертизы таким образом, чтобы можно было сделать заключение о пригодности среды для использования в запланированных целевых программах [Зыкова, 2017; Meena, 2020; Panidi, 2016]. Это важно в решении вопросов зонирования территории индустриального района с помощью биоиндикаторов [Гермонова, 2019; Bespalova, 2011].

Среди надежных показателей состояния открытых ландшафтных систем наиболее изучены в донецком экономическом регионе растительные объекты [Глухов, 2001, 2002; Алемасова, 2019; Сафонов, 2019; Сафонов, Глухов, 2020, 2021]. Стратегии устойчивости и способы адаптаций растений к неблагоприятным условиям промышленной среды [Антонова, 2014; Bespalova, 2010] формируют базу для внедрения индикационных экспериментов в практику экологического мониторинга.

Цель работы – на основании данных о значимости растений-индикаторов в оценке природных экотопов Донбасса рассчитать комплексный показатель уровня техногенного воздействия в зонах влияния (промышленного импакта) некоторых предприятий-загрязнителей. Реализация программы осуществлена в соответствии с методологическими блоками проведения экологического фитомониторинга [Сафонов, Глухов, 2020, 2021]. Для территорий в 1,0-1,5-км зоне воздействия предприятий-загрязнителей были опубликованы некоторые первичные данные фитоиндикационного содержания за 2008-2018 гг. [Сафонов, 2019].

Материал был собран на пробных площадках, расположенных на расстоянии 1,0-1,5 км в западном направлении от предприятий: 1) Донецкий (Юзовский) металлургический завод; 2) Енакиевский металлургический завод; 3) Макеевский металлургический комбинат; 4) Енакиевский коксохимзавод; 5) Макеевский коксохимзавод; 6) Ясиновский коксохимзавод; 7) Харцызский трубный завод; 8) Зуевская ТЭС; 9) Старобешевская ТЭС; 10) Горловский Концерн Стирол. Были использованы индексированные значения показателей структурной пластичности растений по 10-балльним аддитивным шкалам. Специфика такого целевого направления работы не предусматривает оперирования данными по контрольным участкам в Донбассе, где значение любого из использованных показателей не превышало 3 (из возможных максимальных 10).

Основной способ выделения индикаторной значимости заключается в многофакторном корреляционном анализе (по табличным сводкам и картографическому материалу).

Важным представляется проследить динамику состояния фитокомпонентов в зоне промышленного импакта в разные годы, поскольку уровень выбросов существенно отличался. Имеющиеся данные в таком случае можно рассматривать как элемент независимой экологической экспертизы в условиях воздействия конкретного предприятия.

Для каждого промышленного объекта (как априори загрязнителя) с 2001 по 2020 гг. были рассчитаны индексы суммарной техногенной нагрузки по 10 критериям:

1) индекс габитуального морфотипического разнообразия видов (розеточность, архитектоника побегообразования) *Cichorium intybus* L., *Reseda lutea* L. и *Berteroa incana* (L.) DC.;

2) индекс трихоморазнообразия (по волоскам кроющего типа) для видов *Echium vulgare* L., *Centaurea diffusa* Lam. и *Cichorium intybus* L.;

3) анормальность сети анастомозов листа (по идентификации с нижней стороны листовой пластинки, у её основания) *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., *Cyclachaena xanthiifolia* (Nutt.) Fresen. и *Berteroa incana* (L.) DC.;

4) индекс по частоте встречаемости пыльцевого материала с атипичным строением лакун для видов *Cichorium intybus* L., *Lactuca tatarica* (L.) C. A. Mey., *Achillea collina* J. Becker ex Rchb., *Artemisia absinthium* L., *Cyclachaena xanthiifolia* (Nutt.) Fresen., *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip., *Echium vulgare* L. и *Tanacetum vulgare* L.;

5) коэффициент дефектности пыльцы (палинологического материала) для индикаторных видов *Cichorium intybus* L., *Reseda lutea* L., *Stellaria subulata* Boeber ex Schlecht., *Gipsophila paniculata* L., *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip., *Echium vulgare* L., *Plantago major* L., *Berteroa incana* (L.) DC. и *Artemisia vulgaris* L.,

6) расчетный коэффициент встречаемости признака с элиминацией протодермальных тканей с разных сторон зародыша для видов *Diplotaxis muralis* (L.) DC., *Atriplex hortensis* L. и *Echium vulgare* L.;

7) индексированное значение тератологической схизокотилии, которая установлена на начальных этапах прорастания семенного материла *Cichorium intybus* L. и *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip.;

8) индексированное значение тератологической синкотилии, которая установлена на начальных этапах прорастания семенного материла тех же видов;

9) индекс частоты регистрации аберрантного зародышевого аппарата видов *Tanacetum vulgare* L., *Cichorium intybus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *Reseda lutea* L. и *Diplotaxis muralis* (L.) DC.;

10) показатель матрикальности в оценке гетерокарпии (в узком понимании – в пределах одного соцветия при 5-кратной повторности) для видов *Tanacetum vulgare* L. и *Plantago major* L.

Поскольку использовано 10 критериев, каждый из которых имеет весовой коэффициент в 10-балльном оценивании, то максимальное значение комплексного индекса не превышает 100.

Подвержено, что в условиях геохимически напряженной среды растения формируют защитные структурные компоненты, или совокупность системных отклонений приводит к развитию и частому проявлению структурных аномалий, которые повышают общую морфотипическую гетерогенность особей. Такие изменения проявляются как для вегетативных, так и генеративных органов. Большинство используемых признаков можно диагностировать в полевых условиях, следовательно – использовать в экспресс-оценке качества среды в градиенте промышленного импакта.

Значение комплексных показателей за годы эксперимента представлены в таблице. Сводная таблица позволяет ранжировать объекты по степени промышленного импакта, установить временные тренды меняющейся техногенной нагрузки в разные годы.

Таблица. Сводная таблица значения комплексных показателей техногенной нагрузки по фитоиндикационному анализу

Годы	Предприятия-загрязнители*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2001	91	89	91	89	89	66	50	53	50	65
2002	89	88	88	85	88	67	*нет данных*			
2003	89	91	89	91	89	68	65	50	52	65
2004	*нет данных*					68	43	45	53	64
2005	91	89	90	86	90	70	55	52	53	62
2006	88	89	88	89	88	70	68	51	56	71
2007	*нет данных*					70	42	50	56	75
2008	90	91	91	91	91	76	54	49	55	64
2009	91	88	91	88	92	88	65	48	60	74
2010	90	91	90	91	90	89	*нет данных*			
2011	89	95	89	92	89	89	52	49	62	76
2012	85	94	85	92	85	90	64	50	63	77
2013	84	95	84	91	84	90	71	51	63	79
2014	80	89	80	89	80	*нет данных*				
2015	71	91	71	91	66	90	65	49	64	76
2016	70	88	70	88	70	91	59	48	65	70
2017	66	92	65	91	65	88	45	40	65	70
2018	65	85	64	83	61	88	45	49	66	68
2019	65	77	65	76	62	88	43	43	67	65
2020	64	78	64	75	60	87	42	43	66	60

*Примечание: 1) Донецкий (Юзовский) металлургический завод; 2) Енакиевский металлургический завод; 3) Макеевский металлургический комбинат; 4) Енакиевский коксохимзавод; 5) Макеевский коксохимзавод; 6) Ясиновский коксохимзавод; 7) Харцызский трубный завод; 8) Зуевская ТЭС; 9) Старобешевская ТЭС; 10) Горловский Концерн Стирол.

Взятые для расчетного анализа признаки являются фенотипическими. Это доказано их элиминацией при перенесении семенного материала в благоприятные (контрольные условия), что было подвержено в экспериментах с 2005 г.

В сравнении между показателями разных вегетативных и генеративных стратегий выживания фитоиндикаторов установлено, что из перечисленных критериев нет сугубо консервативных (они и были отобраны по принципу максимальной пластичности) в структурном отношении. Безусловно, уровень интенсификации производства отражается на значении признаков структурной гетерогенности, что использовано в экологическом мониторинге. Зафиксирована достоверная разница в значениях суммационных индексов, подтверждающих геолокальное уменьшение уровня токсической нагрузки, связанное с использованием технологий очистки и доочистки от промышленных эмиссий, например, на Донецком (Юзовском) металлургическом заводе внедрение новых технологий с 2010 г.

В разные годы выбросы от стационарных источников промышленности существенно отличались, однако комплексные реакции растительных объектов на такие изменения не происходят одномоментно, поскольку за многие десятилетия в буферных территориях изучаемых предприятий сформировались специфические геохимические условия с повышенными фоновыми концентрациями загрязняющих веществ, что отражается в структурно-функциональных перестройках дикорастущих видов. Следовательно, благодаря импактному фитомониторингу (наряду с фоновым), реализована комплексная оценка техногенной нагрузки на локальные экотопы Донбасса.

Литература

Алемасова А.С. Накопление тяжелых металлов мохообразными в различных экотопах Донбасса // Трансформация экосистем под воздействием природных и антропогенных факторов: Матер. Междунар. научн. конф. (Киров, 16-18 апреля 2019 г.). Киров: ВятГУ, 2019. С. 60–65.

Антонова Е.В., Позолотина В.Н. Изменчивость костреца безостого в условиях хронического облучения в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа // Экология. 2014. № 6. С. 459–468.

Гермонова Е.А. Визуализация микроклиматических изменений индикаторных признаков в локальных популяциях растений г. Донецка // Глобальные климатические изменения: региональные эффекты, модели, прогнозы: Материалы междунар. научн.-практич. конф. Воронеж: Изд-во «Цифровая полиграфия», 2019. Том 2. С. 39–40.

Глухов А.З., Сафонов А.И. Перспективы проведения фитоиндикационного мониторинга техногенно трансформированных экотопов // Промышленная ботаника. 2002. Т. 2. С. 7–14.

Глухов А.З., Хархота А.И. Растения в антропогенно трансформированной среде // Промышленная ботаника. 2001. Т. 1. С. 5–10.

Зыкова Ю. Н., Скугорева С. Г., Ашихмина Т. Я. Подходы к оценке состояния городских почв методами биотестирования с использованием организмов различной систематической принадлежности и данных химического анализа // Теоретическая и прикладная экология. 2017. № 3. С. 38–46. doi: 10.25750/1995-4301-2017-3-038-046.

Сафонов А.И. Экспертиза промышленных предприятий Донбасса по состоянию фитокомпонентов // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2019. № 1-2. С. 35-43.

Сафонов А.И., Глухов А.З. Методологические аспекты фитомониторинга в техногенно трансформированной среде // Донецкие чтения 2020: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности: Матер. V Междунар. научн. конф. Донецк: ДонНУ, 2020. С. 254–257.

Сафонов А.И., Глухов А.З. Экологический фитомониторинг в Донбассе: эмпирические блоки методологии // Татищевские чтения: актуальные проблемы науки

и практики. Матер. XVIII Междунар. научн.-практ. конф. Тольятти, 2021. С. 225–227.

Bespalova S.V. Determination of bioindicators sensitivity thresholds for ecologically unfavourable environmental factors // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2010. № 1(10). С. 9–25.

Bespalova S.V. The criteria of assessment of ecological state of environment on thresholds of sensitivity of bioindicators // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2011. № 1. С. 25–43.

Meena M.K. Impact of arsenic-polluted groundwater on soil and produce quality: a food chain study // Environmental Monitoring and Assessment. 2020. Vol. 192, № 12. P. 785–795.

Panidi E., Trofimetz L., Sokolova J. Application of phyto-indication and radiocesium indicative methods for microrelief mapping // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2016. № 34. P. 12–29.

COMPLEX ASSESSMENT OF TECHNOGENIC LOAD IN IMPACT PHYTOMONITORING OF DONBASS

A.I. Safonov, A.Z. Glukhov

Donetsk National University, Donetsk, andrey_safonov@mail.ru

Annotation. The indicator of technogenic load on the local natural systems of Donbass was calculated according to the aggregate coefficient of the degree of structural transformation of indicator plants: teratological manifestations, defective pollen, embryonic apparatus and the general habitual state of plant species informative for ecological expertise. A calculated assessment of the level of technogenic pollution for the central industrial facilities in region has been carried out.

Key words: ecological monitoring, phytoindication, Donbass, industrial botany

УСТОЙЧИВОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТОПОЛЕЙ (*POPULUS* SSP.) К ЗАБОЛЕВАНИЯМ И КОМПЛЕКСУ ВРЕДИТЕЛЕЙ

Н.В. Синчук, В.П. Курченко

Белорусский государственный университет, Минск (Беларусь), n.v.sinchuk@gmail.com

Аннотация. В обзоре дан анализ, взаимосвязи эволюции формирования представителей рода *Populus* и устойчивости к заболеваниям и комплексу вредителей. Интродукция различных видов тополя и их гибридов в Европе связана с использованием их древесины, благодаря низкой плотности и теплопроводности, которая почти в два раза ниже значений, установленных для дуба, бука или граба. Древесина тополя нашла широкое применение в качестве строительных и топливных материалов. Представители рода тополь (*Populus* L.) широко используется для озеленения населенных пунктов и создания защитных насаждений. Широкое распространение тополей и их гибридов ограничивается их неустойчивостью к различным заболеваниям и вредителям. Существуют межвидовые различия устойчивости к заболеваниям и действию вредителей у представителей рода *Populus*. Это связано с особенностями эволюции и появление у представителей этого рода ряда свойств, которые способствуют устойчивости к грибным заболеваниям и воздействию различных насекомых.

Ключевые слова. Тополь, вредители, заболевания, интродукция, антропогенные факторы.

Род *Populus* L. относится к семейству Salicaceae, распространенных в умеренных и холодных районах северного полушария по широте от 20" до 70 ". Представители этого рода являются широко распространенными видами. Северная граница распространения тополей совпадает с границей древесной растительности, а южная захватывает Северную Африку, Персию, Гималаи, горы Южного Китая, Калифорнию, Новую Мексику и Флориду [Комаров, 1934]. Представители рода *Populus* являются пионерными видами в освоении различных территорий. Исследование пыльцы показывают, что после ледникового периода виды *Populus*часто доминировали в первичных лесных сообществах [Keenan, 1992]. В Европе такими видами являются *P. tremula, P. nigra*, которые встречаются вдоль рек и на пастбищах вместе с *Salixalba*.

Интродукция различных видов тополя и их гибридов в Европе связана с использованием их древесины. В середине 18 века *P.* × *canescens* ‘Serotina’ (*P. nigra* × *P. deltoides* var. Moniifera) был одним из первых широко культивируемых гибридных тополей. Благодаря низкой плотности и теплопроводности, которая почти в два раза ниже значений, установленных для дуба, бука или граба. Первые плантации тополя, предназначенные для производства древесины, появились на рубеже XIX и XX веков в связи с растущим спросом на фанеру и балансовую древесину. Интерес к тополям резко возрос после Второй мировой войны, из-за высокого спроса на быстрорастущую и доступную древесину. В рамках национальных программ ряда стран Европы ведутся работы о межвидовой гибридизации тополей. Зачастую в качестве родительских видов используются *P. deltoides* и *P. nigra* для последующего отбора гибридов устойчивых к антропогенному загрязнению, болезням и различным вредителям [Nervo, 2011]. Многие клоны от гибридов *P. deltoides, P. nigra, Populus trichocarpa* Torr. &Gray., *Populus maximowiczii* A. Henry, *Populus balsamifera* L. были протестированы на скорость роста, морозостойкость, устойчивость к насекомым и болезням. Были отобраны клоны, пригодные для конкретных экологических регионов Северной Америки и Европы [Nervo, 2011]. Древесина тополя, производимая в европейских странах, широко используется для производства фанеры / шпона (40%), пиломатериалов (31%), целлюлозы, бумаги, картона (15%), а топливная древесина составляет 1 % [Nervo, 2011].

Представители рода тополь (*Populus* L.) широко используется для озеленения населенных пунктов и создания защитных насаждений. Это обусловлено тем, что он

обладает целым рядом полезных биологических свойств, таких как быстрый рост, экологическая пластичность, легкость вегетативного размножения многих видов и форм. Тополи, за исключением старых деревьев, проявляют высокую пыле-, дымо- и газоустойчивость и успешно выполняют защитные и санитарно-гигиенические функции. Листья поглощают из воздуха значительное количество токсичных веществ (сероводород, диоксид серы, окислы азота, аммиак и др.), частично очищая его от вредных примесей [Кулагин, 1974].

Широкое распространение тополей и их гибридов ограничивается их неустойчивостью к различным заболеваниям и вредителям. Существуют межвидовые различия устойчивости к заболеваниям и действию вредителей у представителей рода *Populus*. Это связано с особенностями эволюции рода *Populus* и времени возникновения видов.

Род обычно делится на 6 секций: *Turanga*, *Leucoides*, *Leuce*, *Aigeiros*, *Abaso* и *Tacamahaca*, представленных до 95 видов. Филогеографические закономерности распространения тополей в Европе находятся под сильным влиянием ледниковых периодов. Из-за климатических условий после отступления ледяных щитов, миграция сформировала сегодняшние ареалы распространения видов [Petit, 2003].

Многочисленные виды рода *Populus* первоначально диверсифицировались в недавнем прошлом около 6 млн лет назад (см. Рис.1). Все семейство отделилось от сестринского семейства около 92 млн лет назад, а три последовательные группы внутри семейства разошлись на 69, 61 и 55 млн лет назад, что указывает на относительно позднюю диверсификацию клад.

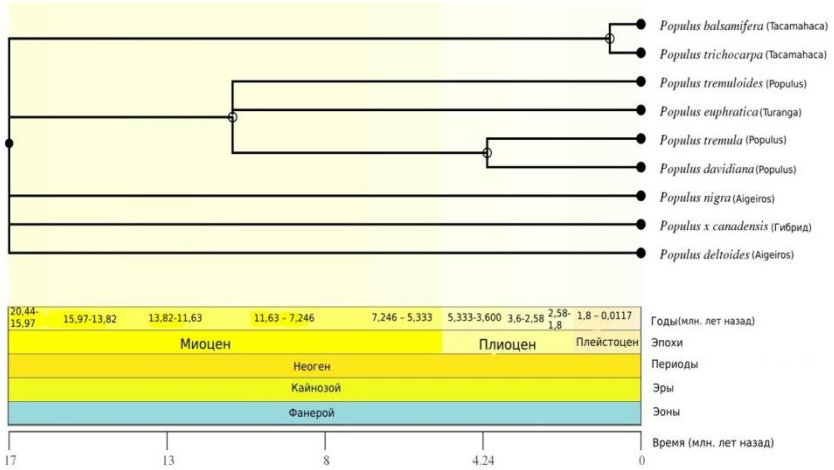


Рис.1 Дерево времени рода *Populus* [Time Tree (electronic resource)]

Наиболее эволюционно продвинутые секции – *Populus*, *Aigeiros* Lunell и *Tacamahaca* Mill. – имеют гибридное происхождение [Wang, 2014]. При этом виды секции *Aigeiros*, вероятно, возникли позже в результате древней гибридизации предков *Populus* и *Tacamahaca*, что согласуется с палеоботаническими результатами, поскольку ископаемые остатки видов секции *Aigeiros* появляются в отложениях позже [Eckenwalder, 1996]. На ранних стадиях эволюции генетическая дивергенция между предками разных секций была слабой, что, в частности, подтверждается фактами древних захватов пластид вследствие гибридизации [Wang, 2014]; [Du, 2015]; [Liu, 2017]. В настоящее время межсекционная гибридизация успешно протекает только между видами *Aigeiros* и *Tacamahaca* [Прошкин, 2017].

Тополя представляют собой среду для обитания, богатую разнообразием различных видов грибов и насекомых. Существование системы растение-хозяин – фитофаг насчитывает более 400 млн. лет, это означает, что она сформировалась

практически сразу после выхода растений на сушу [Bruce, 2015]. Виды *Populus* подвергаются нападению по крайней мере 300 видов насекомых и клещей в Северной Америке [Mattson, 2001] и около 525 видов в Европе. Большая численность, разнообразие и способы воздействия насекомых на развитие тополей приводит к угнетению их роста, что создает экологические проблемы. Они поедают листья и почки, высасывают сок, вызывают образование галлов, проникают в побеги и древесину, поражают корни и переносят болезни растений. Насекомые также могут сильно повлиять на функциональные или эстетические характеристики тополей. Вспышка вредителей может снизить, если не уничтожить, функцию ряда деревьев, посаженных в качестве ветрозащиты или для защиты от солнца. И наоборот, ветрозащитные деревья могут быть проблемой, если они являются хозяевами вредителей соседних продовольственных культур. Виды деревьев, произрастающих в городах, теряют свою эстетическую ценность из-за нападений минеров, которые портят листья и вызывают их преждевременное опадание. Наконец, насекомые могут передавать или способствовать проникновению грибковых или других патогенных микроорганизмов растениям. Это наносит деревьям такой серьезный физический ущерб, который снижает их экономическую или экологическую ценность.

Тополя поражаются болезнетворными микроорганизмами, которые обычно специализируются на листьях, стеблях или корнях. Заболевания, вызываемые этими патогенами, часто являются причиной снижения роста и качества древесины пораженных деревьев [Steenackers, 1996]. Часто одновременно возникают множественные лиственные и стеблевые патогены, что приводит к множественным заболеваниям, которые могут повредить деревья. Многие патогенные микроорганизмы могут поражать ветки, ветви и стебли, вызывая язвы, отмирание и поломку ветвей. Их воздействие во многом зависит от возраста деревьев, местного микроклимата, времени заражения и условий распространения патогенов и развития болезней.

В связи с особенностями эволюционного формирования секций тополей, входящие в них виды имеют различную устойчивость к заболеваниям и комплексу вредителей.

Секция *Leucoides* (Левкоидные тополя) является наиболее древней группой тополей. Представители обладают наиболее крупными почками, серёжками и листьями. В неё входят виды:*Populus lasiocarpa* oliv., *Populus glauca* Haines, *Populus heterophylla* L., *Populus wilsonii* C.K. Schneid.Представители видов этой секции наименее устойчивы к повреждению насекомыми и грибковыми заболеваниями.

Секция *Aigeiros* (Дельтовидные тополя) От других отличается характерными дельтовидными листьями на длинных, как у осин, черешках. Имеются формы деревьев, имеющие пирамидальную крону, которые разводятся в южных районах России — так называемые пирамидальные тополя. Представители видов тополей этой секции сформировались более 15 лет назад. В эту секцию входят виды: *Populus nigra* L., *Populus deltoides* W.Bartram ex Marshall, *Populus fremontii* S.Watson.

Секция *Tacamahaca* (Бальзамические тополя) Почки и листья наиболее богаты душистой смолой. Представители видов тополей этой секции сформировались в послеледниковый период. В эту секцию входят виды:*Populus angustifolia* E.James, *Populus balsamifera* L., *Populus ciliata* Wall. ex Royle, *Populus koreana* Rehder, *Populus laurifolia* Ledeb., *Populus maximowiczii* A.Henry, *Populus simonii* Carriere, *Populus suaveolens* Fisch., *Populus szechuanica* C.K.Schneid., *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex. Hook., *Populus yunnanensis* Dode.

Для секции тополей *Aigeiros* и *Tacamahaca* наиболее опасными являются следующие болезни. Листовая ржавчина (*Melampsor*a spp.) – самое распространенное и серьезное заболевание тополей, которое вызвает снижение роста до 65 % [Widin, 1981].

Листовая пятнистость (*Marssonina* spp.) может вызывать преждевременную дефолиацию, снижать потенциал роста. Вызывает 16 % потерь деревьев среди коммерческих посадок в Италии [Thielges, 1985]. Септориозная листовая пятнистость или рак (*Septoria* spp.) вызывает нектрию в коренных лесопосадках, особенно губительна для гибридов [Thielges, 1985]. Бактериальное заболевание (рак), вызванное *Xanthomonas populi,* на протяжении многих лет является приоритетным возбудителем резистентной селекции тополей в Европе [Thielges, 1985].

Основными вредителями тополей секций *Aigeiros* и *Tacamahaca* являются различные насекомые. Листогрызущие (отряды насекомых Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera и Diptera), которые вызывают дефолиацию обширных участков деревьев. Листовые минеры (отряды Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera и Coleoptera), у которых личинки съедают лист между верхним и нижним эпидермисом, повреждая при этом 75 % листьев. Грудохоботные насекомые – сосущие насекомые, например, тли, щитовки и цикадки, питающиеся соком флоэмы с дерева или тканями коры. Вредителями побегов являются личинки *Paranthreneta baniformis* Rottemburg, которые питаются стеблями, побегами и ветвями многих видов тополей, вызывая заметное набухание растительной ткани [Bertucci, 1986]. Цикады также наносят физический урон, который ослабляет молодые побеги и заставляет их обламываться. Древесные вредители представлены Coleoptera, Lepidoptera, иногда Diptera и Hymenoptera, у которых личинки сверлят туннели в стволе и ветвях, в результате чего прерывается циркуляция сока, вызывают трещины в коре, приводящие к некрозу древесины. Ущерб может также привести к появлению патогенных заболеваний растений, которые наносят значительно больший ущерб, чем исходное насекомое. Корневыми вредителями являются некоторые личинки почвенных жуков, которые питаются корнями и могут быть особенно опасны для посадок молодого тополя. Бутонные вредители поедают почки весной, прежде чем повреждать листья. Взрослые жесткокрылые, такие как *Peritelus sphaeroides* Germar могут повреждать целые почки, или могут откладывать яйца в почках. Личинки питаются внутри почек, что приводит к высыханию и опаданию почек. [Kippenberg, 1975].

Секция *Populus* наиболее распространённая группа. Содержит вид осина (*Populus tremula*) и группу белые тополя. Близки к осинам. Отличительная особенность — пальчатолопастная форма листьев порослевых побегов и плотное снежно-белое опушение нижней стороны этих листьев. Представители этой секции сформировались 12–5,0 млн. лет назад. В эту секцию входят виды:*Populus adenopoda* Maxim., *Populus alba* L. , *Populus grandidentata* Michx., *Populus guzmanantlensis* A.Vázquez & Cuevas, *Populus sieboldii* Miq., *Populus simaroa* Rzed., *Populus tremula* L., *Populus tremuloides* Michx. В отличие от других представителей рода тополь почки и листья не выделяют клейкого вещества. Это может являться причиной плохой устойчивости видов тополей, входящих в эту секцию, к грибным заболеваниям и комплексу вредителей. Грибы, входящие в сообщества с *Populus,* – самые разнообразные. Известно, что гниение одного лишь *P. tremuloides* вызывается более, чем 250 видами [Lindsey, 1978]. Для представителей секции *Populus* опасными являются следующие паразиты: гипоксилонный рак (*Entoleuca mammata*) и фитофтороз листьев (*Venturia* spp.).

Секция *Turanga* (Туранги) издалека напоминают осину, но крона более рыхлая. В отличие от всех остальных тополей, ствол у них нарастает не моноподиально, а симподиально, как у ив. В эту секцию входят и виды: *Populus euphratica* Olivier, *Populus ilicifolia* (Engl.) Rouleau, *Populus pruinosa* Schrenk. Представители этой секции сформировались около 12,0 млн. лет назад. Почки и листья видов, входящих в эту секцию, наиболее богаты душистой смолой. В связи с этим эти деревья не

повреждаются бутонными вредителями, которые поедают почки весной, прежде чем перейти к листьям, и в значительной мере не подвергаются различными грибковыми заболеваниями [Федорова, 2013].

Таким образом, интенсивность поражения микроорганизмами и насекомыми различных видов тополя находится в зависимости от особенности их эволюции и приобретенных признаков устойчивости к патогенным вредителям.

Литература

Белова, Н.К. Вредители городских зеленых насаждений / Н. К. Белова // Защита растений. – 1994.– №8. – С. 37 – 38.

Комаров, В. А. Тополи СССР/ В.А. Комаров // Ботанический журнал СССР. – 1934. – Т. 19, № 5. – С. 495–511.

Кулагин, Ю.З. Древесные растения и промышленная среда / Ю.З. Кулагин. – М.: Наука, 1974. – 124 с.

Прошкин Б. В. Populus×jrtyschensis Chang Y. В Алтае-Саянской горной стране /Б. В. Прошкин, А. В. Климов // Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова Томского государственного университета. – 2017.– № 115. – P. 28 – 35. DOI: 10.17223/20764103.115.5.

Фёдорова, О. А.Влияние экологических факторов на радиальный прирост тополя бальзамического в г. Томске / О. А. Фёдорова, Д. А. Савчук // ВестникКрасГАУ. – 2013. – № 3. – С. 84–90.

Bertucci, B.M. Il tarlo vespa del pioppo / B.M. Bertucci // Informatore Fitopatologico. – 1986. – № 36. – P. 29 – 34.

Bruce T.J.A. Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds / T.J.A. Bruce// J. Exp. Botany. – 2015.– Vol66, № 2. – P. 455 – 465.

