

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

**ВЕСТНИК  
ТОМСКОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО  
УНИВЕРСИТЕТА**

**БИОЛОГИЯ**

**Tomsk State University Journal of Biology**

---

---

**Научный журнал**

---

---

**2021**

**№ 53**

Зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере  
массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия  
(свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-29499 от 27 сентября 2007 г.)

Подписной индекс в объединённом каталоге «Пресса России» 44024

Журнал включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, входящих  
в международные реферативные базы данных и системы цитирования, в которых должны  
быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание  
ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук»  
Высшей аттестационной комиссии

**Учредитель – Томский государственный университет**

Научный журнал «Вестник Томского государственного университета. Биология» публикует результаты завершенных оригинальных исследований (теоретические и экспериментальные статьи) в различных областях современной биологии, ранее нигде не публиковавшиеся и не представленные к публикации в другом издании; публикуются описания принципиально новых методов исследования, обзорные статьи по отдельным проблемам. Основные требования к представляемым рукописям: новизна и обоснованность фактического материала, ясность, сжатость изложения, воспроизводимость экспериментальных данных. Решение о публикации принимается редколлегией после рецензирования, учитывающая соответствие материала тематике журнала, актуальность проблемы, научную и практическую новизну и значимость, профессионализм выполнения работы. Принимаются статьи на русском и английском языках. Средний срок публикации 3–6 месяцев. Журнал выходит ежеквартально. Публикации осуществляются на некоммерческой основе. Все опубликованные материалы находятся в свободном доступе.

Индексируется: SCOPUS; Web of Science (Biological Abstracts, BIOSIS Previews, Emerging Sources Citation Index, Zoological Record, RSCI); Google Scholar; eLIBRARY.RU; CYBERLENINKA. Внесен в Ulrich's Periodicals Directory.

Адрес издателя и редакции: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, Национальный исследовательский Томский государственный университет, Биологический институт; сайт: <http://journals.tsu.ru/biology/>

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Кулижский С.П.** – гл. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)

E-mail: [kulizhskiy@yandex.ru](mailto:kulizhskiy@yandex.ru)

**Покровский О.С.** – зам. гл. редактора (Национальный центр научных исследований, Тулуза, Франция)

**Баранова О.Г.** – отв. редактор (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия)

**Бобровский М.В.** – отв. редактор (Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино, Россия)

**Громовых Т.И.** – отв. редактор (Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия)

**Денисов Е.В.** – отв. редактор (НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия)

**Зверев А.А.** – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)

**Иванов Ю.В.** – отв. редактор (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия)

**Литвяков Н.В.** – отв. редактор (НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия)

**Лойко С.В.** – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)

**Тарасов В.В.** – отв. редактор (Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия)

**Шефтель Б.И.** – отв. редактор (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия)

**Акимова Е.Е.** – отв. секретарь (Томский государственный университет, Томск, Россия)

E-mail: [biotsu@rambler.ru](mailto:biotsu@rambler.ru), [biotsu@mail.ru](mailto:biotsu@mail.ru)

**Волокитина А.В.** (Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск); **Воробьев Д.С.** (Томский государственный университет, Томск); **Дюкарев А.Г.** (Институт мониторинга и климатических систем РАН, Томск); **Кривец С.А.** (Институт мониторинга и климатических систем РАН, Томск); **Минсвева Н.М.** (Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, пос. Борок); **Штерншис М.В.** (Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар).

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

**Александровский А.Л.** (Институт географии РАН, Москва, Россия); **Ананьева Н.Б.** (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия); **Афтанас Л.И.** (НИИ физиологии и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск, Россия); **Васильев В.П.** (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия); **Васильева Е.Д.** (Зоомузей МГУ, Москва, Россия); **Дюбуа А.** (Национальный музей естественной истории, Париж, Франция); **Зеллер Б.** (Национальный институт агрономических исследований, Нанси, Франция); **Зинченко Т.Д.** (Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, Россия); **Кингма Г.** (Маастрихтский университет, Маастрихт, Нидерланды); **Крюков В.Ю.** (Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия); **Кузнецов В.В.** (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия); **Лодыгин Е.Д.** (Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Коми научный центр УрО РАН, Сыктывкар, Россия); **Лушанин В.В.** (Университет Арканзаса медицинских наук, Арканзас, США); **Максимов Т.Х.** (Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия); **Носов А.М.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия); **Оленников Д.Н.** (Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия); **Пердиссе А.** (Национальный Музей естественных наук, Мадрид, Испания); **Смирнова О.В.** (Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов РАН, Москва, Россия); **Соколова Ю.Я.** (Университет Луизианы, Батон Руж, Луизиана, США); **Степанов В.А.** (НИИ медицинской генетики Томского НЦ СО РАМН, Томск, Россия); **Шарахов И.В.** (Политехнический университет Вирджинии, Вирджиния, США).

**Издательство:** Издательство Томского государственного университета. Редактор К.Г. Шилько; редактор-переводчик М.Б. Кузьменко; оригинал-макет А.И. Лелюро; дизайн обложки Л.Д. Кривонова

Подписано в печать 26.03.2021 г. Формат 70x108<sup>1/16</sup>. Усл. печ. л. 13,6. Тираж 50 экз. Заказ № 4620. Цена свободная. Дата выхода в свет 31.03.2021 г.

Журнал отпечатан на полиграфическом оборудовании Издательства ТГУ. 634050, Ленина, 36, Томск, Россия. Тел. 8+(382-2)-52-98-49. Сайт: <http://publish.tsu.ru>. E-mail: [rio.tsu@mail.ru](mailto:rio.tsu@mail.ru)

**About *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya* =  
Tomsk State University Journal of Biology**

**Founder – Tomsk State University**

*Tomsk State University Journal of Biology* is a quarterly international and peer-reviewed scientific journal publishing the results of the completed experimental research, reviews and novel methods of research in Agricultural & Biological Sciences on the basis of its originality, importance, scientific character, validity, precision and clarity. The Journal is intended for a broad range of scientists and experts in biology, agriculture and ecology.

The editorial board of the *Tomsk State University Journal of Biology* commits to the internationally accepted principles of publication ethics expressed.

**International standard serial edition number:** EISSN 2311-2077, ISSN 1998-8591

**Language:** Russian, English

**Publications are on non-commercial basis (FREE)**

**Open access**

**Publication timeframe:** 3-6 months

All manuscripts are to be reviewed: double blind peer review (2-10-weeks)

**Abstracting and Indexing:** SCOPUS; Web of Science (Biological Abstracts, BIOSIS Previews, Emerging Sources Citation Index, Zoological Record, RSCI); Google Scholar; eLIBRARY.RU; CYBERLENINKA; Ulrich's Periodicals Directory

**Contact the Journal**

Tomsk State University, Institute of Biology, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation

<http://journals.tsu.ru/biology/en/>

**Editor-in-Chief - Sergey P Kulizhskiy**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Tomsk State University (Tomsk, Russia), [kulizhskiy@yandex.ru](mailto:kulizhskiy@yandex.ru)

**Co Editor-in-Chief - Oleg S Pokrovsky**, National Centre for Scientific Research (Toulouse, France).

**EDITORIAL COUNCIL**

**Akimova EE** - Associate Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

[biojournaltsu@gmail.com](mailto:biojournaltsu@gmail.com), [biotsu@mail.ru](mailto:biotsu@mail.ru)

**Baranova OG** - Editor, Komarov Botanical Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

**Bobrovsky MV** - Editor, Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, RAS, Pyskhino, Russia

**Gromovykh TI** - Editor, IM Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

**Denisov EV** - Editor, Cancer Research Institute of Tomsk NRC, Tomsk, Russia

**Zverev AA** - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

**Ivanov Yu V** - Editor, Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow, Russia

**Litviakov NV** - Editor, Cancer Research Institute of Tomsk NRC, Tomsk, Russia

**Loyko SV** - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

**Tarasov VV** - Editor, Institute of Plant and Animal Ecology, RAS, Yekaterinburg, Russia

**Sheftel BI** - Editor, AN Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia

**Volokitina AV** (Sukachev Institute of Forest, SB RAS, Krasnoyarsk, Russia); **Vorobiev DS** (Tomsk State University, Tomsk, Russia); **Dukarev AG** (Institute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems, SB RAS, Tomsk, Russia);

**Krivets SA** (Institute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems, SB RAS, Tomsk, Russia); **Mineeva NM** (Papanin Institute for Biology of Inland Waters, RAS, Borok, Russia); **Shternshis MV** (All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia).

**EDITORIAL BOARD [In Russian Alphabetical order]**

**Alexandrovskiy AL**, Institute of Geography RAS (Moscow, Russia); **Ananjeva NB**, Zoological Institute RAS (St. Petersburg, Russia); **Aftanas LI**, State Research Institute of Physiology SB RAMS (Novosibirsk, Russia); **Vasil'ev VP**, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS (Moscow, Russia); **Vasil'eva ED**, Zoological Museum, MV Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia); **Dubois A**, French National Museum of Natural History (Paris, France); **Zeller B**, French National Institute for Agricultural Research (Nancy, France); **Zinchenko TD**, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS (Togliatti, Russia); **Kingma H**, Maastricht University (Maastricht, Netherlands); **Kryukov VY**, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS (Novosibirsk, Russia); **Kuznetsov VIV**, Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS (Moscow, Russia); **Lodygin ED**, Institute of Ecology of Komi Scientific Centre UB RAS (Syktyvkar, Russia); **Lupashin VV**, University of Arkansas for Medical Sciences (Arkansas, USA); **Maximov TC**, Institute for Biological Problems of the Cryolithozone SB RAS (Yakutsk, Russia); **Nosov AM**, MV Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia); **Oleznikov DN**, Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Ulan-Ude, Russia); **Perdices A**, National Museum of Natural Sciences (Madrid, Spain); **Smirnova OV**, Center of Ecology and Productivity of Forests RAS (Moscow, Russia); **Sokolova YY**, Louisiana State University (Baton Rouge, Louisiana, USA); **Stepanov VA**, Research Institute of Medical Genetics SB RAMS (Tomsk, Russia); **Sharakhov IV**, Virginia Polytechnic Institute and State University (Blacksburg, Virginia, USA)

**PUBLISHER:** TSU Press (Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation). Editor KG Shilko; Translator/Editor MB Kuzmenko; camera-ready copy AI Leloyur; cover design LD Krivtsova.

Passed for printing 26.03.2021. Format 70x108<sup>1/16</sup>. Conventional printed sheets 13.6. Circulation is 50 copies. Orders No.4620 Open price. Date of publication 31.03.2021.

36 Lenin Ave, Tomsk 634050, Russian Federation. Tel. +7 (382-2)-52-98-49. <http://publish.tsu.ru>. E-mail: [rio.tsu@mail.ru](mailto:rio.tsu@mail.ru)

## СОДЕРЖАНИЕ

### АГРОХИМИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

- Шени Е.В., Верховцева Н.В., Суздалева А.В., Абросимов К.Н.** Рентгеновская компьютерная томография структуры корней и динамика почвенной биоты на ранних стадиях роста ячменя (*Hordeum vulgare* L.) .....6

### БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Киселева О.И., Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гаврюшина И.А., Садыкова В.С., Пигалева М.А., Рубина М.С., Громовых Т.И.** Структура популяции *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода .....22

### БОТАНИКА

- Ветрова В.П., Барченков А.П., Синельникова Н.В.** Сравнительный анализ изменчивости формы семенных чешуй шишек *Larix dahurica* и *L. cajanderi* (Pinaceae) .....47
- Егорова Н.Ю., Егошина Т.Л., Ярославцев А.В.** *Vaccinium myrtillus* L. в Кировской области (южно-таежная подзона): фитоценотическая приуроченность, экологические предпочтения .....68
- Тетерюк Л.В., Валуйских О.Е., Кирсанова О.Ф.** Распространение, состояние популяций и охрана редких эфемероидов в Республике Коми.....89

### ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

- Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В.** Влияние совместной обработки эндوفитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* В-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.....109

### ЭКОЛОГИЯ

- Головатюк Л.В., Михайлов Р.А.** Анализ пространственного распределения сообществ макрозообентоса в равнинной реке полупустынной зоны .....131
- Минеева Н.М.** Оценка связи содержания хлорофилла и биогенных элементов в крупных равнинных водохранилищах .....151

## TABLE OF CONTENTS

## AGROCHEMISTRY &amp; SOIL SCIENCE

- Shein EV, Verkhovtseva NV, Suzdaleva AV, Abrosimov KN.** X-ray computed tomography of the structure of roots and dynamics of soil biota in the early growth stages of barley (*Hordeum vulgare* L.) .....6

## BIOTECHNOLOGY &amp; MICROBIOLOGY

- Kiselyova OI, Lutsenko SV, Feldman NB, Gavryushina IA, Sadykova VS, Pigaleva MA, Rubina MS, Gromovykh TI.** The structure of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 population cultivated in static conditions on various sources of carbon .....22

## BOTANY

- Vetrova VP, Barchenkov AP, Sinelnikova NV.** Comparative analysis of shape variation in the cone scales of *Larix dahurica* and *L. cajanderi* (Pinaceae).....47
- Egorova NYu, Egoshina TL, Yaroslavtsev AV.** *Vaccinium myrtillus* L. in Kirov region (southern taiga subzone): phytocoenotic confinement and ecological preferences .....68
- Teteryuk LV, Valuyskikh OE, Kirsanova OF.** Distribution, population status and protection of rare ephemeroids in the Komi Republic .....89

## PLANT PHYSIOLOGY &amp; BIOTECHNOLOGY

- Sorokan AV, Burkhanova GF, Alekseev VYu, Maksimov IV.** The influence of co-treatment with *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary .....109

## ECOLOGY

- Golovatyuk LV, Mikhailov RA.** Spatial distribution of macrozoobenthos communities in a plain river of a semi-desert zone .....131
- Mineeva NM.** Assessment of the relationship between chlorophyll content and biogenic elements in large lowland reservoirs .....151

## АГРОХИМИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

УДК 631.43

doi: 10.17223/19988591/53/1

**Е.В. Шенн<sup>1,2</sup>, Н.В. Верховцева<sup>1</sup>, А.В. Суздалева<sup>1</sup>, К.Н. Абросимов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева, г. Москва, Россия

### **Рентгеновская компьютерная томография структуры корней и динамика почвенной биоты на ранних стадиях роста ячменя (*Hordeum vulgare* L.)**

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект No. 19–29–05112А, «Трансформация свойств и строения внутриагрегатных пор суглинистых почв при переменной влажности и внешней нагрузке», проекты фундаментальных научных исследований, 04 БИОЛОГИЯ, 04–180 Почвоведение; РФФ, проект No. 19–74–10070 «Универсальный метод сегментации томографических изображений порового пространства почв на основе машинного обучения: от современных локальных алгоритмов к синтетическим томограммам», а также с привлечением оборудования Центра коллективного пользования Почвенного института имени В.В. Докучаева «Функции и свойства почв и почвенного покрова».

*Морфометрическое динамическое описание роста корней прорастающего семени и состава окружающей почвенной микробиоты в зависимости от архитектуры пахотного слоя почв является важной методической и практической проблемой в агропочвоведении, агрофизике и биологии почв. В модельном физическом опыте использованы семена ячменя (сорт Михайловский). Семена укладывали в специальные боксы из ПВХ объемом около 3 см<sup>3</sup> на границе двух слоев различной плотности, насыпанных из гумусового горизонта (диапазон плотности почвы от 0,7 до 1,2 г/см<sup>3</sup>). Внутри бокса создавалась оптимальная для растений влажность. Гумусовый горизонт отобран из агродерново-подзолистой почвы – Albic Glossic Retisols (Lomic, Citanic). В период от посадки до 7 суток исследовали динамику развития корневой системы с помощью рентгеновского микротомографа «Bruker SkyScan 1172G» (Bruker, Бельгия). Созданная архитектура почвы по плотности существенно не влияла на рост и развитие корней во всех повторностях. Одновременно в динамике изучали состав почвенной микробиоты, который реконструировали по микробным маркерам (жирным кислотам и их производным). Маркеры определяли методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. Общая численность бактерий увеличивалась к 5-м суткам при доминировании в биоте трех филумов: Actinobacteria, Proteobacteria и Firmicutes. В филуме Actinobacteria в наибольшем количестве представлены аэробные гидролитики сложных углеводов Rhodococcus equi, в филуме Firmicutes – анаэробный гидролитик*

*Ruminococcus sp.* и анаэробный азотфиксатор *Clostridium pasteurianum*, а в филуме *Proteobacteria* – аэробный нитрификатор *Nitrobacter sp.* при последующем снижении численности на 7-е сутки. Увеличение обилия этих видов свидетельствует о первоначальном разрушении целлюлозной оболочки зерна, а также процессе фиксации и преобразовании азота в микробиоте прорастающего семени, необходимого для формирования C/N соотношения. Компьютерная томография позволила зафиксировать объемное распределение корней в различные периоды прорастания. На начальном этапе корни успешно осваивали все почвенное пространство вне зависимости от архитектуры пахотного слоя, созданной в экспериментах.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия; архитектура семенного ложа; агродерново-подзолистая почва; микробное сообщество; Albic; Glossic Retisols; Lomic; Cutanic.

**Для цитирования:** Шейн Е.В., Верховцева Н.В., Суздалева А.В., Абросимов К.Н. Рентгеновская компьютерная томография структуры корней и динамика почвенной биоты на ранних стадиях роста ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 6–21. doi: 10.17223/19988591/53/1

## Введение

Ризосфера – поле исследования для ряда естественных наук, таких как земледелие, физика почв, микробиология, биофизика, биотехнология, молекулярная биология, экология и другие с интегрированными между собой комплексными фундаментальными и прикладными аспектами. Одним из важных начальных этапов жизни растения, играющих центральную роль в формировании урожая зерновых культур, является процесс прорастания семени. В этот период семя теряет состояние покоя, активируются генетические программы на развитие зародыша, мобилизуются запасы питательных веществ. Показано, что это строго координированный биохимический процесс [1, 2]. Важную роль в этой координации играют и сообщества микроорганизмов, которые находятся и на поверхности, и внутри семени [3], участвуя в гидролизе слоев семенной оболочки. Разнообразные ткани семени состоят из материалов, которые отличаются не только химическим составом, но и специфическими особенностями водопоглощения [4]. Научные проблемы, возникающие в этой определенной в пространстве и во времени системе почва – растение, являются весьма востребованными и информативными в отношении дальнейшей судьбы развития и роста растений, их функционирования, формирования продуктивности и ряда других биологических особенностей. Анализ системы почва – растение – почвенная биота является одной из задач современной агрофизики. В центре динамических взаимоотношений почва – микробиота – растение находятся вопросы и физики, и биофизики почв, так как структура семенного ложа и формирование корневой системы являются важнейшими параметрами, которые необходимо учитывать при совершенствовании агротехнологий [5, 6]. Именно в связи с этими особенностями формирования взаимодействий органов растений с окружающей почвенной средой в настоящее

время указанная проблематика является активно исследуемым направлением в агробиологии и, соответственно, в агрофизике и биофизике [6–8].

Почвенная структура и архитектура порового пространства представляет собой арену для развития почвенных процессов и физического, и биологического характера. В этой системе как агрегаты оказывают влияние на почвенную биоту, так и почвенные микроорганизмы участвуют в их формировании [9]. Отмечена необходимость сочетания томографического подхода с химическим и биологическим анализом. К такому выводу пришли М. Вологини с соавторами, исследуя потенциально благоприятные для развития микроорганизмов агрегаты с точки зрения морфологической доступности [10].

Следует отметить, что особое внимание в процессе формирования взаимоотношений прорастающего семени с окружающей почвой уделяется проблемам образования и развития вокруг него специфической микробиоты [11]. Считается, что группы микроорганизмов могут локально заселять корневую систему [12], иметь различный состав и существенную динамичность распределения вокруг прорастающего семени и развивающихся корней. Эта особенность – трудная для экспериментального исследования, в частности количественное ее решение в динамическом аспекте. Действительно, на данный момент практически не существует неразрушающих методов одновременного исследования формирования корневых систем, ризосферы и состава микробиоты в этой зоне. Отдельные попытки такого рода исследований пока лишь внушают надежду на проведение количественных экспериментов и получения стабильных взаимосвязей, в частности использование неразрушающих методов рентгеновской томографии [6, 13–15]. Однако даже применяя компьютерную томографию, остаются вопросы количественной характеристики распространения корней растений на начальном этапе, а также проблемы фиксации изменения микробиологической взаимосвязанной системы вокруг прорастающего семени и формирующейся ризосферы, что чрезвычайно важно для изучения и понимания проблем современной агробиологии, микробиологии и физики почв. Количественное решение обозначенных выше задач, особенно в их динамическом аспекте, – чрезвычайно сложная методическая проблема. В данной работе предпринята попытка методами рентгеновской компьютерной томографии изучить рост корней проростков ячменя на ранних стадиях развития при одновременном исследовании изменения численности и доминирующих групп микроорганизмов в прикорневой биоте.

### Материалы и методики исследования

В качестве объектов изучения выбраны семена ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Михайловский. Средние значения для исследуемого объекта по энергии прорастания составляли 92%, по всхожести – 61%. Семена посажены в специальные рентген-прозрачные бюксы с агродерново-подзоли-

стой почвой (по классификации WRB 2014 г. (версия 2015 г.)) – Albic Glossic Retisols (Lomic, Cutanic). Место отбора проб – Московская область, с. Ельдигино 56°07'23" северной широты, 37°48'16" восточной долготы. В бюксах создавалась определенная по плотности архитектура почвы: верхняя более рыхлая (надсеменная) часть семенного ложа состояла из просеянных агрегатов (3–5 мм), в нижней части – уплотненная неагрегированная та же самая почва, доведенная до плотности около 1,2 г/см<sup>3</sup>. Основные свойства агродрново-подзолистой почвы указаны в таблице.

**Физические свойства пахотных гор дерново-подзолистой почвы  
(Зеленоградский опорный пункт Почвенного института  
имени В.В. Докучаева, Пушкинский р-н, Московская обл.)  
[Physical properties of arable mountains of sod-podzolic soil (Zelenograd reference  
point of V. V. Dokuchaev Soil Institute, Pushkinsky district, Moscow region)]**

Глубина, см [Depth, cm]	Гранулометрический состав фракций, % масс. [Texture of soil, % mass]			НВ [FC], %	Коэффициент фильтрации, см/сут [Saturation con- ductivity, cm/day]	C <sub>org</sub> , %
	< 0,002	0,002–0,05	> 0,05			
0–10	10,50	84,78	4,72	30,1	21,6	1,23

*Примечание.* НВ – наименьшая влагоемкость.  
[Note. FC - field capacity].

В бюксах установлена оптимальная влажность (29–30%, близкая к наименьшей влагоемкости) для прорастания семени. Семя ячменя размещалось на границе двух слоев так, что оно лежало на плотном субстрате и укрывалось рыхлой агрегированной почвой.

Для томографической съемки использован рентгеновский микротомограф «Bruker SkyScan 1172G» (Bruker, Бельгия). Томографические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием «Функции и свойства почв и почвенного покрова» Почвенного института им. В.В. Докучаева. Томографическая съемка проведена на 1, 3, 4, 5, 6, 7-е сутки, несколько раз (в динамике) по мере роста семени при разрешении 16,1 μm. Параметры исследования, такие как размер образца и настройки съемки неоднократно отрабатывались в других исследованиях [16–22], но в данном случае важен приоритет скорости из-за быстрого роста корней. Томография одного сегмента (из пяти в образце) при оптимальных настройках занимает около 40–60 мин, но в нашем случае удалось сократить время до 10 минут за счет снижения количества накоплений и съемки объекта с поворотом на 180° вместо 360°. В результате обработки данных компьютерной томографии получена объемная структура с четко различимыми рентгенконтрастными фазами (почва, поровое пространство, зерно с проростком и корнями), но осложненное высокой шумностью изображения. Автоматическая

сегментация фаз в таких условиях оказалась частично работоспособной – методом Оцу [23] успешно можно сегментировать только почву. По этой причине в исследовании использована ручная сегментация с применением фильтров изображений, что с высокой степенью достоверности позволило разделить поровое пространство и органическое вещество прорастающего семени.

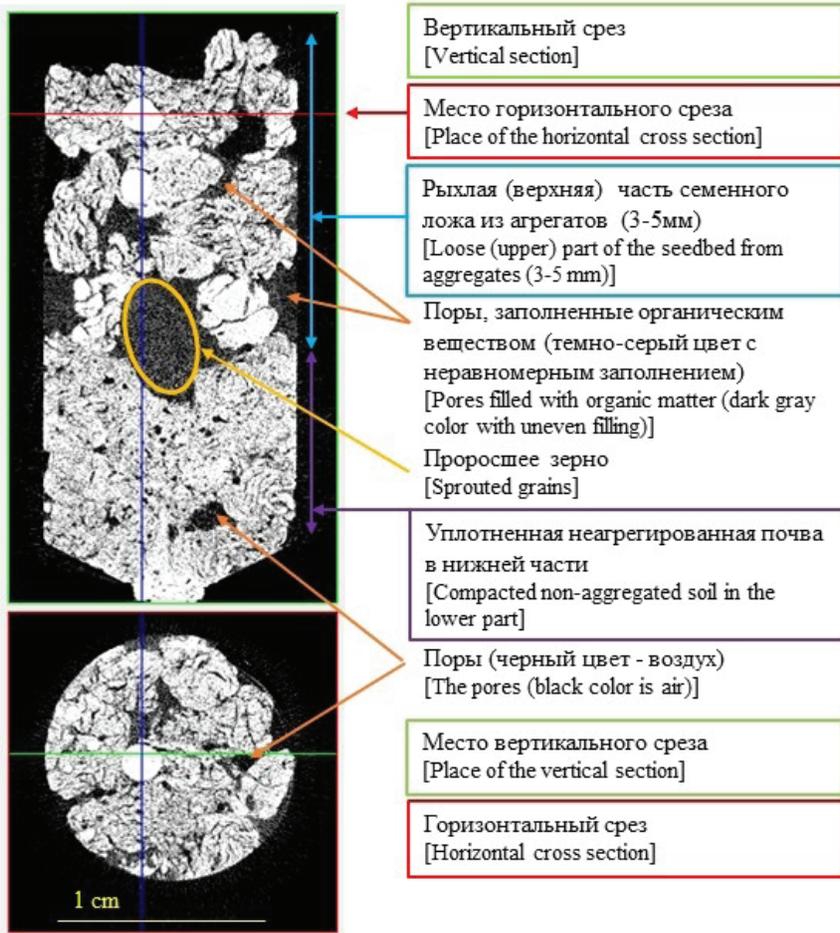
Помимо визуализации объемной структуры проросшего семени рассчитан объем семени и корней на каждом этапе исследования при помощи программного обеспечения Bruker CT analyzer (СТan).

Состав микробного сообщества реконструировали по микробным маркерам (жирным кислотам и их производным – жирным гидроксикислотам и альдегидам), которые определяли после кислого метанолиза почвенных образцов молекулярным методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС). Анализ проводили на ГХ-МС системе «HP-5973 Agilent» (Agilent Technologies Inc, США). Подробно методика анализа описана в [24, 25]. Анализировали следующие образцы: контрольный образец – исходная почва, в которой не производилось выращивание ячменя; почва из образцов с прорастающим семенем ячменя на 5-е и 7-е сутки. Измерения проведены в трехкратной повторности.

Гранулометрический состав исследуемых почвенных объектов определен методом лазерной дифракции, на лазерном анализаторе размера частиц «Analysette 22 comfort» (FRITCH, Германия). Определение содержания углерода в почвенных образцах проведено методом сухого сжигания в потоке воздуха – с помощью экспресс-анализатора «АН- 7529» (завод-изготовитель ПО «Измеритель», г. Гомель) [26]. Плотность почв, наименьшая влагоемкость, коэффициент фильтрации определены общепринятыми методами, подробно описанными в [27].

### **Результаты исследования и обсуждение**

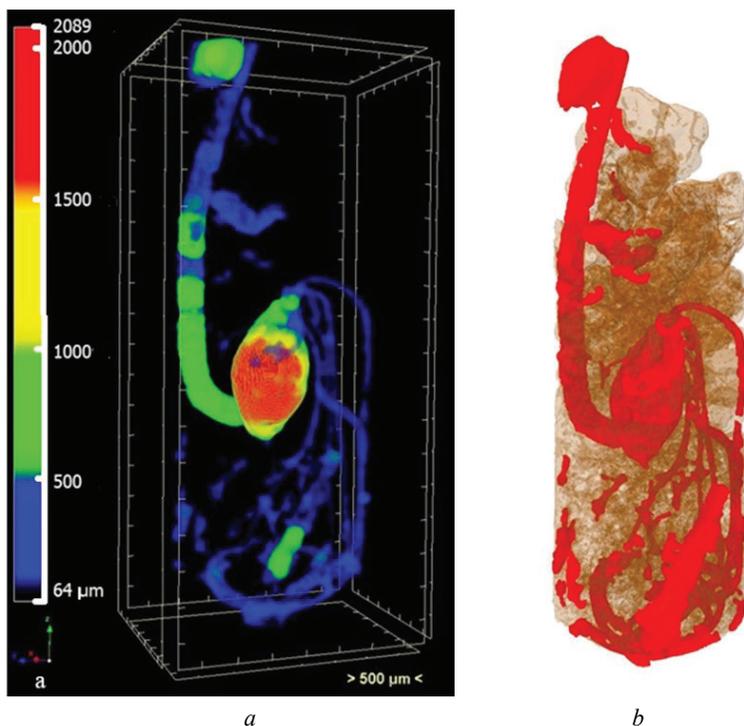
Анализ томографического изображения (рис. 1) экспериментального бокса с почвой показывает, что как на горизонтальном, так и на вертикальном срезах отчетливо различаются надсеменной и подстилающий подсеменной слои различной плотности. На снимках хорошо видно и положение семени ячменя в подготовленном боксе с двуслойной почвенной архитектурой, ясно выделяется различие в поровом пространстве двух слоев специально созданной архитектуры семенного ложа. Верхний, состоящий из водоустойчивых агрегатов агродерново-подзолистой почвы, имел высокую пористость с отдельными явно заметными макропорами. Межагрегатные поры в этом слое имели размер до 0,6–0,8 мм, что способствовало хорошей аэрации надсеменного слоя. Нижний, более плотный и однородный, представлял более близкую к однородной пористости массу, на которой находилось семя. Тонкие поры имели в основном диаметр 0,015–0,02 мм. Нижний, более плотный и однородный, слой представлял более близкую к однородности по пористости массу, на которой и находилось семя.



**Рис. 1.** Томографическое изображение почвы в боковых вертикальном и горизонтальном срезах. Видно положение семени и границы между уплотненным и рыхлым (агрегатными) слоями.

В центре вертикального среза отмечено положение семени  
**[Fig. 1.** Tomographic image of the soil in the lateral vertical and horizontal sections.  
 Visible position of the seed and the border between the compacted and loose (aggregation)  
 layers. In the center of the vertical section, the position of the seed is marked]

На рис. 2 показана томографическая реконструкция прорастающего семени ячменя на 4-й день после посадки. На томограмме хорошо различаются coleoptиле и растущие корни. Развитие корней происходило во всех повторностях идентичным образом. Созданная архитектура почвы по плотности не оказала существенного пагубного влияния на рост корней. Видимо, в этот начальный период роста во влажных условиях доминировали биологические программы роста растений, в которых геотропизм и необходимость освоения почвенного пространства играют главенствующую роль.



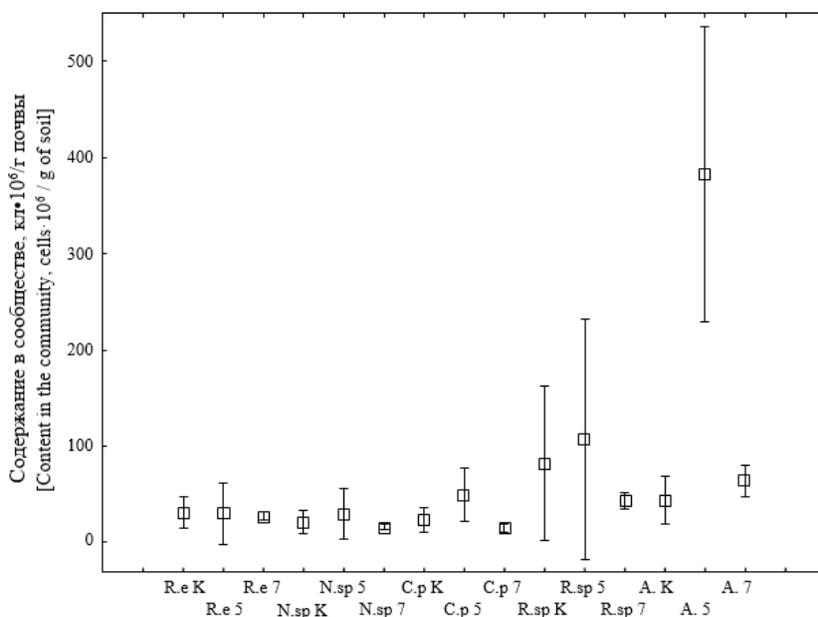
**Рис. 2.** Томографическая объемная реконструкция прорастания зерна ячменя на плотном зерновом ложе. Толщина семени, проростка и корней (а); моделирование проросшего семени (красный цвет) на фоне почвы (коричневый цвет) (b)

[Fig. 2. Tomographic reconstruction (3-D) of barley grain germination on a dense soil grain bed. The thickness of the seed, seedling and roots (a); modeling of sprouted seed (red) against the background of the soil (brown) (b)]

При помощи томографической съемки наблюдалось сокращение объемов семени за период с 3-х по 7-е сутки с 50 до 36% от общего объема растения, находящегося в зоне наблюдения. При этом изменение доли объема, занимаемой корневой массой, составило от 22 до 61%.

Реконструированный состав микробного комплекса по жирнокислотному анализу мембранных структур бактерий с использованием баз этих микробных маркеров («Sherlock MIDI Inc» (США) и «Entire Collection» (Швеция)) показал, что он включает 38 видов микроорганизмов, относящихся к пяти филумам.

На рис. 3 приведена статистика количества бактерий основных групп микроорганизмов. По оси абсцисс указаны виды в различные сроки наблюдений: К – контроль, исходная почва, в которой не производилось выращивание ячменя; 5 – на пятый день; 7 – на седьмой день опыта; через нижнее подчеркивание указаны виды бактерий, для которых приведена статистика. Следует отметить явное и статистически значимое доминирование рода *Ruminococcus* и филума Actinobacteria, в особенности на 5-й день эксперимента.



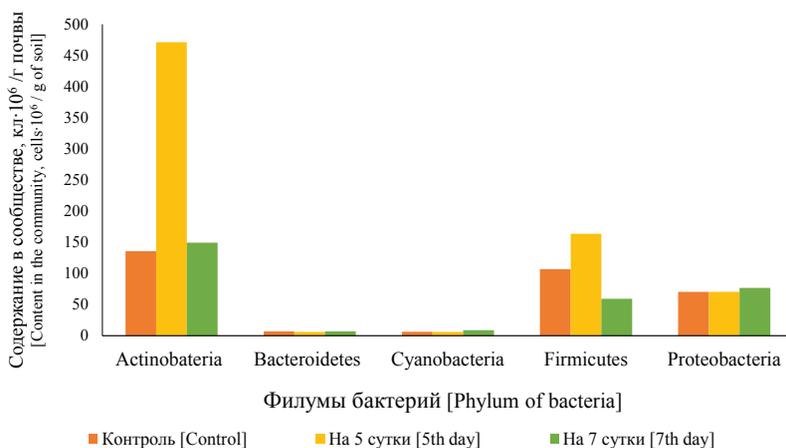
**Рис. 3.** Статистика количества микроорганизмов (кл·10<sup>6</sup>/г) различных видов в почвенных образцах: исходная почва, без растений (К) и на 5-е и 7-е сут. К – исходная почва без выращивания растений ячменя; 5 и 7 – почва из образцов с прорастающим семенем ячменя на 5-е и 7-е сутки соответственно  
 [Fig. 3. Statistics of the number of microorganisms, cells·10<sup>6</sup>/g of different types of soil samples. K - The original soil in which no barley plants were grown; 5 and 7 - Sample soils with the germinating barley seed on the 5th and the 7th days]

(□ Mean □ Mean±SD ⊥ Mean±1,96\*SD):

R.e – *Rhodococcus equi*, N.sp – *Nitrobacter* sp., C.p – *Clostridium pasteurianum*, R.sp – *Ruminococcus* sp., A. – Actinobacteria

Следует отметить, что общая численность бактерий также увеличивалась к 5-м суткам при постоянном доминировании в микробиоте трёх филумов – Actinobacteria, Proteobacteria и Firmicutes, два других – Bacteroidetes и Cyanobacteria – представлены в незначительном количестве. На рис. 4 представлена динамика основных пяти филумов бактерий на 5-е и 7-е сутки проращивания. Статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение численности бактерий отмечено на 5-е сутки проращивания для филума Actinobacteria.

В филуме Actinobacteria в наибольшем количестве на 5-е сутки представлены аэробные гидролитики сложных углеводов *Rhodococcus equi*, в филуме Firmicutes – анаэробный азотфиксатор *Clostridium pasteurianum*, в филуме Proteobacteria – аэробный нитрификатор *Nitrobacter* sp. при последующем снижении численности на 7-е сутки. Увеличение этих видов свидетельствует о первоначальном разрушении целлюлозной оболочки зерна и процессах фиксации и преобразования азота в микробиоте прорастающего семени, необходимого для формирования C/N соотношения.



**Рис. 4.** Относительное обилие филумов бактерий  
 [Fig. 4. Relative abundance of bacterial phyla]

Увеличивалась численность *Cellulomonas* sp. на 5-е сутки с последующим снижением на 7-е. Этот вид является представителем факультативно анаэробных целлюлозолитиков, так же как и другой представитель филума Actinobacteria, *Pseudonocardia* sp. – активный целлюлозолитик с комплексом целлюлозолитических ферментов. Увеличение их численности на 5-е сутки, предположительно, связано с активным прорастанием семени и проявлением их функции, способствующей разрушению семенной оболочки. Продуктами гидролиза целлюлозы могут быть углекислый газ, вода.

Тенденция пика численности на 5-е сутки со значительным ее сокращением к 7-м суткам проявляется и у анаэробных азотфиксаторов *C. pasteurianum*, что предположительно связано с иссушением почвы и сменой условий в сторону аэробных.

Наблюдаемое обилие анаэробных *Ruminococcus* sp. и видов железоредукторов можно объяснить химизмом дерново-подзолистой почвы, присутствием  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  в почвенно-поглощающем комплексе, который восстанавливается анаэробными железоредукторами. Так же как и у других анаэробов, их численность снижается к 7-м суткам. Эти виды в процессе своего анаэробного метаболизма образуют такие газообразные компоненты почвенного воздуха, как водород, углекислый газ, кислород.

Постепенное увеличение численности к 7-м суткам происходило у аэробных видов, таких как *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. vesicularis*, *Sphingomonas adgesiva*, что также косвенно свидетельствует об изменении газового состава в сторону аэробных условий. По мере изменения газового режима изменялась численность аэробных и анаэробных микроорганизмов, соответственно.

В составе микробиоты доминировал филум Actinobacteria, а из видов – *Rhodococcus equi* на всем промежутке исследования. При этом к 5-м суткам экс-

перимента содержание актинобактерий возрастало, по-видимому, из-за участия этих микроорганизмов в распаде семенной оболочки. В дальнейшем, вплоть до окончания эксперимента на 7–10-е сутки содержание актинобактерий несколько уменьшилось, практически достигнув исходного уровня.

Таким образом, даже в первый этап прорастания семени численность и состав почвенной биоты подвергалась динамическим изменениям, протекающим физиологически согласованно с процессом прорастания. Иссушение почвы приводит к увеличению численности аэробных видов к 7-м суткам и уменьшению анаэробных видов. Представленное на томографической съемке снижение объема семени за период с 3-х по 7-е сутки с 50 до 36% от общего объема растения происходило при постоянном доминировании в микробиоте актинобактерий (аэробные *Rhodococcus equi*) – «активных гидролитиков», разлагающих сложные органические соединения (оболочку семени) в аэробных условиях. При этом суммарная численность бактерий увеличивалась к 5-м суткам. В последующие 2 суток она снижалась (уменьшается численность актинобактерий), что связано, по-видимому, с окончанием разрушения оболочки семени.

В ходе прорастания семени формируются поры, заполненные водой, газом или органическим веществом. Структура микробного сообщества изменяется в ответ на происходящие процессы, при этом происходит накопление продуктов метаболизма аэробных и анаэробных видов микроорганизмов. Количественное исследование комплекса микроорганизмов молекулярным методом позволяет отобразить реакцию микробиома на структурные изменения в почве, так как определенные условия стимулируют увеличение доли в сообществе видов с соответствующими экологическими функциями. Сочетание с компьютерной визуализацией, полученной в результате применения метода рентгеновской томографии, позволяет яснее охарактеризовать происходящие в ризосфере процессы.

### Выводы

1. Компьютерная томография может быть успешно использована для визуализации роста корней в агрегированных негомогенных средах, в частности в агрегированном и уплотненном слоях агродерново-подзолистой почвы. К недостаткам метода можно отнести отсутствие отработанных методик съемки живых объектов и затруднения при сегментации проросшего семени и порового пространства.

2. На первых стадиях проростков ячменя (7 дней после посадки) корни успешно осваивают все почвенное пространство вне зависимости от исследованной в экспериментах плотности (в диапазоне 1,2–0,7 г/см<sup>3</sup>).

3. Общая численность бактерий увеличивается к 5-м суткам при постоянном доминировании в микробиоте активных гидролитиков филума Actinobacteria (аэробные *Rhodococcus equi*) с последующим её снижением на 7-е сутки, что связано, по-видимому, с разрушением семенной оболочки.

*Литература*

1. He H., Willems LAJ., Batushansky A., Fait A., Hanson J., Nijveen H., Hilhorst HWM., Bentsink L. Effects of Parental Temperature and Nitrate on Seed Performance are Reflected by Partly Overlapping Genetic and Metabolic Pathways // *Plant and Cell Physiology*. 2016. Vol. 57, No. 3. PP. 473–487. doi: [10.1093/pcp/pcv207](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv207)
2. Kai Shu, Xiao-dong Liu, Qi Xie, Zu-hua He. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination // *Molecular plant*. 2016. Vol. 9. PP. 34–45. doi: [10.1016/j.molp.2015.08.010](https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010)
3. Artursson V., Finlay R.D., Jansson J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth // *Environmental microbiology*. 2006. No. 8. PP. 1–10. doi: [10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x)
4. Steinbrecher T., Leubner-Metzger G. The biomechanics of seed germination // *Journal of Experimental Botany*. 2017. Vol. 68, No. 4. PP. 765–783. doi: [10.1093/jxb/erw428](https://doi.org/10.1093/jxb/erw428)
5. Круглов Ю.В., Умаров М.М., Мазиров М.А., Хохлов Н.Ф., Патыка Н.В., Думова В.А., Андронов Е.Е., Костина Н.В., Голиченков М.В. Изменение агрофизических свойств и микробиологических процессов дерново-подзолистой почвы в экстремальных условиях высокой температуры и засухи // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2012. Вып. 3. С. 79–87.
6. Mawodza T., Burca G., Casson S., Menon M. Wheat root system architecture and soil moisture distribution in an aggregated soil using neutron computed tomography // *Geoderma*. 2020. Vol. 359. 113988 doi: [10.1016/j.geoderma.2019.113988](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113988)
7. Li W.Z., Zhou H., Chen X.M., Peng X.H., Yu X.C. Characterization of aggregate microstructures of paddy soils under different patterns of fertilization with synchrotron radiation micro-CT // *Acta Pedologica Sinica*. 2014. Vol. 51, No. 1. PP. 67–74. doi: [10.11766/trxb201307160340](https://doi.org/10.11766/trxb201307160340)
8. Daly K.R., Tracy S.R., Crout N.M.J., Mairhofer S., Pridmore T.P., Mooney S.J., Roose T. Quantification of root water uptake in soil using X-ray computed tomography and image-based modelling // *Plant Cell Environ*. 2018. Vol. 41, No. 1. PP. 121–133. doi: [10.1111/pce.12983](https://doi.org/10.1111/pce.12983)
9. Zhou H., Peng X., Peth S. Xiao T.Q. Effects of vegetation restoration on soil aggregate microstructure quantified with synchrotron-based micro-computed tomography // *Soil and Tillage Research*. 2012. Vol. 124. PP. 17–23. doi: [10.1016/J.STILL.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/J.STILL.2012.04.006)
10. Voltolini M., Taş N., Wang S., Brodie E.L. Ajo-Franklin Quantitative characterization of soil microaggregates: New opportunities from sub-micron resolution synchrotron X-ray microtomography // *Geoderma*. 2017. Vol. 305. PP. 382–393. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.06.005)
11. Marilley L., Aragno M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots // *Applied soil ecology*. 1999. Vol. 13. PP. 127–136. doi: [10.1016/S0929-1393\(99\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00028-1)
12. Yang C.H., Crowley D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location plant iron nutritional status // *Applied and environmental microbiology*. 2000. Vol. 66. PP. 345–351. doi: [10.1128/AEM.66.1.345-351.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000)
13. Gerke K.M., Skvortsova E.B., Korost D.V. Tomographic method of studying soil pore space: current perspectives and results for some Russian soils // *Eurasian Soil Sci*. 2012. Vol. 45, No. 7. PP. 700–709. doi: [10.1134/S1064229312070034](https://doi.org/10.1134/S1064229312070034)
14. Ivanov A.L., Shein E.V., Skvortsova E.B. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural–functional assessment of pore space // *Eurasian Soil Sci*. 2019. Vol. 52, No. 1. PP. 50–57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
15. Jiang Z., van Dijke M.I.J., Geiger S., Ma J., Couples G.D., Li X. Pore network extraction for fractured porous media // *Advances in Water Resources*. 2017. Vol. 107. PP. 280–289. doi: [10.1016/j.advwatres.2017.06.025](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2017.06.025)

16. Skvortsova E.B., Shein E.V., Abrosimov K.N., Romanenko K.A., Yudina A.V., Klyueva V.V., Khaidapova D.D., Rogov V. V. The Impact of Multiple Freeze–Thaw Cycles on the Microstructure of Aggregates from a Soddy-Podzolic Soil: A Microtomographic Analysis // *Eurasian Soil Science*. 2018. Vol. 51, No. 2. PP. 190–199. doi: [10.1134/S1064229318020102](https://doi.org/10.1134/S1064229318020102)
17. Ivanov A.L., Shein E.V., Skvortsova E.B. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural–functional assessment of pore space // *Eurasian Soil Science*. 2019. Vol. 52, No. 1. PP. 50–57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
18. Müller K., Katuwal S., Young I., McLeod M., Moldrup P., de Jonge L.W., Clothier B. Characterising and linking X-ray CT derived macroporosity parameters to infiltration in soils with contrasting structures // *Geoderma*. 2018. Vol. 313. PP. 82–91. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.10.020](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.020)
19. Helliwell J.R., Sturrock C.J., Grayling K.M., Tracy S.R., Flavel R.J., Young I.M., Whalley W.R., Mooney S.J. Applications of X-ray computed tomography for examining biophysical interactions and structural development in soil systems: a review // *European Journal of Soil Science*. 2013. Vol. 64. PP. 279–297. doi: [10.1111/ejss.12028](https://doi.org/10.1111/ejss.12028)
20. Borges J.A.R., Pires L.F., Cássaro F.A.M., Roque W.L., Heck R.J., Rosa J.A., Wolf F.G. X-ray microtomography analysis of representative elementary volume (REV) of soil morphological and geometrical properties // *Soil Tillage Research*. 2018. Vol. 182. PP. 112–122. doi: [10.1016/j.still.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.still.2018.05.004)
21. Wildenschild D., Rivers M.L., Porter M.L., Iltis G.C., Armstrong R.T., Davit Y., Anderson S.H., Hopmans J.W. Using synchrotron-based X-ray microtomography and functional contrast agents in environmental applications In: *Soil–Water–Root Processes: Advances in Tomography and Imaging* // The Soil Science Society of America, Inc. 2013. PP. 1–22. doi: [10.2136/sssaspecpub61.c1](https://doi.org/10.2136/sssaspecpub61.c1)
22. Wildenschild D., Sheppard A.P. X-ray imaging and analysis techniques for quantifying pore-scale structure and processes in subsurface porous medium systems // *Advances in Water Resources*. 2013. Vol. 51. PP. 217–246. doi: [10.1016/j.advwatres.2012.07.018](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.07.018)
23. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms // *IEEE Trans. Sys., Man., Cyber.: journal*. 1979. Vol. 9. PP. 62–66. doi: [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076)
24. Verkhovtseva N.V., Osipov G.A. Comparative Investigation of Vermicompost Microbial Communities // *Microbiology of composting*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2002. PP. 99–108. doi: [10.1007/978-3-662-08724-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4_8)
25. Shekhovtsova N.V., Marakaev O.A., Pervushina K.A., Osipov G.A. The underground organ microbial complexes of moorland spotted orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013. Vol. 4, No. 7B. PP. 35–42 doi: [10.4236/abb.2013.47A2005](https://doi.org/10.4236/abb.2013.47A2005)
26. Практикум по физике твердой фазы почв : учеб. пособие / Е.В. Шейн, Е.Ю. Милановский, Д.Д. Хайдапова, А.И. Поздняков, З.Н. Тюгай, Т.Н. Початкова, А.В. Дембовецкий. М. : Буки-Веди, 2017. 119 с.
27. Теории и методы физики почв / под ред. Е.В. Шейна, Л.О. Карпачевского. М. : Гриф и К., 2007. 616 с.

Поступила в редакцию 10.07.2020 г.; повторно 29.12.2020 г.;  
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

#### Авторский коллектив:

**Шейн Евгений Викторович**, д-р биол. наук, профессор кафедры физики и мелиорации почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 12).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0101-5293>

E-mail: [evgeny.shein@gmail.com](mailto:evgeny.shein@gmail.com)

**Верховцева Надежда Владимировна**, д-р биол. наук, профессор кафедры агрохимии и биохимии растений, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 12).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6830-4295>

E-mail: [verh48@list.ru](mailto:verh48@list.ru)

**Суздалева Ангелина Владимировна**, аспирант кафедры физики и мелиорации почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 12).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1525-8605>

E-mail: [avsuzdaleva@gmail.com](mailto:avsuzdaleva@gmail.com)

**Абросимов Константин Николаевич**, канд. геогр. наук, с.н.с. отдела физики, гидрологии и эрозии почв, Почвенный институт им. В.В. Докучаева (Россия, 119017 г. Москва, Россия, Пыжевский пер., 7, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3552-8054>

E-mail: [kv2@bk.ru](mailto:kv2@bk.ru)

**For citation:** Shein EV, Verkhovtseva NV, Suzdaleva AV, Abrosimov KN. X-ray computed tomography of the structure of roots and dynamics of soil biota in the early growth stages of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:6-21. doi: 10.17223/19988591/53/1 In Russian, English Summary

**Evgeny V Shein<sup>1,2</sup>, Nadezhda V Verkhovtseva<sup>1</sup>,  
Angelina V Suzdaleva<sup>1</sup>, Konstantin N Abrosimov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>VV Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russian Federation

### **X-ray computed tomography of the structure of roots and dynamics of soil biota in the early growth stages of barley (*Hordeum vulgare* L.)**

The architecture of the seed bed, a certain alternation of compacted and loose sections of the arable horizon, largely determines the development of the root system of plants. The morphology and growth of the root system of the germinating seed in the created seed bed is also determined by the composition of the surrounding soil biota. Dynamic studies of the development of the root system and composition of the surrounding soil biota is an essential methodological and practical problem in soil cultivation, agrophysics, and soil biology. This task is especially important in the first few days when the root system is laid and the plant rhizosphere is formed. Modern tomography makes it possible to carry out such studies that do not violate the soil-root biological system, in particular, in model mesoscale experimental physical models. The aim of this research was to use x-ray computed tomography to study the structure of the roots of barley seedlings in the early stages of development, while simultaneously studying changes in the number and dominant groups of microorganisms in the basal biota.

Barley seeds (variety Mikhailovsky) in a model physical experiment with a two-layer soil bed density (soil density range from 0.7 to 1.2 g / cm<sup>3</sup>) Albic Glossic Reticols (Lomic, Cutanic), WRB, 2014 were laid for germination at the layer boundary in a special cylindrical box with a volume of about 3 cm<sup>3</sup> at optimal humidity. The position of the seed in the soil of the seedbed model is shown in the tomographic image (See Fig. 1). During the period from planting to 7 days, the dynamics of the root system was studied using a Bruker X-ray microtomography “SkyScan 1172G” (Bruker, Belgium) while studying the composition of soil biota, which was reconstructed by microbial markers (fatty acids and their derivatives). Markers were determined by molecular gas

chromatography - mass spectrometry. Computer tomography allowed to record the volume distribution of roots at different periods of germination in the aggregated and compacted layers of agro-sod-podzolic soil. In this case, the roots successfully mastered the entire soil space, regardless of the plowing architecture of soil density created at the initial stage of germination. The total number of bacteria also increased by the 5th day with the constant dominance of 3 phyla: Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes in the biota; the other two, Bacteroidetes and Cyanobacteria, were represented in relatively small numbers. In the phylum Actinobacteria, aerobic hydrolytics of complex carbohydrates *Rhodococcus equi* were presented in the largest amount on the 5th day, in the Firmicutes phylum it is anaerobic hydrolytic *Ruminococcus* sp. and the anaerobic nitrogen fixator *Clostridium pasteurianum*, in the phylum Proteobacteria-the aerobic nitrifier *Nitrobacter* sp. with a subsequent decrease in the number on the 7th day. The increase in these species indicates the initial destruction of the cellulose shell of the grain and the processes of fixation and conversion of nitrogen in the microbiota of the germinating seed, necessary for the formation of the C/N ratio.