Du, S.H. Multilocus analysis of nucleotide variation and speciation in three closely related *Populus* (Salicaceae) species / S.H. Du, Z.S. Wang, P.K. Ingvarsson, D.S. Wang, J.H. Wang, Z.Q.Wu // Mol. Ecol. – 2015.– Vol.24, iss.19. – P. 4994–5005.

Eckenwalder, J.E. Systematics and evolution of *Populus* /J.E. Eckenwalder// National Research Council of Canada Research Press. – Ottawa, 1996. – Chapter1. –32 p.

Keenan, T.J. Late Quaternary history of black spruce and grasslands in southwest Yukon Territory / T.J.Keenan, L.C. Cwynar // Canadian Journal of Botany. – 1992. –Т. 70, № 7. – С. 1336–1345.

Kippenberg, H. Die Käfer Mitteleuropas. / H. Kippenberg. – Krefeld: Groecke and Evers, 1975. – 11 vol. – 344 p.

Lindsey, J.P. Basidiomycetes that decay aspen in North America / J.P.Lindsey, R.L. Gilbertson //J. Cramer. – 1978.– № 63. – P. 1 – 406.

Liu, X. Phylogenetic and taxonomic status analyses of the Abaso section from multiple nuclear genes and plastid fragments reveal new insights into the North America origin of *Populus* (Salicaceae)/ X.Liu, Z.Wang, W.Shao, Z.Ye ,J. Zhang //Front. Plant Sci. –2017. – Vol. 7 (2022). P. 1–9.

Mattson, W.J. Insect pests of Populus: coping with the inevitable. Poplar culture in NorthAmerica / W.J.Mattson, E.A. Hart, W.J.A.Volney// National Research Council of Canada Research Press. – Ottawa, 2001. –Chapter 7. –219–248pp.

Nervo, G. Current situation and prospects for European popular culture: the role of Italian research / G. Nervo, D. Coaloa, L. Vietto, A. Giorcelli, G. Allegro // Tercer Congreso Internacional de Salicaceasen Argentina. – 2011.

Ostry, M.E.Susceptibility of Populus species and hybrids to disease in theNorth Central United States / M.E. Ostry, H.S. Jr McNabb // Plant Disease. – 1985.– №69. – P. 755 – 757.

Petit RJ. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity / RJ. Petit[et.al.] // Science – 2003. – Vol.300, iss.5625. – C. 1563–1565.

Steenackers, J. Poplar diseases, consequences on growth and wood quality / J.Steenackers, M.Steenackers, V.Steenackers, M. Stevens // Biomass and Bioenergy. – 1996. – № 10. – P. 267 – 274.

Thielges, B.A.. Breeding poplars for disease resistance [Electronic resource] / B.A. Thielges // FAO Forestry Paper:56.– 1985.– 66 pp. – Date of access: http://www.fao.org/forestry/62269/en/.

Time Tree [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.timetree.org/search/goto_pairwise. – Date of access: 24.06.2021.

Wang, Z. Phylogeny reconstruction and hybrid analysis of *Populus* (*Salicaceae*) based on nucleotide sequences of multiple single-copy nuclear genes and plastid fragments / Z.Wang [et al.] // PloS ONE. – 2014.– Vol. 9, iss.8: e103645. – P. 1–8.

Widin, K.D. Epidemiology and impact of *Melampsora medusae* leaf rust infection on yield of hybrid poplars in the north-central United State / K.D.Widin, A.L.Schipper // Eur. J. For.–Vol. 11, iss. 7. – 1981. – P. 438–448.

RESISTANCE OF VARIOUS POPLAR SPECIES (*POPULUS* SSP.) TO DISEASES AND A COMPLEX OF PESTS

N.V. Sinchuk, V.P. Kurchenko

Belarusian State University, Minsk (Republic of Belarus)

Annotation. The review provides an analysis of the relationship between the evolution of the formation of representatives of the genus *Populus* and resistance to diseases and pests. The introduction of various types of poplar and their hybrids in Europe is associated with the use of their wood, due to its low density and thermal conductivity, which is almost two times lower than the values established for oak, beech or hornbeam. Poplar wood has found wide application as building and fuel materials. Representatives of the poplar genus (*Populus* L.) are widely used for landscaping settlements and creating protective plantations. The wide distribution of poplars and their hybrids is limited by their instability to various diseases and pests. There are interspecific differences in resistance to diseases and pests in representatives of the genus *Populus*. This is due to the peculiarities of evolution and the appearance in representatives of this genus of a number of properties that contribute to resistance to fungal diseases and the effects of various insects.

Key words. poplar, pests, diseases, introduction, anthropogenic factors.

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ-ФИТОРЕМЕДИАНТОВ К ДЕЙСТВИЮ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Ю.М. Сотникова, Р.Г. Фархутдинов

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия, sotnikova-bashedu@mail.ru

Аннотация. В настоящее время фиторемедиация является одним из перспективных методов очистки и восстановления нефтезагрязненных земель. Имеется множество исследований, посвященных оценке устойчивости растений-фиторемедиантов к нефтяному загрязнению. Однако, множество растительных объектов, видов поллютантов и физиолого-биохимических параметров остаются неизученными. В этой связи нами был проведен анализ устойчивости растений семейства Злаковые (*Poaceae*) к различным концентрациям нефтяного загрязнения. Рожь посевная обладала относительной устойчивостью в опытах с 4% содержанием нефти в почве и может быть рекомендована к возделыванию для фитоэкстракции земель, подвергнутых нефтяному загрязнению.

Ключевые слова: рожь посевная, фиторемидиация, нефтяное загрязнение

Для эффективной фиторемедиации нефтезагрязненных почв необходимо использовать растения с высокой адаптивной устойчивостью [Панченко и др., 2015]. В настоящее время известно несколько сотен растений-гипераккумулянтов различных загрязнителей [Киреева и др., 2003]. Продолжаются поиски растений, пригодных для фиторемедиации, предполагающей извлечение загрязнителей из почв корневой системой растений с последующим их переносом и аккумуляцией в надземной части растений [Киреева и др., 2011; Сотникова и др., 2020; Trakal et al., 2015]. Целью данной работы был анализ устойчивости растений семейства Злаковые (*Poaceae*), способных произрастать на нефтезагрязненных почвах.

Объектами исследования были выбраны растения семейства Злаковые (*Poaceae*) (рожь посевная (*Secale cereale* L.) сорт «Татьяна», ячмень яровой (*Hordeum distichum* L.) сорт «Новичок» и сорго суданское (*Sorghum drummondii*) сорт «Чишминская ранняя»).

Для определения всхожести семян в условиях нефтяного загрязнения в чашки Петри помещали по 100 г почвы, вносили нефть в концентрациях 1%, 3%, 4%, 6% и 8% от сухой массы почвы. В качестве контроля использовали незагрязненную почву. Через 3 суток в почву вносили семена исследуемых растений в соответствии с нормами высева для каждой культуры [Trakal et al., 2015]. Оценку результатов проводили через 7 суток. Сравнивали количество проросших семян в опытном и контрольном варианте. После проводили оценку устойчивости растений к нефтяному загрязнению. Растения выращивали в сосудах объемом 0,5 л, при 12-часовом светопериоде, и температуре воздуха 22-25 °С. Для выращивания использовали серую лесную почву. В почву вносили товарную нефть в концентрациях 1%, 3%, 4%, 6% и 8% от сухой массы почвы. Почву увлажняли и поддерживали на протяжении всего периода выращивания. Через 3 суток в почву вносили семена исследуемых растений в соответствии с рекомендациями для каждой культуры [Trakal et al., 2015]. В контрольном варианте растения выращивали без внесения нефти. Сравнительную оценку устойчивости проводили через 30 суток растений [Сотникова и др., 2020].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и доверительный интервал при $P \leq 0,05$.

Важным показателем растений-фиторемедиантов является их устойчивость к действию поллютантов. Нами была проведена оценка способности семян к всхожести в условиях нефтяного загрязнения (табл. 1).

Таблица 1. Влияние уровня нефтяного загрязнения почвы на всхожесть семян растений разных видов, %

	Рожь	Ячмень	Сорго
Контроль	97±1	90±1	90±1
Нефть 1%	**95±1**	**84±2**	**81±2**
Нефть 3%	**84±3**	61±2	57±5
Нефть 4%	**73±3**	39±4	29±7
Нефть 6%	33±4	19±1	20±1
Нефть 8%	31±4	14±5	17±4

Примечание: представлены средние значения и их стандартные ошибки; отличия от контрольных образцов при $P \leq 0,05$.

Оценка фитотоксичности почвы после внесения разных концентраций нефти при посеве растений-фиторемедиантов семейства Злаковые (*Poaceae*) (рожь, ячмень, трава суданская) показала, что всхожесть семян в контрольном варианте была выше 90% у всех растений. Концентрации нефти 1% и 3% не оказали значительного влияния на всхожесть семян. При концентрациях нефти 6% и 8% отмечено резкое снижение показателей всхожести всех исследуемых видов растений по сравнению с контрольным вариантом. При загрязнении почвы нефтью в концентрации 4% всхожесть ржи снижалась на 25 % по сравнению с контрольным вариантом, всхожесть ячменя на 67%, а сорго на 78 %. Таким образом, семена ржи при прорастании оказались наиболее устойчивы к токсическому действию нефтяного загрязнения.

При анализе ростовых показателей при концентрации нефти 1% наблюдалось снижение длины побегов в сравнении с контролем. Так, средняя длина побега ржи была ниже контрольного образца на 25%, у ячменя – на 8%, у сорго – на 31%. При концентрации нефти в почве до 4% происходило дальнейшее снижение ростовых процессов у побега. Торможение ростовых процессов в корнях растений также происходило, соответственно, на – 31%, 43% и 31% (табл. 2). При увеличении концентрации до 6% и 8% у всех видов растений произошло резкое снижение всех ростовых показателей.

Таким образом, в ходе оценки влияния нефтяного загрязнения на всхожесть и морфометрические показатели было установлено, что наиболее устойчивы проростки ржи посевной. Наиболее «оптимальный» для сохранения всхожести семян и роста исследуемых растений объем нефтяного загрязнения – 4%.

Полученные результаты позволяют судить об относительной устойчивости растений ржи посевной в опытах с 4% содержанием нефти в почве. При повышении содержания нефти в почве резко снижалась всхожесть семян и ростовые показатели. Поэтому рожь посевная может быть рекомендована к возделыванию для фитоэкстракции земель, подвергнутых нефтяному загрязнению.

Таблица 2. Влияние нефтяного загрязнения почвы на длину побега (П) и корня (К) растений, см

		Рожь	Ячмень	Сорго
Контроль	П	5,2±0,02	4,1±0,03	3,6±0,02
	К	3,3±0,01	2,8±0,02	2,6±0,04
Нефть 1%	П	**3,9±0,02**	**3,8±0,03**	2,8±0,03
	К	**2,8±0,02**	**2,7±0,03**	**2,1±0,02**
Нефть 3%	П	**2,8±0,02**	**2,6±0,03**	**2,5±0,03**
	К	**2,6±0,01**	2,1±0,03	2,0±0,02
Нефть 4%	П	**2,4±0,01**	1,9±0,03	1,7±0,01
	К	**2,3±0,01**	1,6±0,02	1,8±0,02
Нефть 6%	П	1,6±0,01	1,1±0,01	1,2±0,01
	К	2,1±0,01	1,3±0,02	1,6±0,02
Нефть 8%	П	1,7±0,01	1,1±0,01	0,9±0,01
	К	1,6±0,01	1,0±0,01	1,3±0,01

Примечание: представлены средние значения и их стандартные ошибки; отличия от контрольных образцов при $P \leq 0,05$.

Литература

Панченко, Л.В. Атлас растений-фиторемидиантов / Л.В. Панченко, А.Ю. Муратова, Е.В. Дубровская, С.Н. Голубев, М.А. Березуцкий, О.В. Турковская. – Саратов: Научная книга, 2015. – 560 с.

Киреева, Н.А. Фитотоксичность антропогенно-загрязненных почв / Н.А. Киреева, Г.Г. Кузяхметов, А.М. Мифтахова, В.В. Водопьянов. – Уфа: Гилем, -2003. – 266 с.

Сотникова Ю.М., Григориади А.С., Фархутдинов Р.Г., Хисамов Р.Р. Влияние предпосевной обработки семян люцерны посевной препаратом Елена на повышение её устойчивости к загрязнению почвы нефтепродуктами. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2020. № 5 (85). С. 79-83.

Киреева, Н.А. Подбор растений для фиторемедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, В.В. Водопьянов, А.Р. Амирова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2011. - Т. 13. - № 5(2). - С. 184-187.

Trakal, L. Phytoextraction of Metals: Modeling Root Metal Uptake and Associated Processes / L. Trakal, D. Martinez-Fernandez, M. Vitkova, M. Komarek. - Phytoremediation Management of Environmental Contaminants, 2015. - V. 1. - P. 69-86.

RESISTANCE OF PLANTS-PHYTOREMEDIANS TO OIL CONTAMINATION

Yu.M. Sotnikova, R.G. Farkhutdinov

Bashkir State University, Ufa, Russia, sotnikova-bashedu@mail.ru

Annotation. At present, phytoremediation is one of the most promising methods for cleaning and restoring oil-contaminated lands. There are many studies devoted to assessing the resistance of phytoremediated plants to oil pollution. However, many plant objects, types of pollutants and physiological and biochemical parameters remain unexplored. In this regard, we analyzed the resistance of plants of the Cereal family (Poaceae) to various concentrations of oil pollution.

Key words: sowing rye, phytoremidation, oil pollution

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PROTEGENS* ДА1.2 НА УСТОЙЧИВОСТЬ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К ЗАСУХЕ ПРИ ОБРАБОТКЕ ГЕРБИЦИДОМ ЧИСТАЛАН

А.В. Феоктистова, М.Д. Тимергалин, Т.В. Рамеев, С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия,
feoktistova.arisha@yandex.ru

Аннотация. Представлены данные о влиянии ауксинпродуцирующего штамма бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2 на растения мягкой яровой пшеницы при обработке гербицидом чисталан в условиях засухи. Положительное действие штамма бактерий на состояние растений пшеницы заключалось в снижении содержания МДА, нивелировании ингибирования роста растений, нормализации содержания хлорофиллов и соотношения концентрации ауксинов между побегом и корнем в растениях.

Ключевые слова: *Pseudomonas protegens* ДА1.2, пшеница, гербицидный стресс, дефицит воды, фитогормоны, чисталан

Засуха и сорняки – одни из самых серьезных проблем современного сельского хозяйства, ограничивающий урожайность культурных растений, в частности, пшеницы [Oerke et al., 2006; Asseng et al., 2020]. Эффективность препаратов для химической прополки в борьбе с сорными растениями повысила их применение для защиты от потери урожайности сельскохозяйственных культур [Varhney et al., 2015]. Но применение гербицидов растений негативно сказывается и на культурных растениях, которое становится наиболее ощутимым в условиях засухи [Мокроносов и др., 1983].

Известно, что при абиотических стрессах наиболее уязвимыми является фотосинтез [Никитин и др., 2010; Загоскина, Назаренко, 2016; Kutilkin et al., 2018] и антиоксидантная система растений [Ahemad, Khan, 2010]. Гормоны растений являются одной из ключевых систем, интегрирующих метаболические процессы во всем растении, и позволяют им выбрать необходимую стратегию для противодействия неблагоприятным последствиям стресса [Han et al., 2015], а также влияют на урожайность и качество сельскохозяйственных культур.

В последнее время все больший интерес в нивелировании абиотических стрессов отводится бактериальным препаратам [Silva et al., 2007; Martins et al., 2011; Bourahla et al., 2018; Chennappa et al., 2018]. Выделенный ранее штамм *Pseudomonas protegens* ДА1.2 обладал наличием ряда полезных признаков: устойчивость к гербицидам, синтез ауксинов, мобилизация неорганических фосфатов, антагонизм к фитопатогенных грибам, рост в отсутствии источника азота в среде, ростстимулирующее и антистрессовое влияние на растения пшеницы [Четвериков и др., 2021].

Цель работы заключалась в том, чтобы показать перспективность использования штамма бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2 в качестве антистрессанта растений пшеницы на фоне комбинированного стресса «гербицид+засуха».

Исследования проводили в лабораторных условиях на растениях мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Экада 109. В работе использовали штамм бактерий *P. protegens* ДА1.2 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН и гербицид (против двудольных) чисталан экстра (производитель ООО «АХК-АГРО», Уфа).

Условия засухи достигали путем сокращения полива до 30% от полной влагоемкости почвы и поддержания ее на протяжении всего эксперимента. Семена пшеницы стерилизовали и проращивали в течение 3-х суток. Затем высаживали

в сосуды объемом 0,5 л с почво-песочной смесью в соотношении 10/1. Растения выращивали на светоплощадке (14-часовой фотопериод, температура 22-26 °С). Через 7 суток растения обрабатывали гербицидом и бактериями путем опрыскивания. Пробы для определения гормонов, малонового диальдегида (МДА) и хлорофиллов отбирали через 3 суток после обработки, а ростовые показатели оценивали через 14 дней. Фитогормоны определяли методом иммуноферментного анализа [Veselov et al., 1992], МДА – методом Costa [Costa et al., 2002], хлорофиллы – спектрофотометрическим методом [Кудряшов и др., 2011].

Одновременное воздействие засухи и гербицида чисталан приводило к снижению сырой массы как корня, так и побега растений пшеницы (на 24% и 32%, соответственно), однако внесение бактерий *P. protegens* ДА1.2 в этих условиях способствовало увеличению массы побега (на 13% по сравнению с растениями при воздействии стресса), не вызывая при этом увеличения массы корня. В экспериментах у растений, выращиваемых в условиях гербицидной обработки при недостатке воды, не было типичной реакции (относительная активация корня) на недостаток воды: соотношение масс корень/побег не менялось по сравнению с контролем. Достоверно снижалась сырая масса и корня, и побега, в то время как внесение ростстимулирующих бактерий в раствор гербицида приводило к относительной активации роста побега.

Обработка растений гербицидом при засухе приводила к накоплению МДА (один из метаболитов при перекисном окислении липидов [Загоскина и др., 2016]) (15% относительно контроля), тогда как внесение бактерий штамма *P. protegens* ДА1.2 нивелировало стресс снижением роста его концентрации. Таким образом, снижение уровня МДА свидетельствует об уменьшении повреждающего действия активных форм кислорода в листьях пшеницы при инокуляции растений бактериями *P. protegens* ДА1.2 в условиях комбинированного стресса.

Важным показателем состояния растений в условиях стресса является содержание хлорофиллов a, b [Николаева и др., 2010]. При комбинированном стрессе «гербицид+засуха» содержание хлорофиллов в листьях пшеницы снижалось на 8%. Положительное влияние бактерий выражалось в нивелировании негативного влияния гербицида на фотосинтетический аппарат. Совместная обработка с бактериями приводила к повышению суммарного содержания хлорофиллов на фоне комбинированного стресса на 17%. Таким образом, взаимодействие пшеницы с ростстимулирующими бактериями штамма ДА1.2 улучшало состояние растений по сравнению с необработанными бактериями растениями.

Внесение гербицида из класса синтетических ауксинов чисталана приводило к накоплению ИУК более чем в 2,5 раза. Мы предположили, что это могло быть связано со способностью растений к поглощению экзогенных ауксинов [Тимергалин и др., 2020; Феоктистова и др., 2020] или же сам гербицид действовал на содержание эндогенной ИУК [Kudoyarova et al., 2017]. Наблюдаемый дисбаланс в распределении ауксинов между побегом и корнем в растении, вызываемый гербицидом может быть причиной уменьшения его устойчивости к засухе. А накопление ауксинов под влиянием бактерий в корнях служит одним из механизмов, ответственных за улучшение состояния растений при обработке гербицидом в условиях засухи. Было выявлено накопление АБК в растениях при воздействии стресса. Наиболее сильно оно проявлялось в корнях, что могло быть следствием торможения их роста. Что касается цитокининов, то стресс приводил к повышению их содержания, однако при внесении бактерий мы наблюдали наибольшее накопление цитокининов в побеге. Накопление цитокининов под влиянием изученного стрессового воздействия могло компенсировать рост-ингибирующее действие повышенного уровня АБК, что в наибольшей степени проявлялось у растений, обработанных бактериями.

Бактериальный штамм *Pseudomonas protegens* ДА1.2 оказывал положительное влияние на состояние растений пшеницы, обработанных гербицидом чисталан в условиях дефицита почвенной влаги. Применение бактерий *P. protegens* ДА1.2 способствовало устойчивости растений пшеницы к воздействию гербицида и засухи и может быть рекомендовано для разработки агробиотехнологий для повышения толерантности растений.

Литература

Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник МГПУ. Сер.: Естественные науки. 2016. № 2. С. 9–23.

Кудряшов А.П., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Смолич И.И., Яковец О.Г. Физиология растений: лабораторный практикум для студентов биологического факультета / Минск : БГУ. 2011. с. 70.

Мокроносов А.Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма // М.: Наука. 1983. 64 с.

Никитин Н.В. Научно-практические аспекты технологии применения современных гербицидов в растениеводстве // М.: Печатный город. 2010. 200 с.

Николаева М.К., Маевская С.Н., Шугаев А.Г., Бухов Н.Г. Влияние засухи на содержание хлорофилла и активность ферментов антиоксидантной системы в листьях трех сортов пшеницы, различающихся по продуктивности // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 1. С. 94–102.

Тимергалин М.Д., Феоктистова А.В., Рамеев Т.В., Кудоярова Г.Р., Четвериков С.П. Роль ауксинпродуцирующих бактерий в преодолении стресса растениями пшеницы в условиях обработки гербицидом чисталан // Агрохимия. 2020. № 11. С. 35-40.

Феоктистова А.В., Тимергалин М.Д., Рамеев Т.В., Четвериков С.П. Влияние совместного применения бактерий, продуцирующих фитогормоны, и гербицида «Чисталан» на физиолого-морфологические параметры растений пшеницы // Аграрный научный журнал. 2020. № 11. С. 67-70.

Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д., Кенджиева А.А., Стариков С.Н., Султангазин З.Р. Перспективный штамм бактерий *Pseudomonas protegens* для стимуляции роста сельскохозяйственных злаков, устойчивый к гербицидам // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 87-94.

Ahemad M., Khan M.S. Ameliorative effects of Mesorhizobium sp. MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress // Pesticide Biochemistry and Physiology. 2010. V. 98. P. 183–190.

Asseng S., Guarin J.R., Raman M. Wheat yield potential in controlled-environment vertical farms // Proc. Natl. Acad. Sci. 2020. https://doi.org/10.1073/pnas.2002655117.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies // Plant and Soil. 1973. V. 39. P. 205-207.

Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere // Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie. 2018. V. XXV. P. 74–83.

Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. Azotobacter salinestris: a novel pesticide-degrading and prominent biocontrol PGPR bacteria // Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability. 2018. V. 7. P. 23–43.

Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B Radiation on Antioxidant Defense System in Sunflower Cotyledons // Plant Science. 2002. V. 162. P. 939-945.

Oerke E.C. Crop Losses to Pests // Journal of Agricultural Science. 2006. V. 144. P. 31-43.

Varhney S., Khan M.I.R., Masood A., Per T.S., Rasheed F., Khan N.A. Contribution of Plant Growth Regulators in Mitigation of Herbicidal Stress // J Plant Biochem Physiol. 2015. V. 3. doi:10.4172/2329-9029.1000160.

Han L., Zhao D., Li C. Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of Cupriavidus campinensis BJ71 // Brazilian Journal of Microbiology. 2015. V. 46. № 2. P. 433-441.

Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants // Acta Physiologiae Plantarum. 2017. V. 39. P. 253.

Kutilkin V.G. Weediness and yield of spring barley depending on the farming system elements // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2018. V. 9. № 5. P. 911-918.

Martins P.F. Carvalho G., Gratão P.L., Dourado M.N., Pileggi M. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria // Process Biochemistry. 2011. V. 46. P. 1186–1195.

Silva T.M. Stets M.I., Mazzetto A.M., Andrade F.D., Pileggi S.A.V. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil // Brazilian Journal of Microbiology. 2007. V. 38. P. 522–525.

Veselov S.U., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Guili-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // Physiologia Plantarum. 1992. V. 86. P. 93–96.

THE EFFECT OF *PSEUDOMONAS PROTEGENS* DA1.2 BACTERIA ON THE RESISTANCE OF SOFT SPRING WHEAT TO DROUGHT WHEN TREATED WITH THE HERBICIDE CHISTALAN

A.V. Feoktistova, M.D. Timergalin, T.V. Rameev, S.P. Chetverikov

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, UFA, Russia, feoktistova.arisha@yandex.ru

Annotation. Data on the effect of the auxin-producing strain of *Pseudomonas protegens* bacteria DA1.2 on soft spring wheat plants when treated with the herbicide chistalan in drought conditions are presented. The positive effect of the bacterial strain on the condition of wheat plants was to reduce the content of MDA, level the inhibition of plant growth, normalize the content of chlorophylls and the ratio of the concentration of auxins between the shoot and the root in plants.

Keywords: *Pseudomonas protegens* DA1. 2, wheat, herbicidal stress, water deficiency, auxins, chistalan

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ КАРТОФЕЛЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ СОВМЕСТНОЙ ОБРАБОТКИ *BACILLUS SUBTILIS* 26Д С САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТАМИ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ И ИНФИЦИРОВАНИЯ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Е.А. Черепанова[1], Л.Г. Яруллина[1], В.О. Цветков[2], А.В. Сорокань[1], Е.А. Заикина[1], Ж.Н. Калацкая[3], Н.В. Балюк[3]

[1] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, Уфа, 450054, проспект Октября, 71, k_cherepanova@mail.ru
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет», Россия, Уфа, 450076, ул. Заки Валиди, 32
[3] Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси», Беларусь, Минск, 220072, ул. Академическая, 27

Аннотация. Выявлена связь обработки растений картофеля спорами *B. subtilis* 26Д в сочетании с сигнальными молекулами - салициловой и жасмоновой кислотами, с развитием устойчивости растений к возбудителю фитофтороза после перенесенного ими дефицита влаги. Изменения в про-/антиоксидантной системе при этом были связаны с накоплением H_2O_2 и активацией антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова*: Solanum tuberosum; Phytophthora infestans; Bacillus subtilis*; сигнальные молекулы, про-/антиоксидантная система.

Актуальной задачей растениеводства является повышение устойчивости растений к патогенам и неблагоприятным агроклиматическим условиям. Основой экологически чистых препаратов для защиты растений от биотических и абиотических стрессов являются стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) [Maksimov et al., 2015]. В этом отношении особенно привлекательны высокоэффективные бактерии рода *Bacillus*, способные длительное время сохранять жизнеспособность. Рост и развитие картофеля, а также урожайность сильно зависят от влажности почвы. У картофеля эта зависимость выражена гораздо сильнее, чем у других видов сельскохозяйственных культур [Burton, 1981].

Показано, что экзогенно применяемая салициловая кислота (СК), помимо повышения устойчивости к патогенам, повышает устойчивость растений к ряду физиологических стрессов [Hayat et al., 2010], аналогичные данные были получены при обработке жасмонатом (ЖК) [Chanda et al., 2011]. Таким образом, значительный интерес представляет выяснение механизмов комплексной устойчивости растений к стрессовым факторам под действием бактерий рода *Bacillus* в сочетании с сигнальными молекулами.

Цель данной работы – изучение влияния бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с СК и ЖК на содержание H_2O_2 и активность ферментов антиоксидантной системы, в связи с устойчивостью картофеля к *Phytophthora infestans* при засухе.

В опытах использовали растения картофеля *Solanum tuberosum*, выращенные из микроклубней восприимчивого сорта Ранняя роза. Растения выращивали на светоплощадке с фотопериодом 16 ч (освещенность 8000–10000 люкс) при температуре 20–22 °С. Бактерии *B. subtilis* 26Д культивировали в среде LB (Lysogeny Broth) в течение 24 ч, затем суспензию разбавляли дистиллированной водой до необходимой концентрации. На 15-е сутки после прорастания растений часть из них опрыскивали суспензией (5 мл на 1 растение) бактерий *B. subtilis* 26Д (10^8 клеток / мл) и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖК (10^{-7} М) или СК (10^{-6} М) + ЖК (10^{-7} М). Контрольные опрыскивали 5 мл дистиллированной воды на 1 растение. Дефицит влаги создавали за счет сокращения полива до появления видимых симптомов дефицита воды при влажности почвы 40% ± 5 [Batool et al., 2020].

Для заражения растений использовался возбудитель фитофтороза – оомицет *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary* из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН. Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 дней. О развитии болезни судили по проценту пораженной площади от общей площади листовой пластинки на 7-е сутки после заражения растений *Ph. infestans*. Листья фотографировали, полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (NIH, США).