During the germination of the seed, pores are formed that are filled with water, gas, or organic matter. The structure of the microbial community changes in response to the ongoing processes, while the accumulation of metabolic products of aerobic and anaerobic species of microorganisms occurs. The quantitative study of the complex of microorganisms by the molecular method allows us to display the reaction of the microbiome to structural changes in the soil, since certain conditions stimulate an increase in the share of species with appropriate ecological functions in the community. The combination with the computer visualization obtained as a result of the application of the X-ray tomography method makes it possible to more clearly characterize the processes occurring in the rhizosphere.

*The paper contains 3 Figures, 1 Table and 27 References.*

**Keywords:** soil structure; seed bed architecture; soil biota; agro-soddy-podzolic soil; Albic Glossic Retisols; Lomic; Cutanic.

**Funding:** The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 19-29-05112A, “Transformation of properties and structure of intra-aggregate pores of loamy soils under variable humidity and external load”, projects of basic scientific research, 04 BIOLOGY, 04-180 soil science; Russian Science Foundation, Project No.19-74-10070 “Universal method of segmentation of tomographic images of soil pore space based on machine learning: from modern local algorithms to synthetic tomograms”, as well as with the involvement of the equipment of the Center for collective use of VV Dokuchaev Soil Institute “Functions and properties of soils and soil cover”.

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. He H, Willems LAJ, Batushansky A, Fait A, Hanson J, Nijveen H, Hilhorst HWM, Bentsink L. Effects of parental temperature and nitrate on seed performance are reflected by partly overlapping genetic and metabolic pathways. *Plant and Cell Physiology*. 2016;57(3):473-487. doi: [10.1093/pcp/pcv207](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv207)
2. Kai Shu, Xiao-dong Liu, Qi Xie, Zu-hua He. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*. 2016;9:34-45. doi: [10.1016/j.molp.2015.08.010](https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010)
3. Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. 2006;8:1-10. doi: [10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x)
4. Steinbrecher T, Leubner-Metzger G. The biomechanics of seed germination. *J Experimental Botany*. 2017;68(4):765-783. doi: [10.1093/jxb/erw428](https://doi.org/10.1093/jxb/erw428)

5. Kruglov YuV, Umarov MM, Mazirov MA, Khokhlov NF, Patyka NV, Dumova VA, Andronov EE, Kostina NV, Golichenkov MV. Changes in both agro-physical properties and microbiological processes of sod-podzolic soils under extreme conditions of high temperature and drought. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2012;3:79-87. In Russian
6. Mawodza T, Burca G, Casson S, Menon M. Wheat root system architecture and soil moisture distribution in an aggregated soil using neutron computed tomography. *Geoderma*. 2020;359:113988. doi: [10.1016/j.geoderma.2019.113988](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113988)
7. Li WZ, Zhou H, Chen XM, Peng XH, Yu XC. Characterization of aggregate microstructures of paddy soils under different patterns of fertilization with synchrotron radiation micro-CT. *Acta Pedologica Sinica*. 2014;51(1):67-74. doi: [10.11766/trxb201307160340](https://doi.org/10.11766/trxb201307160340)
8. Daly KR, Tracy SR, Crout NMJ, Mairhofer S, Pridmore TP, Mooney SJ, Roose T. Quantification of root water uptake in soil using X-ray computed tomography and image-based modelling. *Plant Cell Environ*. 2018;41(1):121-133. doi: [10.1111/pce.12983](https://doi.org/10.1111/pce.12983)
9. Zhou H, Peng X, Peth S, Xiao TQ. Effects of vegetation restoration on soil aggregate microstructure quantified with synchrotron-based micro-computed tomography. *Soil and Tillage Research*. 2012;124:17-23. doi: [10.1016/J.STILL.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/J.STILL.2012.04.006)
10. Voltolini M, Taş N, Wang S, Brodie EL, Ajo-Franklin JB. Quantitative characterization of soil microaggregates: New opportunities from sub-micron resolution synchrotron X-ray microtomography. *Geoderma*. 2017;305:382-393. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.06.005)
11. Marilley L, Aragno M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*. 1999;13:127-136. doi: [10.1016/S0929-1393\(99\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00028-1)
12. Yang CH, Crowley DE. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66:345-351. doi: [10.1128/AEM.66.1.345-351.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000)
13. Gerke KM, Skvortsova EB, Korost DV. Tomographic method of studying soil pore space: current perspectives and results for some Russian soils. *Eurasian Soil Sci*. 2012;45(7):700-709. doi: [10.1134/S1064229312070034](https://doi.org/10.1134/S1064229312070034)
14. Ivanov AL, Shein EV, Skvortsova EB. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural-functional assessment of pore space. *Eurasian Soil Sci*. 2019;52(1):50-57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
15. Jiang Z, van Dijke MIJ, Geiger S, Ma J, Couples GD, Li X. Pore network extraction for fractured porous media. *Advances in Water Resources*. 2017;107:280-289. doi: [10.1016/j.advwatres.2017.06.025](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2017.06.025)
16. Skvortsova EB, Shein EV, Abrosimov KN, Romanenko KA, Yudina AV, Klyueva VV, Khaidapova DD, Rogov VV. The Impact of multiple freeze-thaw cycles on the microstructure of aggregates from a Soddy-Podzolic soil: A Microtomographic Analysis. *Eurasian Soil Science*. 2018;51(2):190-198. doi: [10.1134/S1064229318020102](https://doi.org/10.1134/S1064229318020102)
17. Ivanov AL, Shein EV, Skvortsova EB. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural-functional assessment of pore space. *Eurasian Soil Science*. 2019;52(1):50-57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
18. Müller K, Katuwal S, Young I, McLeod M, Moldrup P, de Jonge LW, Clothier B. Characterising and linking X-ray CT derived macroporosity parameters to infiltration in soils with contrasting structures. *Geoderma*. 2018;313:82-91. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.10.020](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.020)
19. Helliwell JR, Sturrock CJ, Grayling KM, Tracy SR, Flavel RJ, Young IM, WhalleyWR, Mooney SJ. Applications of X-ray computed tomography for examining biophysical interactions and structural development in soil systems: a review. *European J Soil Science*. 2013;64(3):279-297. doi: [/10.1111/ejss.12028](https://doi.org/10.1111/ejss.12028)
20. Borges JAR, Pires LF, Cássaro FAM, Roque WL, Heck RJ, Rosa JA, and Wolf FG. X-ray microtomography analysis of representative elementary volume (REV) of soil morphological and geometrical properties. *Soil and Tillage Research*. 2018;182:112-122. doi: [10.1016/j.still.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.still.2018.05.004)

21. Wildenschild D, Rivers ML, Porter ML, Iltis GC, Armstrong RT, Davit Y, Anderson SH, Hopmans JW. Using synchrotron-based X-ray microtomography and functional contrast agents in environmental applications In: *Soil-Water-Root Processes: Advances in Tomography and Imaging*. The Soil Science Society of America, Inc. 2013;61:1-22. doi: [10.2136/sssaspecpub61.c1](https://doi.org/10.2136/sssaspecpub61.c1)
22. Wildenschild D, Sheppard AP. X-ray imaging and analysis techniques for quantifying pore-scale structure and processes in subsurface porous medium systems. *Advances in Water Resources*. 2013;51:217-246. doi: [10.1016/j.advwatres.2012.07.018](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.07.018)
23. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*. 1979;9(1):62-66. doi: [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076)
24. Verkhovtseva NV, Osipov GA, Bolysheva TN, Kasatnikov VA, Kuzmina NV, Antsiferova EJ, Alexeeva AS. Comparative Investigation of Vermicompost Microbial Communities. *Microbiology of Composting*. 2002:99-108. doi: [10.1007/978-3-662-08724-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4_8)
25. Shekhovtsova NV, Marakaev OA, Pervushina KA, Osipov GA. The underground organ microbial complexes of moorland spotted orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013;4(7B):35-42 doi: [10.4236/abb.2013.47A2005](https://doi.org/10.4236/abb.2013.47A2005)
26. Shein EV, Milanovskii EYu, Khaydapova DD, Pozdnyakov AI, Tyugai ZN, Pochatkova TN, Demboveckii AV. Workshop on solid phase physics of soils. tutorial. Moscow: Buki-Vedi Publ.; 2017. 119 p. In Russian
27. *Theories and Methods of Soil Physics*. Shein EV and Karpachevskiy LO, editors. Moscow: Grif and K Publ.; 2007. 616 p. In Russian

*Received 10 July 2020; Revised 29 December, 2020;  
Accepted 21 February 2021; Published 31 March, 2021.*

**Author info:**

**Shein Evgeny V**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Soil Physics and Reclamation, Soil Science Faculty, Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0101-5293>

E-mail: [evgeny.shein@gmail.com](mailto:evgeny.shein@gmail.com)

**Verkhovtseva Nadezhda V**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Agrochemistry and Biochemistry, Soil Science Faculty, Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6830-4295>

E-mail: [verh48@list.ru](mailto:verh48@list.ru)

**Suzdaleva Angelina V**, Postgraduate Student, Department of Soil Physics and Reclamation, Soil Science Faculty, Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1525-8605>

E-mail: [avsuzdaleva@gmail.com](mailto:avsuzdaleva@gmail.com)

**Abrosimov Konstantin N**, Cand. Sci. (Geogr.), Senior Researcher, Department of Soil Physics and Hydrology, VV Dokuchaev Soil Science Institute, 7 Pyzhevskii Per., Moscow 119017, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3552-8054>

E-mail: [kv2@bk.ru](mailto:kv2@bk.ru)

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.69:577.33

doi: 10.17223/19988591/53/2

**О.И. Киселева<sup>1</sup>, С.В. Луценко<sup>2</sup>, Н.Б. Фельдман<sup>2</sup>, И.А. Гаврюшина<sup>3</sup>,  
В.С. Садыкова<sup>3</sup>, М.А. Пигалева<sup>1</sup>, М.С. Рубина<sup>4</sup>, Т.И. Громовых<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков  
им. Г.Ф. Гаузе, г. Москва, Россия

<sup>4</sup>Институт элементоорганических соединений  
им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва, Россия

### **Структура популяции *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода**

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках  
научных проектов No. 19-34-90088 и No. 18-29-06049 мк  
и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Проведена оценка способности штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 к образованию мутантов, не синтезирующих пленки целлюлозы. Установлено, что при культивировании на средах с различными источниками углерода глюкозе, фруктозе, галактозе, сахарозе, лактозе и мальтозе штамм образует колонии двух морфологических фенотипов. Обнаружено, что популяции клеток, образующие гладкий блестящий фенотип колоний, способны к биосинтезу целлюлозы, тогда как клоны, образующие колонии мукоидного фенотипа, являются мутантами, неспособными к синтезу целлюлозы. Показано, что источник углеродного питания играет селективную роль в соотношении численности популяции целлюлозонегативных и целлюлозоположительных клеток. Показаны значительные различия в структуре пленок, синтезируемых штаммом *G. hansenii* GH 1/2008. Наиболее плотную ячеистую структуру, состоящую из слоев, расположенных параллельно поверхности, имеют пленки, синтезируемые на средах, содержащих фруктозу, глюкозу и сахарозу. Расстояние между слоями составляет около 5 мкм для глюкозы. Микроструктура гидрогелей представляет собой тончайшие полупрозрачные для электронного микроскопа листки, толщина которых соответствует 1–2 волокнам, разделенные областями с изотропным распределением волокон. Исследования гелей и пленок методом ИК Фурье-спектроскопии показали, что гели состоят также из волокон бактериальной целлюлозы.

**Ключевые слова:** *Gluconacetobacter hansenii*; бактериальная целлюлоза; целлюлозоположительные; целлюлозонегативные; микроструктура; гель-пленки.

**Для цитирования:** Киселева О.И., Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гаврюшина И.А., Садыкова В.С., Пигалева М.А., Рубина М.С., Громовых Т.И. Структура популяции *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 22–46. doi: 10.17223/19988591/53/2

## Введение

Бактериальная целлюлоза – природный полимер, обладающий рядом уникальных свойств, в первую очередь высокой степенью чистоты и отсутствием лигниновых, пектиновых и гемицеллюлозных примесей в отличие от растительной целлюлозы. Обладая механической прочностью, эластичностью и особой сетчатой укладкой волокон, бактериальная целлюлоза (БЦ) находит применение в широчайшем спектре отраслей, в том числе и в медицине [1–4]. Растущий интерес к данному полимеру обуславливает необходимость синтезировать его в больших количествах и ставит основной задачей поиск способов повышения продуктивности штаммов и оптимизации питательных сред. Среди выделенных продуцентов бактериальной целлюлозы большая часть относится к семейству Acetobacteraceae, в котором следует особо отметить представителей рода *Gluconacetobacter* [5–7], в том числе выделенных в России [8–11]. Известно, что выбор продуцента для биосинтеза целлюлозы влияет на ее конечные свойства. На данный момент существует огромное множество публикаций, связанных с разработкой питательных сред, оптимизацией их состава и условий культивирования целлюлозосинтезирующих бактерий с целью повышения их продуктивности [12–14]. Штаммы, относящиеся к разным видам, имеют различную продуктивность в зависимости от составов питательных сред и условий культивирования [2, 5].

В условиях стационарного жидкофазного культивирования все известные целлюлозосинтезирующие бактерии образуют однородную пленку на поверхности среды, которая выполняет важную роль носителя для иммобилизации клеток, таким образом обеспечивая им доступ к границам фаз воздух/жидкость, где поступление кислорода не лимитировано [15–17]. Однако при культивировании в условиях перемешиваемой культуры, несмотря на лучший доступ кислорода, большинство штаммов *G. xylinus* синтезирует целлюлозу в меньшем количестве и в форме глобул разных размеров [18–21]. Более низкий выход целлюлозы при культивировании продуцентов в условиях перемешивания авторы связывают с образованием в их популяции спонтанных мутантов, которые не синтезируют целлюлозу [22, 23]. В 1982 г. S. Valla с соавторами высказали предположение, что отсутствие лимита кислорода, создаваемое достаточной и равномерной аэрацией перемешиваемых культур, является решающим фактором, приводящим к появлению не синтезирующих целлюлозу клеток мутантов у штаммов *G. xylinus* [24]. Позднее установлено, что не синтезирующие целлюлозу мутанты (Cel<sup>-</sup>) штаммов

*G. xylinus* при росте на агаровых средах формируют мукоидную (неблестящую и плоскую) морфологию колоний, которая отличается от немучкоидных (выпуклых и глянцевого) колоний штаммов дикого типа, синтезирующих целлюлозу [25].

Однако авторы [25] связывают появление мутаций не с отсутствием лимита кислорода, а с источником углерода, на котором культивировали продуцент. В ряде исследований [21, 22] показано, что биосинтез целлюлозы у таких мутантов невозможен ввиду отсутствия у них двух ферментов – фосфоглюкомутазы и уридинфосфо-глюкопирофосфорилазы. Эти ферменты необходимы для синтеза UDP-глюкозы, которая является основным мономером для синтеза целлюлозы. Однако известно также, что спонтанные мутации в популяции целлюлозосинтезирующих бактерий возникают как в перемешиваемых, так и в статических культурах. В частности, спонтанные мутанты были изолированы из культуры *G. xylinus* ATCC 23769 в условиях стационарного культивирования [26, 27]. Впоследствии обнаружено, что при добавлении в питательную среду этанола можно сохранить продукцию целлюлозы и сдерживать появление таких мутантов у *G. xylinus* [5, 7, 28]. Исследований о влиянии условий культивирования и состава питательной среды на возникновение спонтанных фенотипических мутаций в популяции представителей *G. hansenii* неизвестно. Представители вида *G. hansenii*, так же, как и другие целлюлозосинтезирующие микроорганизмы, способны расти и в перемешиваемой культуре, образуя вместо пленки глобулы [29, 30]. Известно, что штаммы этого вида способны к синтезу значимого количества олигомеров глюкуроновой кислоты [31], что, вероятно, может снижать общую продукцию бактериальной целлюлозы. Использование продуцентов вида *G. hansenii* для получения бактериальной целлюлозы влечёт необходимость изучения структуры популяции и условий возникновения мутантов при культивировании на различных субстратах.

Цель данного исследования – оценить влияние источника углерода на продуктивность штамма бактерий *G. hansenii* GH 1/2008 и возникновение целлюлозонегативных мутантов в условиях стационарного культивирования.

### Материалы и методики исследования

**Получение инокулята.** В качестве продуцента использовали штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008, выделенный в 2008 г. и депонированный в ВКПМ (В-10547) [8]. Штамм хранили на агаровой питательной среде Хестрина–Шрамма (HS) [18], имеющей следующий состав (г/л): глюкоза – 20, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 2,7, лимонная кислота  $\times \times \text{H}_2\text{O}$  – 1,15, агар – 15. Инокулят получали путем переноса колонии из рабочей агаровой культуры на жидкую питательную среду Хестрина–Шрамма в колбы объемом 500 мл, содержащие 100 мл жидкой среды, и затем инкубировали без перемешивания при температуре 30 °С в течение 48 ч. После

инкубации полученную культуру энергично встряхивали до высвобождения иммобилизованных клеток *G. hansenii* из синтезируемой целлюлозной пленки с последующей фильтрацией суспензии культуры через стерильные сетки и затем полученную биомассу клеток осаждали путем центрифугирования (MiniSpin Plus, «Eppendorf», Германия) со скоростью 10 000 об./мин. Полученную суспензию клеток использовали в качестве инокулята культуры клеток для последующих экспериментов. Титр клеток в инокуляте доводили до плотности клеток  $4,5-5 \times 10^8$  КОЕ/мл с использованием спектрофотометра UV-1601 PC («Shimadzu», Япония).

**Жидкофазное стационарное культивирование продуцента бактериальной целлюлозы *G. hansenii* GH 1/2008.** Культивирование штамма *G. hansenii* GH 1/2008 проводили на модифицированной среде Хестрина–Шрамма (HS), содержащей в качестве источников углерода моносахариды (глюкозу, фруктозу и галактозу) и дисахариды (сахарозу, лактозу и мальтозу). Концентрация углеводов в каждом случае составляла 4%. Жидкие питательные среды (100 мл) разливали в плоскодонные колбы объемом 250 мл, стерилизовали автоклавированием при температуре 100 °С и давлении 101,32 кПа в течение 10 мин. После охлаждения в питательную среду вносили 1 мл инокулята с титром  $4,5-5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Культивирование проводили при температуре 27 °С в течение 10 суток в термостате («Binder», Германия) до образования полимера в виде пленки или геля. Полученный экзополимер бактериальной целлюлозы отделяли фильтрованием от культуральной жидкости.

**Изучение морфологии колоний и численности популяции.** Для оценки различий в морфологии колоний по фенотипам диких и возникающих в результате спонтанных мутаций клеток проводили посеvy клеток, взятых из культуральной жидкости и из смывов с пленок, полученных в конце культивирования, на модифицированную агаризованную среду Хестрина–Шрамма, содержащую тот же источник углерода в той же концентрации, что и при культивировании. Из 1 мл каждой культуральной жидкости готовили серию разведений стерильной водой и высевали на агаризованную среду с тем источником углерода, на котором продуцент до этого выращивали в жидкой питательной среде. Смывы клеток из пленок получали в стерильной водопроводной воде путем интенсивного встряхивания в течение 6 ч с дальнейшим посевом методом серийных разведений. Посевы инкубировали при температуре 30 °С в течение 4 суток, после чего оценивали визуально морфологию колоний.

Для определения способности пленки бактериальной целлюлозы к биосинтезу выросшую колонию каждого морфотипа вырезали и перемещали в пробирки со стерильными жидкими питательными средами, содержащими моносахариды (глюкозу, фруктозу и галактозу) и дисахариды (сахарозу, лактозу и мальтозу) в концентрации 4% и инкубировали при температуре 30 °С в течение 72 ч. Затем 100 мкл культуральной жидкости из каждой среды снова переносили в 10 мл свежей питательной среды в пробирках и инкубировали таким же образом. Последнюю процедуру повторяли четыре последующих

пассажа. Если при пересевах отобранный клон колонии не синтезировал пленки, морфотип считали мутантным и стабильным. При образовании пленок в течение 4 пассажей морфотип считали диким и стабильным. Численность клеток для каждого эксперимента определяли как общий показатель по количеству выросших жизнеспособных колоний каждого морфотипа на агаровой среде в соответствующем разведении. Колонии подсчитывали после 4 суток инкубирования при температуре 30 °С, а количество клеток выражали как число колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл).

Для оценки стабильности морфотипов мукоидные и блестящие колонии вырезали и затем суспензировали в 10 мл стерильной воды. Полученные суспензии сеяли на плотные агаровые среды, содержащие моносахариды (глюкозу, фруктозу и галактозу), и дисахариды (сахарозу, лактозу и мальтозу), и инкубировали при температуре 30 °С в течение 4 суток. Затем проводили оценку морфологии выросших колоний.

**Определение выхода целлюлозы.** Выход целлюлозы выражали в виде абсолютно сухой массы (а.с.м.) на единицу объема культуральной среды [19]. Полученный экзополимер целлюлозы очищали от клеток отмыванием в растворе буфера RIPA («Thermo Scientific», США) следующего состава: 25 мМ Трис-НСl, рН 7–8, 150 мМ NaCl, 0,5% дезоксихолат натрия, 1% Тритон X-100, 0,1% SDS. Образцы бактериальной целлюлозы промывали в буфере в течение 3 суток, используя вращающийся шейкер при 150 об./мин. Моющие растворы меняли каждые 24 ч. Затем образцы промывали дистиллированной водой в течение 3 суток, меняя воду каждые 24 ч [32]. Очищенные пленки целлюлозы сушили до постоянного веса при 105 °С. Продуктивность штамма на средах рассчитывали по формуле

$$P = m/V \times 1000,$$

где  $m$  – средняя масса полученных абсолютно сухих пленок, г;  $V$  – объем среды в одной повторности, мл.

**Атомно-силовая микроскопия.** Для изучения морфологии и локальных свойств поверхности пленок бактериальной целлюлозы и морфологии клеток продуцента была использована атомно-силовая микроскопия (АСМ). Клетки из колоний, выращенных на агаризованных средах, снимали стерильной петлей и помещали в физраствор. Затем суспензию наносили на поверхность свежесколотой слюды и высушивали на воздухе, как описано в работе М. Пигалевой с соавторами (Pigaleva et al.) [33]. Изображения получали с помощью сканирующего зондового микроскопа MultiMode IIIa («Bruker», США), позволяющего оценить наноструктуру объекта с высоким пространственным разрешением. Исследования проводили на воздухе, в контактном режиме с использованием кантилеверов из нитрида кремния серии NP с константой жесткости 0,06 Н/м и радиусом кривизны 8 нм («Bruker», США). Обработку изображений выполняли с помощью программы FemtoScan 001 («Центр перспективных технологий», Россия).

**Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).** Пространственную организацию синтезируемого полимера исследовали на сканирующем элек-

тронном микроскопе SU8000 («Hitachi», Япония). Образцы замораживали при температуре  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , после чего подвергали глубокой заморозке в жидком азоте и лиофильно сушили в течение 2 суток при температуре  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  и давлении 0,07 мбар в камере Alpha 1-2 LD («Christ», Германия). Образцы фиксировали в алюминиевый держатель для сколов с помощью проводящего адгезива и запыляли платино-палладиевым сплавом (80/20) методом магнетронного распыления, как описано в работе А.С. Кашина и др. [34]. Изображения получали в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 10 кВ и рабочем расстоянии 7–15 мм.

**Инфракрасная (ИК) Фурье-спектроскопия.** ИК Фурье-спектры пленок и гелей БЦ получали на спектрометре Nexus FT-IR («Thermo Nicolet», США) в режиме пропускания 128 сканов с разрешением  $2\text{ см}^{-1}$ . Перед съемкой образцы высушивали до постоянной массы на воздухе при относительной влажности около 50%.

**Статистическая обработка данных.** Полученные данные обработаны с использованием параметрических критериев, данные представлены в виде средней арифметической ( $M$ ) из пяти повторностей ( $n$ ), стандартной ошибке среднего ( $m_M$ ); статистическую значимость различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

### Результаты исследования и обсуждение

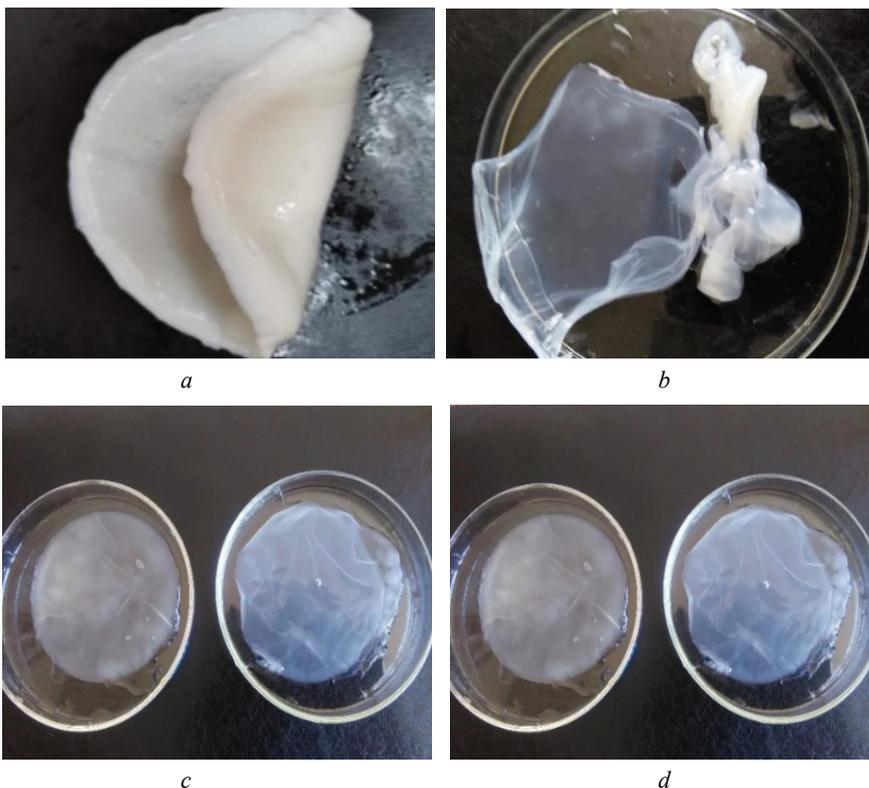
Интерес к бактериальной целлюлозе обуславливает необходимость синтезировать её в больших количествах в промышленных масштабах. Задачу повышения продуктивности исследуемого штамма *G. hansenii* GH 1/2008 решали путем подбора оптимального источника углерода в питательной среде при стационарных условиях культивирования. Получаемый экзополимер бактериальной целлюлозы оценивали как с позиций учета его абсолютно сухой массы, так и исследования формирующейся при культивировании его структуры. Продукцию целлюлозы и общую численность клеток в культуральной жидкости сравнивали на 10-е сутки культивирования штамма *G. hansenii* GH 1/2008 (табл. 1), так как в этот период уже четко формировались различия в форме образующегося экзополимера. В результате анализа установлено, что на средах с фруктозой, глюкозой и сахарозой продуцент *G. hansenii* GH 1/2008 синтезирует плотную пленку, тогда как на средах с мальтозой, лактозой и галактозой образуется гель (рис. 1). Максимальное количество абсолютно сухого веса полимера, синтезированного штаммом *G. hansenii*, получено на средах с фруктозой и сахарозой (табл. 1).

Анализ с помощью сканирующей электронной микроскопии показал значительные различия в структуре пленок и гелей, синтезируемых штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 при росте на различных источниках углерода. Наиболее плотную структуру имела пленка, выращенная на среде, содержащей фруктозу. Она имеет слоистую структуру, расстояние между слоями около 2 мкм, пространство между слоями заполнено неупорядоченными волокнами БЦ.

Таблица 1 [Table 1]

Продуктивность полимера бактериальной целлюлозы (г/л) у штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с различными углеводами  
 [Productivity of the bacterial cellulose polymer in the strain *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 on media with different carbohydrates],  $M \pm m_n$

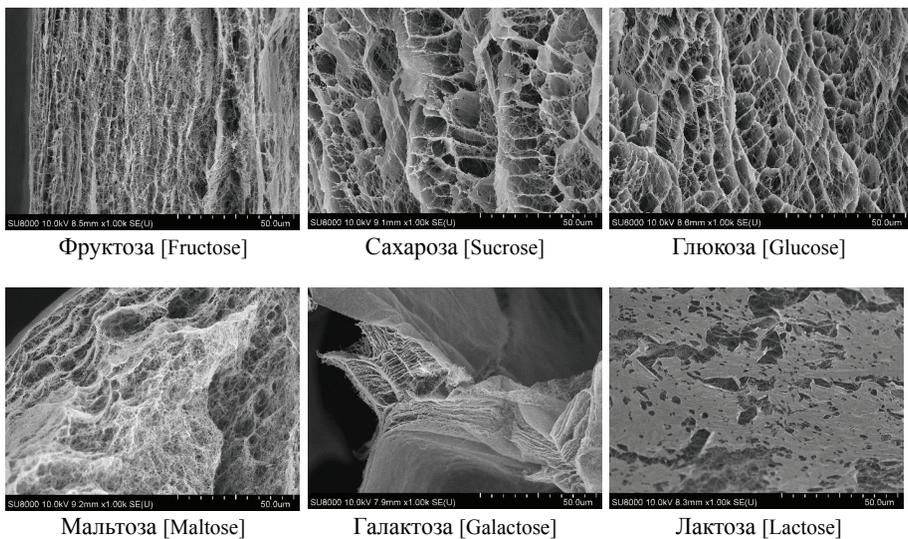
Продукция полимера (абсолютный сухой вес, г/л) на средах с различными источниками углерода [Polymer production (absolute dry weight, g/L) on media with various carbon sources]					
Фруктоза [Fructose]	Сахароза [Sucrose]	Глюкоза [Glucose]	Мальтоза [Maltose]	Лактоза [Lactose]	Галактоза [Galactose]
13,2±0,50	12,7±0,70	11,8±0,60	1,4±0,10	1,2±0,14	0,9±0,02



**Рис. 1.** Внешний вид образуемого полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемого штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с фруктозой, глюкозой или сахарозой (а), мальтозой (b), лактозой (c) и галактозой (d) (фото И.А. Гаврюшиной)  
 [Fig. 1. The overall look of the bacterial cellulose polymer, synthesized by *G. hansenii* GH 1/2008 on media containing Fructose, Glucose or Sucrose (a), Lactose (b), Maltose (c) and Galactose (d). Photo by Irina Gavryushina]

Структура плёнок на основе сахарозы и глюкозы весьма сходна. В целом ее можно описать как ячеистую, но при ближайшем рассмотрении видно,

что она состоит из слоев, расположенных параллельно поверхности пленки (на рис. 1 соответствует вертикальному направлению) на расстоянии около 5 мкм для глюкозы. Пространство между слоями в свою очередь поделено на ячейки более тонкими перпендикулярными перегородками с характерным масштабом 5 мкм. Для мальтозы слоистая структура наблюдается только вблизи поверхности, остальная масса представляет собой изотропный гель из хаотически переплетенных волокон. Полимер, синтезируемый штаммом на среде, содержащей галактозу, образовал гель-пленку толщиной около 25 мкм. На рис. 2 видны как поперечный скол, так и поверхность пленки. Микроструктура представляет собой тончайшие полупрозрачные для электронного микроскопа листки, толщина которых соответствует 1–2 волокнам.



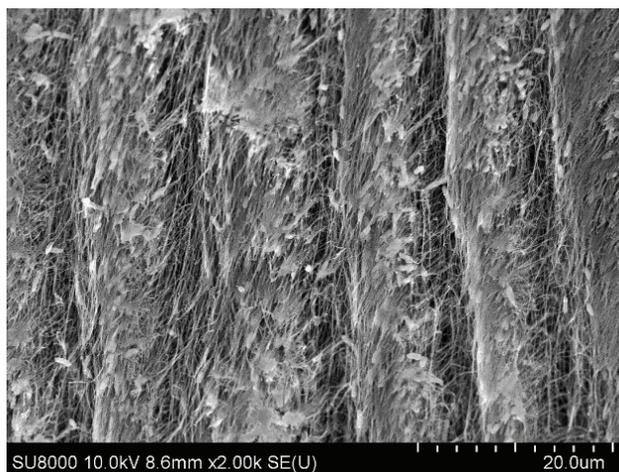
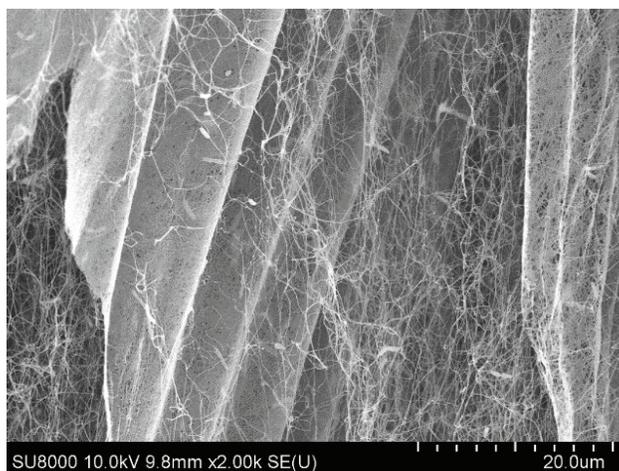
**Рис. 2.** Микроструктура гель-пленок, синтезируемых штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с различными источниками углерода: сканирующая электронная микроскопия. Показаны поперечные сколы пленок.

Для фруктозы, сахарозы и глюкозы поверхность пленок параллельна вертикальной оси на фотографиях. Для лактозы показан вид в плоскости пленки [Fig. 2. The microstructure of gel-films, synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 on media containing various carbon sources: scanning electron microscopy. Cross-sections of films are shown. For fructose, sucrose and glucose the film surface is parallel to the vertical axis of the images. For lactose, the film surface is shown]

Пленка, синтезируемая на среде с лактозой, образуется настолько тонкой (менее 5 мкм), что получить поперечный скол при закреплении в держатель не удалось. На рис. 2 показана плоскость пленки. Слоистые структуры в данном случае не сформировались, на поверхности наблюдается начальный этап формирования такого слоя.

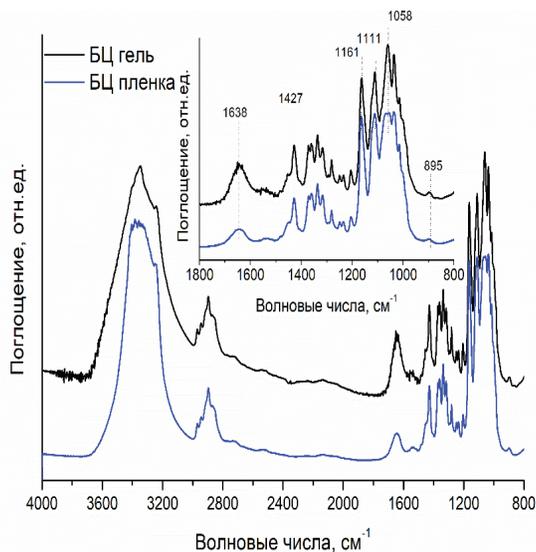
На электронных микрофотографиях пленок и гелей, синтезируемых на средах с различными источниками углерода, обнаруживается боль-

шое количество иммобилизованных клеток продуцента (рис. 3). Пленки (рис. 3, *a*) имеют периодическую слоистую структуру. В гелевых образцах все структуры типа листов, состоящих из переплетенных волокон, если и встречаются, то расположены на больших расстояниях, порядка 50–100 мкм. Такие листы имеют толщину порядка диаметра волокна: на электронных фотографиях видно, что они полупрозрачные и изгибаются, образуя складки.

*a**b*

**Рис. 3.** Иммобилизованные клетки продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на пленке (*a*) и на геле (*b*), синтезируемом на среде с мальтозой: сканирующая электронная микроскопия  
[**Fig. 3.** Cells of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 immobilized on the film (*a*) and the gel synthesized on a maltose-containing medium (*b*): scanning electron microscopy]

Исследования гелей и пленок методом ИК Фурье-спектроскопии показали, что гели состоят также из волокон БЦ. ИК Фурье-спектры пленок и гелей приведены на рис. 4. Спектры нормированы по пику  $2897\text{ см}^{-1}$ , соответствующему валентным колебаниям  $-\text{CH}$ . Спектры пленок и гелей содержат пики, характерные для бактериальной целлюлозы, ранее многократно описанные в литературе [35–37]:  $1427\text{ см}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  у C6),  $1161\text{ см}^{-1}$  (C–O–C в пиранозном кольце),  $1111\text{ см}^{-1}$  (C–H валентные асимметричные в пиранозном кольце),  $1058\text{ см}^{-1}$  (деформационные C–O–C в пиранозном кольце),  $1020\text{ см}^{-1}$  (C–O),  $895\text{ см}^{-1}$  ( $\beta$ -глюкозидные связи между сахарами). Спектры пленок и гелей практически не отличаются друг от друга. Единственное различие по интенсивности отмечено для пика  $1638\text{ см}^{-1}$ , обусловленного присутствием связанной воды [36]. Как и следует ожидать, ее содержание выше в образцах гелей, так как контактов между волокнами меньше, и на поверхности волокон больше групп, доступных для гидратации. Известно, что штаммы этого вида в неблагоприятных условиях синтезируют олигомеры глюкуроновой кислоты [31]. Пиков, соответствующих карбоксильным и карбонильным группам, присутствующим в глюкуроновой кислоте, на спектрах не выявлено, что свидетельствует о том, что синтеза заметного количества глюкуроновой кислоты в данных условиях не происходит. Различия в консистенции гелей объясняются данными СЭМ, показывающими, что плотность укладки волокон для геля значительно ниже, чем у пленок.



**Рис. 4.** ИК Фурье-спектры полимера, синтезируемого штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в виде пленки и геля  
[Fig. 4. FTIR spectroscopy of the polymer synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 in the form of film (blue color line) and gel (black color line).  
On the X-axis - Wave numbers,  $\text{cm}^{-1}$ ; on the Y-axis - Absorption, a.u.]

Следует отметить, что в гелях слоистые структуры типа листов образуются редко, волокна в гелях имеют пространственную организацию, близкую к изотропной. Ранее мы показали [38], что в случае, когда получаемый полимер имеет гелеобразную консистенцию и низкие значения модуля Юнга, его микроструктура не является слоистой.

Общая численность жизнеспособных клеток значительно выше в пленках при росте продуцента на средах с глюкозой, фруктозой и сахарозой, чем на гелях, синтезируемых на галактозе, мальтозе и лактозе (табл. 2). Более высокая численность клеток продуцента отмечена и в культуральной жидкости после культивирования штамма на средах с фруктозой, глюкозой и сахарозой. При этом численность клеток продуцента на этих источниках углерода как в культуральной жидкости, так и в иммобилизованных пленках достоверно не различается. Незначительное число КОЕ/мл продуцента отмечено на средах с галактозой и мальтозой и с лактозой. Интересно отметить, что показатель продуктивности полимера на среде с сахарозой равен среднему арифметическому значению для показателей продуктивности штамма на средах с глюкозой и фруктозой. Предположительно, это отражает тот факт, что сахароза содержит глюкозу и фруктозу в равных пропорциях. Численность клеток продуцента, иммобилизованных в пленках, при росте на среде с сахарозой также близка к среднему показателю таковой при росте продуцента на средах с глюкозой и фруктозой. Это подтверждает тот факт, что количество синтезируемого полимера пропорционально численности клеток продуцента.

Влияние условий культивирования и состава питательных сред на возникновение спонтанных мутаций ранее было установлено у штаммов *G. xylinus* рядом авторов, которые показали, что в условиях перемешивания при достаточном насыщении кислородом происходит появление большого количества спонтанных мутантов, не способных продуцировать целлюлозу [22–24]. Мы исследовали возможность появления спонтанных мутаций, возникающих в популяции штамма *G. hansenii* GH 1/2008 в стационарных условиях культивирования на различных источниках углерода. Условно принимая, что одна колония образована из одной клетки, количество выросших мукоидных колоний приравнивали к количеству образовавшихся мутантных (Cel-) клеток, а количество гладких (блестящих) – к числу клеток дикого (Cel+) типа. Изначально используя инокулят из колонии немучоидного фенотипа, в стационарных условиях культивирования у штамма *G. hansenii* GH 1/2008 на различных источниках углерода мы выявляли колонии с двумя доминирующими фенотипами: немучоидные гладкие выпуклые и мукоидные плоские (рис. 5).

Исследования численности популяции в посевах показало, что в культуральной жидкости и в пленках после 10 суток культивирования количество клеток, образующих гладкие немучоидные колонии на агаровых средах, максимально в образцах, полученных на средах, содержащих фруктозу и сахарозу, т.е. именно те сахара, на которых продуктивность на 1 л культуральной жидкости выше.

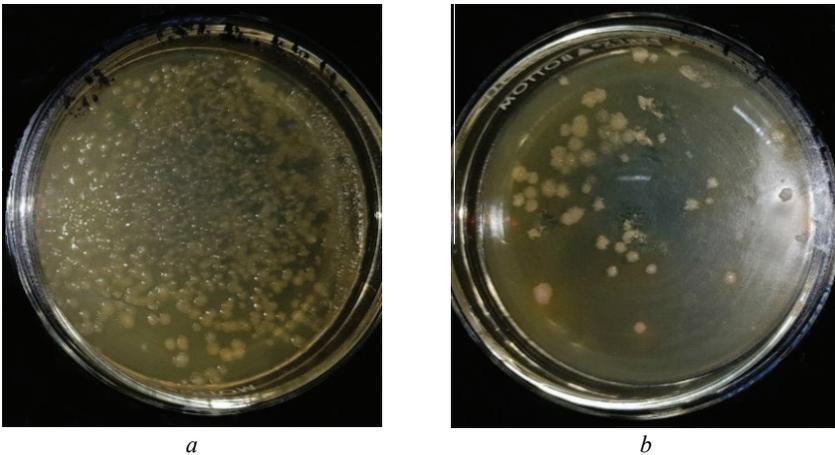
Таблица 2 [Table 2]

**Численность клеток *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в культуральной жидкости и пленке при культивировании на различных питательных средах**  
 [The number of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 cells in the cultural liquid and in the film when cultivated on different media],  $M \pm m_m$

Источник углерода в среде [Carbon source in the medium]	Численность жизнеспособных клеток (КОЕ)/мл [Number of living cells (CFU)/ml]	
	в 1 мл культуральной жидкости [per 1 ml of cultural liquid]	в 1 г а.с.в пленки / геля [per g of a.d.w. of film/gel]
Фруктоза [Fructose]	$3,3 \pm 0,6 \times 10^6$	$5,1 \pm 0,3 \times 10^7$
Сахароза [Sucrose]	$2,9 \pm 0,3 \times 10^6$	$4,5 \pm 0,6 \times 10^7$
Глюкоза [Glucose]	$2,6 \pm 0,2 \times 10^6$	$3,8 \pm 0,1 \times 10^7^*$
Мальтоза [Maltose]	$4,3 \pm 0,05 \times 10^4^*$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^6^*$
Галактоза [Galactose]	$3,7 \pm 0,08 \times 10^4^*$	$2,2 \pm 0,1 \times 10^5^*$
Лактоза [Lactose]	$2,6 \pm 0,04 \times 10^4^*$	$5,6 \pm 0,5 \times 10^5^*$

\* – статистически значимые различия, полученные на среде с сахарозой ( $p < 0,05$ ).

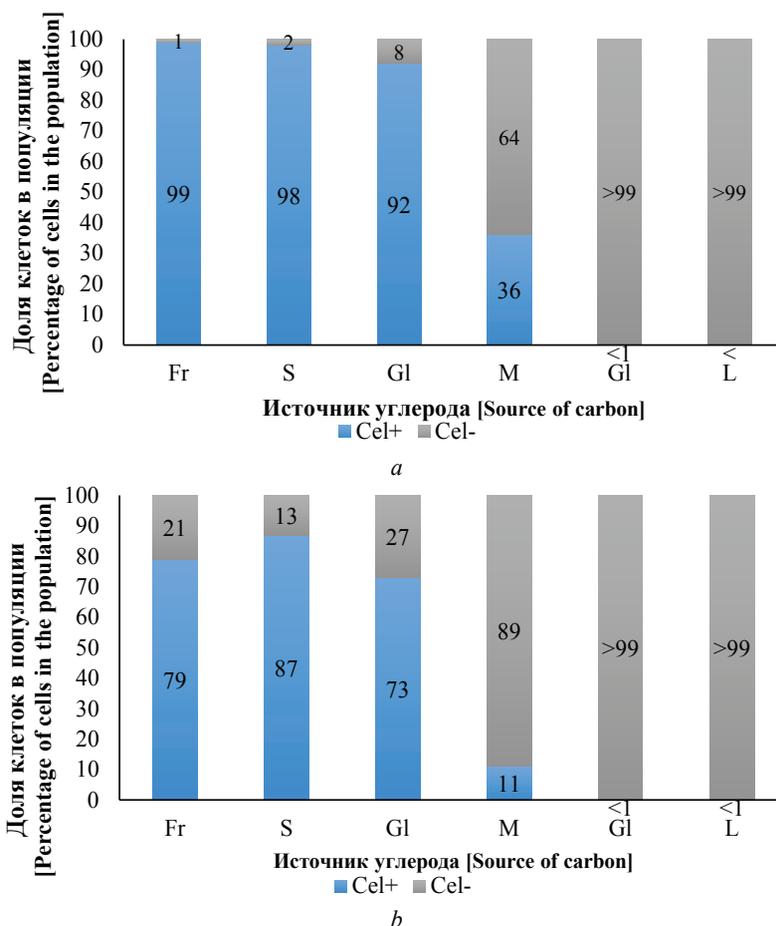
[\* - statistically significant differences from the data obtained on the medium with sucrose ( $p < 0.05$ )].



**Рис. 5.** Морфология гладких (a) и мукоидных (b) колоний штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на питательной среде HS (фото В.С. Садыковой)  
 [Fig. 5. The morphology of smooth (a) and mucoid (b) colonies of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 on HS medium (photo by Vera Sadykova)]

При этом в посевах образцов культуральной жидкости и смывов из пленок, полученных после культивирования на средах, содержащих галактозу и лактозу, количество мукоидных колоний было значительно выше. Относительное содержание мукоидных и гладких колоний в культуральной жидкости и пленках на различных питательных средах показано на рис. 6.

Полученные результаты дают основание предполагать, что источники углерода могут играть определенную роль в формировании внутривидовой структуры клонов продуцента бактериальной целлюлозы. Увеличение численности целлюлозонегативных клеток приводит к конкуренции за субстрат с популяцией целлюлозоположительных клеток.



**Рис. 6.** Соотношение (%) численности популяции клеток, образующих мукоидные (Cel-) и немучоидные (Cel+) колонии штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в культуральной жидкости (a) и в пленке (b) в зависимости от источника углерода.

F – фруктоза, S – сахароза, Gl – глюкоза, M – мальтоза, G – галактоза, L – лактоза

[Fig. 6. The content (%) of cells, forming mucoid (Cel-) and non-mucoid (Cel+) colonies in the population of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008

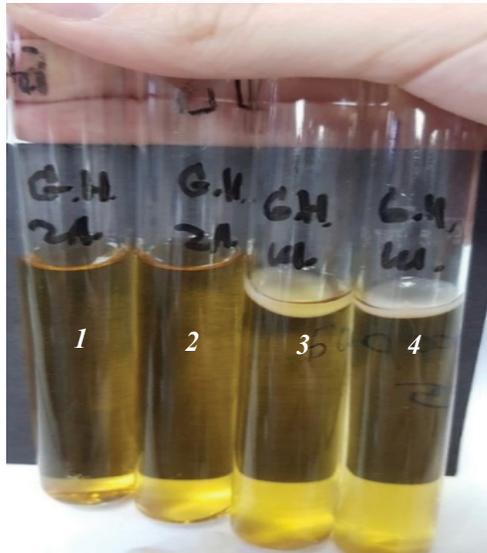
in the cultural liquid (a) and in the film (b) for various carbon sources.

On the X-axis - Source of carbon: F - Fructose, S - Sucrose, Gl - Glucose, M - Maltose, G - Galactose, L - Lactose; on the Y-axis - Percentage of cells in the population]

Так, на средах с источниками углерода галактозой и лактозой в посевах на агаризованных средах отмечали в основном колонии мукоидного типа (99%). На этих же источниках углерода не было образования пленки бактериальной целлюлозы, а образовывался гель по всему объему питательной среды. Как показано ранее [38], основным фактором, определяющим, будут ли фибриллы бактериальной целлюлозы формировать плотную пленку или же образуют гель, является скорость накопления полимера. В условиях куль-

тивирования, обеспечивающих высокую скорость роста и синтеза целлюлозы, формируются пленки, тогда как при низкой скорости роста продуцента образуется гель. Присутствие в популяции существенной доли целлюлозо-негативных мутантов, не участвующих в синтезе целлюлозы, должно приводить к заметному снижению общего темпа накопления полимера, что в свою очередь препятствует формированию плотной пленки и приводит к образованию геля. Та же закономерность наблюдалась на среде с мальтозой, где численность колоний мукоидного типа в посевах культуральной жидкости и смывов с пленок составляла 89%.

Дальнейшие наши исследования показали, что возникающие клоны с колониями мукоидного типа при пересевах на жидкие питательные среды на всех источниках углерода не образуют пленки бактериальной целлюлозы. Клоны продуцента, имеющие колонии гладкого немучоидного типа, синтезируют пленки на жидкой среде уже на третьи сутки культивирования (рис. 7).



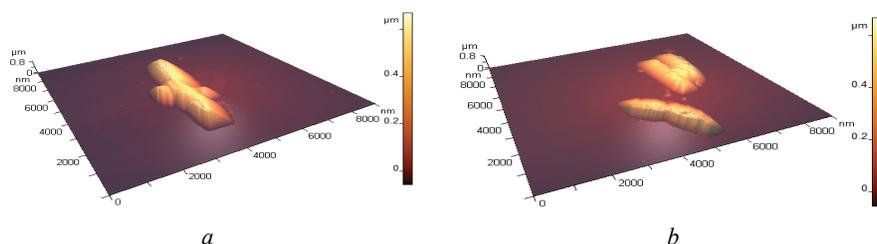
**Рис. 7.** Характер роста клонов *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на среде Хестирин–Шрамма: 1, 2 – отсутствие биосинтеза пленки у клонов мукоидного типа; 3, 4 – образование пленки у клонов немучоидного типа (фото И.А. Гаврюшиной)

[Fig. 7. The growth of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 clones on Hestrin-Schramm medium: 1 and 2 - Absence of film biosynthesis for mucoid clones; 3 and 4 - Formation of a film for non-mucoid ones (photo by Irina Gavryushina)]

Чтобы подтвердить стабильность образования морфологических типов, делали пассаж колоний каждого фенотипа на агаровые среды. Протестированы все вышеперечисленные источники углерода. Как показали полученные результаты, вырастающие колонии из суспензии мукоидных плоских колоний давали рост в виде таких же колоний в течение всех четырех пере-

сево́в вне зависимости от источника углерода, содержащегося в среде, на которую его пересеивали. Однако при посевах суспензий, полученных из блестящих колоний, некоторое число колоний мукоидного типа появляется на всех протестированных агаризованных средах. При этом количество появляющихся колоний мукоидного типа коррелирует с долей клонов дикого типа, как и в случае жидкофазного культивирования. Эти результаты позволяют утверждать, что морфологический фенотип мукоидного типа *G. hansenii* GH 1/2008 сохраняет свою стабильность. Селективными факторами появления большого числа спонтанных мутантов, не способных к синтезу пленки целлюлозы, являются источники углерода галактоза, лактоза и мальтоза.

Форма и размеры клеток обоих типов исследованы методом АСМ. Клетки, взятые из колоний обоих типов, имели цилиндрическую форму (рис. 8).



**Рис. 8.** Морфология клеток *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 из колоний гладкого (a) и мукоидного фенотипов (b): атомно-силовая микроскопия  
 [Fig. 8. The morphology of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 cells from colonies of smooth (a) and mucoid (b) phenotypes: atomic force microscopy]

По изображениям, полученным методом АСМ, измерены длины клеток и их диаметры. Для оценки диаметра использованы данные о высоте клеток. В результате измерений размеров клеток из колоний гладкого и мукоидного типа были построены распределения размеров, не выявившие статистически значимых различий между клетками из колоний мукоидного и немуккоидного типов. Клетки обоих типов, выращенные на агаризованных средах, имели среднюю длину  $1\ 600 \pm 500$  нм и диаметр  $700 \pm 100$  нм.

### Заключение

В настоящем исследовании установлено, что источник углеродного питания является селективным фактором в формировании внутривидовой структуры клонов продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008. Увеличение численности целлюлозонегативными клетками обуславливает конкуренцию за субстрат с целлюлозоположительным клеткам штамма *G. hansenii* GH 1/2008, что снижает численность последних и продукцию экзополимера. В результате исследований морфологии клеток

установлено, что только целлюлозоположительные клетки, которые образуют гладкие колонии, при росте на жидкой питательной среде синтезируют целлюлозу, в то время как клетки, образующие мукоидный фенотип колоний, являются целлюлозонегативными и не способны синтезировать полимер. Однако мутанты всегда спонтанно обнаруживаются и в пленках, синтезируемых клетками, образующими гладкий фенотип колоний. Хотя механизм спонтанной мутации *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 не установлен, показано, что при многократном пересеве способность к синтезу целлюлозы у целлюлозонегативных клонов не восстанавливается. На средах, имеющих в составе в качестве источника питания фруктозу, сахарозу или глюкозу, развиваются популяции клеток, в составе которых присутствует лишь незначительная доля мутантов. При статическом жидкофазном культивировании такие популяции с большим числом целлюлозоположительных клеток синтезируют пленки на поверхности культуральной жидкости. Культивирование на средах, в которых роль источника углерода выполняют галактоза, мальтоза или лактоза, доля мутантов, не способных к синтезу целлюлозы, оказывается существенной. В таких популяциях синтез целлюлозы идет медленно, так как доля клеток, осуществляющих его, оказывается невелика. В результате вместо пленки в культуральной жидкости формируется гель, также состоящий из наночастиц целлюлозы, которые, однако, имеют просторанственную организацию, иную, нежели пленки.