Содержание H_2O_2 определяли с использованием ксиленолового оранжевого методом [Jiang et al., 1990]. Активность СОД (КФ 1.15.1.1.) измеряли методом [Bonnet et al., 2000], для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) использовали метод [Hadwan and Abed, 2016], основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Пероксидазную активность супернатанта определяли методом [Fornera and Walde, 2010], содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорд, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [Bradford, 1976]. Эксперименты включали 5 биологических повторностей. Различия исследуемых параметров анализировали с помощью теста Краскела – Уоллиса.

Сравнительный анализ степени пораженности фитофторозом листьев восприимчивого сорта картофеля при недостатке влаги выявил различия в скорости роста *Ph. infestans* в вариантах с инокуляцией бактериями и сигнальными молекулами. Так, в отсутствие обработки (при опрыскивании дистиллированной водой) степень пораженности составила 64%, предварительная обработка *B. subtilis*, в том числе в сочетании с СК и ЖК, значительно снижала пораженность листьев. Предобработка *B. subtilis* в сочетании с ЖК оказала наиболее эффективное защитное действие, снизив степень поражения листьев в два раза по сравнению с необработанными растениями. Ранее нами было показано, что обработка ЖК и *B. subtilis* 26Д снижают развитие *Ph. infestans* на клубнях картофеля [Yarullina et al., 2016].

H_2O_2, наиболее стабильная из активных форм кислорода (АФК), участвующая в передаче внутриклеточных сигналов, регулирующих экспрессию генов и активность защитных систем [Galvez-Valdivieso et al., 2009]. Увеличение устойчивости картофеля к *Ph. infestans* под влиянием комплекса *Bacillus* spp. с сигнальными молекулами может быть связана с изменением концентрации H_2O_2 в тканях растений [Pfannschmidt et al., 2009]. Наши исследования показали, что концентрация H_2O_2 в обработанных только *B. subtilis* растениях в условиях засухи была ниже, чем в необработанных, в то же время у растений, обработанных бактериями и сигнальными молекулами, перенесших засуху, при заражении *Ph. infestans* уровень перекиси водорода в листьях заметно увеличивался, особенно при обработке *B. subtilis* + ЖК. Вероятно, сочетание *Bacillus* с сигнальными молекулами усиливает генерацию АФК и передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов, предотвращающих развитие патогенов. Изменение концентрации H_2O_2 в тканях растений в процессе патогенеза может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности антиоксидантных ферментов [Smirnoff and Arnaud, 2019].

Одним из важных ферментов антиоксидантной системы растений, участвующих в утилизации АФК, является супероксиддисмутаза. В наших исследованиях при заражении растений *Ph. infestans* наблюдалось повышение активности СОД, обработка бактериями усиливала этот эффект. Однако обработка бактериями в сочетании с СК или ЖК, наоборот, приводила к снижению активности СОД у инфицированных растений. У незараженных растений на фоне засухи достоверное повышение активности СОД выявлено в варианте с обработкой растений бактериями в сочетании с СК, ЖК или одновременно СК и ЖК. Таким образом, при использовании обработки

растений *B. subtilis* 26Д с СК и ЖК повышается активность СОД, а при инфицировании этих вариантов активность в них СОД снижается.

Известно, что активность СОД может изменяться разнонаправленно в зависимости от интенсивности и продолжительности воздействия стрессового фактора [Rizhsky et al., 2003]. Снижение активности СОД при стрессе способствует дальнейшему увеличению продукции АФК и развитию окислительного повреждения клеток и тканей растений [Jiang and Huang, 2001]. Следовательно, эффективное функционирование СОД во многом определяется функционированием других компонентов защитных систем, в частности, утилизирующих перекись водорода (каталазы, пероксидазы, ферменты аскорбат-глутатионового цикла).

Каталаза - основной фермент, разлагающий избыточное количество перекиси водорода в тканях [Pradedova et al., 2011]. Исследования показали, что у растений, инфицированных *Ph. infestans*, в условиях засухи наблюдалось снижение активности каталазы. У инфицированных растений, обработанных только бактериями или в сочетании с СК или ЖК, активность каталазы значительно увеличивалась. Более того, в вариантах с обработкой *B. subtilis* + СК и *B. subtilis* + ЖК повышение активности каталазы происходило и у незараженных растений на фоне засухи.

Пероксидаза является важным антиоксидантным ферментом, принимающим участие не только в утилизации H_2O_2, но и в её генерации [Fornera and Walde, 2010], являясь, таким образом, ферментом двойного назначения, тонко регулирующим концентрацию перекиси водорода. Известно, что обширное мультигенное семейство классических пероксидаз растений класса III, входящих в семейство защитных белков семейства PR-9, способствует укреплению клеточных стенок за счет окислительных реакций, катализирующих процессы полимеризации фенольных соединений в лигнин клеточных стенок, повышая их устойчивость к разрушению фитопатогенами.

В наших исследованиях активность пероксидазы увеличивалась у незараженных растений на фоне засухи только в вариантах с обработкой *B. subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами. Однако при заражении растений *Ph. infestans* значительное увеличение активности пероксидазы происходило у растений, обработанных одними *B. subtilis,* а также при сочетании бактерий с ЖК и СК+ЖК. Ранее было показано, что сочетание *B. subtilis* 26Д и СК способствовало активации пероксидазы у инфицированных *P. infestans* растениях картофеля в условиях нормальной влажности [Maksimov et al., 2014]. В то же время у инфицированных растений, обработанных *B. subtilis* 26Д и ЖК, активность фермента значительно не изменялась. Вероятно, регуляция содержания H_2O_2 в растениях картофеля под действием бактерий *B. subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами на фоне засухи может происходить разными путями: через активацию СОД, снижение активности каталазы и в результате модулирующего воздействия на активность пероксидазы. Баланс между синтезом и инактивацией АФК имеет решающее значение для поддержания метаболизма растений и повышения их устойчивости к стрессовым факторам различной природы [Sathyamurthy et al., 2015].

Таким образом, полученные результаты исследований указывают, что механизм активации защитных систем растений картофеля бактериями рода *Bacillus* и сигнальными молекулами связан с накоплением H_2O_2 и изменением активности антиоксидантных ферментов, активировавшихся в условиях засухи. Вероятно, эти процессы «подстёгивают» защитную систему растений, в результате чего последние меньше подвержены последующему инфицированию возбудителем фитофтороза.

Работа выполнялась частично по теме госзадания (№ гос. регистрации АААА-А21-121011990120-7), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-516-00005, на оборудовании Центра коллективного пользования “Биомика” (Отделение

биохимических исследований и нанобиотехнологии Регионального центра коллективного пользования “Агидель”) и Уникальной научной установки “Кодинк”.

Литература

Batool T., Ali S., Seleiman M.F., Naveed N.H., Ali A., Ahmed K., Abid M., Rizwan M., Shahid M.R., Alotaibi M., Al-Ashkar I., Mubushar M. // Sci Rep. 2020. V. 10. No. 1. P. 169-175.

Bonnet M., Camares O., Veisseire P. // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 945-953.

Bradford M.M. // Anal Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254

Burton W.G. // American Potato Journal. 1981. V. 58. P. 3–14.

Chanda B., Xia Y., Mandal M.K., Sekine K.T., Gao Q.M., Selote D. // Nat Genet. 2011. V. 43. P. 421–427.

Fornera S., Walde P. // Analytical Biochemistry. 2010. V. 407. No. 2. P. 293-295.

Hadwan M.H., Abed H.N. // Data in Brief. 2016. V. 6. P. 194-99.

Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. // Environmental and Experimental Botany. 2010. V. 68. P. 14-25.

Jiang Y., Huang B. // Crop Sci. 2001. V. 41. P. 436-442.

Jiang Z.Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P. // FEBS Lett. 1990. V. 268. P. 69-71.

Maksimov I.V., Abizgildina P.P., Sorokan A.V., Burkhanova G.F. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. V. 50. No. 2. P. 173-178.

Maksimov I.V., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Sarvarova E.R., Khairullin R.M. // Russian Journal of Plant Physiology. 2015. V. 62. P. 715-726.

Pfannschmidt T., Bräutigam K., Wagner R., Dietzel L., Schröter Y. // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 599–607.

Pradedova E.V., Isheeva O.D., Salyaev R.K. // Russian Journal of Plant Physiology. 2011. V. 58. No. 1. P. 36-44.

Rizhsky L., Liang H., Mittler R. // The Journal of Biological Chemistry. 2003. V. 278. P. 38921–38925.

Sathyamurthy B., Dama G., Balasubramanian A., Vvs S. // World Journal of Pharmaceutical Research. 2015. V. 4. No. 2. P. 927-939.

Smirnoff N., Arnaud D. // New Phytologist. 2019. V. 221. No. 3. P. 1197-1214.

Yarullina L.G., Kasimova R.I., Ibragimov R.I., Akhatova A.R., Umarov I.A., Maksimov I.V. // Appl Biochem Microbiol. 2016. V. 52. No. 1. P. 71-78.

CHANGES IN THE PRO-/ANTIOXIDANT SYSTEM OF POTATOES UNDER THE INFLUENCE OF JOINT TREATMENT OF BACILLUS SUBTILIS 26D WITH SALICYLIC AND JASMONIC ACIDS UNDER CONDITIONS OF MOISTURE DEFICIENCY AND PHYTOPHTHORA INFESTANS INFECTION

E.A. Cherepanova[1], L.G. Yarullina[1], V.O. Tsvetkov[2], A.V. Sorokan[1], E.A. Zaikina[1], Zh.N. Kalatskaya[3], N.V. Balyuk[3]

[1] Institute of Biochemistry and Genetics – Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054, Prospekt Oktyabrya, 71, Russia, k_cherepanova@mail.ru
[2] Bashkir State University, Ufa, 450076, Zaki Validi str., 32, Russia
[3] V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, Minsk, 220072, Akademicheskaya str., 27

Annotation. The connection between the treatment of potato plants with B. subtilis 26D spores in combination with signal molecules - salicylic and jasmonic acids, with the development of plant resistance to the pathogen of late blight after they suffered a moisture deficiency was revealed. Changes in the pro - / antioxidant system were associated with the accumulation of H_2O_2 and the activation of antioxidant enzymes.

Key words: Solanum tuberosum; Phytophthora infestans; Bacillus subtilis; signaling molecules, pro - / antioxidant system

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТ НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ *TADCL2* И *TADCL4* В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБОМ *STAGONOSPORA NODORUM*

М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов

ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Россия, mikeshenoda@yandex.ru

Аннотация. РНК интерференция – это процесс высокоспецифичного глушения целевых фрагментов РНК или ДНК при помощи комплекса RISC с комплементарным этому фрагменту участком малой РНК. DICER-подобные белки (DCL), представляют один из основных компонентов этого процесса, формирующего устойчивость растений к биотическому стрессу. В данной работе мы оценили, как иммунизирование СК и ЖК, а также инфицирование грибом *S. nodorum* влияло на уровень транскриптов генов *TaDCL2* и *TaDCL4* в растениях пшеницы.

Ключевые слова: РНК-интерференция, *Triticum aestivum, Stagonodpora nodorum* Berk, салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты, транскрипционная активность генов

Введение

На сегодняшний день для научного сообщества большой интерес представляет проблема поиска эффективных и экологически безопасных способов повышения устойчивости культурных растений к различным патогенам. Для мягкой пшеницы большую угрозу представляют заболевания грибной этиологии, к числу которых относится септориоз. Так возбудитель септориоза *Stagonospora nodorum* Berk. при благоприятных для патогена условиях способен снизить урожайность пшеницы до 30-40%.

Уникальным природным механизмом, вовлеченным в формирование защитного ответа растения, является процесс РНК-интерференции (РНКи). РНКи – это процесс высокоспецифичного глушения целевых фрагментов РНК или ДНК при помощи комплекса RISC с комплементарным этому фрагменту участком малой РНК на стадии транскрипции или трансляции [Fire., 2007]. Имеются данные о том, что трансгенные растения пшеницы, благодаря процессу РНКи, могут вызывать серьезные дефекты клеточных стенок гифов гриба *Fusarium culmorum*, нарушая синтез хитин-синтазы или β-1, 3-глюкансинтазы [Cheng et. all., 2015] и демонстрируют повышенную устойчивость. Ключевыми компонентами в РНКи являются DICER-подобные белки (DCL) и белки Argonaute (AGO). Белки DCL, обладая РНКазной активностью, инициируют формирование коротких двуцепочечных фрагментов из исходных РНК. В свою очередь, AGO встраивают эти полученные фрагменты в комплекс RISC и используют их впоследствии в качестве клише для распознавания и последующей деградации мРНК генов-мишеней. Из семейства генов дайсер-подобных белков немалый интерес представляет гены *DCL2* и *DCL4*, поскольку кодируемый ими белки участвуют в развитие системного ответа растения при активации системы РНКи в ответ на инфицирование патогеном [Garcia-Ruiz et. all., 2015].

Кроме того, большой интерес представляет исследование влияние медиаторов сигнальных систем салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на экспрессию генов системы РНКи в листьях пшеницы *Triticum aestivum* при инфицировании возбудителем септориоза *Staganospora nodorum* Berk. Например, известно, что эндофиты *Bacillus ssp.* могут одновременно проявлять как антагонизм по отношению к фитопатогенам, так и запускать СИУ растений, индуцируя салицилат- (PR-1) и жасмонат-зависимые (PR-6) реакции [Бурханова и др., 2017].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы являлась оценка изменений уровня транскрипционной активности генов *TaDCL2* и *TaDCL4* в иммунизированных салициловой и жасмоновой кислотами растениях контрастных по устойчивости

к возбудителю септориоза сортов мягкой пшеницы Жница и Омская 35 в условиях инфицирования возбудителем септориоза S*tagonospora nodorum.*

Материал и методика исследования

Объектом исследования служили 7-суточные проростки мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый). Перед посадкой семена замачивались в растворах 10–5 М (СК) или 10–7 М (ЖК), а также в их смеси. Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных растений пшеницы проводили с использованием реагента “Trizol” согласно протоколу фирмы “Sigma” (Германия), из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте. Амплификация была проведена при помощи метода количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «CFX Connect Real-Time System» («Bio-Rad», США) с использованием интеркалирующего красителя EVA-Green (Синтол, Россия). Изменение транскрипционной активности исследуемых генов оценивалось относительно референсного гена *RLI*(a) (белка подобного ингибитору РНКазы-L пшеницы). Праймеры к пшеничным генам *TaDCL2* и *TaDCL4* были подобраны с использованием базы данных NCBI. Статистический анализ полученных данных проводился в программе Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Version: 4.1.2433.1219 («Bio-Rad», США).

Результаты и обсуждение

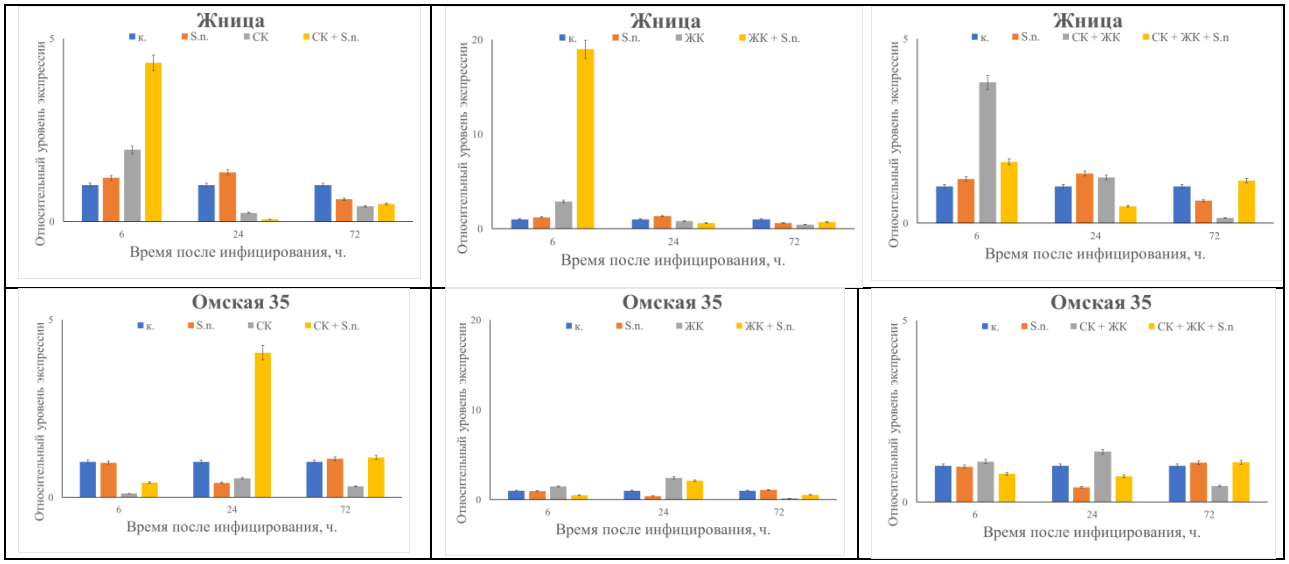


Рис. 1. Изменения в транскрипционной активности гена *TaDcl2* у сортов мягкой пшеницы Жница и Омская 35 при инокуляции СК, ЖК, СК + ЖК и инфицировании грибом *S. nodorum*.

В ходе выполнения данной работы у восприимчивого сорта Жница нами наблюдалось повышение транскрипционной активности гена *TaDcl2* при обработке образцов СК и ЖК уже через 6 часов после инфицирования. Вместе с тем обработка ЖК приводила к более выраженному эффекту – у инфицированных образцов активность *TaDcl2* возрастала почти в 20 раз по сравнению с контрольными образцами. Однако обработка образцов смесью СК и ЖК приводила к аналогичному, но менее выраженному эффекту. У относительно устойчивого к возбудителю септориоза сорта Омская 35 активность данного повышалась у инфицированных и обработанных СК образцов на 24-часовой точке фиксации (рис. 1).

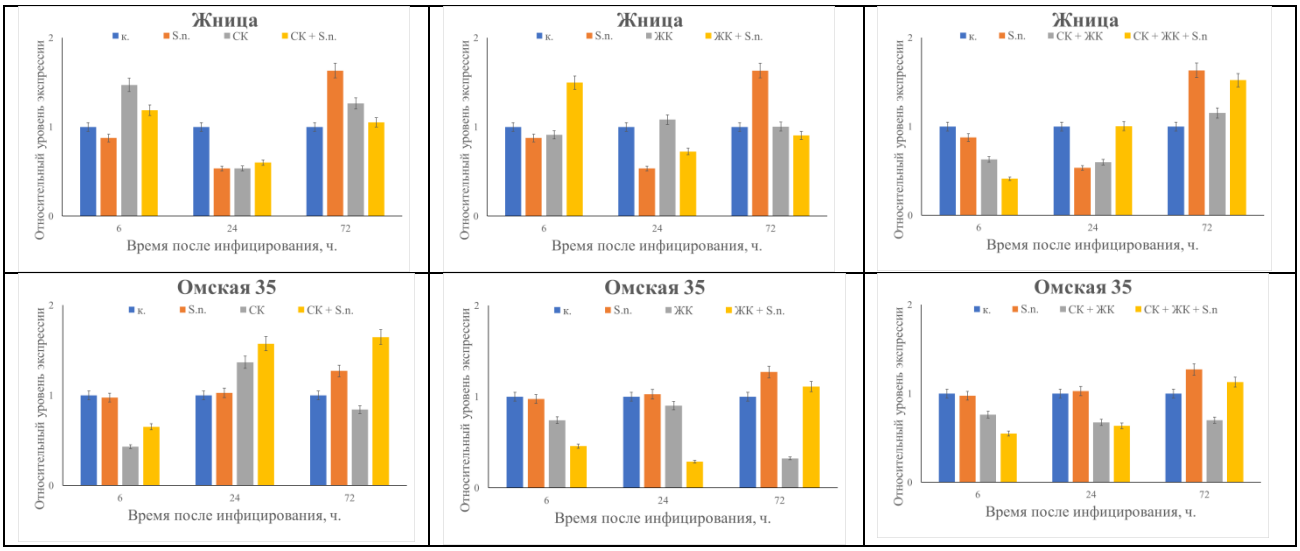


Рис. 2. Изменения в транскрипционной активности гена *TaDcl4* у сортов мягкой пшеницы Жница и Омская 35 при инокуляции СК, ЖК, СК + ЖК и инфицировании грибом *S. nodorum*.

Из полученных в ходе исследования результатов по оценке транскрипционной активности гена *TaDcl4* видно, обработка СК и ЖК не приводила к столь выраженному эффекту, как в случае с геном *TaDcl2*. У сорта Жница наблюдалось небольшое повышение транскрипционной активности *TaDcl4* при обработке СК на 6 часовой и ЖК на 24 часовой точке фиксации. При совместной обработке СК и ЖК уровень транскрипционной активности удерживался на уровне контрольных образцов. Кроме того, можно отметить тенденцию у сорта Жница к снижению активность *TaDcl4* при инфицировании на 24 часовой точке фиксации и ее повышению на 72 часовой - как будто что-то сначала выключает этот ген, а затем, наоборот, его активирует. У устойчивого сорта Омская 35 наблюдалось небольшое относительно контроля повышение активности *TaDcl4* при обработке СК на 24-часовой точке фиксации. Но в целом получения значения удерживались на уровне контроля (рисунок 2).

Заключение

Таким образом нами было установлено, что иммунизация семян СК и ЖК действительно оказывала влияние на транскрипционную активность генов *TaDcl2* и *TaDcl4*. Из полученных данных видно, что активность этих генов у восприимчивого к возбудителю септориоза сорта Жница повышалась уже через 6 часов, после инфицирования, в отличие от устойчивого сорта Омская 35. Это может быть связано с активацией у устойчивого сорта других защитных механизмов на более ранних этапах инфицирования.

Работа выполнена в рамках научного гранта РФФИ-аспирант № 20-34-90004.

Литература

1. Бурханова, Г.Ф. Бактерии рода Bacillus в регуляции устойчивости пшеницы к Septoria nodorum Berk. / Г.Ф. Бурханова, С.В. Веселова, А.В. Сорокань, Д.К. Б лагова, Т.В. Нужная, И.В. Максимов // Прик. биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 3. – С. 308–315.

2. Шеин М.Ю., Мерзлякова А.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Влияние инфицирования грибом Stagonospora nodorum на транскрипционную активность гена Ago1 в растениях пшеницы / М.Ю. Шеин, А.Ю. Мерзлякова, Г.Ф. Бурханова,

И.В.Максимов // Материалы межд. Научн-конф. «World science: Problems and innovations». Пенза. МЦНС «Наука и просвещение. – 2021. – С. 62–65.

3. Agorio, A. Argonaute 4 is required for resistance to Pseudomonas syringae in Arabidopsis / A. Agorio, P. Vera // Plant Cell. – 2007. – Vol. 19. – P. 3778. doi: 10.1105/tpc.107.054494.

4. Carbonell A., Carrington J.C. Antiviral roles of plant Argonautes // Curr Opin Plant Biol. 2015. V.27. P. 111. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.013.

5. Cheng, W. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to Fusarium head blight and seedling blight in wheat / W.Cheng, X.S. Song, H.P. Li, L.H.Cao, K. Sun, X.L. Qiu, Y.B. Xu, P. Yang, T. Huang, J.B. Zhang, B. Qu, Y.C. Liao // Plant Biotechnol. J. – 2015. – V. 13. – P. 1335–1345. doi: 10.1111/pbi.12352.

6. Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V. García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne W., Zimmerli L., Mauch-Mani B. Priming: Getting ready for battle. // Mol. Plant–Microbe Interact. 2006. V. 19. № 10. P. 1062– 1071.

7. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 1998. doi: 10.1038/sj.cdd.4402253

8. Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer J.S., Fahlgren N., ect. all Roles and programming of Arabidopsis Argonaute proteins during turnip mosaic virus // PLoS Pathog. 2015 Mar; 11(3), doi: 10.1371/journal.ppat.1004755

9. Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y. RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors // Cells. 2019. V. 8: 38. doi: 10.3390/cells8010038

10. Paudel D.B., Ghoshal B., Jossey S., Ludman M. Fatyol K., Sanfaçon H. Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in Nicotiana benthamiana plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence // Virology. 2018. V. 524. P.127. doi: 10.1016/j.virol.2018.08.016

11. Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., van Wees S.C., Bakker P.A. Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 347–375.

12. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute 4 modulates resistance to Fusarium brachygibbosum infection by regulating jasmonic acid signaling. Plant Physiol. 2020. V. 184. P. 1128–1152. doi: 10.1104/pp.20.00171.

THE EFFECT OF SALICYLIC AND JASMONIC ACIDS ON TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF TADCL2 AND TADCL4 GENES IN WHEAT PLANTS AT INFECTION WITH *STAGONOSPORA NODORUM* FUNGUS

M.Yu. Shein, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa, Russia, mikeshenoda@yandex.ru

Annotation. RNA interference is a process of highly specific silencing of target RNA or DNA fragments by the RISC complex with a small RNA region complementary to this fragment. DICER-like proteins (DCL) are one of the main components of this process, which forms plant resistance to biotic stress. In this work, we evaluated how immunization with SA and JA, as well as infection with the fungus *S. nodorum*, influenced the level of transcripts of the TaDCL2 and TaDCL4 genes in wheat plants.

Key words: RNA interference, *Triticum aestivum, Stagonodpora nodorum* Berk, salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids, transcriptional activity of genes

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕСОВЕДЕНИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЯ

МИКРОБИОМЫ ЗАЛЕЖНЫХ ПОЧВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЯНАО

Е.В. Абакумов[1], Е.Н. Моргун[2], А.О. Зверев[1]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, e-abakumov@mail.ru

[2] Научный центр изучения Арктики, Салехард, Россия, morgun148@gmail.com

Аннотация. Изучены почвы залежных экосистем центральной части Ямало-Ненецкого автономного округа. Выявлены тренды трансформации их микробиологических параметров, в частности, таксономического состава микробиома.

Ключевые слова: микробиом, почвы, мерзлота, Ямал, криолитозона

По современным оценкам от 30 до 40 миллионов гектаров пахотных земель в настоящее время выведены из сельскохозяйственного пользования в России и не используются. Они переводятся в состояние заброшенных земель и трансформируются под влиянием природных и антропогенных процессов почвообразования, проградации и деградации почв, роста лесов, заболачивания [Иванов и др., 2015; Люри и др., 2010]. В последние десятилетия криолитозона была значительно изменена человеком, что привело к заметным изменениям в структуре почвенного покрова, что оказывает последовательное влияние на устойчивость экосистем [Alekseev et al., 2021]. Многие региональные правительства северных регионов рассматривают все более благоприятные условия выращивания как возможность управлять сельскохозяйственной экспансией. Например, Сибирь в настоящее время находится на уровне менее 50% от своего предполагаемого потенциала производства продовольствия, включая восстановление ранее заброшенных земель и нередко воспринимается как скрытая продовольственная корзина. Несмотря на экстремальные природно-климатические условия, наличие холодов и мерзлого состояния почв в течение 8-10 месяцев в году, очаговый характер промышленного и экономического развития территории, Ямало-Ненецкий автономный округ (ЯНАО) имеет достаточные возможности для обеспечения населения основными сельскохозяйственными культурами, возделываемыми на Крайнем Севере (овощами, ячменем, многолетними травами). Важным фактором развития сельскохозяйственного производства в ЯНАО является повышение эффективности использования агропотенциала естественного и эффективного плодородия пахотных и заброшенных почв в соответствии с их эколого-генетическим статусом, гранулометрическим составом, с учетом гидротермальных климатических показателей (осадков, продолжительности теплого периода, количества осадков холодного периода, региональных особенностей их педогенеза и метаболизма).

Почвы Арктического пояса Российской Федерации и криолитозоны – недооцененная скрытая продовольственная корзина Российской Федерации. Потепление климата в ближайшем будущем будет способствовать экспансии сельского хозяйства в северные экосистемы. В связи с этим наше исследование направлено на изучение микробиома почв зрелой тундры и антропогенно нарушенных экосистем Ямало-Ненецкого автономного округа с использованием высокопроизводительного метагеномного секвенирования. Таксономический анализ почвенных микробиомов

выявил 33 бактериальных и архейных типа, среди которых доминирующими были представители Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroides, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Gematimonadetes, Patescibacteria, Plantomycetes, Thaumarchaeota, Verrucomicrobia и WPS-2. Анализ альфа- и бета-разнообразия показал, что ненарушенные (природные) почвы полностью отличаются от антропогенно-нарушенных (в том числе агрогенных) по параметрам биоразнообразия микроорганизмов. Почвы урбанизированной зоны г. Салехарда отличались от всех остальных изученных почв по количеству OTUs и бета-разнообразию. При этом микробиом в верхних и нижних почвенных горизонтов, развившийся под сильным техногенным воздействием, был крайне неоднороден как по качественным, так и по количественным характеристикам. В то же время почвы, развитые в рекреационной зоне г. Салехарда, демонстрировали менее выраженную профильную дифференциацию микробиома (бывшие поля агроландшафтов и бывшие огородные почвы). Микробные сообщества в зрелых тундровых почвах демонстрировали менее дифференцированный состав микробиома по профилю почвы. Проведено изучение экотоксикологического состояния почв в различных функциональных зона в гг. Салехард и Лабытнанги. Установлена функциональная связь параметров микробного сообщества и отдельных экотоксикологических показателей природных и антропогенно-нарушенных почв.