*Авторы благодарят отдел структурных исследований Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва, Россия) за проведение исследования методом электронной микроскопии.*

### Литература

1. Brown R.M.Jr., Saxena I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000. Vol. 38, No. 1. PP. 57–67.
2. Hassan E.A., Abdelhady H.M., Abd El-Salam S.S., Abdullah S.M. The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions // *Br. Microbiol. Res. J.* 2015. Vol. 9, No. 3. PP. 1–13.
3. Болотова К.С., Чухчин Д.Г., Майер Л.В., Гурьянова А.А. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы // *Лесной журнал*. 2016. No. 6. С. 153–165.
4. Lee K.-Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // *Macromolecular Bioscience*. 2014. Vol. 14, No. 1. PP. 10–32.
5. Park J.K., Jung J.Y., Park Y.H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol // *Biotechnol lett.* 2003. Vol. 25. PP. 2055–2059.
6. Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 // *Journal of Applied Microbiology*. 2009. Vol. 107, No. 2. PP. 576–583.
7. Jozala, A.F., Pértile R.A.N., dos Santos C.A., de Carvalho Santos-Ebinuma V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa A., Jr. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by

- employing alternative culture media // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99, No. 3. PP. 1181–1190.
8. Громовых Т.И., Фан М.Х., Данильчук Т.И. Штамм бактерии *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент 2464307. Российская Федерация, МПК: C12N 1/20, C12P 19/04. Заявка No. 2011121841, приор. 31.05.2011; опубл. 10.20.2012 г. Бюл. 2011. No. 29. 12 с.
  9. Хрипунов А.К., Ткаченко А.А. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы // Патент 2141530. Российская Федерация, МПК: C12P 19/02, C12N 1/20. Заявка No. 98108987/13, приор. 05.05.1998; опубл. 11.20.1999 г. Бюл. 1999. No. 6 с.
  10. Ревин В.В., Лияськина Е.В. Штамм *Gluconacetobacter sucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент 2523606. Российская Федерация, МПК: C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Заявка No. 2013111072/10, приор. 12.03.2013; опубл. 20.07.2014 г. Бюл. 2015. No. 20. 6 с.
  11. Волова Т.Г., Прудникова С.В., Шишачкая Е.И. Штамм бактерии *Komagataeibacter xylinus* – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент 2568605. Российская Федерация, МПК: C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/00. Заявка No. 2014150288/10, приор. 12.11.2014; опубл. 20.11.2015 г. Бюл. 2015. No. 32. 11 с.
  12. Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2001. Vol. 33, No. 1. PP. 1–5.
  13. Ruka D.R., Simon G.P., Dean K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose // *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 89, No. 2. PP. 613–622.
  14. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, No. 7. PP. 14832–14849.
  15. Ross P., Mayer R., Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // *Microbiol. Rev.* 1991. Vol. 55. PP. 35–58.
  16. Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase S.A., Singhal R.S. Fermentative Production of Microbial Cellulose // *Food Technol. Biotechnol.* 2009. Vol. 47. PP. 107–124.
  17. Li Y., Tian C., Tian H., Zhang J., He X., Ping W., Lei H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012. Vol. 96. PP. 1479–1487.
  18. Schramm M., Hestrin S. Factors affecting production of cellulose at the air liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum* // *Journal of General Microbiology*. 1954. Vol. 11, PP. 123–128.
  19. Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2001. Vol. 33. PP. 1–5.
  20. Song H.-J., Li H., Seo J.-H., Kim M.-J., Kim S.-J. Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2009. Vol. 26. PP. 141–146.
  21. Li H., Kim S.-J., Lee Y.-W., Kee C., Oh I. Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2011. Vol. 28. PP. 2306–2311.
  22. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Goncalves-Miskiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 29. PP. 189–195.

23. Krystynowicz A., Koziolkiewicz M., Wiktorowska-Jezierska A., Bielecki S., Wojtera E., Masny A., Plucienniczak A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum* // *Acta Biochimica Polonica*. 2005. Vol. 52. PP. 691–698.
24. Valla S., Kjosbakken J. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum* // *Journal of General Microbiology*. 1982. Vol. 128. PP. 1401–1408.
25. Nguyen V.T., Flanagan B., Mikkelsen D., Ramirez S., Rivas L., Gidley M.J., Dykes G.A. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha // *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 80. PP. 337–343.
26. Kuga S., Takagi S., Brown R.M. Native folded-chain cellulose II // *Polymer*. 1993. Vol. 34. PP. 3293–3297.
27. Valla S., Coucheron D.H., Fjaervik E., Kjosbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene // *Molecular and General Genetics*. 1989. Vol. 217, No. 1. PP. 26–30.
28. Mohammadkazemi F., Doosthoseini K., Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734) // *Cellulose chemistry and technology*. 2015. Vol. 49, No. 5–6. PP. 455–462.
29. Mohite B.V., Salunke B.K., Patil S.V. Enhanced production of bacterial cellulose by using *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. Vol. 169. PP. 1497–1511.
30. Фан Ми Хань. Биотехнология бактериальной целлюлозы с использованием штамма – продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH - 1/2008 : дис. ... канд. биол. наук. М. : Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, 2013. 161 с.
31. Park J.K., Khan T., Jung J.Y. Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by *Gluconacetobacter hansenii* strain // *Carbohydr. Polym.* 2006. Vol. 63. PP. 482–486.
32. Gromovykh T.I., Feldman N.B., Timashev P.S., Kiselyova O.I., Kraeva M.N., Grinevich A.S., Tikchonova O.A., Bardakova K.N., Churbanov S.N., Lutsenko S.V. Elaboration of bacterial cellulose matrix for the immobilization of *Escherichia coli* cells // *International Journal of Nanotechnology*. 2018. Vol. 15, No. 4/5. PP. 288–300.
33. Pigaleva M.A., Bulat M.V., Gromovykh T.I., Gavryushina I.A., Lutsenko S.V., Gallyamov M.O., Novikov I.V., Buyanovskaya A.G., Kiselyova O.I. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019. Vol. 147. PP. 59–69.
34. Кашин А.С., Анаников В.П. Формирование наноразмерных покрытий и наночастиц металлов путем магнетронного распыления и их исследование методом сканирующей электронной микроскопии // *Известия Академии Наук Серия Химическая*. 2011. No. 12. С. 2551–2556. doi: 10.1007/s11172-011-0399-x
35. Coseri S., Biliuta G., Zemljič L.F., Srndovic J.S., Larsson P.T., Strnad S., Krežec T., Naderic A., Lindström T. One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate // *RSC Adv*. 2015. Vol. 5. PP. 85889–85897.
36. Zhang X., Xiao N., Wang H., Liu C., Pan X. Preparation and characterization of regenerated cellulose film from a solution in lithium bromide molten salt hydrate // *Polymers*. 2018. Vol. 10. PP. 614–626.
37. Рубина М.С., Пигалева М.А., Наумкин А.В., Громовых Т.И., Васильков А.Ю. Пленки бактериальной целлюлозы, продуцированной *Gluconacetobacter hansenii*, как источник окисленной формы нанофибриллярной целлюлозы // *Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах*. 2019. Т. 492. С. 70–75.
38. Gromovykh T.I., Pigaleva M.A., Gallyamov M.O., Ivanenko I.P., Ozerova K.E., Kharitonova E.P., Bahman M., Feldman N.B., Lutsenko S.V., Kiselyova O.I. Structural

organization of bacterial cellulose: the origin of anisotropy and layered structures // Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 237. PP. 116140–116152.

*Поступила в редакцию 23.08.2020 г.; повторно 01.11.2020 г.; принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.*

**Авторский коллектив:**

**Киселева Ольга Игоревна**, канд. физ.-мат. наук, старший преподаватель кафедры физики полимеров и кристаллов, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7637-7758>

E-mail: [ok@polly.phys.msu.ru](mailto:ok@polly.phys.msu.ru)

**Луценко Сергей Викторович**, профессор, д-р биол. наук, заведующий кафедрой биотехнологии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2017-6025>

E-mail: [svlutsenko57@mail.ru](mailto:svlutsenko57@mail.ru)

**Фельдман Наталья Борисовна**, д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6098-2788>

E-mail: [n\\_feldman@mail.ru](mailto:n_feldman@mail.ru)

**Пигалева Марина Алексеевна**, канд. физ.-мат. наук, м.н.с. кафедры физики полимеров и кристаллов, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7483-1294>

E-mail: [pigaleva@polly.phys.msu.ru](mailto:pigaleva@polly.phys.msu.ru)

**Гаврюшина Ирина Александровна**, аспирант Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4889-4977>

E-mail: [irina-alekcandrovna2013@yandex.ru](mailto:irina-alekcandrovna2013@yandex.ru)

**Садыкова Вера Сергеевна**, д-р биол. наук, зам. директора Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9372-5948>

E-mail: [sadykova\\_09@mail.ru](mailto:sadykova_09@mail.ru)

**Рубина Маргарита Сергеевна**, н.с. Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

E-mail: [margorubina@yandex.ru](mailto:margorubina@yandex.ru)

**Громовых Татьяна Ильинична**, д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

E-mail: [gromovykhtatyana@mail.ru](mailto:gromovykhtatyana@mail.ru)

**For citation:** Kiselyova OI, Lutsenko SV, Feldman NB, Gavryushina IA, Sadykova VS, Pigaleva MA, Rubina MS, Gromovykh TI. The structure of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 population cultivated in static conditions on various sources of carbon. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:22-46. doi: 10.17223/19988591/53/2 In Russian, English Summary

**Olga I. Kiselyova<sup>1</sup>, Sergey V. Lutsenko<sup>2</sup>, Natalia B. Feldman<sup>2</sup>, Irina A. Gavryushina<sup>3</sup>, Vera S. Sadykova<sup>3</sup>, Marina A. Pigaleva<sup>1</sup>, Margarita S. Rubina<sup>4</sup>, Tatiana I. Gromovykh<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>G.F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup>A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

### **The structure of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 population cultivated in static conditions on various sources of carbon**

Bacterial cellulose (BC) is a natural polymer that has a number of unique properties that determine the need to synthesize large amounts of it and to search the ways to increase the productivity of strains and to optimize the nutritive media. It is known that the choice of the producer for BC synthesis has an impact on its final properties and on the productivity of this polymer production. Under static liquid phase cultivation conditions, all cellulose-producing bacteria form a uniform film on the medium surface that serves as a scaffold for cells immobilization, thus providing them with the access to the air/liquid interface, where the access to oxygen is not limited. Meanwhile, when cultivation goes under agitating conditions, most of *Gluconacetobacter xylinus* strains produce less cellulose in form of globules of various sizes, despite the better oxygen access. Several authors explain the lower cellulose outcome when cultivated under agitated conditions by the appearance of spontaneous mutants that do not produce cellulose in the population. It was revealed that when grown on agarized media, cellulose-non-producing mutants form colonies of a specific mucoid type, while non-mucoid phenotype cells form smooth colonies of non-mucoid type. To our knowledge, there is no published research on the impact of cultivation conditions and nutritive medium composition on the appearance of spontaneous phenotype mutations in the population of *Gluconacetobacter hansenii* representatives. The aim of the present research is to elucidate the impact of the carbon source on the productivity of *G. hansenii* strain and the appearance of cellulose-negative mutants under static cultivation conditions.

We studied the strain *G. hansenii* GH 1/2008 (VKPM B-10547) as a BC source. Liquid phase static cultivation of *G. hansenii* GH 1/2008 was carried out using the modified Hestrin-Schramm (HS) medium, containing 4% of monosaccharides (glucose, fructose and galactose) or disaccharides (sucrose, maltose, lactose) as carbon sources. The occurrence of mutants was calculated considering phenotypes of colonies obtained by seeding the samples of cultural liquid and wash-offs of cells from films produced by the cultivation of the producer on modified agarized HS media. The polymer outcome was expressed as the film absolute dry weight (a.d.w.) per cultivation medium volume unit. We studied the morphology of the producer's wild type and mutant cells by means of atomic force microscopy (AFM) (See Fig. 8). The structural organization of the produced films and gel was revealed by means of scanning electron microscopy (SEM) performed after freeze-drying. The composition of the fibers was checked acquiring FTIR Spectroscopy.

We established that *G. hansenii* GH 1/2008 produces a dense film on media containing fructose, glucose and sucrose, while the polymer has gel consistence when

grown on maltose, galactose and lactose (See Fig. 1). The maximal quantity (a.d.w.) of polymer was produced on fructose- and sucrose-containing media. The overall number of immobilized producer cells was considerably higher when grown on media with glucose, fructose and sucrose than on gels grown on those containing maltose, galactose and lactose (See Table 1). SEM imaging revealed considerable difference in the microscale organization of films and gels produced by *G. hansenii* GH 1/2008 on various carbon sources (See Fig. 2). Fructose-containing medium yields the densest structure with dense layers separated by 2 $\mu$ m thick areas filled with non-ordered BC fibrils. The microscale organization of sucrose- and glucose-based films were very similar and had a cell-like structure. In cases where the synthesized polymer had squeezable gel consistence, its microstructure was not layered but close to isotropic. The studies of gels by means of FTIR spectroscopy showed that the gels are also formed of BC molecules; the spectra were almost identical (See Fig. 4). The only difference, i.e. the intensity of the 1638  $\text{cm}^{-1}$  peak, can be explained by the presence of a higher amount of bound water in the latter. It is known that some strains of this species may produce glucuronic acid oligomers under unfavorable conditions, but peaks corresponding to carboxyl or carbonyl groups were not revealed in the spectra. This is the evidence that no detectable amounts of glucuronic acid were produced under conditions studied. The analysis of colonies of *G. hansenii* GH 1/2008 cultivated under static conditions on media containing various carbon sources revealed colonies with two dominating phenotypes: non-mucoid smooth convex colonies and mucoid flat ones (See Fig. 5). The number of cells forming smooth non-mucoid colonies on agarized media was maximal in the inoculations of cultural liquids after the cultivation on media containing fructose and sucrose, i.e. those carbon sources that demonstrated high productivity per 1L of cultural liquid (See Fig. 6). In the inoculations of the cultural liquid and wash-offs of cells immobilized on gels obtained by the cultivation on media containing galactose and lactose, the number of mucoid colonies was considerably higher (See Table 2). The clones forming mucoid type colonies did not produce BC films when reinoculated in liquid media, while those forming colonies of mucoid (smooth) type produce films on the 3rd day of cultivation (See Fig. 7). The analysis of cells shape and sizes by means of AFM did not reveal any statistically valid difference between the mutants and the wild type.

The present research shows that the source of carbon is a selective factor in the formation of the inner composition of the population of clones of the bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008. The proliferation of cellulose-negative cells arouses competition for the substrate with cellulose-positive cells of *G. hansenii* GH 1/2008 that reduces the number of the latter and the production of the exopolymer.

*The paper contains 8 Figures, 2 Tables and 38 References.*

**Key words:** *Gluconacetobacter hansenii*; bacterial cellulose; cellulose-negative mutants; microscale morphology.

**Funding:** This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 19-34-90088) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. 18-29-06049 mk).

**Acknowledgments:** The authors thank the Department of Structural Studies, ND Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow for carrying out SEM imaging.

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. Brown RMJr, Saxena IM. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000;38(1-2):57-67. doi: [10.1016/S0981-9428\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00168-6)

2. Hassan EA, Abdelhady HM, Abd El-Salam SS, Abdullah SM. The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions. *Br. Microbiol. Res. J.* 2015(9):1-13. doi: [10.9734/BMRJ/2015/18223](https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/18223)
3. Bolotova KS, Chukhchin DG, Mayer LV, Gur'yanova AA. Morphological features of the fibrillar structure of plant and bacterial cellulose. *Lesnoy zhurnal = Russian Forestry Journal.* 2016;6:153-165. doi: [10.17238/issn0536-1036.2016.6.153](https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2016.6.153)
4. Lee K-Y, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience.* 2014;14(1):10-32. doi: [10.1002/mabi.201300298](https://doi.org/10.1002/mabi.201300298)
5. Park JK, Jung JY, Park YH. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters.* 2003;(25):2055-2059. doi: [10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18](https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18)
6. Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J Applied Microbiology.* 2009;107(2):576-583. doi: [10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x)
7. Jozala, AF, Pértile RAN, dos Santos CA, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Seckler MM, Gama FM, Pessoa AJr. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2015;99(3):1181-1190. doi: [10.1007/s00253-014-6232-3](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3)
8. Gromovykh TI, Fan MK, Danil'chuk TN. *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 bacterial strain – bacterial cellulose producer. Patent No. 2464307 Russian Federation. Int. Cl. C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Application No. 2011121841/10, Prior. 31.05.2011; Publ. 20.10.2012. Bul. No. 29. 12 p. In Russian
9. Khripunov AK, Tkachenko AA. Composition of nutrient medium for culturing *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose preparing (variants). Patent No. 2189394 Russian Federation. Int. Cl. C12P19/02, C12N1/20. Application No. 98108987/13, Prior. 05.05.1998; Publ. 20.11.1999. Bul. No. 6 p. In Russian
10. Revin VV, Lijas'kina EV. Strain *Gluconacetobacter sucrofermentans* – producer of bacterial cellulose. Patent No. 2523606 Russian Federation. Int. Cl. C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Application No. 2013111072/10, Prior. 12.03.2013; Publ. 20.07.2014. Bul. No. 20. 6 p. In Russian
11. Volova TG, Prudnikova SV, Shishatskaja EI. Bacterial strain *Komagataeibacter xylinus* – bacterial cellulose producer. Patent No. 2568605 Russian Federation. Int. Cl. C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/00. Application No. 2014150288/10, Prior. 11.12.2014; Publ. 20.11.2015. Bul. No. 32. 11 p. In Russian
12. Son HJ, Heo MS, Kim YG, Lee SJ. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2001;33(1):1-5. doi: [10.1042/ba20000065](https://doi.org/10.1042/ba20000065)
13. Ruka DR, Simon GP, Dean KM. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers.* 2012;89(2):613-622. doi: [10.1016/j.carbpol.2012.03.059](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059)
14. Tsouko E, Kourmentza C, Ladakis D, Kopsahelis N, Mandala I, Papanikolaou S, Paloukis F, Alves V, Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams. *Int J Molecular Sciences.* 2015;16(7):14832-14849. doi: [10.3390/ijms160714832](https://doi.org/10.3390/ijms160714832)
15. Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* 1991;55(1):35-58. doi: [10.1128/MMBR.55.1.35-58.1991](https://doi.org/10.1128/MMBR.55.1.35-58.1991)
16. Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS. Fermentative production of microbial cellulose. *Food Technol. Biotechnol.* 2009;47(2):107-124.
17. Li Y, Tian C, Tian H, Zhang J, He X, Ping W, Lei H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate

- involved. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96(6):1479-1487. doi: [10.1007/s00253-012-4242-6](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4242-6)
18. Schramm M, Hestrin S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J General Microbiology.* 1954;11(1):123-128. doi: [10.1099/00221287-11-1-123](https://doi.org/10.1099/00221287-11-1-123)
  19. Son HJ, Heo MS, Kim YG, Lee SJ. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2001;33(1):1-5. doi: [10.1042/ba20000065](https://doi.org/10.1042/ba20000065)
  20. Song H-J, Li H, Seo J-H, Kim M-J, Kim S-J. Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. *Korean J Chemical Engineering.* 2009;26(1):141-146. doi: [10.1007/s11814-009-0022-0](https://doi.org/10.1007/s11814-009-0022-0)
  21. Li H, Kim S-J, Lee Y-W, Kee C, Oh I. Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes. *Korean J Chemical Engineering.* 2011;28:2306-2311. doi: [10.1007/s11814-011-0111-8](https://doi.org/10.1007/s11814-011-0111-8)
  22. Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jeziarska A, Goncalves-Miskiewicz M, Turkiewicz M, Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2002;29:189-195. doi: [10.1038/sj.jim.7000303](https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303)
  23. Krystynowicz A, Koziolekiewicz M, Wiktorowska-Jeziarska A, Bielecki S, Wojtera E, Masny A, Płucienniczak A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. *Acta Biochimica Polonica.* 2005;52(3):691-698. doi: [10.18388/abp.2005\\_3432](https://doi.org/10.18388/abp.2005_3432)
  24. Valla S, Kjosbakken J. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *J General Microbiology.* 1982;128:1401-1408. doi: [10.1099/00221287-128-7-1401](https://doi.org/10.1099/00221287-128-7-1401)
  25. Nguyen VT, Flanagan B, Mikkelsen D, Ramirez S, Rivas L, Gidley MJ, Dykes GA. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydrate Polymers.* 2010;80:337-343. doi: [10.1016/j.carbpol.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.019)
  26. Kuga S, Takagi S, Brown, RM. Native folded-chain cellulose II. *Polymer.* 1993;34:3293-3297. doi: [10.1016/0032-3861\(93\)90404-X](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90404-X)
  27. Valla S, Coucheron DH, Fjaervik E, Kjosbakken J, Weinhouse H, Ross P, Amikam D, Benziman M. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Molecular and General Genetics.* 1989;217(1):26-30. doi: [10.1007/BF00330938](https://doi.org/10.1007/BF00330938)
  28. Mohammadkazemi F, Doosthoseini K, Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734). *Cellulose Chemistry and Technology.* 2015;49(5-6):455-462. doi: [10.13140/RG.2.1.3415.5685](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3415.5685)
  29. Mohite BV, Salunke BK, Patil SV. Enhanced production of bacterial cellulose by using *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013;169:1497-1511. doi: [10.1007/s12010-013-0092-7](https://doi.org/10.1007/s12010-013-0092-7)
  30. Fan Mi Khan. *Biotehnologiya bakterial'noy tsellyulozy s ispol'zovaniem shtamma – produtsenta Gluconacetobacter hansenii* GH – 1/2008 [Biotechnology of bacterial cellulose using the producer strain *Gluconacetobacter hansenii* GH – 1/2008]. Cand. Sci. Diss. Biotechnology specialty. Moscow: Faculty of Biology, MV Lomonosov Moscow State University; 2013. 161 p.
  31. Park JK, Khan T, Jung JY. Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by *Gluconacetobacter hansenii* strain. *Carbohydrate Polymers.* 2006;63:482-486. doi: [10.1016/j.carbpol.2005.10.004](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.004)
  32. Gromovykh TI, Feldman NB, Timashev PS, Kiselyova OI, Kraeva MN, Grinevich AS, Tikchonova OA, Bardakova KN, Churbanov SN, Lutsenko SV. Elaboration of bacterial cellulose matrix for the immobilization of *Escherichia coli* cells. *Int J Nanotechnology.* 2018;15(4/5):288-300. doi: [10.1504/IJNT.2018.094784](https://doi.org/10.1504/IJNT.2018.094784)

33. Pigaleva MA, Bulat MV, Gromovykh TI, Gavryushina IA, Lutsenko SV, Gallyamov MO, Novikov IV, Buyanovskaya AG, Kiselyova OI. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? *The J Supercritical Fluids*. 2019;147:59-69. doi: [10.1016/j.supflu.2019.02.009](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.009)
34. Kashin AS, Ananikov VP. A SEM study of nanosized metal films and metal nanoparticles obtained by magnetron sputtering. *Russ Chem Bull Int Ed*. 2011;60:2602-2607. doi: [10.1007/s11172-011-0399-x](https://doi.org/10.1007/s11172-011-0399-x) In Russian
35. Coseri S, Biliuta G, Zemlji LF, Srndovic JS, Larsson PT, Strnad S, Krežze T, Naderic A, Lindström T. One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate. *RSC Adv*. 2015;5:85889-85897. doi: [10.1039/c5ra90100f](https://doi.org/10.1039/c5ra90100f)
36. Zhang X, Xiao N, Wang H, Liu C, Pan X. Preparation and characterization of regenerated cellulose film from a solution in lithium bromide molten salt hydrate. *Polymers*. 2018;10:614-626. doi: [10.3390/polym10060614](https://doi.org/10.3390/polym10060614)
37. Rubina MS, Pigaleva MA, Naumkin AV, Gromovykh TI, Vasil'kov AYu. Bacterial cellulose pellicles produced by *Gluconacetobacter hansenii* as a started material for oxidized nanofibrillated cellulose. *Doklady rossiysskoy akademii nauk. Khimiya, nauki o materialakh = Proceedings of the Academy of Sciences. Chemistry, Material Science*. 2019;492:70-75. In Russian
38. Gromovykh TI, Pigaleva MA, Gallyamov MO, Ivanenko IP, Ozerova KE, Kharitonova EP, Bahman M, Feldman NB, Lutsenko SV, Kiselyova OI. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures. *Carbohydrate Polymers*. 2020;237:116140-116152. doi: [10.1016/j.carbpol.2020.116140](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140)

*Received 23 August, 2020; Revised 01 November, 2020;  
Accepted 21 February, 2021; Published 31 March, 2021.*

#### Author info:

**Kiselyova Olga I**, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Lecturer, Chair of Polymer and Crystal Physics, Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7637-7758>

E-mail: [ok@polly.phys.msu.ru](mailto:ok@polly.phys.msu.ru)

**Lutsenko Sergei V**, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Biotechnology, Institute for Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya Str., Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2017-6025>

E-mail: [svlutsenko57@mail.ru](mailto:svlutsenko57@mail.ru)

**Feldman Natalia B**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, Institute for Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8 Trubetskaya Str., Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6098-2788>

E-mail: [n\\_feldman@mail.ru](mailto:n_feldman@mail.ru)

**Pigaleva Marina A**, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Junior Researcher, Chair of Polymer and Crystal Physics, Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7483-1294>

E-mail: [pigaleva@polly.phys.msu.ru](mailto:pigaleva@polly.phys.msu.ru)

**Gavryushina Irina A**, Graduate Student, G.F. Gause Institute of New Antibiotics, 11 Bolshaya Pirogovskaya Str., Bld. 1, Moscow 119021, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4889-4977>

E-mail: [irina-alekcandrovna2013@yandex.ru](mailto:irina-alekcandrovna2013@yandex.ru)

**Sadykova Vera S**, Dr. Sci. (Biol.), Vice Director of G.F. Gause Institute of New Antibiotics, 11 Bolshaya Pirogovskaya Str., Bld. 1, Moscow 119021, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9372-5948>

E-mail: [sadykova\\_09@mail.ru](mailto:sadykova_09@mail.ru)

**Rubina Margarita S**, Research Fellow, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, 28 Vavilova Str., Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

E-mail: [margorubina@yandex.ru](mailto:margorubina@yandex.ru)

**Gromovykh Tatiana I**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, Institute for Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya Str., Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

E-mail: [gromovykhhtatyana@mail.ru](mailto:gromovykhhtatyana@mail.ru)

## БОТАНИКА

УДК 575.174.015.3:582.475.2

doi: 10.17223/19988591/53/3

**В.П. Ветрова<sup>1</sup>, А.П. Барченков<sup>2,3</sup>, Н.В. Синельникова<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Камчатский филиал Тихоокеанского института географии  
ДВО РАН, г. Петропавловск-Камчатский, Россия

<sup>2</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

<sup>4</sup>Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан, Россия

### **Сравнительный анализ изменчивости формы семенных чешуй шишек *Larix dahurica* и *L. sajanderi* (Pinaceae)**

Проведен анализ изменчивости формы семенных чешуй шишек двух близкородственных видов – лиственницы даурской (л. Гмелина) *L. dahurica* Laws. (= *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и л. Каяндера (*L. sajanderi* Mayr) с помощью методов геометрической морфометрии. Сравнение по морфотипам и относительной деформации чешуй выполнено на примере двух популяций *L. dahurica* из Эвенкии и Забайкалья и шести популяций *L. sajanderi* из Якутии и Магаданской области. Проанализированы выборки объемом 100–150 шишек, собранные с 20–30 деревьев в каждой популяции. В эвенкийской популяции *L. dahurica* выделено 11 морфотипов семенных чешуй, четыре из которых незначительно отличались от морфотипов, определенных ранее в якутских популяциях *L. sajanderi*. Данные фенотипического анализа подтверждают дифференциацию двух видов лиственницы по форме семенных чешуй шишек, включая различия и по морфотипам и по относительным деформациям чешуй. Значительно различаются между собой внутривидовые группы: популяции *L. sajanderi* из Магаданской области и Якутии, популяции *L. dahurica* из Эвенкии и Забайкалья. Результаты подтверждают возможность использования геометрической морфометрии в качестве эффективного инструмента для анализа внутри- и межвидовой дифференциации лиственницы по форме семенных чешуй шишек.