Настоящее исследование является одной из первых попыток описания микробных сообществ почв в зрелых тундрах и антропогенно-загрязненных участках Ямала с использованием современных молекулярных методов качественного и количественного анализа биоразнообразия. 13 из 30 идентифицированных филумов объясняют более 99% всего микробного разнообразия. Это исследование выявляет самые распространенные типы почвенных микроорганизмов в образцах, собранных из естественных и антропогенно загрязненных почв: Firmicutes (в среднем 26,86%), Proteobacteria (в среднем 23,41%) и Actinobacteria (в среднем 15,45%). Выявлено, что филум Firmicutes в основном распространен в почвах после пахотного воздействия, которые являются наиболее засушливыми и более аэрированными. Протеобактерии в основном описаны в почве зрелой тундры, а наличие актинобактерий объясняется расположением района исследований в относительно влажной части полуострова Ямал. Наибольшее количество наблюдаемых таксономических единиц (OTU) находится в антропогенных почвах с бывшего посевного поля, так как этот участок интенсивно использовался для ведения сельского хозяйства в течение последних десятилетий. В то же время наименьшее количество OTE обнаружено в наиболее техногенно-загрязненной части города Салехарда. Анализ бета-разнообразия микробных сообществ показал, что почва зрелой тундры имеет менее дифференцированный состав микробиома по профилю почвы, в то время как почвы из антропогенно затронутых районов Салехарда могут отличаться по составу микробиома при сравнении верхнего и нижнего горизонтов почвы. Описанное микробное сообщество в зрелой почве демонстрирует многие общие для арктического региона бактериальные таксоны. Таким образом, наши результаты могут быть использованы как жизненно важный вклад в комплексное изучение почвенного микробиома арктических почв. Это, в свою очередь, имеет решающее значение для лучшего понимания реакции экосистем на глобальное изменение климата.

Работа выполнена при поддержке РФФИ-ЯНАО, проект № 19-416-890002

Литература

Иванов И.В., Александровский А.Л., Макеев А.О., Булгаков Д.С. и др. Эволюция почв и почвенного покрова. Теория, разнообразие природной эволюции и антропогенных трансформаций почв. М.:: ГЕОС, 2015, 925 с.

Люри Д.И., Горячкин С.В., Караваева Н.А., Денисенко Е.А. и др. Динамика сельскохозяйственных земель России в XX веке и постагрогенное восстановление растительности и почв. М: ГЕОС, 2010, 426 с.

Alekseev, I., Zverev, A., Abakumov, E. Organic carbon and microbiome in tundra and forest-tundra permafrost soils, Southern Yamal, Russia (2021) Polar Research, 40, статья № 5283, 18 p.

MICROBIOMES OF ABANDONED SOILS OF CENTRAL PART OF YANAO

E.V. Abakumov[1], E.N. Morgun[2], A.O. Zverev[1]

[1] St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, e-abakumov@mail.ru
[2] Scientific Center for Arctic Studies, Salekhard, Russia, morgun148@gmail.com

Annotation. Soils of abandoned ecosystems of the central part of the Yamalo-Nenets Autonomous Okrug have been studied. Trends of transformation of their microbiological parameters, in particular, taxonomic composition of microbiome, have been revealed.

Keywords: microbiome, soils, permafrost, Yamal, cryolithozone

ДИНАМИКА ГОДИЧНОГО ПРИРОСТА ПОДРОСТА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕЖГОДОВЫХ ФЛУКТУАЦИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

С.Ю. Бахтина

«Башкирский государственный аграрный университет», Уфа, Россия,
Svetlana.bakhtina@inbox.ru

Аннотация. В техногенной зоне Учалинского горно- обогатительного комбината на 4 пробных площадях изучен годичный прирост в высоту сосны обыкновенной. Полученные данные сопоставлены с температурой по месяцам 2004-2019 гг. Установлено, что месячные и годовые значения этого фактора не имеет какой-либо направленной динамики. Отклоняющиеся величины температуры в целом не оказали какую-либо выраженное воздействие на размер прироста. Установлено, что реакция растений на температуру носит преимущественно индивидуальный характер. Сделано заключение, что зависимость годичного прироста в высоту от температуры должна изучаться в комплексе с другими факторами, в первую очередь с количеством осадков.

Ключевые слова: прирост древесины, климатические факторы, сосна обыкновенная.

Промышленное загрязнение окружающей среды к настоящему времени достигло угрожающих масштабов. Особенно опасными являются последствия деятельности горнодобывающих предприятий в регионах добычи полезных ископаемых. Большие масштабы и длительность добычи и переработки руды, открытый способ разработки месторождений привели к существенному загрязнению окружающей среды такими особо токсичными компонентами руд, как тяжелые металлы [Chudzińska et al., 2014], Тяжелые металлы, мигрируя по пищевой цепи, представляют угрозу растениям и животным, здоровью человека. По этой причине крайне важны работы по рекультивации промышленных земель, в том числе за счет естественной лесной рекультивации. «Вид-пионер» и один из основных лесообразователей Евразии сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) при этом обладает особенно высоким потенциалом. По этой причине актуальными являются исследования состояния растения в экстремальных условиях среды на техногенных территориях [Кулагин, Тагирова, 2015]. Наиболее эффективным способом его определения является измерение величины годичного прироста деревьев в высоту и в радиальном направлении, являющегося объективным (не относительным), сравнительно недорогим и доступным для измерения в полевых условиях показателем [Dobbertin, 2005]. Измерения точны и легкодоступны для хвойных видов древесных растений по расстояниям между мутовками. На величину прироста одновременно влияют много факторов, в первую очередь пространственная гетерогенность экологических условий [Bakhtina et al., 2020]. Но «вычленить» влияние условий произрастания на признак бывает затруднительно, так как он также формируется под влиянием сезонных природно-климатических явлений, воздействующих на весь древостой в целом одинаковым образом [Suvanto et al., 2017]. Целью данной работы являлся анализ динамики месячных и годовых значений температуры в районе Учалинского горно- обогатительного комбината (УГОК) и влияния этого фактора на динамику годичного прироста в высоту у сосны обыкновенной. Метеорологические данные за 2004-2019 гг были получены в Башкирском управлении по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Измерения прироста за этот же период проведены в 2020 г. на 4 пробных площадях (по 4 модельных деревьев в каждой из них), расположенных на разном удалении от промышленных отвалов.

Наши данные показывают, что изменения средней температуры в 2004-2019 гг. не имеет какой-либо направленной динамики, хотя наблюдается повторяющая тенденция к ее роста до 2009 г. и, после падения в 2014 г., до 2019 г. Обнаружены два года (2011 и

2018 гг) с особо выраженными внутригодовыми разбросами температуры (таблица 1). Подсчеты показали, что без их учета коэффициент вариации среднегодовой температуры варьируется относительно слабо (21,9 %). При учете всех 16 годов он возрастает до 62,8 %. Распределение месячных температур по годам (таблица 2) является биномиальным, о чем свидетельствует хорошее соответствие средних и медиан (коэффициент корреляции этих двух параметров 0,999653, p <0,001). Наибольшей изменчивостью по годам характеризуются апрель, ноябрь и декабрь.

Данные, приведенные в таблицах 1 и 2, были проанализированы на фоне данных по измерению годичного прироста в высоту (таблица 3) деревьев 4 пробных площадей. В целом, отклоняющиеся от средних значений температуры в отдельные месяцы и годы не оказали какого-либо закономерного влияния на величину прироста модельных деревьев. Корреляционный анализ показал, что в среднем для 16 модельных деревьев отрицательные коэффициенты выявляются в сентябре, октябре, ноябре, декабре, марте, мае и июне, в остальные месяцы – положительные. Однако большинство из них статистически недостоверны. Установлено, что реакция растений на температуру носит выраженный индивидуальный характер. На уровне $p < 0,05$ зависимость связь прироста в высоту была статистически достоверной лишь 2,6 % из 192 возможных случаев.

Температура является важным, но не единственным климатическим фактором. С учетом полученных данных о его слабом влиянии на прирост в высоту сосны обыкновенной нам сделано заключение о необходимости рассмотрения его вклада в комплексе с другими факторами, важнейшим из которых является количество осадков.

Таблица 1. Статистические показатели температуры в 2004-2019 гг.

Месяцы	Средняя	Медиана	Пределы изменений	Коэффициент вариации, %
2004	2,7±3.4	0,75	(-) 13,0 -19,3	447,058
2005	2,4±3,5	3,90	(-) 16,4 -17,4	515,900
2006	1,7±3,5	2,65	(-) 20,4 -17,1	726,507
2007	2,4±3,5	3,90	(-) 15,7 -17,8	489,794
2008	3,2±3,3	4,45	(-) 16,3 -19,1	354,637
2009	2,1±3,4	2,80	(-) 14,7 -17,1	550,629
2010	2,1±4,2	3,00	(-) 21,0 -19,3	671,323
2011	0,7±3,9	3,55	(-) 19,3 -18,5	1945,520
2012	2,2±4,3	6,75	(-) 19,0 -20,0	662,932
2013	2,8±3,4	3,25	(-) 15,2 -17,2	406,831
2014	1,8±3,4	0,55	(-) 15,4 -16,9	664,781
2015	2,6±3,2	1,70	(-) 12,7 -18,2	424,066
2016	1,9±3,8	2,70	(-) 18,3 -19,8	679,351
2017	1,9 ±3,0	2,20	(-) 13,5- 16,7	601,184
2018	0,8±3,4	2,80	(-) 18,8 -18,3	1623,364
2019	2,4±3,0	3,45	(-) 15,0 -17,8	469,949

Таблица 2. Статистические показатели температуры по месяцам 2004-2019 гг.

Месяцы	Средняя	Медиана	Пределы изменений	Коэффициент вариации, %
Январь	-15,4±0,9	-15,0	(-) 21,0 – (-) 7	24,1
Февраль	-13,5±0,9	-13,1	(-) 19,0 - (-) 6,5	25,3
Март	-6,4±0,6	-6,1	(-) 10,3 - (-) -3,4	34,5
Апрель	3,4±0,5	3,5	(-) 0,1 – 9,0	61,1
Май	11,7±0,3	11,6	9,4 – 14,2	11,2
Июнь	16,0±0,4	15,8	13,2 – 19,0	10,7
Июль	17,4±0,4	17,6	13,8 – 20,0	10,0
Август	16,0±0,5	16,1	12,9 – 19,8	12,0
Сентябрь	9,8±0,3	10,3	7,1 – 11,4	13,4
Октябрь	2,6±0,4	3,0	(-) 0,5 – 4,5	67,5
Ноябрь	-4,8±0,8	-5,2	(-) 9,3 – 0,9	65,2
Декабрь	-11,5±0,8	-11,8	(-) 17,6 - (-) 7,4	26,5
2004-2019 гг	2,1±0,2	2,2	0,7 – 3,2	31,4

Таблица 3. Изменчивость годичного прироста в высоту сосны обыкновенной

Годы	Среднее, мм				С, %			
	1	2	3	4	2	3	4	4
2019	58,0	54,5	47,2	21,2	6,45	9,65	28,73	19,35
2018	63,7	56,7	41,2	28,7	17,95	12,32	11,61	42,82
2017	81,7	72,2	49,0	36,7	12,49	13,0	14,14	36,94
2016	70,0	62,7	45,2	33,5	9,55	6,02	16,18	30,88
2015	71,7	69,0	46,5	31,0	10,70	7,94	18,46	26,47
2014	72,7	68,7	54,2	35,2	9,48	8,34	12,17	21,65
2013	79,2	76,0	56,5	41,7	4,29	12,39	15,60	13,17
2012	67,0	74,7	42,2	40,5	7,11	10,61	30,94	14,75
2011	69,5	70,0	38,5	34,2	13,62	22,25	51,49	13,98
2010	53,5	54,0	39,0	35,5	12,99	22,42	24,59	14,08
2009	53,0	54,7	38,5	37,2	25,27	24,018	49,67	14,27
2008	67,2	53,0	42,5	35,2	17,69	26,91	20,82	19,84
2007	60,2	42,7	42,7	35,7	16,62	30,04	11,83	22,65
2006	53,2	37,7	40,0	35,2	14,66	43,92	10,61	20,64
2005	41,7	26,2	27,0	33,0	40,71	56,88	22,43	43,28
2004	36,00	22,2	30,5	33,2	40,26	54,10	40,20	43,82
Среднее	62,4±3,2	55,9±4,1	42,54±1,9	34,2±1,2	16,2	22,5	23,7	24,9

Литература

Кулагин А.Ю., Тагирова О.В. Лесные насаждения Уфимского промышленного центра: современное состояние в условиях антропогенных воздействий. - Уфа: Гилем, 2015. - 196 с.

Bakhtina S.Yu., Yanbaev Yu.A., Kulagin A.Yu., Redkina N.N., Masalimov I.Kh., Fayzrakhmanov Sh.F. Dynamics of annual growth of common pine on industrial dumps of miming companies // Journal of Forestry Research. 2020. V. 32 (107). P. 1-9.

Chudzińska E., Diatta J.B., Wojnicka-Półtorak A. Adaptation strategies and referencing trial of Scots and black pine populations subjected to heavy metal pollution // Environmental science and pollution research. 2014. V. 21(3). P. 2165-2177.

Dobbertin M. Tree growth as indicator of tree vitality and of tree reaction to environmental stress: a review // European Journal of forest research. 2005. V. 124. P. 319-333.

Suvanto S., Henttonen H.M., Nöjd P., Helama S., Repo T., Timonen M., Mäkinen H. Connecting potential frost damage events identified from meteorological records to radial growth variation in Norway spruce and Scots pine // Trees. 2017. V. 31. P. 2023-2034.

DYNAMICS OF SCOTS PINE ANNUAL INCREMENT IN UNDERGROWTH UNDER THE CONDITIONS OF INDUSTRIAL POLLUTION, DEPENDING ON INTERANNUAL TEMPERATURE FLUCTUATIONS

S. Y. Bakhtina

Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia, Svetlana.bakhtina@inbox.ru

Abstract. We studied on 4 test areas the annual increment in the height of the Scots pine, growing in the technogenic zone of the Uchaly mining and processing plant. The obtained data are compared with the monthly temperatures of 2004-2019. It is established that the monthly and annual values of this factor do not have any directional dynamics. The deviating temperature values in general did not have any pronounced effect on the size of the increment. It is established that the reaction of plants to temperature is mainly individual in nature. We concluded that the dependence of the annual increment in height on temperature should be studied in combination with other factors, primarily with the amount of precipitation.

Key words: wood increment, climatic factors, scots pine.

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ, И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ

Л.А. Беловежец[1], Ю.А. Маркова[2], М.С. Третьякова[2]

[1]ИрИХ СО РАН, Иркутск, Россия, lyu-sya@yandex.ru
[2]СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия, juliam06@mail.ru

Аннотация. Проведен скрининг микроорганизмов, способных трансформировать сложные органические субстраты: древесные опилки, нефть, гидролизный лигнин. Выявлены биологически активные соединения, синтезируемые данными микроорганизмами и оценен их вклад в ремедиацию почвы. Показаны перспективы их практического использования.

Ключевые слова: биоремедиация, БАВ, скрининг эффективных микроорганизмов, микробные препараты.

Экологическая функция почвы как сложной высокоорганизованной структуры, включающей в себя минеральную (механическую) и органическую части, почвенные воздух, воду, микрофлору и микрофауну, заключается в регулировании всех потоков вещества в биосфере. При этом почвенный микробиоценоз находится в состоянии динамического равновесия, максимально эффективно функционируя в каждый конкретный момент времени. При попадании в почвенную экосистему загрязнителя (особенно это касается хронического загрязнения) нарушается ее гомеостаз, что способствует множественным и иногда необратимым изменениям, приводя к образованию «техногенных пустошей». К наиболее опасным загрязнителям относятся нефть и нефтепродукты, древесные опилки, гидролизный лигнин (ГЛ), количество которых оценивается в миллионы тонн (объемы заготовки древесины в мире оцениваются в 3,73 млрд. м^3 в год [FAOSTAT, 2021], в России – 127,8 млн м^3 деловой и 13,3 млн м^3 дровяной древесины, а добыча нефти в 2019 г. составила около 560,2 млн т [Запасы…, 2021]). Экологические последствия загрязнения носят трудно учитываемый характер, поскольку нарушают многие естественные процессы и взаимосвязи, что приводит к глубокому изменению всех звеньев естественных биоценозов.

Воздействие вышеуказанных субстратов связано с изменениями как физико-химических (pH, аэрация, водопроницаемость и влагоемкость, соотношение C/N), так и биологических свойств почвы. Появление в верхних почвенных горизонтах большого количества органического углерода, а также ухудшение газообмена способствуют активизации анаэробной, в том числе патогенной, микрофлоры, а выделение токсичных, чаще всего ароматических, соединений определяет общую супрессию почвенной биоты [Исакова, 2019]. Существенным негативным фактором является также их высокая возгораемость, приводящая к длительным трудно гасимым пожарам, еще более повреждающим почву и в целом наносящим экосистеме значительный ущерб. Процесс демутации достаточно длителен и характеризуется значительными перестройками всех членов почвенного сообщества. Наиболее перспективными, эффективными, экономичными, экологически безопасными методами являются микробные технологии, направленные на ускорение восстановления почвенного гомеостаза. Микроорганизмы, входящие в подобные препараты, способны синтезировать широкий спектр биологически активных веществ, что позволяет им взаимодействовать с почвенными микроорганизмами и растениями, целенаправленно

изменяя их метаболизм, тем самым увеличивая их выживаемость в неблагоприятных экологических условиях.

Следовательно, всестороннее исследование микроорганизмов, входящих в состав микробных препаратов, позволит понять степень их экологического действия на почвенный биоценоз, а также найти пути его восстановления.

Применение микробных ассоциаций для эффективной трансформации субстратов осуществляется, как правило, тремя вариантами: выращивание микроорганизмов на питательной среде с субстратом в виде единственного источника углерода и энергии, рост собственно на субстрате и/или использование для скрининга модельных соединений. В работе мы использовали все варианты скрининга.

Для скрининга нефтеокисляющих микроорганизмов из эндо- и ризосферы растений и почвы было выделено 60 культур, исследованных по способности утилизировать 2 % (об.) сырой нефти в жидкой минеральной среде в виде единственного источника углерода [Третьякова и др., 2015]. Для дальнейших исследований были взяты 6 наиболее активных в отношении углеводородов нефти штаммов микроорганизмов (убыль нефти более 40 %). Интересно, что большая часть выделенных культур была ассоциирована с ризосферой пырея (табл. 1). Показано, что они способны эффективно функционировать в составе композиции, разлагая высокие (до 20 %) и экстремально высокие (50 %) концентрации нефти в среде даже при низких положительных температурах (4-10 ^{o}C). Наиболее перспективные микроорганизмы были идентифицированы молекулярно-генетическими методами с помощью анализа 16S рРНК.

Таблица 1. Источник выделения, молекулярно-генетическая идентификация выделенных штаммов и степень нефтедеструкции (2 % нефти)

Штамм	Источник выделения	Идентифицированный вид	Убыль нефти, %
102	Ризосфера осоки (*Carex hancockiana maxim*)	*Pseudomonas oryzihabitans*	40±0.7
90	Эндосфера осоки (*Carex acuta*)	*Pseudomonas corrugate*	45±0.9
109	Ризосфера пырея (*Elytrigia repens*)	*Pseudomonas sp.*	45±1.4
112	Ризосфера пырея (*Elytrigia repens*)	*Acinetobacter guillouiae*	54±0.8
114	Ризосфера пырея (*Elytrigia repens*)	*Acinetobacter guillouiae*	48±0.7
108	Ризосфера пырея (*Elytrigia repens*)	*Rhodococcus erythropolis*	52±1.2

Для модификации ранее созданной ассоциации, участвующей в переработке ГЛ, из самопроизвольно трансформирующегося субстрата выделено 46 штаммов микроорганизмов. По скорости роста на минеральной питательной среде с ГЛ в виде единственного источника углерода выбраны 8 наиболее активных культур, отнесенных к двум видам: *Penicillium cyclopium* (2 штамма) и *Trichoderma asperellum* (6 штаммов). По совокупности данных (скорость утилизации фенольных субстратов, активность Mn-зависимой пероксидазы и совместимость с микроорганизмами ранее созданной закваски) оптимальной была признана культура *T. asperellum* 3 [Беловежец и др., 2010].

Лабораторное компостирование ГЛ, проведенное ассоциацией, модифицированной *T. asperellum* 3, показало, что полученный компост характеризуется увеличением количества гуминовых кислот (до 15,5 %) и пониженным содержанием лигнина – до 31 % против 38 % при использовании стандартной композиции.

Для микробной деградации древесных опилок использовали ряд музейных культур ИрИХ СО РАН. В результате первичного скрининга выбраны 7 культур дереворазрушающих грибов. Исходя из совместимости микроорганизмов, были составлены 4 различных варианта ассоциации. По совокупности результатов оптимальным был признан вариант, включающий следующие культуры: *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1767, *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *P. chrysosporium* 1 MR-1.3 [Беловежец, 2019].

Микроорганизмы, поступающие в почву вместе с микробными препаратами, вступают в различные взаимодействия с микробиотой и растениями, что обусловливает необходимость исследования их влияния на естественных обитателей почвы. В первую очередь важно понимать, как они воздействуют на растения, которые при выращивании в неблагоприятных условиях загрязнения могут быть восприимчивы даже к слабовирулентным штаммам. Микроорганизмы, участвующие в процессах биодеструкции органических субстратов, как правило, характеризуются широким спектром внеклеточных биологически активных метаболитов. Более того, растения способны селективно накапливать полезную микробиоту для создания наиболее благоприятных условий их роста и развития. В то же время, не исключено и подавление роста и развития растения за счет появления в непосредственной близости от корня токсичных низкомолекулярных продуктов, образующихся в процессе деятельности микроорганизмов.

Нами показан фитозащитный эффект *Rhodococcus erythropolis*, входящего в состав препарата для биоремедиации почв от нефти. Предобработка семян взвесью микроорганизмов существенно улучшала морфологические параметры и фотосинтезирующую систему растений, выращенных в условиях нефтезагрязнения (рис.1). Визуально заметно, что растения, выращенные из семян, обработанных *R. erythropolis* 108, в присутствии нефти лучше набирают листовую массу, чем необработанные растения.

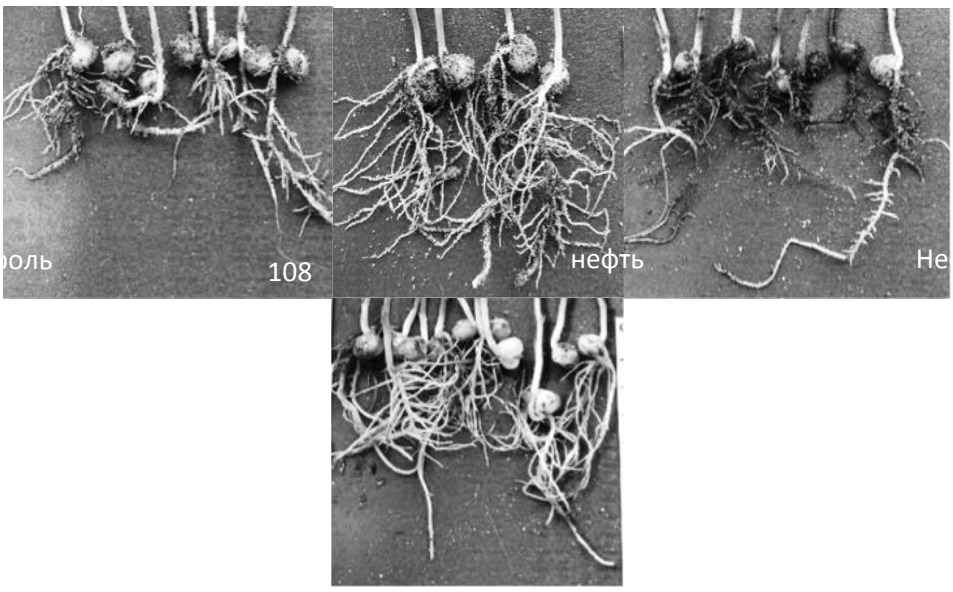


Рис. 1. Корневая система гороха

Одной из вероятных причин фитозащитного действия *R. erythropolis* является его способность синтезировать значительное количество внеклеточных биосурфактантов,

что позволяет эмульгировать нефтяную пленку на поверхности корней. Для подтверждения этой гипотезы было проведено исследование зоны корневых волосков с помощью световой микроскопии (рис. 2).

У растений, выращенных в условиях нефтезагрязнения, эта зона покрыта пленкой нефти, а количество корневых волосков крайне мало. При обработке *R. erythropolis* происходит элиминирование нефтяной пленки с поверхности корня, а развитие корневых волосков не отличается от их развития у контрольных растений.

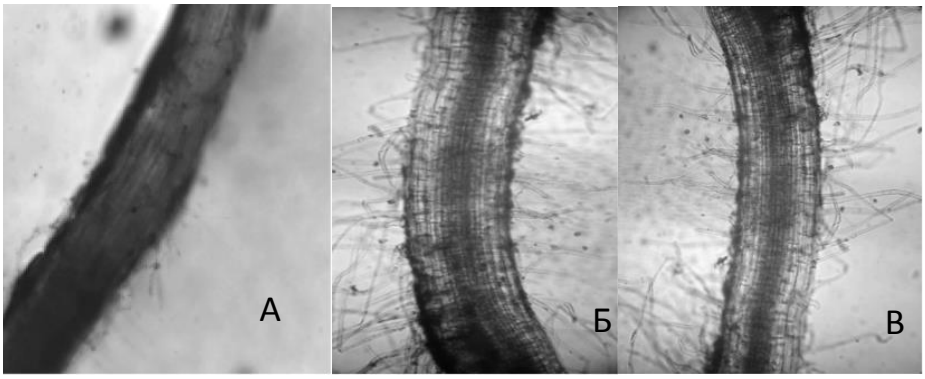


Рис. 2. Развитие корневой системы *Raphanus sativus* при добавлении нефти. А – нефть без бактерий, Б – нефть и *R. erythropolis*, В – контроль без добавления нефти и бактерий, х100.

Для остальных микроорганизмов, входящих в состав того или иного препарата были определены способность синтезировать фитогормоны, а также вещества, обладающие антимикробной активностью (табл.2).

Таблица 2. Антибиотическая активность исследуемых микроорганизмов

Исследуемая культура	Диаметр зоны подавления роста, мм				
	B. subtilis	*E. durans*	*P. aeruginosa*	*E. coli*	*F. orthoceras*
T. cutaneum D-46	11±0,2	2±0,1	15±0,2	11±0,2	не опр.
T. cutaneum 5	10±0,2	1±0,1	17±0,2	11±0,1	не опр.
Trametes versicolor	1±0,1	0	6±0,1	1±0,1	6±0,5
Ph. chrysosporium ATCC 24725	0	0	6±0,1	0	3±0.2
Ph. chrysosporium 1 MR-1	0	6±0,1	5±0,1	0	7±0,7
S. pulverulentum 1767	13±0,1	7±0,2	7±0,1	13±0,5	11±0,5
P. citreo-viride	0	0	0	1±0,1	-
Acremonium sp.	13±0,2	11±0,2	5±0,1	2±0,1	не опр.
A. guillouiae 112	2±0,1	6±0,2	7±0,1	11±0,2	не опр.
R. erythropolis 108	8±0,1	12±0,3	13±0,1	14±0,9	не опр.
A. guillouiae 114	2±0,1	8±0,2	7±0,1	11±0,3	не опр.

Комплекс образующихся БАВ обеспечивает исследованным штаммам преимущества как активным деструкторам органических субстратов и фитозащитным микроорганизмам. Кроме того, это способствует их высокой активности при трансформации органических субстратов.

Процессы, протекающие при микробной трансформации различных субстратов, характеризуются, прежде всего формированием сукцессии микроорганизмов, присущей только конкретным субстратам, активными изменениями в химическом и ферментативном спектре субстрата, его дыхании и фитотоксичности. Микробная переработка обязательно сопровождается всплеском токсичности перерабатываемого субстрата, однако за счет эффективного действия ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания, к окончанию переработки токсичность не отличается от контроля, а все показатели биологической активности нормализуются. Максимумы активности оксидоредуктазных ферментов, совпадающие с увеличением фитотоксичности, служат одним из основных доказательств интенсивности происходящих изменений. Параллельно происходит направленное изменение количества основных групп микроорганизмов, индуцированное как внесением микробной ассоциации, так и наличием продуктов промежуточного разложения субстрата [Беловежец, 2021].