**Ключевые слова:** *Larix*; морфология шишек, геометрическая морфометрия; дифференциация популяций.

**Для цитирования:** Ветрова В.П., Барченков А.П., Синельникова Н.В. Сравнительный анализ изменчивости формы семенных чешуй шишек *Larix dahurica* и *L. sajanderi* (Pinaceae) // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 47–67. doi: 10.17223/19988591/53/3

## Введение

Изучение изменчивости генеративных органов имеет важное значение в познании таксономической дифференциации восточносибирских и дальневосточных видов лиственницы, обладающих исключительной полиморфностью [1–5]. В систематике лиственниц в качестве диагностирующих маркеров используют главным образом признаки строения шишек, к числу особо важных признаков относится форма семенных чешуй [6]. Обзор многочисленных исследований по изменчивости и систематике лиственницы за прошедшее столетие показал их недостаточность для суждений о статусе и генезисе восточносибирских и дальневосточных таксонов [7]. Особое внимание уделяется изучению внутривидовой изменчивости и дифференциации двух видов лиственниц – *Larix dahurica* Laws.<sup>1</sup> (= *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и *L. cajanderi* Mayr, наиболее распространенных в этом регионе. Сведения об объеме и распространении *L. dahurica* и *L. cajanderi* противоречивы. По мнению ряда авторов [11–15], лиственница даурская (л. Гмелина), распространенная на северо-востоке Азии, включает 4 разновидности: *L. gmelinii* var. *gmelinii* с ареалом от Енисея до Берингова моря, *L. gmelinii* var. *japonica* (Maxim. ex Regel) Pilg. с ареалом на Хоккайдо, Сахалине и на юге Курильских островов, *L. gmelinii* var. *olgensis* (A. Henry) Ostenf. & Syrach., отмеченную для Приморья, северного Китая и Северной Кореи, и высокогорный эндемик Китая *L. gmelinii* var. *principis-rupprechtii* (Mayr) Pilg. Генетические и кариологические исследования подтвердили видовой таксономический статус лиственницы Каяндера [16–18], которая считалась синонимом типовой разновидности л. Гмелина (*L. gmelinii* var. *gmelinii*) [12] или восточной расой лиственницы даурской [2], а также обособленность дальневосточных видов лиственниц – л. ольгинской (*L. olgensis* A. Henry) и л. курильской (*L. kamtschatica* (Rupr.) Carrig. (= *L. kurilensis* Mayr) [18–23].

Изучение морфологической изменчивости лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока позволило выявить видовые различия и описать границы распространения лиственниц даурской, ольгинской, курильской [1, 2] и лиственницы Каяндера [3, 4, 9]. В ходе недавней критической ревизии рода *Larix* подтверждены видовые различия по вегетативным и репродук-

<sup>1</sup> В настоящее время нет единого мнения о приоритетном названии лиственницы даурской (л. Гмелина). Известно, что название «даурская» для лиственницы, произрастающей в Забайкалье, предложено в 1838 г. Н.С. Турчаниновым [4]. Однако ботаническое описание вида сделано позднее [8]: Ruprecht описал этот вид в 1845 г. как *Abies gmelinii* Rupr., позднее в 1856 г. он сделал новую комбинацию в роде *Larix* – *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr., и Trautvetter описал этот вид в 1846 г. как *Larix dahurica* Turcz. ex Trautv. Е.Г. Бобров доказал, что приоритетным названием является *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. [9]. По мнению Н.Н. Цвелёва [10], приоритетным является *L. dahurica* Laws., описанная Lawson в 1836 г. Монограф хвойных Farjon [11] не принял названия *Larix dahurica* C. Lawson и *Larix dahurica* Turcz. ex Trautv., считая приоритетным названием *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen., которое в настоящее время принято в мировом списке хвойных [12].

тивными органам восточносибирских и дальневосточных таксонов, включая лиственницу даурскую, Каяндера, лиственницу курильскую, ольгинскую, а также распространенную на севере Китая лиственницу Принца Рупрехта (*L. principis-rupprechtii* Mayr) [6].

Хотя результаты изучения морфологической и генетической изменчивости лиственниц на Российском Дальнем Востоке доказывают видовую самостоятельность лиственницы Каяндера [3, 4, 9, 16], этому виду свойственна значительная структурированность в границах ареала и по морфологическим и по генетическим параметрам. Так, отмечается существование значительных генетических различий между популяциями лиственницы с побережья Охотского моря, Камчатки и континентальными популяциями из Якутии и Магаданской области [16, 22–26]. Оценка генетической изменчивости лиственницы по хлоропластным маркерам подтверждает выделение *L. cajanderi* в самостоятельный таксон, в то время как по митохондриальным маркерам популяции северо-востока нечетко отделяются от остальных восточносибирских популяций лиственницы, что указывает на недавнюю дивергенцию лиственницы Каяндера от лиственницы Гмелина [16]. По мнению Б.П. Колесникова [1] и Е.Г. Боброва [9], лиственница Каяндера – молодой вид, сформировавшийся в конце плейстоцена в исходных популяциях лиственницы Гмелина. Видовой статус лиственницы Каяндера и её генетическую обособленность от л. Гмелина связывают с барьером для потока генов, который мог представлять в плейстоцене Верхоянский хребет [16]. По данным о морфологической изменчивости, граница ареала лиственницы Каяндера проходит западнее Верхоянского хребта [9, 3, 4].

Значительная генетическая и морфологическая внутривидовая дифференциация лиственницы Каяндера является основанием для пересмотра границ ареала этого вида. По генетическим параметрам в ареал лиственницы Каяндера не входят популяции лиственницы, произрастающие в Приморье, которые относятся к лиственнице ольгинской или ее гибридам с *L. dahurica*, *L. cajanderi* и *L. kamtschatica*, популяции лиственницы на Сахалине, а также выделенные в самостоятельный таксон популяции лиственницы на Камчатке [16]. По результатам исследований изменчивости признаков генеративных органов лиственниц, произрастающих в южной части Российского Дальнего Востока, установлено, что популяции с Курил, Сахалина и Камчатки объединяются в один кластер в соответствии с признаками, характерными для лиственницы курильской, а популяции расположенные в бухтах Ольга и Валентин и на прилегающей к ним территории существенно отличались от остальных континентальных популяций и отнесены к лиственнице ольгинской [5]. Исследование морфологической изменчивости семенных чешуй шишек лиственниц *L. dahurica* и *L. cajanderi* методами классической морфометрии не обнаружило различий между этими видами по форме чешуй [3, 27].

Применение новых методов геометрической морфометрии генеративных органов позволило выявить значительные различия камчатских попу-

ляций лиственницы и лиственницы с о-ва Шикотан от лиственниц Каяндера и Гмелина по форме семенных чешуй шишек [28]. Эти исследования подтверждают таксономический видовой статус лиственницы курильской и видовую самостоятельность произрастающей на Камчатке лиственницы в статусе гибридного вида (*L. cajanderi* × *L. kurilensis*), как ранее установлено по комплексу таксономически значимых признаков генеративных органов [29]. По кариологическим признакам также обнаружены отличия камчатских популяций лиственницы от лиственниц *L. dahurica* и *L. cajanderi* [18]. Сравнительные исследования изменчивости формы семенных чешуй шишек по трем видам – *L. sibirica* Ledeb., *L. dahurica* и *L. cajanderi*, проведенные методами геометрической морфометрии, позволили определить основные направления изменчивости чешуй и оценить уровень внутри- и межвидовых различий [30]. Опыт с изучением лиственницы курильской показал, что более детальные исследования межвидовых различий дает сравнение популяций по морфотипам семенных чешуй [28].

Цель работы – оценить дифференциацию *L. dahurica* и *L. cajanderi* по составу и частоте встречаемости морфотипов семенных чешуй шишек, используя методы геометрической морфометрии.

### Материалы и методики исследования

Исследованы две выборки шишек из популяций л. даурской (*L. dahurica*) из Эвенкии и Забайкалья и шесть выборок шишек из популяций л. Каяндера (*L. cajanderi*) из Якутии и Магаданской области (таблица, рис. 1).

В задачи исследования входило сравнение популяций по изменчивости формы чешуй, выделение морфотипов чешуй и проверка различий двух видов по составу и частоте встречаемости морфотипов. Материалом для исследования послужили шишки, собранные с 20–30 деревьев в каждой популяции. С каждого дерева собрано по 15–20 шишек, из которых выбраны по 5 наиболее крупных, из средней части которых взяты по 3–5 чешуй для сканирования. Для сканирования чешуй использовали сканер Epson Perfection V500 Photo. Из сканированных чешуй выбраны наиболее репрезентативные 5–10 образцов чешуй для каждого дерева.

Для характеристики формы семенных чешуй методами геометрической морфометрии использована расстановка контурных точек по краю чешуй с последующим анализом частных деформаций, описывающих индивидуальные различия по изменчивости координат меток, и относительных деформаций, рассчитанных методом анализа главных компонент (РСА) на основе ковариации частных оценок деформаций [26, 28]. На сканированные изображения по контуру чешуй наносили метки с помощью экранного дигитайзера TPSDig [31], используя угловой алгоритм. Семенные чешуи относятся к билатерально симметричным структурам, поэтому для характеристики их формы выбраны 10 меток на одной стороне чешуй [26].

**Характеристика исследованных выборок лиственницы**  
**[Characteristics of the studied larch samples]**

Код популяции [Population code]	Географическое положение [Geographic position]	Географические координаты [Geographic coordinates]	Количество деревьев в выборке [Number of trees in the sample]
M1_Tord	Магаданская обл., горный массив Торданья [Magadan Oblast, Tordanya mountain range]	61°55'N, 148°40'E	30
M2_Orotuk	Магаданская область, окрестности с. Оротук [Magadan Oblast, surroundings of Orotuk village]	62°07'N, 148°30'E	30
M3_Saturn	Магаданская область, устье ручья Сатурн, хребет Бол. Анначаг [Magadan Oblast, the mouth of the Saturn creek, Bol. Annachag range]	62°03'N, 149°09'E	30
M4_Necha	Магаданская область, устье р. Неча [Magadan Oblast, mouth of the Necha river]	62°10'N, 147°56'E	30
Ja1_Namsk	Якутия, Намский улус [Yakutia, Namsky ulus]	62°35'N, 129°43'E	20
Ja2_Kang	Якутия, Мегино-Кангаласский улус [Yakutia, Megino-Kangalassky ulus]	62°21'N, 130°39'E	27
Ja3_N-kol	Якутия, окр. пос. Черский [Yakutia, surroundings of Chersky village]	68°45'N, 161°19'E	22
Lgm_Even	Эвенкия, окр. пос. Тура, устье р. Кочечум [Evenkia, surroundings of Tura village, mouth of the Kochechum river]	64°19'N, 100°07'E	22
Lgm_Ingod	Восточное Забайкалье, долина р. Ингода [East Transbaikalia, valley of the Ingoda river]	51°49'N, 113°09'E	23

При визуализации результатов анализа для получения полного изображения чешуй использовали дублирование и отражение от оси симметрии координат меток, полученных на одной стороне чешуй методом скользящей базовой линии (SBR-sliding baseline registration), который исключает вращение оси симметрии морфологических структур. Обработку и анализ данных проводили с помощью пакета IMP-программ (Integrated Morphometrics Programms) [32] в соответствии с методическими указаниями по применению геометрической морфометрии в биологии [33, 34].

Исходные координаты меток чешуй нормировали в программе CoordGenb [32] с помощью Прокрустова совмещения со средней конфигурацией, определенной по объединённой выборке чешуй шишек *L. dahurica* и *L. cajanderi*. Для выделения морфотипов полученные в этой программе Прокрустовы координаты меток семенных чешуй шишек каждого дерева сравнивали попарно с другими деревьями в программе TwoGroupb, значимость отличий оценивали по критерию F-теста Гудолла на основе «бутстреп-ресамплинга» [32]. К разным морфотипам по форме семенных чешуй относили выборки с деревьев, образцы чешуй шишек которых статистически значимо различались ( $p < 0,01$ ).

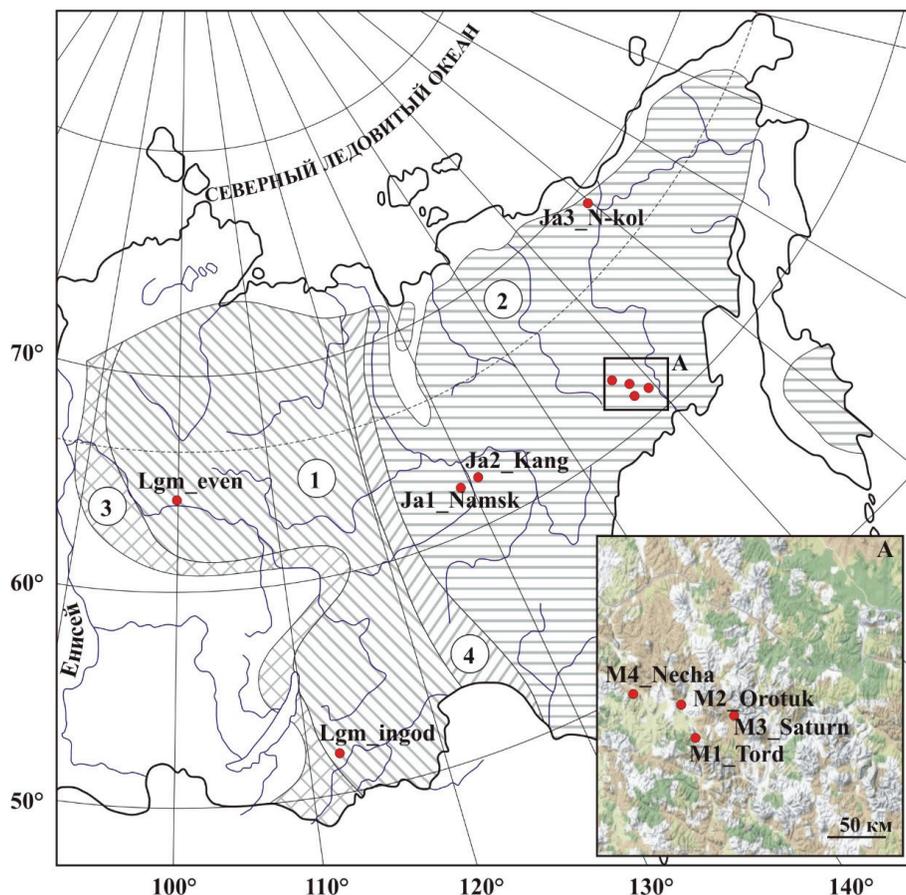


Рис. 1. Карта-схема расположения выборок лиственницы.

Код популяции см. в таблице. Ареалы лиственниц

[Fig. 1. Map layout of larch samples. For the population code see table.

Larch ranges]: 1 – *Larix dahurica* (*L. gmelinii*); 2 – *L. cajanderi*;

3 – *L. czezanowskii*; 4 – *L. dahurica* × *L. cajanderi*

(по: И.Ю. Коропачинский, Л.И. Милютин

[(according to Igor Koropachinskii and Leonid Milyutin] [4])

Первоначально в каждой популяции проводили попарное сравнение выборок семенных чешуй со всех деревьев, объединяя деревья сходных морфотипов в морфологические группы. Затем образцы всех морфологических групп, выделенных в популяциях, сравнивали попарно между собой для определения общих морфотипов. Морфотипы, выделенные в популяциях *L. dahurica*, сравнивали с морфотипами, ранее определенными в популяциях *L. cajanderi* [28]. По составу и частоте морфотипов рассчитаны показатели сходства популяций ( $r$ ) и фенотипические расстояния ( $D$ ) между выборками [35] по формулам, приведенным ниже:

$$r = \sum_{i=1}^m \sqrt{p_i q_i}; D = \frac{2\sqrt{2}}{\pi} \sqrt{1-r},$$

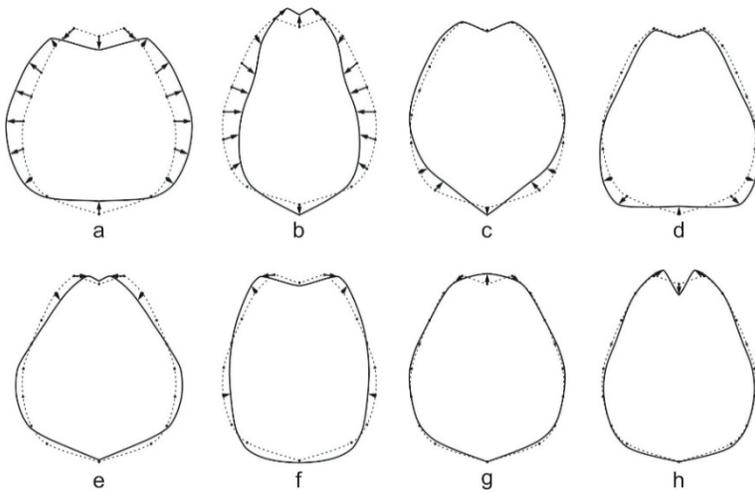
где  $m$  – общее число морфотипов, обнаруженных во всех выборках;  $p_i$ ,  $q_i$  – частоты морфотипов в сравниваемых популяциях.

По матрице фенотипических расстояний проведена ординация выборок методом многомерного шкалирования. Основные направления изменчивости формы чешуй лиственниц определены с помощью анализа главных компонент значений частных деформаций чешуй на основе матрицы их ковариации в программе PCAGEN6n [32]. Полная матрица значений относительных деформаций чешуй (PCA-scores), полученных в программе PCAGEN6n, использована в качестве признаков изменчивости формы чешуй для оценки дифференциации этих двух видов лиственниц при проведении канонического дискриминантного анализа.

### Результаты исследования и обсуждение

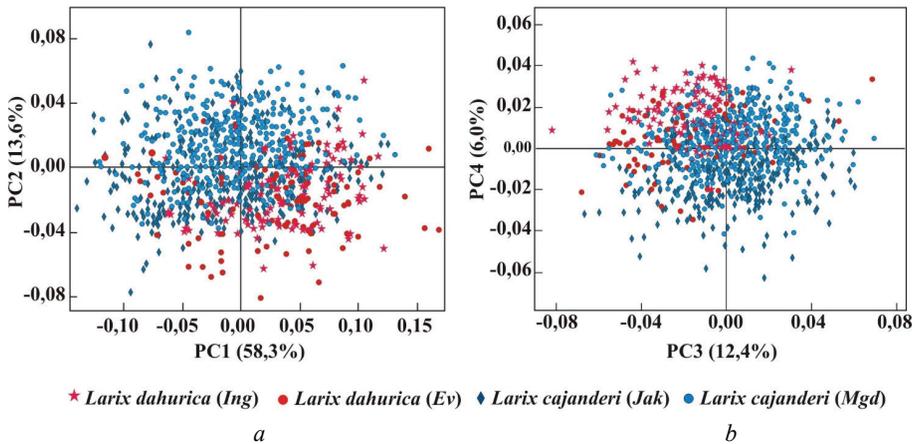
Основные направления изменчивости формы чешуй шишек двух видов лиственниц по результатам анализа четырех главных компонент значений частных деформаций чешуй показаны на рис. 2. Наибольшая степень изменчивости (58,3% общей дисперсии значений частных деформаций чешуй), выделяемая первой главной компонентой (PC1), наблюдается по ширине и длине чешуй (рис 2, *a, b*). Вторая главная компонента (13,6% общей дисперсии) характеризует изменчивость формы нижней части чешуй (рис 2, *c, d*). Третья компонента (12,4%) выделяет вариацию формы чешуй от грушевидной до овальной (рис 2, *e, f*), и четвертая компонента (6%) связана с изменчивостью формы и глубины выемки верхней части чешуй (рис 2, *g, h*).

Ординация выборок на плоскости главных компонент дает некоторое представление о различиях в направлениях изменчивости формы чешуй этих двух видов лиственниц (рис. 3). Образцы *L. dahurica* преобладают в области максимальных положительных значений по PC1 и отрицательных значений по PC2 (рис. 3, *a*), что соответствует большей ширине чешуй и наличию чешуй с широким основанием (лопатовидных) (рис. 2, *a, d*) в отличие от *L. cajanderi* с преобладанием продолговатых и сердцевидных чешуй (рис. 2, *b, c*). По третьей и четвертой главным компонентам образцы *L. dahurica* преобладают в зоне отрицательных значений по PC3 и положительных по PC4 (рис. 3, *b*), что соответствует слабовыемчатым чешуям овальной формы и чешуям с округлой верхушкой (рис. 2, *f, g*) по сравнению с чешуями *L. cajanderi*, расширенными в нижней половине (широкояйцевидными) и выемчатыми (рис. 2, *e, h*). В области максимальных положительных значений PC4 (рис. 3, *b*), соответствующих чешуям с тупоугольной (или округлой) вершиной (рис. 2, *g*), преобладают образцы из Ингодинской популяции *L. dahurica*.



**Рис. 2.** Направления изменчивости формы семенных чешуй шишек *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) и *L. cajanderi* по результатам PCA-анализа. Стрелками показаны изменения положения меток средней конфигурации чешуй в соответствии с максимальными и минимальными значениями четырех главных компонент: PC1 (a, b); PC2 (c, d); PC3 (e, f); PC4 (g, h).

[Fig. 2. Directions of shape variability of the cone scales of *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) and *L. cajanderi* according to PCA analysis. The arrows indicate changes in the position of the landmarks of the reference configuration of the scales in accordance with the maximum and minimum values of four principal components: PC1 (a, b); PC2 (c, d); PC3 (e, f); PC4 (g, h)]

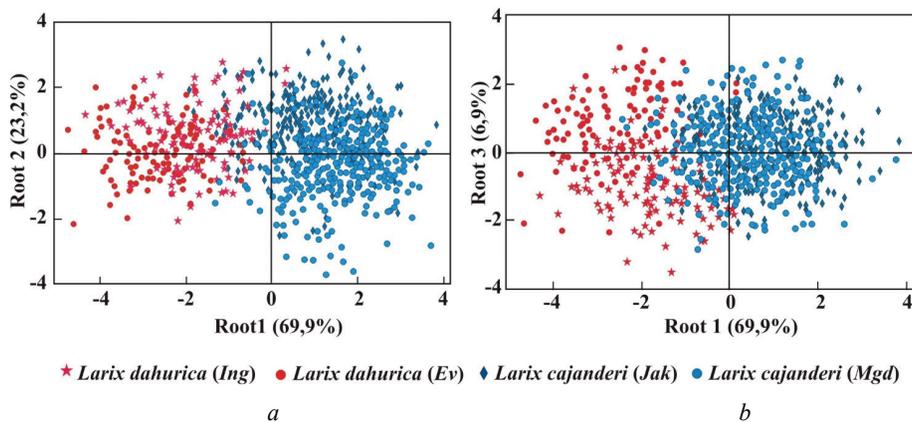


**Рис. 3.** Ординация выборок *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) и *L. cajanderi* на плоскости главных компонент изменчивости формы семенных чешуй (PC1–PC4)

[Fig. 3. The ordination of *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) and *L. cajanderi* samples on the plane of the principal components of the variation in the shape of the cone scales (PC1–PC4)]

Большее представление о дифференциации *L. dahurica* и *L. cajanderi* по изменчивости формы чешуй дает анализ полной матрицы значений всех

16 главных компонент (относительных деформаций чешуй), полученных в программе PCASGenbп. Результаты канонического дискриминантного анализа относительных деформаций чешуй этих двух видов лиственницы показаны на рис. 4.



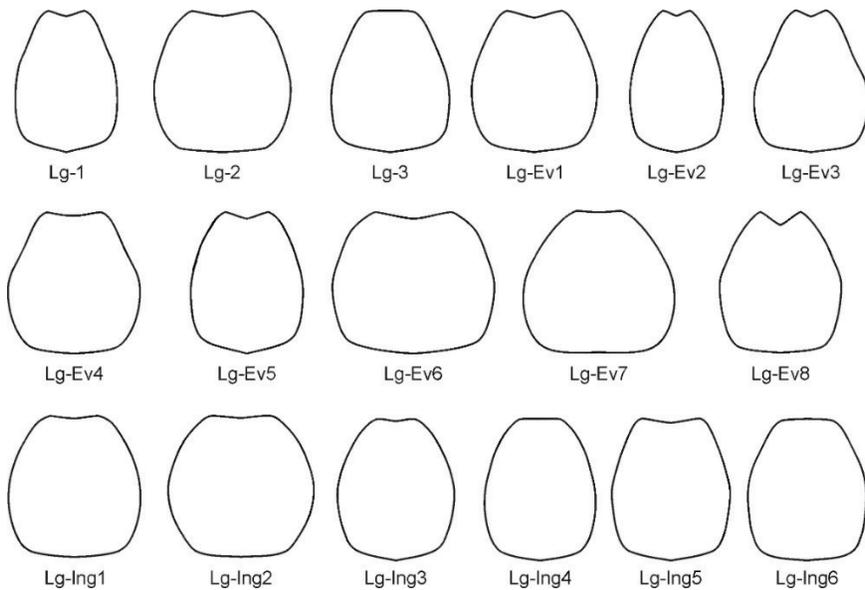
**Рис. 4.** Дифференциация выборок *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) и *L. cajanderi* по результатам канонического дискриминантного анализа относительных деформаций семенных чешуй шишек  
 [Fig. 4. Differentiation of *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) and *L. cajanderi* samples according to the results of the canonical discriminant analysis of relative deformations of the cone scales]

Дифференциация двух видов и различия между якутскими и магаданскими популяциями *L. cajanderi* отражены на рис. 4, а. Четкое разделение двух видов и внутривидовая дифференциация *L. dahurica* показаны на рис. 4, б.

В выборке шишек *L. dahurica* из Эвенкии выделены 11 морфотипов семенных чешуй, в Ингодинской популяции 9 морфотипов, из них общие для двух популяций – три морфотипа (Lg-1, Lg-2 и Lg-3, рис. 5). Форма чешуй варьирует от широких лопатовидных до овальных, от чешуй со слабовеямчатым верхним краем до выемчатых, а в забайкальской популяции преобладают чешуи с тупоугольной (прямосрезанной) верхушкой. В эвенкийской популяции наиболее распространены Lg-Ev1 (26%) и Lg-Ev5 (17%), а в забайкальской – Lg-Ing1(35%) и Lg-Ing2 (17%).

Все выделенные морфотипы сравнивали с морфотипами чешуй шишек *L. cajanderi*, определенными нами ранее в якутских и магаданских популяциях [28]. В якутских популяциях выделено 15 морфотипов семенных чешуй шишек, а в магаданских популяциях – 10 морфотипов (рис. 6).

При сравнении образцов семенных чешуй шишек выявлено 4 морфотипа, различия между которыми в популяциях двух видов лиственниц статистически незначимы ( $p > 0,01$ ). Общий для якутских популяций (нижнеколымской и кангаласской) морфотип L-Jak4 *L. cajanderi* незначительно отличался от выделенного в эвенкийской популяции *L. dahurica* типа чешуй Lg-Ev3 ( $p = 0,017$ ).

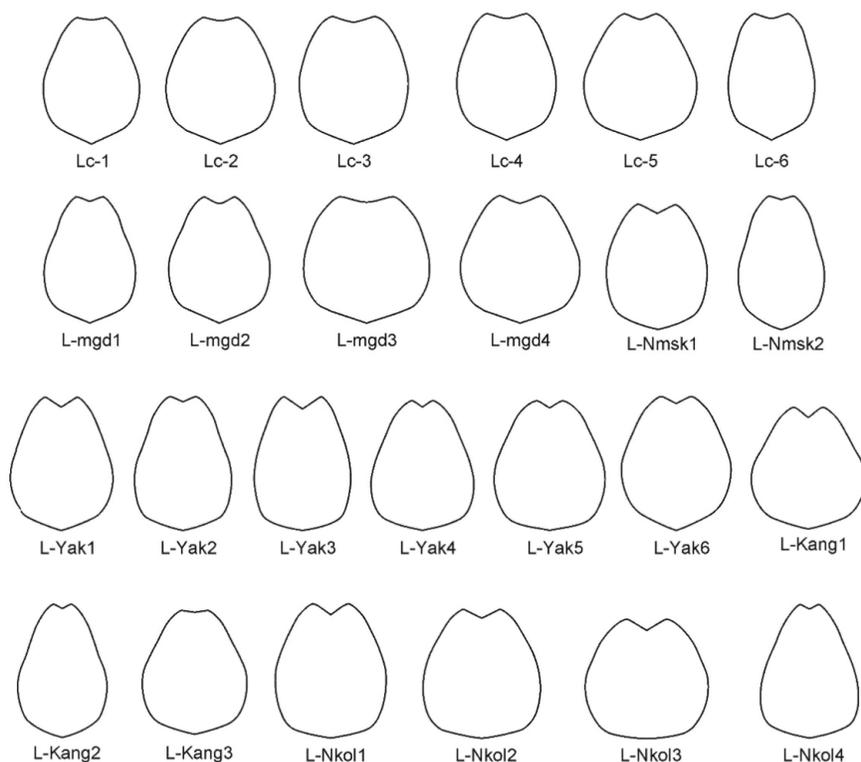


**Рис. 5.** Морфотипы семенных чешуй шишек *Larix dahurica* (*L. gmelinii*). Показана средняя форма чешуй, полученная для каждой морфологической группы в программе CoordGen. Морфотипы Lg-1 – Lg-3 выделены в эвенкийской и в забайкальской популяциях *L. dahurica*, морфотипы Lg-Ev1 – Lg-Ev8 выделены в эвенкийской популяции, морфотипы Lg-Ing1 – Lg-Ing6 выделены в забайкальской популяции [Fig. 5. Morphotypes of the cone scales of *Larix dahurica* (*L. gmelinii*). The average form of the scales obtained for each morphological group in the program CoordGen is shown. Morphotypes Lg-1 – Lg-3 were identified in *L. dahurica* populations from Evenkia and Transbaikalia; morphotypes Lg-Ev1 – Lg-Ev8 were identified in Evenkia; morphotypes Lg-Ing1 – Lg-Ing6 were identified in Transbaikalia]

Морфотип L-Nmsk1, выделенный в центрально-якутской популяции *L. cajanderi* лиственницы Каяндера, имел сходство с типом чешуй шишек *L. dahurica* из Эвенкии Lg-Ev5 ( $p=0,05$ ), а L-Nmsk2 с Lg-Ev2 ( $p=0,02$ ). Морфотип чешуй, единично отмеченный у *L. dahurica* (Lg-Ev8), имел сходство с L-Nkol1, распространённым в нижнеколымской популяции *L. cajanderi* ( $p = 0,34$ ). Все морфотипы чешуй шишек из Ингодинской популяции *L. dahurica* статистически значимо ( $p < 0,01$ ) отличались от морфотипов чешуй шишек *L. cajanderi*.

Ординация популяций лиственницы по результатам многомерного шкалирования матрицы фенотипических расстояний, рассчитанных по сходству морфотипов, показана на рис. 7.

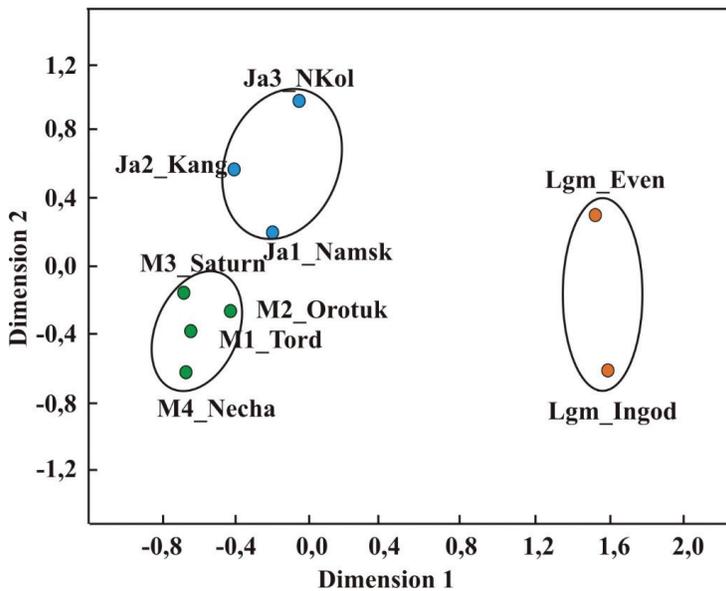
Несмотря на различия по форме чешуй между северо-енисейской и забайкальской популяциями *L. dahurica*, они обе обособлены от популяций *L. cajanderi* (рис. 7). Результаты сравнения популяций *L. dahurica* и *L. cajanderi* по морфотипам семенных чешуй шишек согласуются с результатами их дифференциации по относительным деформациям чешуй (см. рис. 4). Таким образом, результаты фенотипического анализа подтверждают дифференциацию этих двух видов лиственницы. Несмотря на сходство ряда морфотипов, якутские популяции *L. cajanderi* дифференцированы от популяций *L. dahurica* (рис. 7).



**Рис. 6.** Морфотипы семенных чешуй шишек *Larix cajanderi*. Морфотипы Lc-1 – Lc-6 выделены в камчатских и магаданских популяциях, морфотипы L-mgd1 – L-mgd4 выделены в магаданских популяциях, морфотипы L-Yak1 – L-Yak6 выделены во всех якутских популяциях, L-Nmsk1, L-Nmsk2 выделены в намской популяции, L-Kang1 – L-Kang3 выделены в кангаласской популяции и L-Nkol1 – L-Nkol4 выделены в нижнеколымской популяции *L. cajanderi*

[Fig. 6. Morphotypes of the cone scales of *Larix cajanderi*. Morphotypes Lc-1 – Lc-6 were identified in *L. cajanderi* populations from Kamchatka and Magadan Oblast; morphotypes L-mgd1 – L-mgd4 were identified in Magadan Oblast; morphotypes L-Yak1 – L-Yak6 were identified in all *L. cajanderi* populations from Yakutia; morphotypes L-Nmsk1, L-Nmsk2 were identified in Namsky population; morphotypes L-Kang1 – L-Kang3 were identified in Kangalas population; morphotypes L-Nkol1 – L-Nkol4 were identified in Lower-Kolym population of *L. cajanderi*]

Выделение *L. cajanderi* в самостоятельный таксон доказывает оценка генетической изменчивости лиственницы по хлоропластным маркерам [16]. Наличие сходных морфотипов между *L. cajanderi* и *L. dahurica* согласуется с данными генетического анализа по митохондриальным маркерам, показавшим, что популяции северо-востока нечетко отделяются от остальных восточносибирских популяций лиственницы, что указывает на недавнюю дивергенцию *L. cajanderi* от *L. dahurica* [16].



**Рис. 7.** Ординация популяций *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) и *L. cajanderi* по результатам многомерного шкалирования матрицы фенотипических расстояний. Код популяции см. в таблице

[Fig. 7. Ordination of *Larix dahurica* (*L. gmelinii*) and *L. cajanderi* populations in two-dimensional space from multidimensional scaling matrix of phenotypic distances. For the population code see Table]

Сходство некоторых эвенкийских морфотипов чешуй шишек с центрально-якутскими морфотипами согласуется с гипотезой о роли Верхоянского хребта в дивергенции *L. dahurica* и *L. cajanderi*. Между *L. dahurica* и верхнеколымскими (магаданскими) популяциями *L. cajanderi* сходных морфотипов не выявлено. Также отсутствуют сходные с *L. cajanderi* морфотипы чешуй шишек в забайкальской популяции *L. dahurica*. Обособленность выборки из Забайкалья и наличие в ней чешуй с тупоугольной (или прямо-срезанной) верхушкой, более характерной для лиственницы сибирской, обусловлена соседством с зоной распространения лиственницы Чекановского (*L. czekanowskii* Szafer) – гибрида *L. sibirica* и *L. dahurica* [4]. Исследование аллозимной изменчивости показало высокий уровень генетической дифференциации популяций из Эвенкии и Восточного Забайкалья, позволяющий рассматривать их как географические расы *L. dahurica* [36].

Неожиданным было сходство части морфотипов чешуй шишек *L. dahurica* и нижнеколымской популяции *L. cajanderi* (Lg-Ev8 и L-Nkol1, Lg-Ev3 и L-Jak4). По морфологическим признакам лиственницы бассейн р. Колыма, включая низовья, относится к зоне произрастания *L. cajanderi* [3, 4]. Возможно, что «даурские» морфотипы в нижнеколымской популяции являются реликтами распространения этого вида на крайнем северо-востоке. Нижнеколымская популяция по фенотипической изменчивости дифференцирована

от остальных популяций *L. cajanderi* (якутских и магаданских с Охотско-Колымского нагорья), что предполагает сохранение и независимое расселение лиственницы из изолированных ледниковых рефугиумов крайнего северо-востока. Согласно евразийской базе палеоботанических данных [37] в нижнем течении р. Колыма находки макрофоссилий лиственницы датируются начиная с 17–15 тыс. лет, а в Центральной Якутии – с 13 тыс лет. Наиболее древние находки лиственницы даурской обнаружены на северо-востоке Сибири в начале плейстоцена, этот вид лиственницы распространялся на юг и юго-запад, вытесняя *L. sibirica* и *L. olgensis* как менее приспособленные к новым более суровым климатическим условиям [2].

Процессы гибридизации на стыках ареалов *L. cajanderi* и *L. dahurica* детально изучены и описаны [3, 4]. Зона их гибридизации протянулась с севера на юг западнее Верхоянского хребта (см. рис. 1), захватывая бассейн р. Лена и ее притоков. Выборки *L. cajanderi* из Центральной Якутии, в которых обнаружены сходные с *L. dahurica* морфотипы чешуй шишек, могут испытывать влияние гибридов этих двух видов. Миграция гибридов *L. dahurica* × *L. cajanderi* в Центральную Якутию могла происходить вдоль бассейна р. Лена за счет гидрохории семян. Роль гидрохории семян в формировании ареалов хвойных подробно проанализирована в феногенетическом исследовании сосны обыкновенной [38].

Данные фенотипического анализа подтверждают, что граница ареалов *L. cajanderi* и *L. dahurica* проходит западнее Верхоянского хребта, как установлено ранее по их морфологической изменчивости [3, 4]. Значительная структурированность ареала *L. cajanderi* ранее выявлена по генетическим маркерам. Генетические различия между якутскими и магаданскими популяциями *L. cajanderi* установлены по изменчивости аллозимных маркеров [25]. По цитоплазматическим маркерам ДНК среди *L. cajanderi* выявлены популяции, как близкие к типичной *L. dahurica*, так и дифференцированные от нее [16]. Эти исследования показали, что отличие *L. cajanderi* от *L. gmelinii* проявляется по хлоропластным маркерам и что специфичный хлоротип *L. cajanderi* не встречается за пределами Верхоянского хребта. В соответствии с этими данными, таксономический статус *L. cajanderi* подтвержден для популяций в Магаданской области, к этому району относятся четыре наших выборки. Что касается двух наших выборок из Центральной Якутии (лиственничники на Лено-Амгинской равнине и Лено-Вилуйском междуречье), то этот район по изменчивости хлоропластных ДНК-маркеров не входит в ареал *L. cajanderi*, хотя по митохондриальной ДНК четкого различия *L. cajanderi* и *L. dahurica* не выявлено [16]. И по нашим данным и по результатам других морфологических исследований [3, 4], это район произрастания *L. cajanderi*.

Структура изменчивости митохондриальной и хлоропластной ДНК видов *Larix* на Дальнем Востоке указывает на сложные процессы гибридизации и видообразования видов лиственниц, которое продолжается здесь и в

настоящее время [16]. Вероятно, этими процессами объясняется некоторое сходство популяций двух видов по форме чешуй шишек, выявленное в нашем исследовании, однако четкая дифференциация видовых выборок подтверждает самостоятельный видовой статус *L. cajanderi*.

### Заключение

Данные фенотипического анализа подтверждают дифференциацию *L. dahurica* и *L. cajanderi* по форме семенных чешуй шишек. Сходство по морфотипам чешуй выявлено между эвенкийской популяцией *L. dahurica* и якутскими популяциями *L. cajanderi*. Значительно различаются между собой внутривидовые группы: популяции лиственницы Каяндера с Охотско-Колымского нагорья и Якутии, популяции *L. dahurica* из Эвенкии и Забайкалья. Возможно, что сходство между видами и внутривидовые различия объясняются продолжением процессов гибридизации и видообразования в районе пересечения ареалов лиственниц в этом регионе с лиственницей Чекановского (*L. czekanowskii*) и с гибридами *L. dahurica* × *L. cajanderi*. Геометрическая морфометрия может быть использована в качестве эффективного инструмента для анализа дифференциации *L. dahurica* и *L. cajanderi* по форме семенных чешуй шишек.

### Литература

1. Колесников Б.П. К систематике и истории лиственниц секции *Pauciseriales* Paschke // Материалы к истории флоры и растительности СССР / под ред. В.Л. Комарова, М.М. Ильина. М. : Изд-во АН СССР, 1946. Т. 2. С. 321–364.
2. Дылис Н.В. Лиственницы Восточной Сибири и Дальнего Востока. М. : Изд-во АН СССР, 1961. 209 с.
3. Абаимов А.П., Коропачинский И.Ю. Лиственницы Гмелина и Каяндера. Новосибирск : Наука, 1984. 121 с.
4. Коропачинский И.Ю., Милютин Л.И. Ботанико-географические и лесоводственные аспекты интрогрессивной гибридизации лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и лиственницы Каяндера (*L. cajanderi* Mayr) // Сибирский экологический журнал. 2011. No. 2. С. 225–238.
5. Адрианова И.Ю., Васюткина Е.А., Крестов П.В. Эколого-географическая изменчивость генеративных органов лиственницы на Российском Дальнем Востоке // Экология. 2011. Т. 42, No. 1. С. 9–16.
6. Орлова Л.В. Конспект дикорастущих и некоторых интродуцированных видов рода *Larix* Mill. (Pinaceae) флоры Восточной Европы // Новости систематики высших растений. 2011. Т. 43. С. 5–18.
7. Ирошников А.И. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. М. : ВНИИЛМ, 2004. 182 с.
8. IPNI. International Plant Names Index. Kew: The Royal Botanic Gardens, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens Publ.; 2020. URL: <http://www.ipni.org> (дата обращения: 05.06.2020).
9. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. Л. : Наука, 1978. 188 с.
10. Цвелёв Н.Н. О названиях некоторых лиственниц (*Larix*, Pinaceae) России // Ботанический журнал. 1994. Т. 79, No. 11. С. 90–91.

11. Farjon A. World Checklist and Bibliography of Conifers. Second edition. Kew : The Royal Botanic Gardens, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens Publ., 2001. 309 p.
12. Govaerts R., Farjon A. *World Checklist of Pinaceae*. Kew: Royal Botanic Gardens Publ., 2020. URL: <http://wcp.science.kew.org> (дата обращения: 10.06.2020).
13. Christensen K.I. Coniferopsida // *Flora Nordica* / ed. by B. Jonsell. Stockholm : The Royal Swedish Academy of Sciences Publ., 2000. Vol. 1. PP. 91–115.
14. Farjon A. A bibliography of conifers: selected literature on taxonomy and related disciplines of the Coniferales. Kew : Royal Botanic Gardens Publ., 2005. 211 p.
15. Farjon A., Filer D. An Atlas of the World's Conifers. An Analysis of their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status. Leiden; Boston : Brill Publ., 2013. 524 p.
16. Polezhaeva M.A., Lascoux M., Semerikov V.L. Cytoplasmic DNA variation and biogeography of *Larix* Mill. in Northeast Asia // *Molecular Ecology*. 2010. Vol. 19, Iss. 6. PP. 1239–1252. doi: [10.1111/j.1365-294X.2010.04552.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04552.x)
17. Орешкова Н.В., Белоконь М.М., Жамъянсурен С. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // *Генетика*. 2013. Т. 49, No. 2. С. 204–213. doi: [10.7868/S0016675812120090](https://doi.org/10.7868/S0016675812120090)
18. Муратова Е.Н. Особенности кариотипа лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) // *Ботанические исследования в Сибири* / под ред. В.Л. Черепнина, М.А. Шемберга. Красноярск : Институт леса им В.Н. Сукачева СО РАН, 1995. Вып. 3. С. 10–22.
19. Semerikov V.L., Lascoux M. Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. species // *Heredity*. 1999. Vol. 82, No. 2. PP. 193–204.
20. Semerikov V.L., Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species // *American Journal of Botany*. 2003. No. 8. PP. 1113–1123.
21. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Реунова Г.Д., Левина Е.А., Журавлев Ю.Н. Генетическая изменчивость и взаимоотношения лиственниц Сибири и Дальнего Востока по данным RAPD-анализа // *Генетика*. 2004. Т. 40, No. 4. С. 506–515.
22. Семериков В.Л., Полежаева М.А. Структура изменчивости митохондриальной ДНК лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока // *Генетика*. 2007. Т. 43, No. 6. С. 782–789.
23. Полежаева М.А., Семериков В.Л. Генетическая изменчивость cpSSR маркеров в роде *Larix* на Дальнем Востоке // *Вестник СВНЦ ДВО РАН*. 2009. No. 2. С. 75–83.
24. Журавлев Ю.Н., Козыренко М.М., Васюткина Е.А., Адрианова И.Ю., Артюкова Е.В., Реунова Г.Д., Катгышев А.И., Константинов Ю.М. Генетический полиморфизм лиственниц. ДНК-полиморфизм // *Биоразнообразие лиственниц Азиатской России* / ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин. Новосибирск : Изд. ГЕО, 2010. С. 72–96.
25. Ларионова А.Я., Орешкова Н.В. Генетический полиморфизм лиственниц. Изоэнимный полиморфизм // *Биоразнообразие лиственниц Азиатской России* / ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин. Новосибирск : Изд. ГЕО, 2010. С. 51–71.
26. Орешкова Н.В., Ветрова В.П., Синельникова Н.В. Генетическая и фенотипическая изменчивость лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr.) на севере Российского Дальнего Востока // *Сибирский экологический журнал*. 2015. Т. 22, No. 1. С. 13–27.
27. Барченков А.П., Милютин Л.И. Изменчивость генеративных органов лиственниц Гмелина и Каяндера в Восточной Сибири // *Хвойные бореальной зоны*. 2008. Т. 25, No. 1–2. С. 37–43.
28. Ветрова В.П., Баркалов В.Ю., Синельникова Н.В., Барченков А.П. О таксономическом статусе лиственниц Камчатки и Курильских островов на основе морфологии семенных чешуй шишек // *Ботанический журнал*. 2018. Т. 103, No. 12. С. 1565–1587. doi: [10.1134/S0006813618120050](https://doi.org/10.1134/S0006813618120050)

29. Putenikhin V.P. Phenotypic analysis and taxonomy of larches // *Larix*–98. Proceedings of IUFRO Interdivisional Symposium «World resources for breeding, resistance and utilization» / Yu.N. Baranchikov editor. Krasnoyarsk : VN. Sukachev Institute of Forest SB RAS Publ.; 1998. PP. 80.
30. Ветрова В.П., Синельникова Н.В., Барченков А.П. Изменчивость и дифференциация *Larix cajanderi*, *L. dahurica* и *L. sibirica* // *Turczaninowia*. 2018. Т. 21, No. 2. С. 86–100. doi: [10.14258/turczaninowia.21.2.10](https://doi.org/10.14258/turczaninowia.21.2.10)
31. Rohlf F.J. Programs tpsDig, version 2.16, tpsUtility, version 1.47. New York: State University at Stony Brook Publ., 2010. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (дата обращения: 23.02.2012).
32. Sheets H.D. Integrated Morphometrics Programs. New York : Canisius College Publ.; 2001. URL: <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html> (дата обращения: 23.02.2012).
33. Павлинов И.Я., Микешина Н.Г. Принципы и методы геометрической морфометрии // Журнал общей биологии. 2002. No. 6. С. 473–493.
34. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. Geometric morphometrics for biologists: a primer. New York: Elsevier Academic Press, 2004. 290 p.
35. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М. : Наука, 1991. 271 с.
36. Oreshkova N.V., Larionova A.Y., Milyutin L.I., Abaimov A.P. Genetic diversity, structure and differentiation of Gmelin larch (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) populations from Central Evenkia and Eastern Zabaikalje // *Eurasian Journal of Forest Research*. 2006. Vol. 9, No. 1. PP. 1–8.
37. Binney H.A., Willis K.J., Edwards M.E., Bhagwat Sh.A., Anderson P.M., Andreev A.A., Blaauw M., Damblon F., Haesaerts P., Kienast F., Kremenetski K.V., Krivonogov S.K., Lozhkin A.V., MacDonald G.M., Novenko E.Y., Oksanen P., Sapelko T.V., Valiranta M., Vazhenina L. The distribution of late-Quaternary woody taxa in northern Eurasia: evidence from a new macrofossil database // *Quaternary Science Reviews*. 2009. Vol. 28, No. 23. PP. 2445–2464. doi: [10.1016/j.quascirev.2009.04.016](https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.04.016)
38. Санников С.Н., Санникова Н.С. Гипотеза гидрохорного расселения популяций хвойных древесных растений // *Экология*. 2007. No. 2. С. 83–87.

Поступила в редакцию 11.06.2020 г.; повторно 02.11.2020 г.;  
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

#### Авторский коллектив:

**Ветрова Валентина Петровна**, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории экологии растений, Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН (Россия, 683024, г. Петропавловск-Камчатский, Проспект Рыбаков, 19/а).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1628-8443>

E-mail: [v.vetrova@mail.ru](mailto:v.vetrova@mail.ru)

**Барченков Алексей Павлович**, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории лесной генетики и селекции, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28); с.н.с. лаборатории биогеохимии Сибирского федерального университета (Россия, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3964-480X>

E-mail: [alexbarchenkov@mail.ru](mailto:alexbarchenkov@mail.ru)

**Синельникова Надежда Вячеславовна**, д-р. биол. наук, в.н.с. лаборатории ботаники, Институт биологических проблем Севера ДВО РАН (Россия, 685000, г. Магадан, ул. Порговая, 18).

E-mail: [meks\\_mag@mail.ru](mailto:meks_mag@mail.ru)

**For citation:** Vetrova VP, Barchenkov AP, Sinelnikova NV. Comparative analysis of shape variation in the cone scales of *Larix dahurica* and *L. cajanderi* (Pinaceae). *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:47-67. doi: 10.17223/19988591/53/3 In Russian, English Summary

**Valentina P. Vetrova<sup>1</sup>, Alexey P. Barchenkov<sup>2,3</sup>, Nadezhda V. Sinelnikova<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Kamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russian Federation

<sup>2</sup>V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>3</sup>Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>4</sup>Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russian Federation

### **Comparative analysis of shape variation in the cone scales of *Larix dahurica* and *L. cajanderi* (Pinaceae)**

Geometric morphometric analysis of shape variation in the cone scales of two closely related larch species, *Larix dahurica* Laws. (= *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr) and *L. cajanderi* Mayr, was carried out. The data on the taxonomy and distribution of *L. dahurica* and *L. cajanderi* are contradictory. The taxonomic status of *L. cajanderi* has been confirmed by the genetic and morphological studies performed in Russia and based on considerable evidence, but the species has not been recognized internationally, being considered as a synonym of *Larix gmelinii* var. *gmelinii*. In the systematics of larch, morphological characters of the generative organs are mainly used as diagnostic markers, among the most important being the shape variation of the cone scales. The aim of this study was to test geometric morphometrics as a tool for analyzing differentiation of *L. dahurica* and *L. cajanderi* in the shape of their cone scales.