Таким образом, нами показано, что при попадании в почвенную экосистему сложного органического загрязнителя нарушается ее гомеостаз, существенно изменяется микробное сообщество, а в лигноцеллюлозных субстратах формируется новое. Все изменения направлены на минимизацию ущерба с тенденцией к самовосстановлению. Проведен скрининг микроорганизмов, способных к максимальной трансформации исследованных субстратов. Выявлены общие закономерности, характерные для микробной трансформации сложных органических субстратов и способствующие получению целевого продукта. Микроорганизмы, входящие в состав микробных ассоциаций, вступают в симбиотические взаимодействия с различными компонентами почвенного биоценоза путем синтеза внеклеточных биологически активных соединений, нивелируя тем самым негативное воздействие загрязнителя. Образование биосурфактантов способствует эмульгированию нефтяной пленки, что ускоряет ее разрушение в почве и снижает стрессовое воздействие на растения. Фитогормональная активность дает дополнительное преимущество при встраивании штамма в ризосферный микробоценоз. Антибактериальная и фунгицидная активности обеспечивают оздоровление почвы, что также улучшает состояние растений. Комплекс образующихся биологически активных соединений обеспечивает исследованным штаммам приоритет как эффективным деструкторам органических субстратов и фитозащитным микроорганизмам. Все это способствует сохранению и восстановлению растительного покрова и микробоценоза, характерного для интактных почв.

Исследование поддержано грантом РФФИ, проект № 20-016-00114 А.

Литература

FAOSTAT [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.fao.org/faostat/en/#data/FO

Запасы, производство и потребление нефти по странам мира [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.ereport.ru/articles/commod/oilcount.htm

Исакова Е. А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту // Colloquium-journal. 2019. №12 (36). С. 4–7.

Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А. Скрининг бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти // Системы. Методы. Технологии. 2015. №4 (28). С. 138–142.

Беловежец Л.А., Волчатова И.В., Медведева С.А. Деструкция модельных соединений лигнина пионерными штаммами грибов-колонизаторов древесных отходов // Химия в интересах устойчивого развития. 2010, № 18. С. 25–31.

Беловежец Л.А. Способ утилизации древесных опилок с применением композиции дереворазрушающих микроорганизмов для получения комплексного органо-минерального удобрения // РФ Пат. RU 2 701 942 C1, 1019.

Беловежец Л.А. Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических субстратов, и возможности их практического использования для биоремедиации почв // автореф. дис. ... докт. биол. наук. Иркутск, 2021. 48 с.

ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROCESSES OCCURRING DURING THE TRANSFORMATION OF ORGANIC SUBSTRATES, AND THE POSSIBILITY OF THEIR PRACTICAL USE FOR BIOREMEDIATION OF SOILS

L.A. Belovezhets[1], Y.A.Markova[2], M.S. Tretyakova[2]

[1]Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, 1 Favorsky str., 664033, Irkutsk, lyu-sya@yandex.ru
[2]Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132 Lermontova str., 664033, Irkutsk, juliam06@mail.ru

Abstract: Screening of microorganisms capable of transforming complex organic substrates: sawdust, oil, hydrolysis lignin was carried out. Biologically active compounds synthesized by these microorganisms were identified and their contribution to soil remediation was evaluated. The prospects of their practical use are shown.

Keywords: bioremediation, BAS, screening of effective microorganisms, microbial preparations.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОРБЦИОННОЙ БИОРЕМЕДИАЦИЯ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛЛЮТАНТАМИ РАЗНЫХ КЛАССОВ

Г.К. Васильева, Е.Е. Михедова, Е.Р. Стрижакова

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, г. Пущино Московской обл., Россия, gkvasilyeva@rambler.ru

Аннотация. Разработан метод сорбционной биоремедиации почв в разных почвенно-климатических условиях, сильно загрязненных разными классами органических поллютантов, основанный на внесении натуральных сорбентов, которые обеспечивают снижение токсичности поллютантов за счет их обратимой сорбции, снижения риска миграции их подвижных метаболитов в грунтовые и поверхностные воды, а в случае нефтезагрязненных почв обеспечивают снижение гидрофобности почв. Дано эколого-экономическое обоснование метода.

Ключевые слова: нефть, полихлорбифенилы, хлорфенолы, пестициды, полициклические ароматические углеводороды.

В связи с нарастающим уровнем химического загрязнения почв, одной из важнейших проблем современности в настоящее время является разработка способов их ремедиации. Наиболее перспективным методом очистки почв считается биоремедиация *in situ*, основанная на способности почвенных микроорганизмов и других организмов полностью разлагать органические загрязнители или превращать их в нетоксичные продукты. Однако, не смотря на его высокую экономичность и экологичность, на практике этот метод используется лишь в 10% случаев очистки. Чаще всего прибегают к более радикальным методам очистки путем экскавирования загрязненного грунта и последующего его сжигания или захоронения.

Основные проблемы биоремедиации связаны с трудностями адаптации микроорганизмов в токсичных средах, а также с высокой вероятностью миграции загрязнителей в сопредельные среды. В результате 30-тилетних исследований поведения поллютантов разных классов было показано, что внесение различных природных сорбентов может существенно расширить возможности биоремедиации почв в условиях *in situ*.

В данном докладе будет обобщен опыт многолетних исследований по разработке биотехнологий сорбционной биоремедиации почв, загрязненных поллютантами разных классов, находящихся в разных почвенно-климатических условиях, как на территории разных регионов РФ, так и других стран (США и Финляндии), основанных на применении метода сорбционной биоремедиации с использованием разнообразных натуральных (не синтетических) сорбентов разных классов.

Методы

В ходе многолетних исследований проводили эксперименты с разными типами минеральных и органоминеральных почв, загрязненных органическими поллютантами разных классов, как сравнительно деградабельных (гербицид пропанид, его метаболит 3,4-дихлоранилин (ДХА), нефть и нефтепродукты), так и высоко персистентных (полихлорированные бифенилы (ПХБ), 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), стойкие хлорорганические пестициды (ХОП)). Большинство экспериментов проводили на почвах, исторически загрязненных поллютантами, но в некоторых случаях использовали искусственно загрязненные фоновые почвы, отобранные из разных регионов РФ: чернозем Саратовской обл., серая лесная и лугово-аллювиальная почвы Московской обл., а также дерново-глеевая почва ЯНАО и глеево-торфяная почва ХМАО). В качестве биопрепаратов использовали выделенные нами уникальные штаммы микроорганизмов-деструкторов хлоранилинов, микроорганизмы, способные трансформировать 2,4,6-тринитротолуол, а также

биопрепараты на основе углеводород-утилизирующих микроорганизмов. В большинстве исследований с различными классами техногенных поллютантов в качестве сорбентов использовали гранулированные и дробленые активированные угли (ГАУ) разных марок, а в экспериментах с нефть-загрязненными почвами изучали влияние около 10 сорбентов 3-х классов: минеральные (цеолит, каолинит, вермикулит, диатомит), углеродистые (ГАУ, биочар) и органические (торф, растительные остатки, опилки, Спиллсорб - коммерческий препарат на основе сфагнового мха).

В ходе исследований использовали различные методы химического анализа почв для определения содержания органических поллютантов и их метаболитов в почве, в частности, методы ГЖХ, ВЖХ, хроматомасс-спектрометрии, ИК-спектрометрии. В качестве биологических показателей определяли численность микроорганизмов-деструкторов в почве методом высева на селективные агаризованные среды, а также оценивали дегидрогеназную активность почвы. Изменение интегральной токсичности почв наблюдали с помощью разработанного нами экспресс-метода по всхожести клевера белого [Vasilyeva et al., 2020a], а также сертифицированными методами по длине корней проростков пшеницы и по смертности и размножению гидробионтов (дафнии и водоросли хлорелла). Наблюдали за изменением агрохимических и физических характеристик почвы: pH, содержание NPK, гидрофобность почв, предельная полевая влагоемкость (ППВ), пористость, объемная масса. Структуру почвы изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа. Анализы выполнены на базе ЦКП ИФХиБПП РАН, Аналитического центра ф-та Почвоведения МГУ, Биологического ф-та ЮФУ (г. Ростов), ИППЭС КНЦ РАН (г. Апатиты) и других.

Результаты исследований

Исследования показали, что в зависимости от класса и уровня загрязнения, а также почвенно-климатических условий, загрязненные почвы можно разделить на несколько групп, к которым применяются разные подходы биоремедиации.

К первой группе можно отнести почвы, находящиеся в зоне умеренного климате и умеренно загрязненные деградабельными поллютантами. Примером таких почв могут служить почвы центральной полосы РФ, загрязненные нефтью или нефтепродуктами с концентрацией углеводородов нефти (УВН) <3-4%. Для них применимы методы ***классической биоремедиации in situ***, основанные на создании условий для активации аборигенных и/или интродуцированных в виде биопрепаратов соответствующих микроорганизмов-деструкторов, а именно: внесение минеральных удобрений, регулирования pH с помощь известкования, оптимизация водно-воздушного режима [Vasilyeva et al., 2020b].

Ко второй группе относятся почвы разных климатических зон, сильно загрязненные деградабельными поллютантами. Особенно уязвимы сильно загрязненные почвы легкого механического состава, находящиеся в условиях холодного климата. Для рекультивации таких почв более рационально использовать ***технологию сорбционной биоремедиации*** почв *in situ*, основанную на оптимизации условий для микроорганизмов-деструкторов, которую проводят на фоне внесения оптимальных доз ГАУ или других сорбентов, основная роль которых заключается в снижении токсичности загрязненных почв для микроорганизмов и растений за счет обратимой сорбции поллютантов, а также в снижении риска миграции поллютантов и/или их подвижных метаболитов в грунтовые и поверхностные воды.

В качестве примера можно привести метод сорбционной биоремедиации, с помощью которого были ликвидированы последствия аварийной утечки 17 тонн гербицида пропанида в Краснодарском крае. Внесение в эти почвы ГАУ в дозе 3% и биомассы бактериальных штаммов-деструкторов хлоранилинов позволило уже к концу летнего сезона снизить суммарное содержание пропанида и его метаболита 3,4-дихлоранилина в почве с 4000 до 100 мг/кг, а также резко снизить токсичность почв

[Васильева и др., 1994]. В отдельном эксперименте доказана обратимость сорбции ДХА активированным углем и его доступность микроорганизмам-деструкторам, причем основная часть поллютантов подверглась полной минерализации, оцененной по выделению хлорид-ионов [Бахаева и др., 2001].

Аналогичный метод сорбционной биоремедиации был разработан для рекультивации почв, сильно загрязненных моно- и трихлорфенолами, а также нафталином. При этом использовали штаммы микроорганизмов, способных расти на моно- и дихлорфенолах в качестве единственных источников углерода и энергии.

В другой серии экспериментов была показана эффективность данного подхода при рекультивации разных типов почв (выщелоченный чернозем, серая лесная, аллювиально-луговая, подбур оподзоленный, дерново-глеевой), загрязненных углеводородами, в том числе нефтью средней плотности, дизельным топливом, отработанным моторным маслом, смесью горюче-смазочных материалов в концентрации углеводородов нефти (УВН) от 5 до 15% [Мязин и др., 2020; Semenyuk et al., 2014; Vasilyeva et al., 2020b].

В экспериментах с почвами разных типов была продемонстрирована возможность использования различных сорбентов для очистки нефтезагрязнённых почв. Помимо возможности снижения токсичности почв и риска миграции нефти и, в особенности, ее полярных метаболитов (спирты, альдегиды и карбоновые кислоты) в поверхностные и грунтовые воды, сорбенты должны обладать способностью снижать гидрофобность почв, загрязненных высокими дозами нефти, что обеспечит возможность впитывания влаги, необходимой для роста микроорганизмов и растений. Для таких почв был предложен композитный материал на основе ГАУ и ряда других сорбентов, обладающий всеми необходимыми свойствами, и разработана технология его внесения.

К третьей группе можно отнести почвы, загрязненные высоко персистентными поллютантами либо поллютантами смешанного типа. В этом случае роль сорбентов сводится к детоксикации поллютантов путем активации почвенной микрофлоры, способной разлагать деградабельные химикаты, а также к ***прочной сорбции высокостойких поллютантов***, либо продуктов их частичного превращения.

Примером может служить технология сорбционной биоремедиации буроземных почв, исторически загрязненных взрывчатым веществом 2,4,6-тринитротолуолом, находящихся на территории бывшего военного завода в штате Небраска (США). Показано, что механизм детоксикации ТНТ в этих почвах связан с частичным восстановлением нитрогрупп ТНТ и каталитическим окислением метильной группы по радикальному механизму с последующим образованием связанных полимерных продуктов в нанопоровом пространстве ГАУ [Vasilyeva et al., 2001, 2003, 2006].

Еще одним примером может служить эксперимент по разработке сорбционной биоремедиации почв, исторически загрязненных ПХБ, на территории вблизи завода «Конденсатор», где до 1988 г. эти соединения использовались при производстве электрохимического оборудования, в которых концентрация ПХБ достигала 4000 мг/кг. Внесение оптимальных доз ГАУ в эти почвы одновременно с оптимизацией водно-воздушного режима приводит к резкому ускорению полного разложения три- и четыре-хлорбифенилов и прочного связывания высокостойких конгенеров ПХБ. Показано, что сорбированные молекулы ПХБ остаются нетоксичными по отношению к растениям и дафниям (*Daphnia magna*) [Vasilyeva et al., 2010]. Аналогичные результаты получены с почвами на территории могильника запрещенных пестицидов, в том числе дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) и гексахлорциклогекана (ГХЦГ).

Дано эколого-экономическое обоснование метода. Показано преимущество метода сорбционной биоремедиации *in situ* по сравнению с методом экскавации почв [Слюсаревский и др., 2018].

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-05265мк

Литература

Бахаева Л.П., Васильева Г.К., Суровцева Э.Г., Мухин В.М. Микробное разложение 3,4-дихлоранилина, сорбированного активированным углем // Микробиология. 2001. Т. 70, №3. С. 277-284.

Васильева Г.К., Суровцева Э.Г., Белоусов В.С. Разработка микробиологического способа очистки почвы от загрязнения пропанидом и 3,4-дихлоранилином // Микробиология. 1994. Т. 63, №1. С. 129-144.

Мязин В.А., Исакова Е.А., Васильева Г.К. Влияние гранулированного активированного угля на скорость биоремедиации почв Мурманской области, исторически загрязненных нефтепродуктами // Проблемы Региональной Экологии. 2020.№2. С. 20-26.

Слюсаревский А.В., Зиннатшина Л.В., Васильева Г.К. Технико-экономическое обоснование метода биорекультивации нефтезагрязненных земель в условиях *in situ* // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22, №11. С. 40-45.

Semenyuk N.N. et al. Effect of activated charcoal on bioremediation of diesel fuel contaminated soil // Microbiology. 2014. V. 83, №5. P. 589–598.

Vasilyeva G.K., Kondrashina V.S., Strijakova E.R., Pinsky D.L. Express-phytotest for choosing conditions and following process of soil remediation// Environ. Geochem. Health. 2020a. https://doi.org/10.1007/s10653-020-00727-8

Vasilyeva G., Kondrashina V., Strijakova E., Ortega-Calvo J-J. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil // Science of the Total Environment. 2020b. V. 607. №135739.

Vasilyeva G.K., Strijakova E.R., Shea P.J. Use of activated carbon for soil bioremediation. In: Viable methods of soil and water pollution monitoring, protection and remediation. (I. Twardowska, H.E. Allen and M.H Haggblom, *eds).* Serial NATO Collection, Netherlands, Springer, 2006.P. 309-322.

Vasilyeva G.K. Kreslavski V.D., Shea P.J., Oh B-T. Potential of activated carbon to decrease 2,4,6-trinitritoluene toxicity and accelerate soil decontamination // Environmental Journal of Toxicology and Chemistry. 2001. V. 20. № 5. P. 965-971.

Vasilyeva G.K., Kreslavski V.D., Shea P.J. Catalytic oxidation of TNT adsorbed by activated carbon // Chemosphere. 2002. V. 47. P. 311-317.

Vasilyeva G.K., Bakhaeva L.P., Strijakova E.R., Shea P.J. Biodegradation of 3,4-dichloroaniline and 2,4,6-trinitritiluene in soil in the presence of natural adsorbents // Environmental Chemistry Letters. 2003. V. 1(3). P. 176-183.

Vasilyeva G.K. Strijakova E.R., Nikolaeva S.N., Lebedev A.T., Shea P.J. Dynamics of PCB removal and detoxification in historically contaminated soils amended with activated carbon // Environmental Pollution. 2010. V. 158, №3. P. 770-777.

ADSORPTIVE BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH ORGANIC POLLUTANTS OF VARIOUS CLASSES

G.K. Vasilyeva, E.E. Mihedova, E.R. Strijakova

Institute of Physical-chemistry and Biology of Soil Science, RAS

Abstract. A method has been developed for recultivation of different types of soils in various climatic conditions, which are heavily contaminated with different classes of organic pollutants. This method is based on the application of an adsorptive bioremediation approach. It is based on a widespread use of natural sorbents, which reduce the toxicity of degradable pollutants due to their reversible adsorption or strong bound highly persistent pollutants. Thus, the adsorbents reduce risks of their migration into groundwater and surface waters, as well as reduce the hydrophobicity of petroleum-contaminated soils. The ecological and economic basis of the method is given.

Key words: petroleum, polychlorinated biphenyls, chlorophenoles, pesticides, explosives, polycyclic aromatic hydrocarbons.

ОРГАНИЧЕСКОЕ ВЕЩЕСТВО ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО ЮЖНОГО ПРЕДУРАЛЬЯ ПРИ ВНЕСЕНИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ

Т.Т. Гарипов

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия,
timurgar@gmail.com

Аннотация. В 3-летнем полевом опыте изучалось влияние внесения растительных остатков и навоза на органическое вещество чернозема типичного Южного Предуралья. Показано, что влияние удобрений уменьшается в ряду: навоз = предварительно компостированная сплавина > сплавина с добавлением микроскопического гриба = опилки > солома > сплавина. Применение сплавины в качестве органического удобрения позволяет решить проблему её утилизации. По влиянию на урожайность культур растительные остатки уступают навозу.

Ключевые слова: органическое вещество почвы, чернозём, растительные остатки, сплавина, триходерма.

Введение

Дегумификация пахотных почв в настоящее время стала одной из глобальных проблем, стоящих перед человечеством в целом. Для воспроизводства органического вещества (ОВ) в почвах сельхозугодий необходимо поступление в неё достаточного количества углерода, источником которого являются, с одной стороны, органические удобрения, и, с другой стороны растительные остатки. Даже стопроцентное использование традиционного органического удобрения – навоза не обеспечивает бездефицитного баланса ОВ, и его применение должно дополняться возможностью образования гумусовых веществ из других источников органического углерода. В качестве таковых могут выступать разнообразные растительные остатки. В зависимости от учитываемых культур послеуборочные остатки в глобальном масштабе содержат по разным оценкам 1,2–2,4 Гт углерода [Lal, 2005; Hakala et al, 2009; Семёнов и др., 2019].

В качестве альтернативных источников углерода могут быть использованы возобновляемые биологические ресурсы, используемые как органические удобрения – торф, опилки и др. Ещё одним таким источником может служить так называемая сплавина, то есть плавучая растительность на поверхности озёр и водохранилищ [Габбасова и др., 2014; Габбасова и др., 2016], запасы которой в Республики Башкортостан (РБ) составляют сотни тысяч тонн, что вызывает экологическую проблему – необходимость очистки водоёмов и последующей утилизации. Для ускорения разложения сплавины целесообразно компостировать её в измельчённом виде с помощью микроскопического гриба *Trichoderma koningii* Oudem (триходерма), что позволяет уже за 4 месяца получить из неё гумифицированное органическое удобрение [Габбасова и др., 2018].

Цель

Целью работы являлось изучение изменений количества и качественного состава органического вещества чернозёма типичного при внесении в него различных органических удобрений.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования был слабоэродированный чернозём типичный южной лесостепной зоны РБ. Трёхлетний полевой опыт проводился по следующей схеме:

1. Контроль.

2. Сплавина.
3. Сплавина, предварительно компостированная с триходермой (СК).
4. Сплавина с добавлением в почву триходермы (СТ).
5. Опилки.
6. Навоз.
7. Солома.

Сплавина, извлечённая из водохранилища, была измельчена и внесена в почву во влажном состоянии (вариант опыта 2). Такая же сплавина была компостирована в течение 4 месяцев с триходермой в лабораторных условиях (вариант опыта 3). Сырая сплавина вносилась в почву вместе с 2,5 г сырой биомассы триходермы (вариант опыта 4). В варианте с внесением соломы добавляли удобрение из расчёта $N_{30}P_{30}$. Доза всех органических удобрений составляла 2,5 кг/м^2 и вносилась однократно при закладке опыта. Повторность опыта – 3-кратная, площадь делянок – 4 м^2, ширина защитных полос – 1 м. Усреднённые почвенные образцы из пахотного горизонта почвы отбирали дважды в год весной и осенью. Показатели гумусного состояния почв определяли по [Гришина, Орлов, 1978]. Чередование культур в опыте: картофель – яровая пшеница – многолетние травы.

Результаты и обсуждение

Валовое содержание гумуса достоверно возросло сразу после внесения органических удобрений (рис. 1).

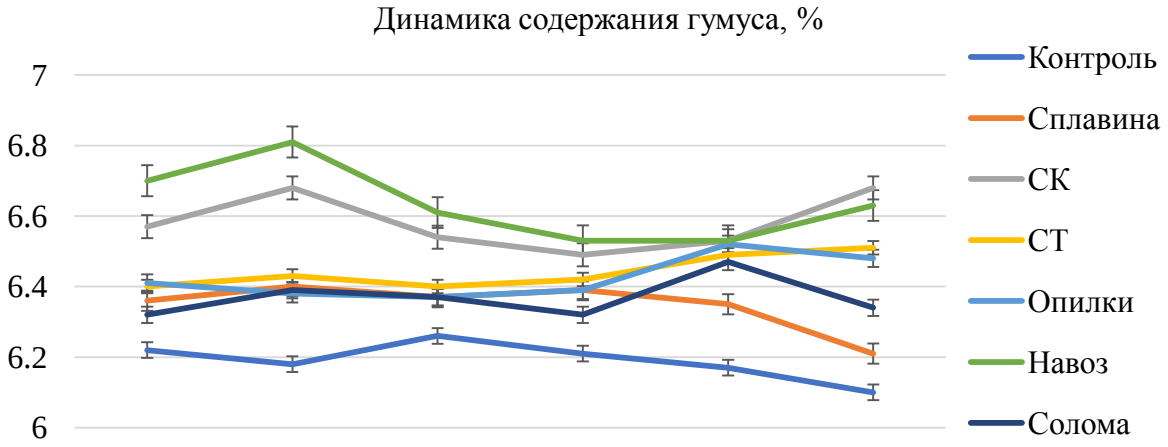


Рис. 1. Динамика содержания гумуса в течение опыта.

По влиянию на содержание гумуса удобрения можно было условно разделить на две группы. За первые 2 года опыта сплавина, СТ, опилки и солома практически не различались между собой, при их внесении в чернозём содержание гумуса было стабильным на уровне 6,3–6,4 % от веса почвы. К другой группе можно отнести наиболее гумифицированные органические удобрения (навоз и СК), которые способствовали достоверному по сравнению со всеми другими вариантами повышению содержания гумуса. Динамика вариантов с внесением навоза и СК тесно коррелировала между собой (r = 0,74), практически выровнявшись к третьему году опыта.

Помимо увеличения содержания гумуса при внесении органических удобрений произошли изменения и других показателей гумусного состояния почвы (степени гумификации ОВ, типа гумуса и относительного содержания углерода гуминовых кислот (ГК) различных фракций). Для почвы опыта была изначально характерна высокая (более 40 %) степень гумификации ОВ (доля углерода ГК в органическом

углероде почвы, $C_{ГК}$:$C_{орг}$). К концу опыта по сравнению с контролем она увеличилась на 1,5–2 % в вариантах с применением СК, СТ, опилок и соломы и на 3 % – при внесении навоза. Это подтверждалось и тем, что к этому времени растительные остатки стали морфологически неразличимы в почве этих вариантах опыта. В варианте с внесением сплавины без добавления триходермы степень гумификации ОВ оставалась на уровне контроля.

При этом существенных изменений типа гумуса (соотношения $C_{ГК}$:$C_{ФК}$) не произошло за исключением варианта с внесением навоза, что связано с исходным гуматным типом гумуса и $C_{ГК}$:$C_{ФК}$ > 2, характерным для данных почв.

На рисунке 2 представлены данные по содержанию ГК (ГК-1 – «свободные» гуминовые кислоты, ГК-2 – гуминовые кислоты, связанные с ионами кальция и ГК-3 – прочносвязанные гуминовые кислоты).

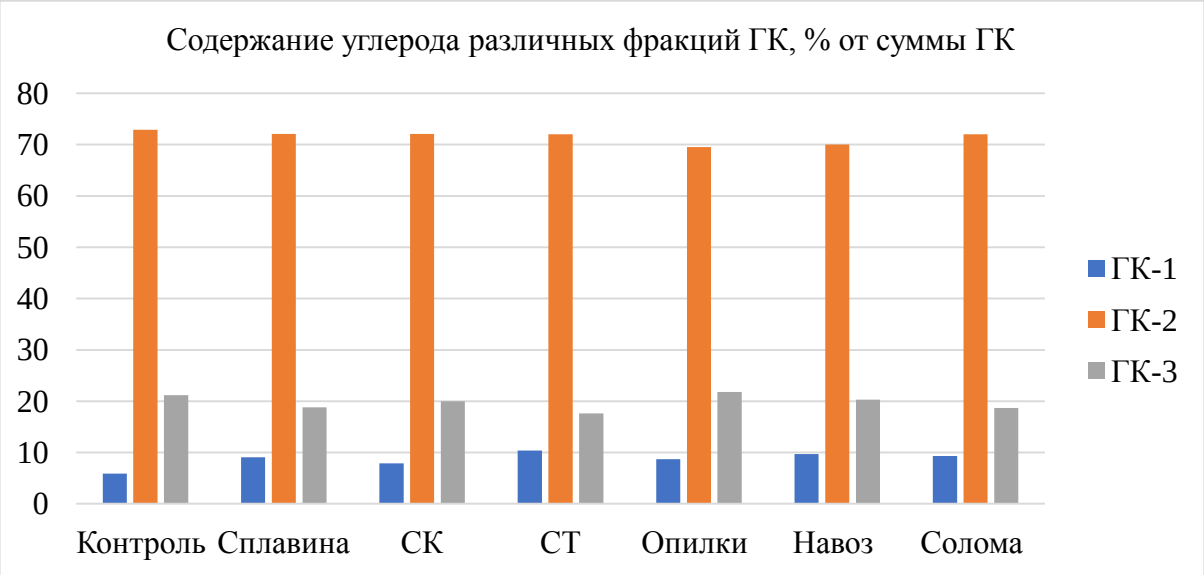


Рис. 2. Содержание углерода различных фракций ГК, % от суммы ГК

Для чернозёмов, в отличие от других типов почв, характерно преобладание ГК, связанных с Ca^{2+}, что объясняется высоким содержанием этих ионов в почвенном поглощающем комплексе. В данном эксперименте основные изменения в составе ГК наблюдались в их наиболее подвижной и изменчивой фракции ГК-1, куда входят и новообразованные гумусовые вещества. Доля «свободных» ГК в их сумме заметно возросла при внесении удобрений (с 6 до 8-10 %). Относительное содержание ГК-2 было на уровне 70–73 %, а ГК-3 – 18–22 %. При этом оно по всем удобренным вариантам опыта не превышало контрольный, а в некоторых случаях даже снизилось.

Урожайность всех культур была при внесении навоза была больше, чем на других удобренных вариантах, где она, в свою очередь, была заметно выше, чем на контроле. При этом необходимо отметить, что сплавина при добавлении триходермы в почву (СТ) по урожайности картофеля и яровой пшеницы практически не уступала варианту с заранее компостированной сплавиной (СК). Это позволяет при необходимости утилизации сплавины не компостировать её заранее, а обрабатывать триходермой непосредственно в почве, что является гораздо менее затратным.

Заключение

В целом изученные органические удобрения по влиянию на органическое вещество чернозёма можно расположить в следующий нисходящий ряд: навоз = СК > СТ = опилки > солома > сплавина. Сплавина с добавлением триходермы, как при

4-месячном компостировании, так и при добавлении непосредственно при внесении в почву, оказывает положительное воздействие на органическое вещество чернозёма, но по влиянию на урожайность культур уступает навозу. Применение сплавины в качестве органического удобрения позволяет решить проблему её утилизации и очистки водоёмов от зарастания, в том числе и без её предварительного компостирования.

Литература

Габбасова И.М., Гарипов Т.Т., Галимзянова Н.Ф., Сулейманов Р.Р., Комиссаров М.А., Сидорова Л.В., Гималетдинова Г.А. Использование удобрения на основе сплавины для повышения плодородия эродированного чернозема типичного // Агрохимия. 2014. № 6. С. 35-42.

Габбасова И.М., Гарипов Т.Т., Сидорова Л.В., Сулейманов Р.Р., Назырова Ф.И., Баязитова Л.И., Комиссаров А.В., Яубасаров Р.Б. Использование куриного помета как удобрения на агрочерноземе Южного Предуралья // Агрохимия. 2016. № 8. С. 30–35.

Габбасова И.М., Сулейманов Р.Р., Гарипов Т.Т., Комиссаров М.А., Сидорова Л.В., Галимзянова Н.Ф., Liebelt P., Абакумов Е.В., Гималетдинова Г.А., Простякова З.Г. Использование местных удобрений, почвенного гриба *trichoderma koningii* Oudem. и no-till обработки для улучшения агрочернозема в Южном Предуралье // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 5. С. 1004-1012. doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1004rus

Гришина Л.А., Орлов Д.С. Система показателей гумусного состояния почв // Проблемы почвоведения. Москва, Наука, 1978. С. 42-47.

Семенов В. М., Паутова Н. Б., Лебедева Т. Н., Хромычкина Д. П., Семенова Н. А., Лопес де Гереню В. О. Разложение растительных остатков и формирование активного органического вещества в почве инкубационных экспериментов // Почвоведение. 2019. № 10. С. 1172–1184. doi: 10.1134/S0032180X19100113

Hakala K., Kontturi M., Pahkala K. Field biomass as global energy source // Agricultural and Food Science. 2009. V. 18. № 3–4. P. 347–365.

Lal R. World crop residues production and implications of its use as a biofuel // Environment International. 2005. V. 31. № 4. P. 575–584. doi: 10.1016/j.envint.2004.09.005

SOIL ORGANIC MATTER OF CHERNOZEM TYPICAL IN THE SOUTHERN PRE-URALS AT THE APPLICATION OF VEGETABLE RESIDUES

T.T. Garipov

Ufa Institute of Biology, UFRC RAS, Ufa, Russia, timurgar@gmail.com

Annotation. In a 3-year field experiment, the effect of the **APPLICATION** of plant residues and manure on the organic matter of typical chernozem in the Southern Pre-Urals was studied. It is shown that the effect of fertilizers decreases in the series: manure = pre-composted marsh plants > marsh plants with the addition of microscopic fungus = sawdust > straw> marsh plants. The use of marsh plants as an organic fertilizer allows solving the problem of its utilization. In terms of influence on crop yields, plant residues are inferior to manure.

Key words: soil organic matter, chernozem, plant residues, marsh plants, trichoderma

ОЦЕНКА СРЕДООЧИЩАЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ТОПОЛЯ БАЛЬЗАМИЧЕСКОГО (*POPULUS BALSAMIFERA* L.) В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Р.Х. Гиниятуллин

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимского федерального исследовательского центра РАН», Уфа grafak2012@yandex.ru

Аннотация. В статье приведены результаты многолетних исследований по оценке жизненного состояния, накопления металлов в надземных органах деревьев тополя бальзамического *(Populus balsamifera L.)* в условиях Стерлитамакского промышленного центра. Показано, что высокое содержание металлов в почвах под насаждениями тополя бальзамического негативно отражается на жизненном состоянии деревьев. Установлен феномен биологической консервации металлов тополем бальзамическим в условиях Стерлитамакского промышленного центра и произведен расчет количества металлов, накапливаемых в древесных насаждениях за вегетационный период.

Ключевые слова: тополь бальзамический, категория жизненного состояния, металлы, Стерлитамакский промышленный центр

Введение

Роль лесных насаждений в очищении воздуха от техногенных загрязнений в настоящее время приобретает важнейшее значение. Избыток металлов в среде, вызванный техногенным загрязнением, приводит к накоплению их растениями и, как следствие, повреждению растений, выпадению чувствительных видов и нарушениям растительных сообществ [Парибок,1982].

Растения, относящиеся к разным семействам, заметно различаются по способности накапливать тяжелые металлы. В зависимости от вида растений содержание в них тяжелых металлов может изменяться во много раз (до 100 и более) [Покровская, 1995].

Тополь бальзамический (Populus balsamifera L.) относится к роду Populus L. – Тополь, семейства Salicaceae Mirbel. – Ивовые [Определитель, 1994]. В г. Стерлитамак насаждения тополя широко используются в озеленении автомагистралей, санитарно–защитных зон промышленных предприятий [Кулагин и др., 2010]

Одно дерево тополя бальзамического, несущее на себе 10 кг листьев в расчете на сухую массу накапливает за период май-сентябрь 180 г сернистого газа [Илькун, 1978].

В процессе жизнедеятельности лесные сообщества перерабатывают своим ассимиляционным аппаратом огромные объемы воздуха – до 500 тыс. м3 на 1 га площади леса. Такой объем воздуха может очищаться от примесей ежегодно, если концентрация и доза загрязнителей не являются губительными для растений сообщества [Алексеев, 1981]. В среднем 1 га леса может поглощать без заметного ущерба для себя до 100 кг соединений Cl [Лебедев и др.,1997].

Цель работы – анализ жизненного состояния тополя бальзамического, изучение накопления металлов в листьях, ветвях тополя бальзамического в условиях Стерлитамакского промышленного центра, а также оценка средоочищающей функции тополя бальзамического в условиях загрязнения Стерлитамакского промышленного центра.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований выбраны озеленительные посадки тополя бальзамического с возрастом (55 лет) расположенные на различном удалении от промышленных предприятий г. Стерлитамак и в зоне условного контроля.

Оценку жизненного состояния деревьев тополя бальзамического определяли по методике В.А. Алексеева [Лесные экосистемы, 1990] согласно которой проводилась

визуальная оценка таких диагностических признаков как густота кроны (в % от нормальной густоты), наличие на стволе мертвых сучьев (в % от общего количества сучьев на стволе), степень повреждения листьев токсикантами, патогенами и насекомыми (средняя площадь в % от площади листьев).

Для изучения содержания металлов в условиях Стерлитамакского промышленного центра производился многократный повторный отбор листьев, ветвей для определения содержания металлов. Пробы листьев и ветвей брали из верхней, средней и нижней частей кроны древесных растений со стороны источника загрязнения с помощью секатора на шесте.

Модельные деревья отбирались путем систематической выборки в процессе перечета на пробной площади [Усольцев, 2007]. Модельные деревья спиливали на уровне корневой шейки, измеряли общую длину дерева от среза и длины кроны. Далее устанавливали возраст дерева по числу годичных колец на пне. При определении валовой массы расчленение кроны на листву и скелет осуществляли комбинированным способом. У отделенной от ствола кроны секторами обрезали облиственные побеги и оставшийся скелет взвешивали повторно. Из обрезанных облиственных побегов отбирали навески листьев. Затем с побегов удалялась вся листва, и побеги вновь взвешивались. В условиях Стерлитамакского промышленного центра и в зоне условного контроля образцы почвы отбирались в слое почвы 0 – 10 (20) см. Почвенные образцы отбирали и подготавливали для химического анализа в соответствии с требованиями (ГОСТ 26423-85) [Гост, 2011]. Взятые пробы высушивали до воздушного – сухого состояния.

Отбор и подготовка к анализу почвенных и растительных образцов осуществляли по общепринятым методам [Методика, 2005]. Содержание металлов в листьях и ветвях определялось методом атомно-абсорбционного анализа спектрометре Zenit-650 (Analytik Jena AD Germany).

Результаты и обсуждение

В условиях промышленного центра на рост и развитие древесных растений оказывают постоянное влияние техногенные нагрузки различной степени. Санитарное состояние является одним из важнейших показателей общего состояния тополевых древостоев в промышленном центре. Для оценки жизненного состояния насаждений тополя бальзамического использовали пятибалльную шкалу категорий состояния деревьев, учитывающую степень повреждения кроны, и формулу расчета состояния древесных растений, предложенную В.А. Алексеевым [Лесные экосистемы, 1990]. Древостои тополя бальзамического *(P.balsamifera L.)* в условиях Стерлитамакского промышленного центра (СПЦ) характеризуются в целом как «ослабленные» (Ln =68,75%). В ходе исследования было выявлено, что деревья находятся в наибольшей степени угнетения, либо повреждены в сравнении с зоной условного контроля. Подавляющее большинство деревьев тополя бальзамического в условиях Стерлитамакского промышленного центра на пробной площади относятся к категории «ослабленных» (10 шт.). В данном древостое имеются здоровые (5 шт.), сильно ослабленные (4 шт.), и сухие (1 шт.). Под влиянием нефтехимического и химического загрязнения в северной части города происходит уменьшение густоты кроны деревьев (до 34,75%) и образование достаточно большого количества мертвых ветвей (до 32,25% от общего количества). Отмечаются повреждения листьев (30 - 35% от общей площади). В листовых пластинках тополя появились различной формы и положения некрозы: они имеют коричневую и местами темно-бурую окраску [Гиниятуллин и др., 2020].

Анализ проведенных исследований, показывают, что жизненное состояние тополя бальзамического в зоне условного контроля (ЗУК) относятся к категории «здоровый» (Ln = 83,25 %). При этом необходимо учесть, что показатель жизненного состояния

в зоне условного контроля находится на рубеже и приближается к жизненному состоянию «ослабленный древостой».

В данном древостое имеются здоровые (12 шт.), ослабленные (6 шт.), сильно ослабленные (1 шт.) и сухие (1шт.) деревья. В зоне условного контроля деревья имеют нормально сформированную крону (густота кроны 89,25%). Ассимиляционный аппарат характеризуется слабым поражением хлорозами не более 18%. Некротических пятен зарегистрировано меньше, чем в условиях промышленного центра (в среднем 15 - 20%). [Гиниятуллин и др., 2020].

Оценка состояния тополевых насаждений невозможна без анализа содержания в городских почвах вредных веществ.

Тяжелые металлы относятся к биохимически активным техногенным веществам, воздействующим на живые организмы. Почвы как компонент природного комплекса чрезвычайно чувствительны к такому роду загрязнениям [Коломыц, 2000].

Загрязнение почв вокруг крупных промышленных предприятий определяется, прежде всего, типом техногенного воздействия [Волкова, 1987], соотношением газообразного и твердого вещества в выбросах. Нами получены данные о валовом и подвижном содержании Cd, Pb, Mn в почвах данного промышленного центра (табл.1). Анализируя табличные данные необходимо отметить следующее. По некоторым показателям в почвах подвижной формы металлов под насаждениями тополя бальзамического в условиях Стерлитамакского промышленного центра наблюдается незначительное превышение предельно допустимой концентрации (ПДК), например, обнаружено превышение по содержанию кадмия, свинца. По критерию ПДК концентрации марганца в почвах в условиях Стерлитамакского промышленного центра и в зоне условного контроля валовая форма в пределах нормы. В то же время в условиях промышленного загрязнения СПЦ, подвергающихся влиянию промышленных источников загрязнения, выявлено превышение содержание валовой формы Cd в 14,5, Pb в 12,9 раза, а подвижной формы Cd, Ni в 2,5 раза, Pb в 3,4 раза, чем в зоне условного контроля.

Таблица 1. Содержание валовых и подвижных форм металлов в почвенном покрове под насаждениями тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) в условиях Стерлитамакского промышленного центра и в зоне условного контроля

Глубина, см	Валовая форма, мг/кг (СПЦ)			Валовая форма, мг/кг (ЗУК)		
	Cd	Pb	Mn	Cd	Pb	Mn
0 – 10 (20)	5,80	45,2	1386	0,4	3,5	540
	Подвижная форма,мг/кг (СПЦ)			Подвижная форма, мг/кг (ЗУК)		
0 – 10 (20)	0,60	7,9	86	0,2	2,3	92
Предельно-допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве						
	0,24	6,0	1500	0,24	6,0	1500

В условиях СПЦ отмечено достаточно высокое содержание металлов в слое почвы 0 - 10 (20) см, что приводит их накопление в подземных и надземных органах (корнях, ветвях, листьях) деревьях тополя бальзамического.

Разные виды растений, а также сорта (линии) одного вида различаются по способности накапливать тяжелые металлы даже при одной и той же их концентрации в почве. В условиях аэротехногенного загрязнения у лиственных пород деревьев (березы, рябина) содержание Zn, Cd и Pb во всех органах растений значительно выше, чем хвойных (сосна) [Федорова, 2005].

Тополевые древостои, произрастающие вблизи промышленных предприятий, накапливают разное количество металлов. Динамика поглощения и предельная

величина накопления листьями токсичных веществ из окружающей среды определяется многими факторами, среди которых ведущее значение имеют, с одной стороны, концентрация и время поглощения фитотоксикантов из воздуха, а с другой – емкость поглощения без проявления токсичных эффектов по отношению к растениям. На основании полученных результатов выполнена оценка насаждений тополя бальзамического в условиях Стерлитамакского промышленного центра как компонент биологического фильтра. В среднем дерево тополя бальзамического (возраст 55 лет) в условиях Стерлитамакского промышленного центра как биологического фильтра формирует в пересчете на сухую массу 18,150 кг ветвей и 7,960 кг листьев (табл.2).

Таблица 2. Фактические значения фитомассы модельных деревьев в условиях Стерлитамакского промышленного центра и зоне условного контроля

№ п/п	Возраст, лет	Диаметр,см	Высота,м	Масса кроны, кг			
				Листья		Ветви	
				Свежая	Сухая	Свежая	Сухая
Стерлитамаский промышленный центр	55	22	23,40	22,62	7,96	33,00	18,15

Расчеты подтверждают, что в условиях загрязнения одно дерево тополя бальзамического аккумулирует за вегетационный сезон в листьях: Cd - 0,003 г, Pb - 0,093 г, Mn – 0,576 г, а в ветвях Cd – 0,006 г, Pb – 0,272 г, Mn – 0,894 г (табл.3).

Таблица 3. Среднее содержание металлов (воздушно-сухой массы) в органах тополя бальзамического в условиях Стерлитамакского промышленного центра

Образец	Воздушно-сухой массы	Металлы		
		Cd	Pb	Mn
В листьях среднего дерева	7,960	0,003 г	0,093 г	0,576 г
В ветвях среднего дерева	18,150	0,006 г	0,272 г	0,894 г

Выводы

Таким образом, общая оценка состояния древостоев тополя бальзамического в районе исследований показала, что усиление промышленного загрязнения сопровождается ухудшением их жизненного состояния: в зоне условного контроля они относятся к категории «здоровые» (Ln =82,25%), в условиях загрязнения Стерлитамакского промышленного центра – к категории «ослабленные» (Ln =68,75%).

Жизненное состояние исследованного вида, произрастающего вблизи промышленных объектов, связано с разным уровнем техногенной нагрузки на зеленые насаждения. В промышленном центре, листья тополя бальзамического, способны поглощать большое количество металлов из воздуха. Содержание Cd, Pb в почве под насаждениями тополя бальзамического в условиях загрязнения превышает нормы и достигает токсических значений. Высокое содержание металлов в почвах под насаждениями тополя бальзамического негативно отражается на жизненном состоянии деревьев тополя бальзамического. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, несмотря на ослабление деревьев, насаждения тополя бальзамического осуществляют средоочищающие функции в промышленном центре.

Литература

Алексеев В.А., Дочинжер Л.С. Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение // Лесоведение. - 1981. - №5. С. 64-71 1.

Волкова В.Г., Давыдова Н.Д. Техногенез и трансформация ландшафтов. Новосибирск, 1987. 237с.

Гиниятуллин Р.Х., Емшина Е.А., Файрузов И.И. Содержание и особенности распределения марганца, никеля в органах у здоровых и ослабленных деревьев тополя бальзамического (Populus balsamifera L) / Экобиотех, 2020, Том 3, №3. С. 488-496.

Гост 26205-84. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, pH и плотного остатка водной вытяжки. М.: Изд-во стандартов, 2011. – 9 с.

Илькун Г.М. Загрязнители атмосферы и растения. - Киев: Наукова думка, 1978. - 246 с.

Коломыц Э.Г., Розенберг Г.С., Глебова О.В и др. Природный комплекс большого города: Ландшафтно-экологической анализ / Коломыц Э.Г., Розенберг Г.С., Глебова О.В и др. – М.: Наука; МАИК «Наука/ Интерпериодика», 2000. – 283 с.

Кулагин, А.Ю. Средостабилизирующая роль лесных насаждений в условиях Стерлитамакского промышленного центра / А.Ю. Кулагин, Р.Х. Гиниятуллин, Р.В. Уразгильдин. -Уфа: Гилем, 2010. - 108 с.

Лебедев И.В., Толкач О.В., Шупик Т.К. Средостабилизирующая роль лесов Урала в условиях техногенного загрязнения атмосферы // Леса Башкортостана: современное состояние и перспективы. Материалы научно-практической конференции. Уфа, 1997. – 263 с.

Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение / Под. ред. В.А. Алексеева. Л.: Наука, 1990. 200 с.

Методика количественного химического анализа. Определение As, Cd, Co, Cr, Cu, Hd, Mn, Pb, Sb, Tn (кислотно – растворимые формы) в почвах и данных отложениях атомно – абсорбционным методом. СПб., 2005. 12 с.

Определитель сосудистых растений Среднего Урала / П.Л. Горчаковский, Е.А. Шурова, М.С. Князев и др. – М.: Наука, 1994. 525 с.

Парибок Т.А. Содержание металлов в листьях деревьев в городе / Т.А Парибок, Н.А. Сазыкина, Г.А. Тэмп // Ботан. журн. – 1982. – Т. 67. - №11.- С.1533-1539.

Покровская С.Ф. Регулирование поведения свинца и кадмия в системе почва-растение. - М.: Наука, 1995. - 51 с.

Усольцев В.А. Биологическая продуктивность лесов Северной Евразии: методы, база данных и ее приложения. - Екатеринбург: УРО РАН, 2007. - 635 с.

Федорова Е.В., Одинцова Г.Я. Биоаккумуляция металлов растительностью в пределах малого аэротехногенно - загрязненного водосброса // Экология. 2005. - №3. С. 26-31.

ESTIMATION OF THE CLEANING POTENTIAL OF BALSAMIC POPLAR (*POPULUS BALSAMIFERA* L.) UNDER INDUSTRIAL POLLUTION

R.Kh. Giniyatullin

Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation Ufa Institute of Biology - a separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa grafak2012@yandex.ru

Annotation. The article presents the results of many years of research on the assessment of the vital state, the accumulation of metals in the aboveground organs of balsam poplar trees (Populus balsamifera L.) in the conditions of the Sterlitamak industrial center. It is shown that the high content of metals in soils under plantations of balsam poplar negatively affects the life state of trees. The phenomenon of biological conservation of metals by balsam poplar in the conditions of the Sterlitamak industrial center was established and the amount of metals accumulated in tree plantations during the growing season was calculated.

Key words: balsam poplar, category of life state, metals, Sterlitamak industrial center

КОНКУРЕНЦИЯ, ВЛИЯНИЕ ПЛОЩАДИ ПИТАНИЯ И ПЛЮСОВЫЕ ДЕРЕВЬЯ В КУЛЬТУРАХ СОСНЫ

М.В. Рогозин

Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, rog-mikhail@yandex.ru

Аннотация. В 55-летних культурах изучены 812 площадей питания и 66 возможных плюсовых деревьев. Из них только 36 % имели площади питания менее среднего значения и достигли выдающихся размеров благодаря предполагаемым генетическим задаткам. Площадь питания, доставшаяся дереву в возрасте 30–40 лет, повлияла как фактор на его диаметр в возрасте 55 лет с силой 11 %. Такое малое влияние уже не может служить теоретическим основанием для интенсивных разреживаний в среднем возрасте насаждений. Поэтому правила ухода для них должны быть изменены.

Ключевые слова: лесные культуры, площадь питания, конкуренция, плюсовые деревья

Существуют теоретические положения, на которых выстраивается парадигма лесоведения как науки. Одним из них является убеждённость многих исследователей о сильной конкуренции между деревьями. На индивидуальном уровне данных о её влиянии на размеры деревьев в количественном выражении почти нет, однако есть множество данных о влиянии густоты на рост насаждений, т.е. о влиянии конкуренции на уровне макроценозов (древостоев). В целом вопрос на удивление простой – с какой силой на дерево влияют его соседи? Казалось бы, всё здесь было ясно: чем они ближе и крупнее, тем сильнее конкуренция, и тем меньше по размерам будет дерево. Отсюда же вытекала и априорная уверенность в том, что чем больше площадь питания, тем слабее конкуренция и тем больше *должны быть* размеры дерева в центре.

Между тем в ряде исследований [Гавриков, 2013; Колобов, 2014], и в работах по конкуренции с её изучением многими методами в 20-летних молодняках [Усольцев, 2013; Усольцев и др., 2018] и в 184-летних насаждениях сосны [Рогозин, 2019], давление соседей, а также площадь питания дерева как факторы влияли на его размеры очень слабо, в пределах всего лишь 0.2–11%. С такой же малой силой деревья-соседи повлияли на рост друг друга и в 55-летних культурах сосны [Рогозин, 2021]. То есть конкурентное давление деревьев в биогруппах и микроценозах оказывается на поверку слабым и в молодняках, и в средневозрастных насаждениях, и в спелом возрасте. Такое постоянство и слабость конкуренции кажется очень «неправильным» с точки зрения закона естественного изреживания, в котором конкуренция между деревьями за ресурсы после смыкания крон является основным фактором отпада слабых особей.

На наш взгляд, априорное представление о сильной конкуренции в насаждениях возникло при наблюдениях за густыми молодняками и принятии закона естественного изреживания насаждений в качестве основного регулятора жизни леса. Идея сильной конкуренции постепенно оформилась далее в некую доктрину в учении В. Н. Сукачева: «Фитоценоз есть совокупность на определенной территории растений, организованных борьбой за существование» [Сукачев, 1934].

То есть сущность фитоценоза – это, прежде всего, конкуренция (борьба) между деревьями за ресурсы питания, затем борьба между деревьями и подростом, подлеском, растениями напочвенного покрова и т.д. Но является ли эта «борьба» за ресурсы доминантой во взаимоотношениях между деревьями? Дело в том, что взаимодействие деревьев включает в себя не только конкуренцию, но и партнерство. И партнерство, как положительное взаимодействие деревьев, по нашим расчётам численно более чем в 5 раз сильнее конкурентного давления соседей на центральное дерево в микроценозе [Рогозин, 2021]. Эти явления лишают конкуренцию её доминирования вследствие того, что кроме закона естественного изреживания в лесных насаждениях действуют ещё

пять (!) законов, которые формируют 20 положений новой парадигмы лесоведения, лесоводства и лесной селекции [Рогозин, 2019].

С целью выяснения влияния площади питания на появление плюсовых деревьев для исследования мы выбрали рядовые 55-летние культуры сосны 1Б класса бонитета, созданные на супесчаной почве посадкой в 1967 г. на площади 3.3 га в кв. 43 Нижне-Курьинского участкового лесничества Пермского городского лесничества. Дополнения в них не проводились, при рубках ухода убирали только отпавшие деревья. На относительно ровной территории заложили пробную площадь размером 80×80 м с нумерацией более 800 деревьев и определением их диаметра через окружность ствола с точностью ± 0.1 см на подготовленных стволах на высоте 1.3 м. Методика работ включала в себя картирование живых и отпавших деревьев по опорным и промежуточным визирам и прямоугольным координатам с итоговой точностью нанесения на план соседствующих деревьев в пределах ± 5–10 см, в том числе при расстояниях между соседями до 2 м с точностью ± 3–5 см. План оцифровали в программе «ArcMap-ArcView», после чего пробную площадь виртуально разделили на 9 секций.

Методика выстраивания полигонов питания известна [Мартынов, 1976]. Также и в компьютерном варианте [Рогозин, 2019] расстояния до 4–8 соседей делили пополам и проводили через эти точки перпендикулярные линии; их соединяли и получали контуры полигона. В нашем случае считалось, что все деревья в раннем возрасте имели равные шансы на использование доставшейся им площади питания, поэтому на план наносили все отпавшие деревья и следы старых пней, которые позволили определить площади питания деревьев 15–25 лет назад, в возрасте культур 30–40 лет. При статистическом анализе рассчитывали показатели корреляции и аппроксимации для связей, обычно используемые в лесоводственных исследованиях [Усольцев, 2013; Демаков, 2018].

Таксационные показатели определяли в два этапа. Вначале на секциях рассчитали текущую густоту, которая колебалась от 970 до 1560 шт./га и далее, учитывая её уровень и плавные перепады высот рельефа до 1.5 м, с целью более точного определения средней высоты древостоя, территорию пробной площади разделили на четыре сектора, где высоты измеряли раздельно. Всего измерено 137 высот деревьев из всех ступеней толщины. Далее по местной таблице полнот и запасов насаждений [Рогозин, Разин, 2015] рассчитали относительные полноты по секциям, которые оказались зависящими от густоты и колебались от 0.85 до 1.0. Средние диаметры и высоты также зависели от неё и изменялись в пределах, соответственно, 19.0–22.9 см и 26.0–28.1 м. Затем на секциях выделяли «плюсовые» деревья с превышением диаметра на 30%. Примерно половина из них имели искривления ствола, толстые сучья и другие недостатки, но для анализа нам был важен их диаметр, как показатель хорошего развития. На рисунке они названы «условно плюсовыми» (рис. 1).

На рисунке 1 видно, что «условно плюсовые» деревья (далее просто плюсовые деревья) встречаются на секциях с частотой от 5 до 10 шт. Ряды распределения площадей питания у обычных и плюсовых деревьев получились разные, с увеличением среднего значения у последних в 1.35 раза и смещением модальных значений в классы 5, 6 и 7 м^2, тогда как у прочих деревьев модальными были классы 4 и 5 м^2 (рис.2).

Различие между средней площадью питания у 66 плюсовых (8.27±0.56 м^2) и прочих деревьев (6.11±0.11 м^2) достоверно при $t = 3.8 > t_{0.01} = 2.6$. Колебания площади питания имеют очень высокую изменчивость, равную 61 % у плюсовых и 48 % у прочих деревьев, что объясняется пропусками посадочных мест при создании культур в местах складирования порубочных остатков после раскорчевки вырубки.

Но именно это обстоятельство поможет нам выяснить, как увеличение площади питания у некоторых деревьев как фактор способствовало увеличению их размеров.

Для этого построили поле корреляции между площадью питания, доставшейся дереву в возрасте 30–40 лет и диаметром его ствола в возрасте 55 лет (рис. 3).

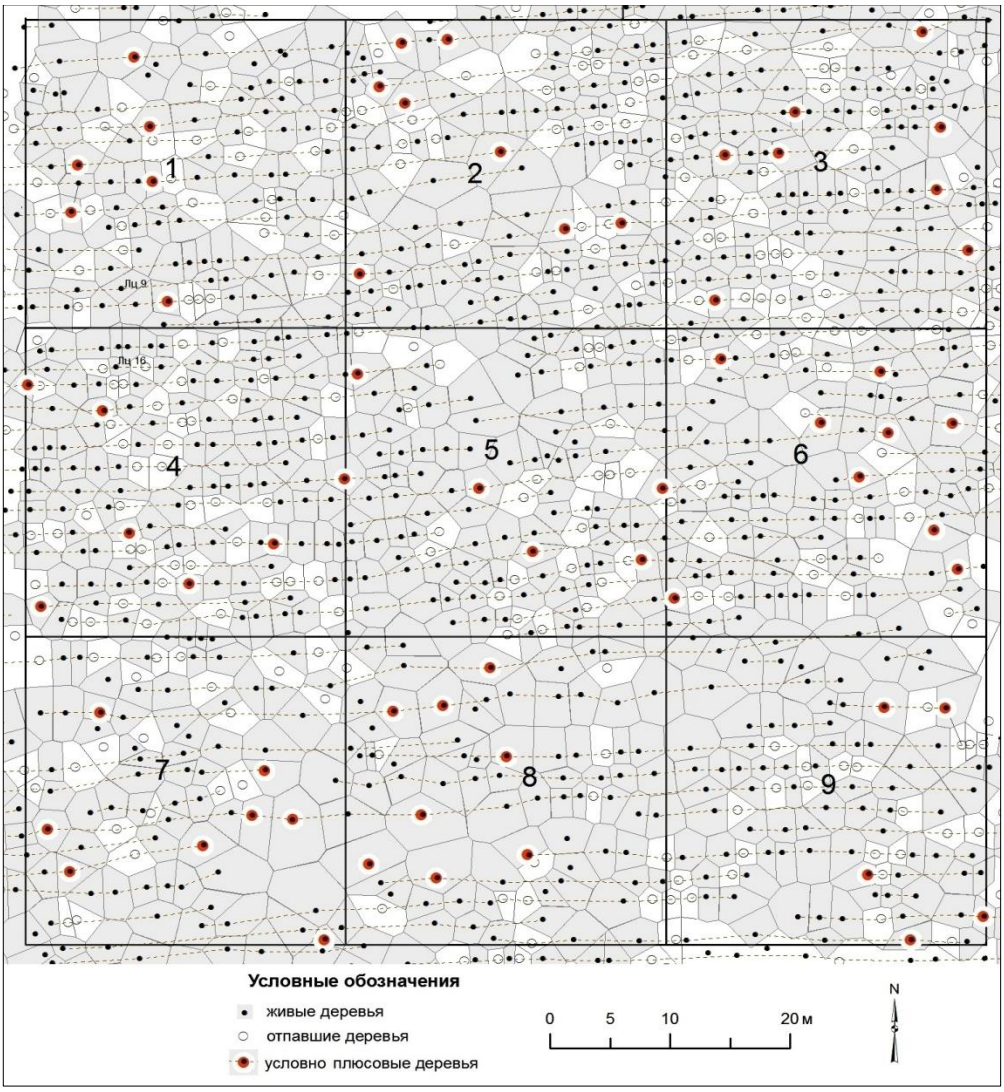


Рис. 1. Полигоны питания деревьев в культурах сосны на 9 секциях на площади 80×80 м.

В целом площадь питания подействовала на рост деревьев по диаметру с силой 11 % при показателе аппроксимации по линейному тренду R^2 = 0.110, поэтому её влияние в качестве фитоценотического фактора можно считать слабым.

Для плюсовых деревьев отметим, что 36 % из них (24 шт.) сформировались на меньшей, а 64 % – на большей площади питания, чем её среднее значение, равное 6.28 $м^2$ для всех деревьев. Поэтому можно полагать, что только меньшая часть деревьев достигает выдающихся размеров благодаря своим генетическим задаткам к быстрому росту в стесненных условиях при уменьшении площади питания.

Обсуждая полученные результаты, следует сослаться на одну из наших недавних и крайне важных работ [Рогозин, 2021], где мы анализировали эти же культуры на значительно большей площади (1.25 га) с выделением уже 1624 полигонов питания, включая и показанные выше. Там корреляция между площадью питания и диаметром ствола дерева была равна r = 0.252±0.023 при силе влияния 6.4%, что несколько ниже, чем на рисунке 3. Однако все эти влияния оказались в целом того же уровня, что и

ранее установленное нами в 184-летнем сосняке (7.7%), расположенном в 8.3 км западнее в аналогичном типе условий [Рогозин, 2019].

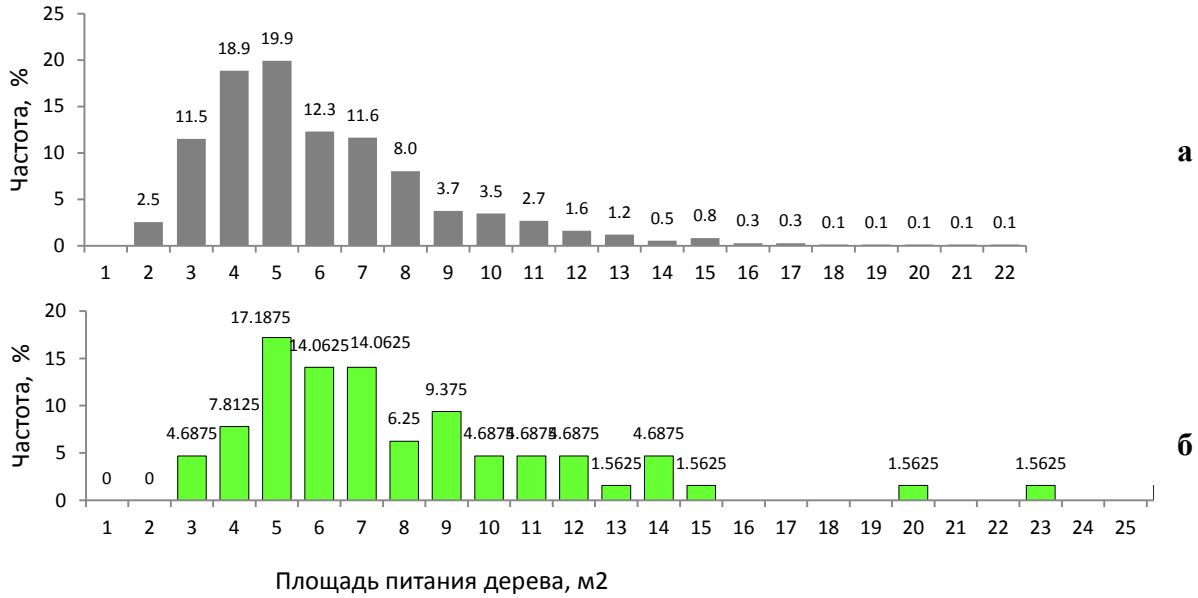


Рис. 2. Площади питания у обычных (а) и плюсовых (б) деревьев

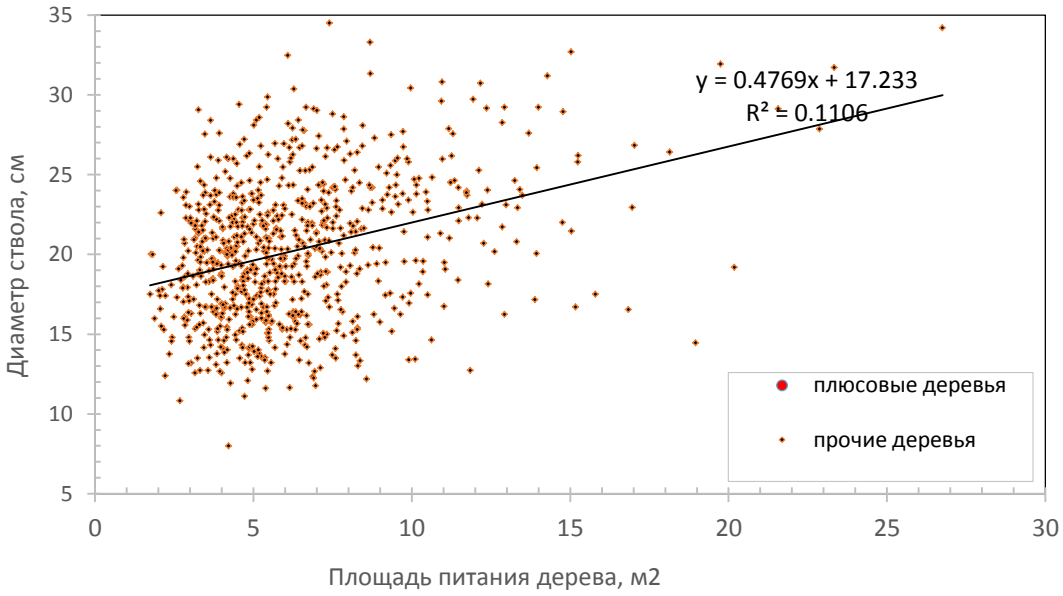


Рис. 3. Влияние площади питания на диаметр ствола в 55-летних культурах сосны. Вертикальная линия – средняя площадь питания дерева.

При этом в густых секциях наших культур интересующая нас корреляция понижалась там [Рогозин, 2021] до r = 0.19±0.03, а в редких местах возрастала до r = 0.32±0.03. Также в этих культурах изучали взаимодействие центрального дерева и 4-8 его соседей в 190 полигонах на двух секциях с полнотой 1.0 тремя более сложными способами: 1) определяли давление суммы диаметров соседей на единицу площади питания центрального дерева; 2) определяли взаимодействие «по расстоянию» – суммировали диаметры соседей, делённых каждое на расстояние до центрального дерева; 3) находили взаимодействие «по контакту» – суммировали диаметры соседей, умноженных на длину контактирующей стороны полигона питания. Первые два способа оценивали давление конкуренции, и она оказалась недостоверной при силе

влияния 0.9–2.2%, а третий оценивал партнёрские отношения, и они были достоверны при r = 0.348±0.064 и силе влияния 12%, что более чем в 5 раз выше, чем конкурентное давление деревьев-соседей [Рогозин, 2021].

Из проведенного обсуждения вытекает очень важная для практики рекомендация. Необходимо разработать иные модели ухода за лесом вместо «логических» моделей ухода на основе априорной «сильной» конкуренции деревьев, которая не нашла подтверждения в молодняках [Усольцев, 2013], культурах среднего возраста [Рогозин, 2021] и в спелых древостоях сосны [Рогозин, 2019].

Таким образом, только 36 % возможных плюсовых деревьев сформировались на площадях питания менее среднего значения и достигли выдающихся размеров благодаря предполагаемым генетическим задаткам. Влияние доставшейся дереву площади питания на его рост по диаметру в целом по участку имеет силу влияния по тренду линейной связи, равную 11.0%.

Литература

Гавриков В.Л. Рост леса: уровни описания и моделирования. Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2013. – 176 с.

Демаков Ю.П. Структура и закономерности развития лесов республики Марий Эл. Йошкар-Ола: ПГТУ. 2018. – 432 с.

Колобов А.Н. Моделирование пространственно-временной динамики древесных сообществ: индивидуально-ориентированный подход //Лесоведение. 2014. № 5. С. 72-82.

Мартынов А.Н. Зависимость биометрических показателей сосны от площади питания // Лесоведение. 1976. № 5. С. 85–88.

Рогозин М.В. Структура древостоев: конкуренция или партнерство? [Электронный ресурс]. Пермь: ПГНИУ. 2019. – 223 с. URL: http://www.psu.ru/files/docs/science/books/mono/

Рогозин М.В. Конкуренция между деревьями в 55-летних культурах сосны // Успехи современного естествознания. 2021. №4. С.27–32. DOI: 10.17513/use.37603

Рогозин М.В., Разин Г.С. Развитие древостоев. Модели, законы, гипотезы [Электронный ресурс]: монография / под ред. М.В. Рогозина. Пермь: ПГНИУ, 2015. – 277 с.. URL: http://elibrary.ru/item.asp?id=24420793.

Сукачев В. Н. О внутривидовых и межвидовых взаимоотношениях среди растений // Сообщения института леса. Вып. 1. М.: АН СССР, 1953. С. 5-44.

Усольцев В.А. Продукционные показатели и конкурентные отношения деревьев. Исследование зависимостей. Екатеринбург: УГЛТУ, 2013. – 556 с.

Усольцев В.А., Часовских В/.П., Акчурина Г.А., Осмирко А.А., Кох Е.В. Фитомасса деревьев в конкурентных условиях: исследование системных связей средствами информационных технологий. Екатеринбург: УГЛТУ, 2018. – 526 с.

COMPETITION, IMPACT OF FOOD AREA, AND PLUS TREES IN PINE CROPS

M.V. Rogozin

Perm State National Research University, Perm, Russia, rog-mikhail@yandex.ru

Abstract. In 55-year-old crops, 812 feeding areas and 66 possible plus trees were studied. Of these, only 36 % had less than average feeding areas and achieved outstanding size due to the supposed genetic makings. In general, the feeding areas affected the barrel diameters with a force of 11.0%. Such a small influence can no longer serve as a theoretical justification for conducting intensive thinning in the middle age of plantings. Therefore, the rules of care for them should be changed.

Keywords: forest crops, food area, competition, plus trees

О ВОЗМОЖНОСТЯХ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПЛОДОВ И СЕМЯН ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОГО СКРИНИНГА

В.Е. Землянова[1], Т.М. Жавкина[1], А.В. Помогайбин[1], Л.М. Кавеленова[1], П.В. Родионова[1], С.А. Розно[1], Н.В. Янков[1], Н.Н. Потрахов[2]

[1] Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, Россия, polina-rodionova-1996@mail.ru

[2] Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Метод рентгенографического анализа качества семян получает все более широкое распространение в отечественной и зарубежной практике. В статье представлены первичные результаты, демонстрирующие возможности рентгенографического скрининга плодов (орех грецкий *Juglans regia*, липы войлочная *Tilia tomentosa* и крупнолистная *T. plathyphyllos*) и семян видов рода катальпа - бигнониевидной, яйцевидной, прекрасной, гибридной и краснеющей (*Catalpa bignonioides, C. ovata, C. speciosa, C. hybrida, C. xerubescens*).

Ключевые слова: семена, древесные растения, рентгенографический анализ.

Качество формируемых древесными растения плодов и семян определяет возможности их практического использования человеком, а для семян – является решающим для их использования в качестве посевного материала либо единиц хранения генетических банков семян, число которых в последние годы значительно увеличилось в разных странах мира [O'Donnell, Sharrock, 2015]. Традиционная процедура оценки качества семян различных культур, в соответствии с ГОСТ, предполагает их проращивание для определения лабораторной всхожести и энергии прорастания, в качестве дополнения может применяться, например, давно известная процедура оценки жизнеспособности семян с применением красителей [Исаченко, Предтеченская, 1936]. Используемые в работе семена представляют собой безвозвратно теряемый «расходный материал». Кроме того, у большинства древесных растений умеренных широт семена сразу после созревания пребывают в состоянии физиологического покоя, выход из которого возможен только после прохождения ими стратификации, и не способны прорастать сразу после сбора. Это обстоятельство, а также временные затраты на проращивание семян, повышают значимость биофизических неповреждающих методов, в частности, с использованием рентгеноскопии, для оперативного исследования семян и плодов. Метод рентгенографического анализа качества семян получает все более широкое распространение в отечественной и зарубежной практике, чему способствует развитие технического оснащения и методического сопровождения, включая специализированное программное обеспечение [Архипов, Потрахов, 2008; Архипов и др., 2010; Потрахов и др., 2012; Рентгенографический…, 2015; Hernandez-Sanchez e.a., 2016]. Помимо семян полевых сельскохозяйственных культур, среди которых преобладают травянистые однолетники, рентгенографическая оценка открывает широкие перспективы для древесных растений, в том числе изучаемых в качестве объектов интродукции в ботанических садах [Староверов и др., 2015; Ткаченко и др., 2015; Ткаченко и др., 2018].

Ботанический сад Самарского университета, период работы которого приближается к 90 годам, является одним из ведущих центров, осуществляющих интродукционное изучение высших растений в Волго-Уральском регионе. В коллекции дендрария, пространственно лидирующей на территории Ботанического сада, по данным инвентаризации на период 03.12.2020 года в соответствии с международной базой The Plant list присутствует 1230 таксонов. Дендрологическая коллекция включает 233 вида из Международной Красной книги (Red List), 19 видов включены в Красную

книгу РФ, и 5 видов - в Красную книгу Самарской области. Наиболее полно представлены следующие родовые комплексы: жимолости, боярышники, орехи, клематисы, ивы, виноградыНаибольший интерес представляют растения Северной Америки и Дальнего Востока. Приобретение в 2020 г. в рамках федерального проекта "Развитие передовой инфраструктуры для проведения исследований и разработок в Российской Федерации" комплекса специализированного лабораторного оборудования, включая уникальную рентгенодиагностическую установку для неповреждающего просвечивания семян ПРДУ, разработанной отечественными специалистами, позволило нам начать исследование внутренней структуры семян неповреждающим методом цифровой микрофокусной рентгенографии. Данный метод уже включен в международные стандарты, в первую очередь для оценки заражения и повреждения зерна вредителями [Arkhipov e.a., 2019; Arkhipov e.a., 2020]. В нашей статье представлены первичные результаты, демонстрирующие возможности рентгенографического скрининга плодов (орех грецкий *Juglans regia*, липы войлочная *Tilia tomentosa* и крупнолистная *T. plathyphyllos*) и семян видов рода катальпа - катальп бигнониевидной, яйцевидной, прекрасной, гибридной и краснеющей (*Catalpa bignonioides, C ovata, C. speciosa, C. hybrida, C. x erubescens*).

Методика. Изучение внутренней структуры односемянных плодов, имеющих плотные оболочки (орех, орешек) и семян проводили методом цифровой микрофокусной рентгенографии. Установка ПРДУ включает защитную камеру для проведения рентгенографии, источник рентгеновского излучения РАП70М-0,1Н-1, приемник рентгеновского изображения на основе многофункционального портативного плоскопанельного детектора рентгеновского излучения для цифровой рентгенографии. Управление осуществляется с компьютеризированного пульта с универсальным программным обеспечением MicroCT-PRDU для анализа цифровых рентгеновских изображений семян. В программном обеспечении MicroCT-PRDU перед исследованием регулируются анодное напряжение и время экспозиции.

Образцы плодов (орех грецкий, липы войлочная и крупнолистная) и семян катальпы бигнониевидной, яйцевидной, прекрасной, гибридной и краснеющей помещали в камеру прибора на пластиковых планшетах, размещая их при разном удалении от рентгеновской трубки в области чувствительности детектора, в зависимости от размера тестируемых плодов и семян. Для семян катальпы отдельные пробы, различавшиеся по годам репродукции (урожаи с 2013 по 2020 г.), выставляли в отдельных планшетах. В течение 10 с изображение выводилось на экран монитора для корректировки контраста, четкости, последующего анализа. После получения изображения на нем визуально выявлялись семена, имеющие следующие негативные признаки: отсутствие заполненности покровов семенем, наличие полости между семенем и оболочкой, повреждения насекомыми, дефекты зародышей, механические повреждения (трещины).

Результаты и их обсуждение. Поскольку рентгенодиагностическая установка ПРДУ была приобретена Самарским университетом только в конце 2020 года, нами проводится отработка режимов сканирования различных семян и плодов различного размера. Экспериментальным путем определялись размеры поля облучения при различном удалении от источника рентгеновского излучения (положение полок внутри камеры установки либо фиксация образцов вблизи рентгеновской трубки), что соответствует различному увеличению сканируемых объектов. Подбирались режимы обработки образцов, различавшихся по плотности оболочек и содержимого семян.

Представим полученные нами результаты рентгенографии проб для плодов типа орех (орех грецкий) и орешек (липы войлочная и крупнолистная) (рис.1). Для каждого объекта параллельно рассматривали изображения - позититив и негатив, выбирая

оптимальные для дальнейшей обработки варианты. Рассматриваемые объекты демонстрируются с использованием изображений-позитивов. Можно заметить, что в рассматриваемой группе мелких плодов ореха грецкого урожая 2020 г. (35 плодов) 1 – с невыполненным ядром (пустой) и два с недоразвитым ядром. Среди плодов липы войлочной, для которой мы демонстрируем пробу из 133 плодов, количество образцов с недоразвитым содержимым – 67 (с отсутствием ядер или ядра меньше внешней наружной оболочки на 50 %). Для плодов липы крупнолистной (проба из 257 плодов) количество невыполненных плодов – 29 (с ядром меньше внешней наружной оболочки на 50 % или менее).

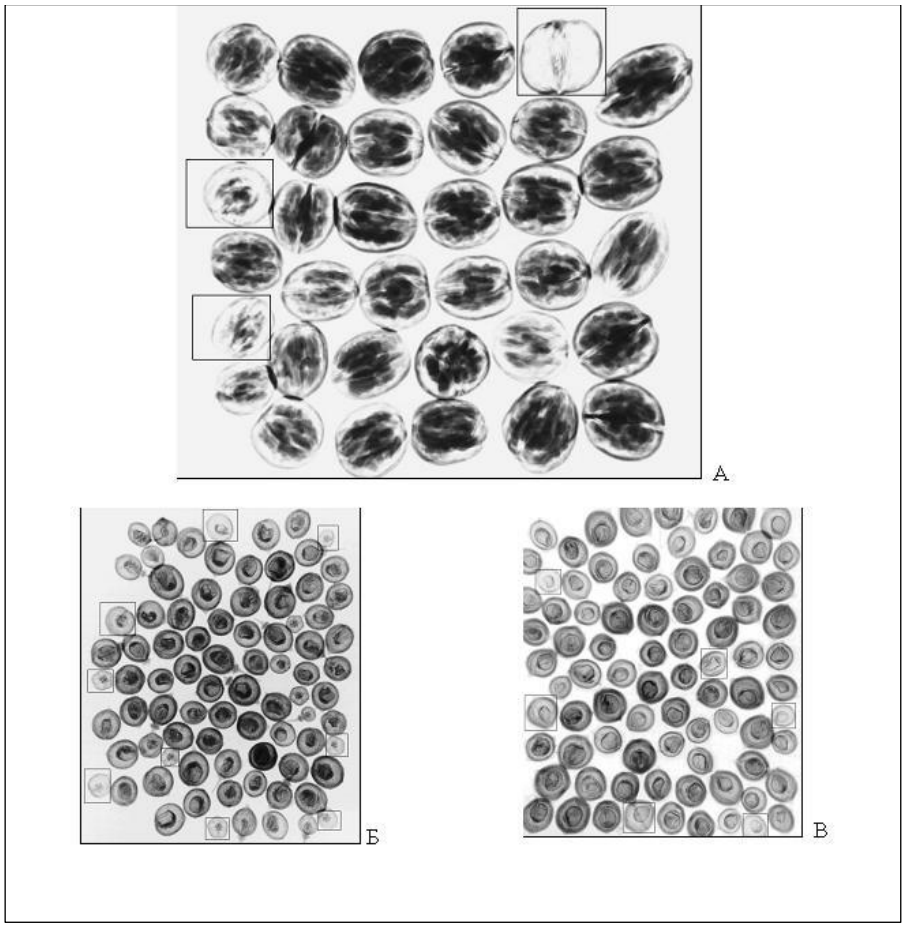


Рисунок 1. Результаты рентгеноскопического микрофокусного рентгенографического исследования образцов с помощью установки ПРДУ: А – Орех грецкий (группа мелких плодов), Б – липа войлочная, В – липа крупнолистная.
Прямоугольниками отмечены примеры дефектных плодов.

Для плодов липы обоих рассматриваемых видов можно отметить, что внешний размер орешка не показатель того, что внутри находится полноценно сформированное семя.

Таким образом, рентгеноскопический скрининг плодов, имеющих твердые покровы (ореха грецкого) и менее твердые, но плотные покровы (лип войлочной и крупнолистной) подтвердил возможности оперативной оценки степени развитости их внутреннего содержимого – собственно семени. Это открывает перспективы оперативного выявления некачественных диаспор для их последующей выбраковки из групп плодов, для которых предполагается сохранение в генетических банках либо использование в качестве посевного материала.

Обработка партий семян четырех видов и одного гибрида катальпы (рис. 2) проводилась для семян, собранных в 2020 г. и хранившихся в фондах семенной лаборатории Ботанического сада. В данном случае мы хотели бы продемонстрировать возможности оперативного сравнения проб семян по их выполненности «в неповреждающем варианте», что важно для выявления не только видоспецифических особенностей различных интродуцентов, но и особенностей их семеношения в различные годы. В случае четырех видов и одного гибрида катальпы, произрастающих в дендрарии Ботанического сада, предварительная оценка выполненности с подсчетом общего числа семян в пробе и числа семян, имеющих недоразвитие или иные дефекты содержимого, обнаружила заметные видовые различия.

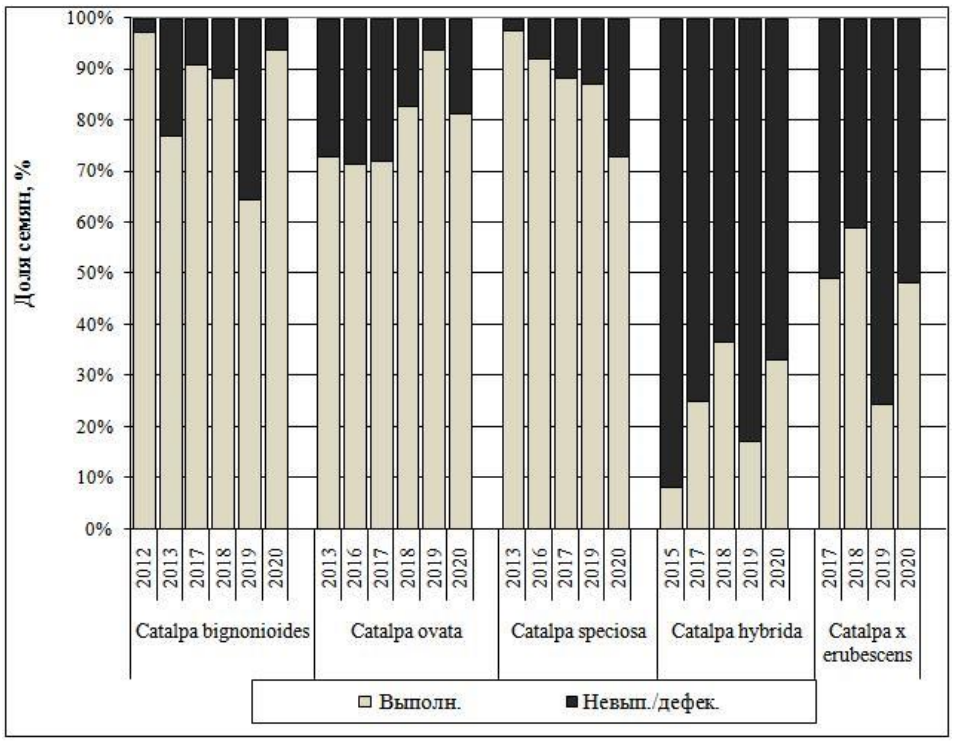


Рисунок 2. Результаты оценки выполненности семян у различных катальп (урожаи 2020 и предшествующих лет)

Наиболее низким, изменяющимся по годам, оказалось качество семян катальпы гибридной. Несколько лучшим оно было у гибрида катальпы краснеющей, что может быть связано с биологическими особенностями данных растений (неполное соответствие местных условий их оптимуму, обеспечивающему завязывание и созревание семян). У катальпы прекрасной доля выполненных семян превышала 80%, но существенно менялась по годам. Для катальпы яйцевидной выполненные семена составляли от 70 до 90% и более. У катальпы яйцевидной рассматриваемый показатель превышал 60%, в отдельные годы приближаясь к 100%. На первый взгляд, следует учесть, что в семенной лаборатории сохранялись образцы семян, прошедших предварительную отбраковку визуально выявляемого дефектного материала. Однако эта рутинная обработка выполнялась ежегодно одними и теми же сотрудниками, что практически снимает вопрос о влиянии «человеческого фактора» на проявившиеся тенденции качества семян катальпы. Для сравнительно мелких и многочисленных семян катальпы рентгеноскопический скрининг перспективен как способ быстрой оценки пробы, из которой в дальнейшем могут отбираться наиболее качественные диаспоры (катальпы гибридная) либо выбраковываться дефектные.

Литература

Архипов М.В., Демьянчук А.М., Гусакова Л.П., Великанов Л.П., Алферова Д.В. Рентгенография растений при решении задач семеноведения и семеноводства // Известия СПбГАУ. 2010. – №19. – С. 36–40.

Архипов М.В., Потрахов Н.Н. Микрофокусная рентгенография растений. СПб.: Технолит, 2008. – 194 с.

Исаченко Б.М., Предтеченская А.А. Применение окрашивания семян как метод определения их жизнеспособности // Экспериментальная ботаника. Тр. БИН АН СССР. 1936. Сер. 4. Вып. 2. С. 317—376.

Потрахов Н.Н., Труфанов Г.Е., Васильев А.Ю., Анохин Д.Ю., Потрахов Е.Н., Акиев Р.М., Балицкая Н.В., Бойчак Д.В., Грязнов А.Ю. Микрофокусная рентгенография – СПб.: ЭЛБИ, 2012. – 80 с.

Рентгенографический анализ качества семян овощных культур: метод. указания. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2015. - 42 с.

Староверов Н.Е., Грязнов А.Ю., Жамова К. К., Ткаченко К. Г., Фирсов Г.А. Применение метода микрофокусной рентгенографии для контроля качества плодов и семян репродуктивных диаспор // № Биотехносфера.2015. № 6(42). - С.16-19

Ткаченко К.Г., Фирсов Г.А., Грязнов А.Ю., Староверов Н.Е. Качество репродуктивных диаспор видов рода Яблоня (Malus Mill.) интродуцированных в Ботаническом саду Петра Великого // Вестник Удмуртского Университета. Серия Биология. Науки о земле. 2015. Т. 25. Вып. 4. С. 75—80.

Ткаченко К.Г., Староверов Н.Е., Грязнов А.Ю. Рентгеноскопическое изучение качества плодов и семян // Hortus Botanicus. 2018. Т.13 С. 52-66.

Arkhipov M.V. et al. Microfocus X-Ray Method for Detecting Hidden Defects in Seeds of Woody Forest Species and Other Types of Vascular Plants // Technical Physics. 2020. Vol. 65, № 2. P. 324-332.

Arkhipov M.V. et al. X-Ray Computer Methods for Studying the Structural Integrity of Seeds and Their Importance in Modern Seed Science// Technical Physics. 2019. Vol. 64, № 4. P. 582-592.

Hernandez-Sanchez N.,, Moreda G.P., Herre-ro-Langreo A., Melado-Herreros A. Assessment of Internal and External Quality of Fruits and Vegetables. In: Imaging Technologies and Data Processing for Food Engineers. Springer International Publishing Switzerland, 2016. - P. 269- 309

O'Donnell K., Sharrock S. Seed banking in botanical gardens: Can botanic gardens achieve GSPC target 8 by 2020? // BG journal. 2015. Vol.12. No.1. P. 3-8.

CONCERNING THE EXPRESS EVALUATION POSSIBILITIES OF FRUITS AND SEEDS QUALITY USING X-RAY SCREENING

V.E. Zemlyanova[1], T.M. Zhavkina[1], A.V. Pomogaybin[1], L.M. Kavelenova[1], P.V. Rodionova[1], S.A. Rozno[1], N.V. Yankov[1], N.N. Potrakhov[2]

[1] Samara National Research University, Samara, Russian Federation, polina-rodionova-1996@mail.ru
[2] Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg Russian Federation

Abstract. The method of X-ray analysis of seed quality is becoming increasingly common in domestic and foreign practice. The article presents primary results showing the possibilities of X-ray screening of fruit (*Juglans regia* walnut, *Tilia tomentosa* mold and large-leaf *T. plathyphyllos*) and the seeds of the species catalapa - bignoidal, ovoid, beautiful, hybrid and red (*Catalpa bignonioides, C. ovata, C. speciosa, C. hybrida, C. xerubescens*).

Keywords: seeds, tree plants, X-ray analysis

ДИНАМИКА РАСТИТЕЛЬНОСТИ И РАЗЛОЖЕНИЕ ВАЛЕЖА ЧЕРЕЗ 14 ЛЕТ ПОСЛЕ МАССОВОГО ВЕТРОВАЛА В ШИРОКОЛИСТВЕННОМ ЛЕСУ (ЗАПОВЕДНИК «КАЛУЖСКИЕ ЗАСЕКИ»)

Л.Г. Ханина[1], М.В. Бобровский[2], И.В. Жмайлов[3]

[1] Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пущино, Россия, khanina.larisa@gmail.com
[2] Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия, maxim.bobrovsky@gmail.com
[3] Российский музей леса, Москва, Россия, ulmus@yandex.ru

Аннотация. На участке ветровала (пески) в 2020 г. количество подроста уменьшилось по сравнению с 2010 г. с 17.5 до 8.2 тыс.шт./га. Через 4 года после ветровала в подросте доминировала осина; спустя 10 лет содоминировали клен остролистный, липа и осина. Общий запас валежа в 2020 г. был 335.8 м3/га (463 в 2010 г.). Для всех видов деревьев были найдены участки стволов практически на всех стадиях разложения (до 4-х стадий в пределах одного ствола); виды различались по представленности валежа разных стадий.

Ключевые слова: валеж, ветровал, широколиственный лес, углерод, азот.

Изучение динамики растительности и процессов, связанных с разложением древесины после массовых и единичных ветровалов, необходимо для оценки, прогноза и моделирования качества выполнения лесами своих экосистемных функций, прежде всего – обеспечивающей (древесина), регулирующей (регулирование климата, циклов элементов питания, почвенного плодородия) и поддерживающей (почвообразование, сохранение местообитаний организмов) [Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Лукина, 2020]. Динамику экосистемных процессов после ветровалов изучали в заповеднике "Калужские засеки", где сохранились участки многовидовых старовозрастных широколиственных лесов на месте бывшей Засечной черты Московского государства XVI века [Яковлев, 1916; Бобровский, 2002]. В заповеднике часто встречаются единичные вывалы деревьев. Кроме того, в июне 2006 года на Южном участке заповедника случился массовый ветровал вследствие ураганно-шквалистого ветра с дождем и градом. Ветровал зарегистрирован под номером 246 в базе данных ветровалов, отмеченных с 1986 по 2017 гг. на Европейской части России [Shikhov et al., 2020]. Описание ветровала, его пространственной структуры, площади, первоначальной динамики растительности и количества валежа было проведено М.В. Бобровским и М.Н. Стаменовым [Бобровский, 2010; Бобровский, Стаменов, 2020] по результатам анализа космоснимков, данных лесотаксационных описаний и полевых исследований 2009 и 2010 гг. Также были проанализированы сосудистые растения на ветровально-почвенных комплексах на различных участках ветровала [Khanina et al., 2019]; проведено сравнительное исследование растительности на валеже дуба черешчатого и на почве, оценен вклад растительности на валеже, образованном в результате единичных вывалов, в общее разнообразие сосудистых растений широколиственного леса [Khanina, Bobrovsky, 2021].

Полевые исследования 2020 г., проведенные на участке ветровала у пос. Ягодное, расположенном в экотопе флювио-гляциальных песков, позволили оценить динамику растительности и процесс разложения валежа через 14 лет после массового ветровала.

На пробной площади, заложенной в 2010 году [Бобровский, Стаменов, 2020; ППП1], был проведен переучет подроста на 120-ти площадках размером 2 × 2 м. Выявлено, что общее количество подроста уменьшилось более чем в два раза (с 17.5 до 8.2 тыс. шт. га$^{-1}$), что было ожидаемо, но участие в нем различных древесных видов существенно изменилось (Рис. 1). Если в 2010 году, через 4 года после ветровала, на участке в подросте доминировала осина, то спустя 10 лет абсолютное доминирование осины сменилось содоминированием клена остролистного, липы и осины (2.7, 2.6 и 2.3 тыс. шт га$^{-1}$, соответственно).

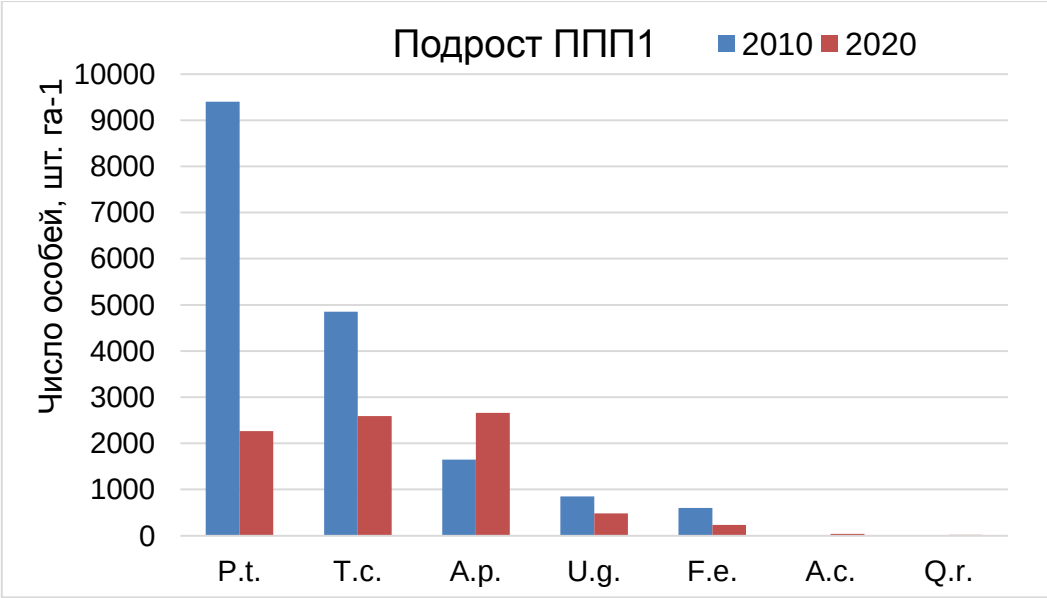


Рис. 1. Изменение численности подроста древесных видов на постоянной пробной площади на участке массового ветровала в экотопе флювио-гляциальных песков с 2010 по 2020 гг. P.t. *Populus tremula*, T.c. *Tilia cordata*, A.p. *Acer platanoides*, U.g. *Ulmus glabra*, F.e. *Fraxinus excelsior*, A.c. *Acer campestre*, Q.r. *Quercus robur*

Учет валежа на 6 трансектах суммарной длиной 120 м на той же постоянной пробной площади, показал, что общий запас валежа в 2020 г. составил 335.8 м3 га$^{-1}$, что на 27.5% меньше, чем запас, отмеченный здесь в 2010 г. (463 м3 га$^{-1}$). Было установлено, что после 14 лет с момента массового ветровала в многовидовом широколиственном лесу можно идентифицировать таксономическую принадлежность валежа по его морфологическим признакам, которая дополнительно верифицируется составом микобиоты. Несмотря на одинаковое время разложения, для валежа каждого вида деревьев можно найти участки стволов практически на всех стадиях разложения – до 4-х стадий в пределах одного лежащего ствола; однако, виды различаются по представленности валежа разных стадий (Табл. 1). Большая часть стволов ели и осины

Таблица 1. Характеристики 40 лежащих стволов 8 видов деревьев через 14 лет после ветровала в экотопе флювио-гляциальных песков в заповеднике «Калужские засеки»

Виды	Доля валежа определенной стадии разложения по всем измеренным стволам для вида					Среднее число стадий на стволе	Число стволов	Средний DBH, см	Средняя длина ствола, м
	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Стадия 4	Стадия 5				
Ель	0	0.11	0.38	0.40	0.11	3.4	5	36.5	29.5
Осина	0	0.13	0.44	0.34	0.09	3.1	9	25.1	25.4
Липа	0.09	0.30	0.14	0.21	0.25	3.8	6	21.7	20.7
Береза	0	0.31	0.30	0.18	0.22	3.8	5	26.8	25.8
Клен о.	0.18	0.47	0.24	0.11	0	2.5	4	22.1	21.1
Ясень	0.21	0.53	0.26	0	0	2.6	5	23.3	21.4
Дуб	0.38	0.47	0.13	0.02	0	2.2	5	41.6	24.4
Вяз	0.47	0.40	0	0.13	0	3	1	28	21.5

находилась на третьей и четвертой стадиях разложения, ясеня и клена – на первых трех, дуба и вяза – на первых двух стадиях. Стволы липы и берез были представлены участками от второй до пятой стадий разложения. Таким образом, по степени

разложения стволов виды соответствовали известному по литературе делению на твердолиственные (дуб, вяз, клен, ясень) и мягколиственные (осина, липа, береза) породы [Анучин и др., 1985]; ель характеризовалась наиболее высокой степенью разложения.

На фрагменте лежащего ствола практически любой стадии разложения, определяемой по внешним признакам ствола, внутри ствола (при его поперечном распиле) часто присутствовала древесина различных стадий разложения (Рис. 2).

Рис. 2. Поперечные распилы семи видов деревьев и общий вид массового ветровала 2006 года в заповеднике «Калужские засеки» у пос. Ягодное в июне 2020 г.

В связи с этим мы различали стадию разложения ствола и стадию разложения древесины. Первую определяли в полевых условиях по методу падающего ножа в соответствии с предложенными ранее методиками [Renvall, 1995; Shorohova, Shorohov, 2001] с модификациями, сделанными нами для валежа дуба [Khanina, Bobrovsky, 2021] и других широколиственных видов. Степень разложения древесины отмечали по сходным признакам в полевых условиях и уточняли после определения объемной плотности образца после его высушивания в сушильном шкафу при температуре 60ºС в течение трех суток.

Для определения объемной плотности и содержания элементов было отобрано 162 образца древесины на 5 стадиях разложения (не менее чем в 3х-кратной повторности) для березы (*Betula pendula*), осины (*Populus tremula*), дуба (*Quercus robur*), ясеня (*Fraxinus excelsior*), липы (*Tilia cordata*), ели (*Picea abies*) и клена остролистного (*Acer platanoides*) и на 4-х стадиях для вяза (*Ulmus glabra*) (валеж вяза на 5-ой стадии разложения на исследуемом участке массового ветровала отсутствовал).

Образцы были взяты путем выпиливания диска из лежащего бревна и вырезания из него кубиков с последующей фиксацией их размера. Валеж на 5-ой стадии разложения отбирался в бюксы. Для оценки более полной динамики всех переменных для каждого вида были взяты по 3 образца на нулевой стадии разложения – образцы взяты коронкой из стоящих деревьев. Всего в анализ объемной плотности древесины было включено 186 образцов; из них 147 образцов были перетерты в пыль и проанализированы в 3-х кратной повторности на содержание углерода, азота и водорода на автоматическом CHNS-анализаторе (LECO Corp., USA); для 106 образцов определено содержание макроэлементов (Ca, P, K и Mg) методом атомно-абсорбционной спектрометрии (Agilent Technologies 5110 ICP-OES).

Предварительный анализ показал, что для всех 8 видов с увеличением стадии разложения наблюдалось уменьшение объемной плотности абсолютно сухой древесины: в среднем от 0.465 г $см^{-3}$ на нулевой стадии до 0.050 г $см^{-3}$ на пятой стадии, минимальные потери наблюдались у вяза, дуба и ясеня, максимальные – у осины и липы. Процентное содержание (концентрация) углерода составляло в среднем 45.6 ± 2.5(sd) %, оно практически не менялось в ходе разложения, но по результатам однофакторного дисперсионного анализа значимо различалось между видами. Концентрация азота между видами значимо не различалась, но различалась между стадиями: увеличивалась с возрастанием стадии от среднего значения 0.27±0.1% на первой до 0.88±0.5% на пятой стадии). Содержание Ca и Mg в целом увеличивалось с увеличением стадии разложения, содержание K уменьшалось, а концентрация P значимо не менялась.

Предварительные результаты в целом подтвердили гипотезу об увеличении процентного содержания макроэлементов в валеже с увеличением стадии разложения. Результаты свидетельствуют о существенной роли крупных древесных остатков в круговороте питательных веществ, которые становятся доступными для биоты в процессе деструкции валежа.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ, проект 20-04-00733а.

Литература

Анучин Н.А., Атрохин В.Г., Виноградов В.Н. и др. Древесная порода // Лесная энциклопедия: В 2-х т. / Гл.ред. Воробьев Г.И.. - М: Сов. энциклопедия, 1985.

Бобровский М.В. Козельские засеки (эколого–исторический очерк). Калуга: Изд–во Н. Бочкаревой, 2002. 92 с.

Бобровский М.В. Лесные почвы европейской России. Биотические и антропогенные факторы формирования. - М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. - 392 с.

Бобровский М.В., Стаменов М.Н. Катастрофический ветровал 2006 года на территории заповедника «Калужские засеки» // Лесоведение. 2020. № 6. С. 523–536.

Лукина Н.В. Глобальные вызовы и лесные экосистемы // Вестник Российской академии наук. 2020. Т. 90. №. 6. С. 528-532.

Яковлев А.И. Засечная черта Московского Государства в XVII веке. М.: Тип. Г. Лисснера и Д. Собко, 1916. 312 с.

Khanina L.G., Bobrovsky M.V. Value of large *Quercus robur* fallen logs in enhancing the species diversity of vascular plants in an old-growth mesic broad-leaved forest in the Central Russian Upland // Forest Ecology and Management 491 (2021) 119172. doi: 10.1016/j.foreco.2021.119172.

Khanina L.G., Bobrovsky M.V., Zhmaylov I.V. Vegetation diversity on the microsites caused by tree uprooting during a catastrophic windthrow in temperate broadleaved forests // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2019. Vol. 4 (3). DOI 10.21685/2500-0578-2019-3-1.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005 URL: https://www.millenniumassessment.org/en/Index-2.html

Renvall P. Community structure and dynamics of wood-rotting Basidiomycetes on decomposing conifer trunks in northern Finland // Karstenia. 1995. V. 35. P. 1–51.

Shikhov A.N., Chernokulsky A.V., Azhigov I.O., Semakina A.V. A satellite-derived database for stand-replacing windthrow events in boreal forests of European Russia in 1986–2017 // Earth Syst. Sci. Data. 2020. V. 12. P. 3489–3513.

Shorohova E.V., Shorohov A.A. Coarse woody debris dynamics and stores in a boreal virgin spruce forest // Ecol Bull. 2001. V. 49. P. 129–137.

VEGETATION DYNAMICS AND DEAD WOOD DECOMPOSITION 14 YEARS AFTER A MASS WINDTHROW IN A BROAD-LEAVED FOREST (KALUZHSKIE ZASEKI STATE NATURE RESERVE)

Larisa Khanina[1], Maxim Bobrovksy[2], Ivan Zhmaylov[3]

[1] Institute of Mathematical Problems of Biology of RAS – branch of the Keldysh Institute of Applied Mathematics RAS, Pushchino, Russia, khanina.larisa@gmail.com
[2] Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science of RAS, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Pushchino, Russia, maxim.bobrovsky@gmail.com
[3] Russian Forest Museum, Moscow, Russia, ulmus@yandex.ru

Annotation. At the windthrow site (sands) in 2020 the volume of tree regrowth decreased compared to 2010 from 17.5 to 8.2 thousand ind. ha^{-1}. Four years after the windthrow event, aspen dominated the undergrowth; 10 years later maple, linden and aspen dominated the understorey. The total stock of dead wood in 2020 was 335.8 m3 ha^{-1} (463 in 2010). For all tree species, patches of trunks at almost all decomposition stages were found (up to 4 stages within one trunk); species differed in the amount of deadwood at different stages.

Key words: deadwood, windthrow, mesic broad-leaved forest, carbon, nitrogen.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В ЕСТЕСТВЕННОМ И ИСКУССТВЕННОМ НАСАЖДЕНИЯХ, ВЫЯВЛЯЕМОЕ ISSR-МАРКЕРАМИ И ПРИ АНАЛИЗЕ SNP

Р.Ю. Янбаев

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия, Yanbaev_ua@mail.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ генетического разнообразия дуба черешчатого в естественном насаждении и лесных культурах дуба черешчатого в Республике Башкортостан. Оба типа использованных генетических маркеров (ISSR-маркеры и локусы однонуклеотидных полиморфизмов) показали одну и ту же закономерность. Число аллелей на локус и гетерозиготность были выше в искусственном насаждении. Внутрипопуляционная генетическая дифференциация в природной популяции была выражена в большей степени. Между сравниваемыми выборками генетические различия оказались статистически высоко достоверными. Полученные закономерности можно объяснить разной основой формирования генотипического состава особей в естественных условиях (выраженная пространственная семейная кластеризация из-за малой дальности распространения желудей) и при искусственном выращивании лесов (сбор семян со многих материнских деревьев и насаждений с перемешиванием семенного материала).

Ключевые слова: популяция, *Quercus robur,* ISSR-анализ, однонуклеотидный полиморфизм

Длительное лесопользование в дубравах, негативные природно-климатические процессы, воздействие энтомофагов и фитопатогенов обусловили значительное ухудшение состояния насаждений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в российской части ареала. Восстановление позиций вида связывается как с естественным возобновлением, так и с искусственным выращиванием. При этом важно использование потенциала к этому, определяемого существующей большой внутривидовой изменчивостью вида [Шутяев, 2000]. При исследовании генофонда популяций дуба черешчатого возникают такие вопросы – насколько богат генофонд природных популяций, как он воспроизводится при искусственном воспроизводстве лесов? Насколько точно этот процесс выявляется разными типами генетических маркеров? Насколько можно экстраполировать результаты, полученные при помощи относительно давно разработанных генетических маркеров с данными по большим наборам локусов, отобранных с применением технологий секвенирования ДНК нового поколения? Попытка получения ответов на такие вопросы составила цель данной работы. Нами проведено сравнительное изучение одних и тех же выборок дуба черешчатого с применением двух методов – ISSR-анализа (Inter Simple Sequence Repeat) [Zietkiewicz et al., 1994], до настоящего времени успешно применяемого в популяционной генетике лесных древесных растений [Сбоева и др., 2020], и исследования их генетического разнообразия с применением набора локусов однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, Single Nunucleotide Polymorphisms), недавно разработанного нами на основе метода ddRAD и технологии Miseq (Degen et al., 2021).

На территории Архангельского лесничества Республики Башкортостан заложены 2 пробные площади. На одной из них (условно обозначена *ArcA_A*, географические координаты 54°23'50.3"N, 56°48'10.1"E) представлены смешанные лесные культуры дуба с первоначальным составом 5Д5С. Вторая выборка (*Arc2,* 54°25'13.8"N, 56°47'53.9"E) взята в 2,5 км в естественном насаждении с доминированием *Q. robur*. На каждой пробной площади для изучения были отобраны по 32 (ISSR-анализ) и 10 (анализ SNP) деревьев, в том числе в местообитании Arc2 на расстоянии не менее 50 м друг от друга. С них был взяты образцы камбия, которые в высушенном состоянии хранились до лабораторных анализов в холодильнике. ДНК извлечена из камбия в соответствии с протоколом [Dumolin et al., 1995].

Растительные образцы при анализе SNP были исследованы по 366 полиморфным ядерным локусам (в т.ч. 361 SNP, 5 InDel) методом GBS (генотипирование путем секвенирования) в компании LGC Genomics GmbH в системе Illumina NextSeq [Degen et al. 2021]. С помощью программы GDA_NT [Degen, 2021] рассчитаны эффективное число аллелей (A_E), наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность (H_O, H_E). Генетические различия между выборками были количественно определены с использованием генетического расстояния d_0 [Gregorius 1984]. В качестве меры генетической дифференциации также был рассчитан параметр *дельта* [Gregorius 1987]. С применением программы COLONY [Jones, Wang 2010] и CERVUS [Marshall et al., 1998] оценено генетическое родство особей (число сибов и полусибов).

Для проведения ISSR-анализа использованы праймеры M1, M3, M27, X11 и X1 [Янбаев и др., 2017]. Разделение продуктов амплификации проведено электрофорезом в 1.7 %-ном агарозном геле в 1xTBE-буфере, окрашивание осуществлялось бромистым этидием. Статистический анализ осуществлен с применением программы POPGENE 1.31 [Yeh et al., 1999] и специализированного макроса GenAlEx6 MS-Excel [Peakall, Smouse, 2006]. Подсчитано число аллелей на локус *A*, эффективное число аллелей и ожидаемую гетерозиготность.

Доминантность (ISSR) и кодоминантность (SNP) использованных маркеров и другие методические причины не позволили сравнить естественное насаждение и лесные культуры дуба черешчатого полностью по одним и тем же генетическим показателям. Тем не менее, два совпадающих показателя (эффективное число аллелей и ожидаемая гетерозиготность) показали одну и ту же закономерность – более высокую изменчивость выборки искусственной дубравы (таблицы 1 и 2). По SNP абсолютные значения A_E и H_E различаются меньше, что может быть вызвано эффектом намного большей выборки генетических маркеров – различия двух выборок статистически достоверны на высоком уровне $p < 0{,}001$. Больший уровень генетического разнообразия выборки *ArcA_A* подтверждается также при рассмотрении наблюдаемой гетерозиготности локусов SNP. Генетическое расстояние между искусственным и естественным насаждениями составило сравнительно большое значение $d_0 = 0{,}065$, различия между ними статистически значимо на уровне $p < 0.01$. Как показал параметр *delta*, особи природной популяции генетически больше дифференцированы между собой, по сравнению с лесными культурами – значения *delta* составили 0.0786 против 0.0701 у деревьев выборки *ArcA_A*. (больше на 10,8 %).

Таким образом, несмотря на принадлежность к разным поколениям, оба типа генетических маркеров оказались одинаково информативным для выявления закономерности

Таблица 1. Генетические показатели выборок по локусам SNP

Выборки	A_E	H_O	H_E
Arc2	1.4200	0.2634	0.2453
ArcA_A	1.4380	0.2665	0.2554

Таблица 2. Генетические показатели выборок по результатам ISSR-анализа

Выборки	*A*	A_E	H_E
Arc2	1,86	1,40	0,202
ArcA_A	1,75	1,31	0,249

большего генетического разнообразия дуба черешчатого при искусственном выращивании дуба черешчатого. Видимо подтвержденная нами эффективность ISSR-анализа определена полилокусностью и высокой полиморфностью генетических

маркеров [Сбоева и др., 2020]. В частности, в выборках Arc2 и ArcA_A нами выявлены 82 и 84 ISSR-фрагмента (доля полиморфных локусов составила 76,6 и 84,8 %%, соответственно). Соответственно, полученные ранее данные о генофонде популяций дуба черешчатого с применением ISSR-анализа [Янбаев и др., 2017] по-прежнему заслуживают доверия. В то же время ясно, что внедрение технологий секвенирования ДНК нового поколения в популяционную генетику лесных древесных растений дает много новых преимуществ [Degen et al., 2021].

Компьютерное моделирование показывает, что лесохозяйственная деятельность может оказывать разнонаправленный эффект на формирование генофонда новых поколений популяций. В частности, сбор семян с большого числа материнских деревьев и разных насаждений может обеспечить более широкую базу генотипов искусственных популяций. С другой стороны, сравнительно малое число особей – источников семян может обеднить генотипический состав лесных культур [Blanc-Jolivet, Degen, 2014]. Видимо, первый сценарий был реализован при создании насаждения *ArcA_A*. Согласно информации из Архангельского лесничества, семена для выращивания исследованных нами лесных культур действительно были заготовлены со многих местных насаждений, а при выращивании в лесном питомнике они неизбежно смешиваются. Другое, не противоречащее первому, предположение может объяснить обнаружение в природной популяции меньшего генетического разнообразия как ISSR-маркерами, так и локусами однонуклеотидных полиморфизмов. Относительно тяжелые желуди падают из-за гравитационного механизма распространения семян недалеко от каждого дерева. По этой причине вокруг семенных деревьев формируется семейная генетическая кластеризация и пространственная концентрация аллелей материнских особей. Доказательством является обнаружение нами в выборке *Arc2* 20 % полусибов, в то время как в выборке *ArcA_A* они не выявлены.

Полученные нами данные подтверждают важность использования широкой генетической базы семян при создании лесных культур дуба черешчатого.

Исследование проведено за счет гранта Российского научного фонда № 19-16-00084.

Литература

Сбоева Я.В., Васильева Ю.С., Чертов Н.В. и др. Молекулярно-генетическая идентификация популяций сосны обыкновенной и лиственницы Сукачева в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR- маркеров // Сибирский лесной журнал. 2020. № 4. С. 35–44.

Шутяев А.М. Биоразнообразие дуба черешчатого и его использование в селекции и лесоразведении. - Воронеж : НИИЛГиС, 2000. - 335 с.

Янбаев Р.Ю., Габитова А.А, Султанова Р.Р. и др. ISSR-анализ полиморфизма ДНК дуба черешчатого: аргументы в пользу использования для лесовосстановления семян местных насаждений // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2017. Т. 63 (1). С. 220-222.

Blanc-Jolivet C., Degen B. Using simulations to optimize genetic diversity in *Prunus avium* seed harvests // Tree Genetics and Genomes. 2014. V. 10 (3). P. 503-512.

Dumolin S., Demesure B., Petit R.J. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method // Theoretical and Applied Genetics. 1995. 91. P. 1253–1256.

Degen B. GDA_NT - Genetic data analysis and numerical tests. 2021. www.thuenen.de/en/fg/software/GDA-NT/

Degen, B., Blanc-Jolivet C., Bakhtina et al. Applying targeted genotyping by sequencing with a new set of nuclear and plastid SNP and indel loci for *Quercus*

robur and *Quercus petraea* // Conservation Genetics Resources. 2021. https://doi.org/10.1007/s12686-021-01207-6

Gregorius H.R. A unique genetic distance // Biometrical Journal. 1984. 26 (1). P. 13–18.

Gregorius H.R. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation // Theoretical and Applied Genetics. 1987. 74. P. 397–401.

Jones O.R., Wang J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data // Molecular Ecology Resources. 2010. V. 10 (3). P. 551-555.

Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations // Molecular Ecology. 1998. Vol. 7 (5). P. 639-655.

Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. V. 6. P. 288-295.

Yeh F.C., Young R.C., Mao J. et al. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. - Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. Alta, 1999. - 238 p.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176–183.

GENETIC DIVERSITY OF PEDUNCULATE OAK IN NAURAL AND ARTIFICIAL STANDS, DETECTED BY ISSR MARKERS AND SNP ANALYSIS

R. Ianbaev

Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia, Yanbaev_ua@mail.ru

Abstract. A comparative analysis of pedunculate oak genetic diversity from a natural and man-made stands in the Republic of Bashkortostan is carried out. Both types of genetic markers used (ISSR markers and loci of single-nucleotide polymorphisms) showed the same patterns. The number of alleles per locus and heterozygosity were higher in artificial oak grove. The individuals genetic differentiation in the natural population was expressed to a greater extent. The genetic differences between the compared groups of samples were statistically highly significant. The obtained regularities can be explained by a different basis of the formation of the individuals genotypic composition in natural populations (pronounced spatial family clustering due to the short distance of acorns falling) and under artificial afforestation (collection and mixing of seed material from many mother trees and stands).

Key words: population, *Quercus robur*, ISSR-analysis, single nucleotide polymorphism