Characterization of shape variations in cone scales using geometric morphometric methods consists in digitizing points along an outline of scales followed by analysis of partial warps, describing individual differences in coordinates of the outline points. We studied the populations of *L. dahurica* from Evenkia and the Trans-Baikal region and six *L. cajanderi* populations from Yakutia and Magadan Oblast. In each population, we analyzed samples of 100–150 cones collected from 20–30 trees. Scales taken from the middle part of the cones were scanned using an Epson Perfection V500 Photo. On the scanned images, outline points were placed with a TPSDig program (Rolf, 2010), using angular algorithm (Oreshkova et al., 2015). The data were processed and analyzed using Integrated Morphometrics Programs (IMP) software (<http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>, Sheets, 2001), following the guidelines on geometric morphometrics in biology (Pavlinov, Mikeshina, 2002; Zelditch et al., 2004). Initial coordinates of the scale landmarks were aligned with the mean structure for *L. dahurica* and *L. cajanderi* cone scales using Procrustes superimposition in the CoordGen6 program. PCA based on covariances of partial warp scores was applied to reveal directions of variation in the shape of the cone scales. The relative deformations of the cone scales (PCA scores) were used as shape variables for statistical comparisons of these two larch species with canonical discriminant analysis. Morphotypes of the cone scales were distinguished in *L. dahurica* populations by pairwise comparison of samples from trees in the TwoGroup6h program using Bootstrap resampling-based Goodall's F-test (Sheets, 2001). Samples from the trees in which the cone scales differed significantly ( $p < 0.01$ ) were considered to belong to different morphotypes. Morphotypes distinguished in *L. dahurica* populations were compared with the morphotypes that we had previously determined in *L. cajanderi* populations. The composition and the frequency of

occurrence of morphotypes were used to determine phenotypic distances between populations (Zhivotovskii, 1991). Multidimensional scaling matrix of the phenotypic distances was applied for ordination of larch populations.

In this research, we revealed differentiation of *L. dahurica* and *L. cajanderi* using geometric morphometric analysis of the shape variation of cone scales. The results of PCA of partial warp scores exposed four principal components, which account for 90% of total explained variance in the shape of the cone scales in the two larch species. Graphical representations of these shape transformations in the vector form characterized directions of shape variability in scales corresponding to the maximum and minimum values of four principal components (See Fig. 2). PCA-ordination of the larch populations revealed some difference in the shape variation of the cone scales in *L. dahurica* and *L. cajanderi* (See Fig. 3). The results of canonical discriminant analysis of relative deformations of scales showed differentiation of the populations of the two larch species (See Fig. 4). Eleven morphotypes were identified in *L. dahurica* cones from Evenkia and nine morphotypes in the Ingoda population, three of the morphotypes being common for both populations (See Fig. 5). The shape of *L. dahurica* cone scales varied from spatulate to oval and their apical margins from weakly sinuate to distinctly sinuate. The Trans-Baikal population was dominated by scales with obtuse (truncate) and rounded apexes. The obtained morphotypes were compared with 25 cone scale morphotypes previously distinguished in the Yakut and the Magadan *L. cajanderi* populations (See Fig. 3). Four similar morphotypes of cone scales were revealed in the North-Yeniseisk population of *L. dahurica* and the Yakut populations of *L. cajanderi*. The differences between them in the populations of the two larch species were non-significant ( $p > 0.01$ ). All morphotypes of cone scales from the Ingoda population of *L. dahurica* differed significantly from *L. cajanderi* cone scale morphotypes. The results of multidimensional scaling phenotypic distance matrix calculated based on the similarity of morphotypes of *L. dahurica* and *L. cajanderi* populations were consistent with the results of their differentiation based on relative deformations of scales obtained using canonical discriminant analysis (See Fig. 4 and Fig. 7). In spite of the differences in the shape of the cone scales between the North-Yeniseisk and the Trans-Baikal populations of *L. dahurica*, they both differed from *L. cajanderi* populations. Thus, phenotypic analysis confirmed differentiation of these two larch species. Despite the similarities between a number of morphotypes, the Yakut *L. cajanderi* populations were differentiated from *L. dahurica* populations. Significant differences were noted between intraspecific groups: between *L. cajanderi* populations from Okhotsk-Kolyma Upland and Yakutia and between *L. dahurica* populations from Evenkia and the Trans-Baikal region (See Fig. 4). The similarities between species and intraspecific differences may be attributed to the ongoing processes of hybridization and species formation in the region where the ranges of the larches overlap with the ranges of *L. czekanowskii* Szafer and *L. dahurica* × *L. cajanderi* hybrids. Geometric morphometrics can be used as an effective tool for analyzing differentiation of *L. dahurica* and *L. cajanderi* in the shape of their cone scales.

*The paper contains 7 Figures, 1 Table and 38 References.*

**Key words:** *Larix*; cone morphology; geometric morphometrics; population differentiation.

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. Kolesnikov BP. K sistematike i istorii listvennits sektsii *Pauciseriales* Paschke [On taxonomy and history of development of larches of the section *Pauciseriales* Patschke]. In: *Materialy k istorii flory i rastitel'nosti SSSR* [Materials on the history of the flora and

- vegetation of the USSR]. Komarov VL and Il'in MM, editors. Vol. 2. Moscow: Academy of Sciences of USSR Publ.; 1946. pp. 321-364. In Russian
2. Dylis NV. Listvennitsy Vostochnoy Sibiri i Dal'nego Vostoka [Larches of Eastern Siberia and the Russian Far East]. Moscow: Academy of Sciences of USSR Publ.; 1961. 209 p. In Russian
  3. Abaimov AP, Koropachinskiy IYu. Listvennitsy Gmelina i Kayandera [Gmelin and Cajander Larches]. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 1984. 121 p. In Russian
  4. Koropachinskii IYu, Milyutin LI. Botanical-geographical and forestry aspects of introgressive hybridization of *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. and *L. cajanderi* Mayr. *Contemp Probl Ecol*. 2011;4:167177. doi: 10.1134/S1995425511020081
  5. Adrianova IYu, Vasyutkina EA, Krestov PV. Ecogeographic variation in the generative organs of larch in the Russian Far East. *Russian J Ecology*. 2011;42(1):9-16. doi: 10.1134/S1067413611010036
  6. Orlova LV. Konspekt dikorastushchikh i nekotorykh introdutsirovannykh vidov roda *Larix* Mill. (Pinaceae) flory Vostochnoy Evropy [The synopsis of wild and some introduced species of the genus *Larix* Mill. (Pinaceae) in flora of the Eastern Europe]. *Novitates Systematicae Plantarum Vascularium*. 2011;43:5-18. In Russian
  7. Iroshnikov AI. Listvennitsy Rossii. Bioraznoobrazie i selektsiya [Larches of Russia. Biodiversity and Selection]. Moscow: VNIILM Publ.; 2004. 182 p. In Russian
  8. *IPNI. International Plant Names Index*. Kew: The Royal Botanic Gardens, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens Publ.; 2020. Available at: <http://www.ipni.org> (accessed: 05.06.2020).
  9. Bobrov EG. Lesobrazuyushchie khvoynye SSSR [Coniferous forests of the USSR]. Leningrad: Nauka Publ.; 1978. 188 p. In Russian
  10. Tsvelev NN. O nazvaniyakh nekotorykh listvennits (*Larix*, Pinaceae) Rossii [On the names of some Russian larches (*Larix*, Pinaceae)]. *Botanicheskii Zhurnal*. 1994;79(11):90-91. In Russian
  11. Farjon A. World Checklist and Bibliography of Conifers. Second edition. Kew: The Royal Botanic Gardens, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens Publ.; 2001. 309 p.
  12. Govaerts R., Farjon A. World Checklist of Pinaceae. Kew: Royal Botanic Gardens Publ.; 2020. Available at: <http://wcsp.science.kew.org> (access: 10.06.2020).
  13. Christensen KI. Coniferopsida. In: *Flora Nordica*. Jonsell B, editor. Stockholm: The Royal Swedish Academy of Sciences Publ.; 2000. Vol. 1. pp. 91-115.
  14. Farjon A. Bibliography of conifers: selected literature on taxonomy and related disciplines of the Coniferales. Kew: Royal Botanic Gardens Publ.; 2005. 211 p.
  15. Farjon A, Filer D. An Atlas of the World's Conifers. An analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status. Leiden, Boston: Brill Publ.; 2013. 524 p.
  16. Polezhaeva MA, Lascoux M, Semericov VL. Cytoplasmic DNA variation and biogeography of *Larix* Mill. in Northeast Asia. *Molecular Ecology*. 2010;19(6):1239-1252. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04552.x
  17. Oreshkova NV, Belokon MM, Jamiyansuren S. Genetic diversity, population structure and differentiation of Siberian larch, Gmelin larch and Cajander larch on SSR-marker data. *Russ J Genetics*. 2013;49(2):178-186. doi: 10.1134/S1022795412120095
  18. Muratova EN. Osobennosti kariotipa listvennitsy Kayandera (*Larix cajanderi* Mayr) [Features in the karyotype of Cajander larch (*Larix cajanderi* Mayr)]. In: *Botanicheskie issledovaniya v Sibiri* [Botanical research in Siberia]. Iss. 3. Cherepnin VL and Shemberg MA, editors. Krasnoyarsk: VN Sukachev Institute of Forest SB RAS Publ.; 1995. pp. 10-22. In Russian
  19. Semerikov VL, Lascoux M. Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. Species. *Heredity*. 1999;82(2):193-204. doi: 10.1046/j.1365-2540.1999.00471.x

20. Semerikov VL, Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species. *American J Botany*. 2003;8:1113-1123.
21. Kozzyrenko MM, Artyukova EV, Reunova GD, Levina EA, Zhuravlev YuN. Genetic diversity and relationships among siberian and far eastern larches inferred from RAPD analysis. *Russian J Genetics*. 2004;40(4):401-409. doi: [10.1023/B:RUGE.0000024978.25458.f7](https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000024978.25458.f7)
22. Semerikov VL, Polezhaeva MA. Mitochondrial DNA variation pattern in larches of Eastern Siberia and the Far East. *Russ J Genetics*. 2007;43(6):646-652. doi: [10.1134/S1022795407060075](https://doi.org/10.1134/S1022795407060075)
23. Polezhaeva MA, Semerikov VL. Geneticheskaya izmenchivost' cpSSR markerov v rode *Larix* na Dal'nem Vostoke [Genetic diversity of cpSSR loci in *Larix* genus over the Far East areas]. *Vestnik Severo-Vostochnogo Nauchnogo Tsentra DVO RAN = The Bulletin of the North-East Scientific Center*. 2009;2:75-83. In Russian
24. Zhuravlev YuN, Kozzyrenko MM, Vasyutkina EA, Adrianova IYu, Artyukova EV, Reunova GD, Katyshev AI, Konstantinov YuM.. Genetic polymorphism of larch. DNK-polimorfizm. In: *Larch biodiversity of Asian Russia*. Efremov SP and Milyutin LI, editors. Novosibirsk: GEO Publ.; 2010. pp. 72-96. In Russian
25. Larionova AYa, Oreshkova NV. Genetic polymorphism of larch. Isozyme variability. In: *Larch biodiversity of Asian Russia*. Efremov SP and Milyutin LI, editors. Novosibirsk: GEO Publ.; 2010. pp. 51-71. In Russian
26. Oreshkova NV, Vetrova VP, Sinelnikova NV. Genetic and phenotypic diversity of *Larix cajanderi* Mayr in the North of the Russian Far East. *Contemp Probl Ecol*. 2015;8(1):9-20. doi: [10.1134/S1995425515010096](https://doi.org/10.1134/S1995425515010096)
27. Barchenkov AP, Milyutin LI. Izmenchivost' generativnykh organov listvennits Gmelina i Kayandera v Vostochnoy Sibiri [Variability of generative organs of Gmelin and Cajander larches in East Siberia]. *Khvoynnye boreal'noy zony = Conifers of the Boreal Area*. 2008;25(1-2):37-43. In Russian
28. Vetrova VP, Barkalov VYu, Sinelnikova NV, Barchenkov AP. O taksonomicheskom statuse listvennits Kamchatki i Kuril'skikh ostrovov na osnove morfologii semennykh cheshuy shishek [On taxonomic status of Kamchatka and Kurilian larches based on morphology of the cone scales. *Botanicheskii zhurnal*. 2018;103(12):1565-1587. doi: [10.1134/S0006813618120050](https://doi.org/10.1134/S0006813618120050) In Russian
29. Putenikhin VP. Phenotypic analysis and taxonomy of larches. In: *Larix-98. Proceedings of IUFRO Interdivisional Symposium "World Resources for Breeding, Resistance and Utilization"*. Baranchikov YuN, editor. Krasnoyarsk: VN Sukachev Institute of Forest SB RAS Publ.; 1998. pp. 80.
30. Vetrova VP, Sinelnikova NV, Barchenkov AP. Variability and differentiation of *Larix cajanderi*, *L. dahurica* and *L. sibirica* on shape of cone scales. *Turczaninowia*. 2018;21(2):86-100. doi: [10.14258/turczaninowia.21.2.10](https://doi.org/10.14258/turczaninowia.21.2.10)
31. Rohlf FJ. Programs tpsDig, version 2.16, tpsUtility, version 1.47. New York: State University at Stony Brook Publ.; 2010. Available at: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (accessed: 23.02.2012).
32. Sheets HD. Integrated Morphometrics Programs. New York: Canisius College Publ.; 2001. Available at: <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html> (accessed: 23.02.2012).
33. Pavlinov IYa, Mikeshina NG. Principles and methods of geometric morphometrics. *Zhurnal obshchey biologii = Biology Bulletin Reviews*. 2002;63(6):473-493. In Russian PMID: 12510587
34. Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. Geometric morphometrics for biologists: A primer. New York: Elsevier Academic Press; 2004. 290 p.
35. Zhivotovskiy LA. Populyatsionnaya biometriya [Population biometrics]. Moscow: Nauka Publ.; 1991. 271 p. In Russian

36. Oreshkova NV, Larionova AY, Milyutin LI, Abaimov AP. Genetic diversity, structure and differentiation of Gmelin larch (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) populations from Central Evenkia and Eastern Zabaikalje. *Eurasian J Forest Research*. 2006;1:1-8.
37. Binney HA, Willis KJ, Edwards ME, Bhagwat ShA, Anderson PM, Andreev AA, Blaauw M, Damblon F, Haesaerts P, Kienast F, Kremenetski KV, Krivonogov SK, Lozhkin AV, MacDonald GM, Novenko EY, Oksanen P, Sapelko TV, Valiranta M, Vazhenina L. The distribution of late-Quaternary woody taxa in northern Eurasia: evidence from a new macrofossil database. *Quaternary Science Reviews*. 2009;28(23):2445-2464. doi: [10.1016/j.quascirev.2009.04.016](https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.04.016)
38. Sannikov SN, Sannikova NS. The hypothesis of hydrochorous dissemination of populations of conifers. *Russ J Ecol*. 2007;38(2):75-79. doi: [10.1134/S1067413607020014](https://doi.org/10.1134/S1067413607020014)

*Received June 11, 2020; Revised November 02, 2020;  
Accepted February 21, 2021; Published March 31, 2021.*

**Author info:**

**Vetrova Valentina P**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Plant Ecology, Kamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 19/a Rybakov Ave., Petropavlovsk-Kamchatsky 683024, Russian Federation. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1628-8443>  
E-mail: [v.vetrova@mail.ru](mailto:v.vetrova@mail.ru)

**Barchenkov Alexey P**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Forest Genetics and Breeding, VN. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Biogeochemistry of Ecosystems, Siberian Federal University, 79 Svobodny Ave., Krasnoyarsk 660041, Russian Federation. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3964-480X>  
E-mail: [alexbarchenkov@mail.ru](mailto:alexbarchenkov@mail.ru)

**Sinelnikova Nadezhda V**, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Botany, Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 18 Portovaya Str., Magadan 685000, Russian Federation. E-mail: [meks\\_mag@mail.ru](mailto:meks_mag@mail.ru)

УДК 634.731 (471.342)  
doi: 10.17223/19988591/53/4

**Н.Ю. Егорова, Т.Л. Егошина, А.В. Ярославцев**

*Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства  
и звероводства имени профессора Б.М. Житкова, г. Киров, Россия*

### ***Vaccinium myrtillus* L. в Кировской области (южно-таежная подзона): фитоценотическая приуроченность, экологические предпочтения**

*Показаны эколого-фитоценотические особенности *Vaccinium myrtillus* L. в условиях южно-таежного фрагмента ареала. Приведена эдафическая характеристика основных местообитаний вида: тип почвы, кислотность, содержание органического вещества. Определен диапазон экологического ареала вида. Установлено, что по климатическим шкалам экологические условия изученных местообитаний занимают центральное положение от потенциально возможных. Тогда как, по некоторым почвенным шкалам (шкалы увлажнения почв и переменности увлажнения), диапазон эдафических условий исследованных ценопопуляций шире, по сравнению со шкалами Д.Н. Цыганова. На основе данных фитоиндикации, в соответствии со значением индекса дискомфорта, выявлено, что наиболее благоприятные условия эдафо- и климатотона для *V. myrtillus* складываются в сфагновых типах фитоценозов. Исследование гегеморбности показало, что вид обладает невысокой устойчивостью к антропогенному воздействию, может выдерживать умеренную интенсивность антропогенного прессинга.*

**Ключевые слова:** черника обыкновенная; ценопопуляция; экологическая валентность; фитоиндикация; индекс дискомфорта; гегеморбность.

**Для цитирования:** Егорова Н.Ю., Егошина Т.Л., Ярославцев А.В. *Vaccinium myrtillus* L. в Кировской области (южно-таежная подзона): фитоценотическая приуроченность, экологические предпочтения // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 68–88. doi: 10.17223/19988591/53/4

### **Введение**

*Vaccinium myrtillus* L. – черника обыкновенная – кустарничек семейства *Ericaceae*, бореальный циркумполярный вид, ареал которого охватывает Европу и значительную часть Азии [1, 2], в России – почти всю европейскую часть, Кавказ, Западную Сибирь, значительную часть Восточной Сибири и Дальнего Востока [3]. *V. myrtillus* является субдоминантом и доминантом лесных сообществ, в которых выполняет важнейшие экологические функции, образует различные консортивные связи. Будучи микоризообразовате-

лем, улучшает условия питания и стимулирует рост растений всех ярусов, обеспечивая внутри- и межвидовые связи растений различных ярусов лесных фитоценозов [4–6]. Показано, что с *V. myrtillus* связано более 190 видов насекомых [7]. Плодами и побегами *V. myrtillus* регулярно питается более 30 видов птиц, многие млекопитающие, такие как лось, благородные олени, бурый медведь и др. [8–10].

*V. myrtillus* – лекарственное растение, её побеги и плоды используются в медицине [11–13]. Ягоды черники – востребованный пищевой продукт. Ценность плодов определяется комплексом нутриентов и биологически активных веществ, состав которых, зависимость накопления от экологических условий местообитания в настоящее время активно изучается [14–20].

Среднегодовалый биологический запас плодов *V. myrtillus* в России составляет 1 697,3 тыс. т [21, 22], в Кировской области – 13,0 тыс. т [23]. Повсеместное сокращение величины ягодоносной площади, среднегодового биологического запаса и продуктивности *V. myrtillus* под влиянием антропогенных факторов [23–25] приводит к пониманию необходимости разработки методов устойчивого использования ресурсов, в основе которых лежат знания экологии вида, в настоящее время являющиеся фрагментарными [26–31].

Цель работы – выявление фитоценологических параметров и экологических условий местообитаний *V. myrtillus* в пределах южно-таежного фрагмента ареала.

### Материалы и методики исследования

Исследования проведены в 2009–2015 гг. в наиболее свойственных для вида лесных фитоценозах южно-таежной подзоны в пределах Слободского района Кировской области (табл. 1).

Описания исследованных растительных сообществ, в которых *V. myrtillus* является доминантом или субдоминантом, выполнены согласно общепринятым геоботаническим методам [32]. Названия видов приведены в соответствии с базой данных The Plant List [33].

Оценка экологических условий местообитаний проведена по составу видов в сообществах с использованием метода средневзвешенной середины интервала по десяти амплитудным шкалам Д.Н. Цыганова [34]. При обработке геоботанических описаний по экологическим шкалам использована программа EcoScaleWin [35].

Для выявления количественной оценки использования каждого фактора исследуемым видом рассчитана экологическая валентность (PEV) как мера приспособленности CP к изменению одного экологического фактора. Величина PEV равна доле диапазона ступеней вида от всей шкалы. Реализованная экологическая валентность (REV) определена как доля суммы ступеней занимаемых CP вида по шкале фактора от числа ступеней шкалы.

Таблица 1 [Table 1]  
**Ценопическая характеристика ценопопуляций (СР) *Vaccinium myrtillus* L. в Кировской области**  
 [Coenotic characteristics of the investigated *Vaccinium myrtillus* L. coenopopulations (СР) in Kirov region]

№СР	Тип местообитания, состав древостоя, возраст древостоя, гт. [Habitat type, tree stand composition, tree stand age, years]	Проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса / <i>V. myrtillus</i> [Cover of the herbaceous-shrub layer / <i>V. myrtillus</i> ], %	Основные виды травяно-кустарничкового яруса [Dominating species of the herbaceous-shrub layer]	Тип почв [Soil type]
1	Елово-лихтовый с примесью березы чернично-долгомошно-сфагновый лес [Bilberry-sphagnum spruce-abies forest with birch] 7P12AsBp, 60–80	50/35	<i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>V. vitis-idaea</i> , <i>Thelypteris palustris</i> , <i>Luzula pilosa</i> , <i>Maianthemum bifolium</i> , <i>Carex sylvatica</i> , <i>Linnea borealis</i> , <i>Melampyrum sylvaticum</i>	Подзолистая глеевая супесчаная на водно-ледниковых отложениях [Podzolic gley sabulous soil on glacial deposits]
2	Ельник с примесью березы чернично-сфагновый [Bilberry-sphagnum spruce forest with birch] 7P13Bp, 100–120	60/50	<i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>Dryopteris austriaca</i> , <i>Triantalis europaea</i> , <i>Oxalis acetosella</i> , <i>Linnea borealis</i> , <i>Maianthemum bifolium</i> , <i>Equisetum sylvaticum</i>	Торфянисто-глебовая песчаная на водно-ледниковых отложениях [Peat-gley sandy soil on glacial deposits]
3	Березняк чернично-сфагновый [Bilberry-sphagnum birch forest] 10Bp, 30–50	35/30	<i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>Vaccinium vitis-idaea</i> , <i>Juncus filiformis</i> , <i>Calamagrostis epigeios</i> , <i>Thelypteris palustris</i> , <i>Maianthemum bifolium</i> , <i>Carex pallescens</i> , <i>Triantalis europaea</i> , <i>Brachypodium pinnatum</i>	Торфянисто-глебовая супесчаная [Peat-gley sabulous soil]
4	Березово-еловый чернично-сфагновый лес [Bilberry-sphagnum birch-spruce forest] 5P15Bp	35/30	<i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>Thelypteris palustris</i> , <i>Vaccinium vitis-idaea</i> , <i>Maianthemum bifolium</i> , <i>Carex pallescens</i> , <i>Triantalis europaea</i>	Торфянисто-глебовая супесчаная на водно-ледниковых отложениях [Peat-gley sabulous soil on glacial deposits]
5	Ельник черничный [Bilberry spruce forest] 6P12As2Bp, 100–120	75/60	<i>V. myrtillus</i> , <i>Rubus saxatilis</i> , <i>Melampyrum sylvaticum</i> , <i>Maianthemum bifolium</i> , <i>Poa nemoralis</i> , <i>Fragaria vesca</i> , <i>Gymnocarpium dryopteris</i> , <i>Veronica chamaedrys</i> , <i>Luzula pilosa</i> , <i>Orchilla secunda</i>	Подзолистая глееватая супесчаная на моренных отложениях [Podzol gley sabulous soil on morainic debris]



Для характеристики отношения вида к совокупному действию нескольких факторов вычислен индекс толерантности ( $I_t$ ) или мера стено-эврибионтности как доля суммы PEV по исследуемым факторам к числу шкал рассматриваемых факторов. Эффективность освоения экологического пространства вида конкретными CP оценена при помощи коэффициента экологической эффективности (Кес. eff.), который представляет соотношение  $REV/PEV$ , выраженное в процентах [36].

Для всех местообитаний вида определено значение индекса экологического дискомфорта – D [37]. Он рассчитан на основе экологических шкал и результатов фитоиндикации как отношение разницы значений экологического фактора в данном сообществе и оптимального значения фактора для *V. myrtillus* в экологических шкалах к количеству учитываемых экологических факторов. Чем выше значение этого показателя, тем условия местообитания меньше соответствуют потребностям вида.

Гемеробность *V. myrtillus* определена по составу видов в растительных сообществах, в которых каждый вид имеет индивидуальный спектр толерантности к антропогенным факторам [38]. Растения являются чувствительными компонентами экосистем, чутко реагируют на изменение интенсивности абиотических и биотических, а также антропогенных факторов среды. Чем сильнее антропогенное влияние, тем больше изменяется структура сообщества, комбинация видов в сравнении с потенциально естественной растительностью, уменьшается стабильность системы – возрастает гемеробия [39]. Для оценки устойчивости сообществ с *V. myrtillus* к антропогенным воздействиям определяли долю антропотолерантных видов (b-c-p-t отрезок спектра гемеробии – от видов интенсивно используемых сообществ до видов полностью нарушенных экосистем) в растительных сообществах – показатель апофитизма [40]. Увеличение доли антропотолерантных видов в растительных сообществах свидетельствует об их большей нарушенности или большей устойчивости к этим воздействиям, а уменьшение – о меньшей нарушенности и большей уязвимости [41].

В работе использованы общепринятые методы отбора почвенных образцов и анализа почвенных проб на содержание органического углерода (%), а также кислотности [42]. Запасы органического углерода и pH солевой вытяжки почвы оценивали раздельно для слоя подстилки (0–5 см) и нижележащего слоя почвы (5–15 см). Согласно рекомендациям [43] подстилкой считается поверхностный горизонт минеральных почв, состоящий из органического материала, мощность которого не превышает 10 см. В органогенных почвах в качестве подстилки принят очес мхов.

Статистическая обработка полученных данных и построение графиков выполнены в программе StatSoft STATISTICA for Windows 6.0. Данные в работе представлены в виде средней арифметической величины со стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ).

## Результаты исследования и обсуждение

Известно, что ценопопуляции *V. myrtillus* приурочены к бореальным хвойным и смешанным лесным сообществам мезофильного и заболоченного типов. *V. myrtillus* является доминантом или субдоминантом травяно-кустарничкового яруса преимущественно средневозрастных, спелых, припевающих низко- и среднеполнотных хвойных и лиственных типов леса.

В результате исследования установлено, что типичными для произрастания *V. myrtillus* в южнотаежной подзоне являются ельник черничный и березово-еловый черничный лес с преобладанием *Picea* × *fennica* в первом ярусе древостоя.

Древостой фитоценозов в основном представлен *Betula pubescens*, *B. pendula*, *Pinus sylvestris*, *Picea* × *fennica*. В древостое ельников (*Picea abies*, *P. obovata*, *P. × fennica*) значительна (до 20–30%) примесь *Abies sibirica*. Возраст древостоя в сообществах с *V. myrtillus* варьирует от 55 до 110 лет, высота – от 17 до 28 м, сомкнутость крон – от 0,4 до 0,75.

Подрост формируют *Picea* × *fennica*, *Betula pubescens*, *B. pendula*, *Abies sibirica*. В подлеске преобладают *Sorbus aucuparia*, *Frangula alnus*, *Juniperus communis*; всего отмечено 7 видов. В травяно-кустарничковом ярусе черничных фитоценозов описано от 11 до 22 видов растений; проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса варьирует от 35 до 90%. Проективное покрытие *V. myrtillus* изменяется от 30% в березняке чернично-сфагновом до 70% в березово-еловом черничном лесу.

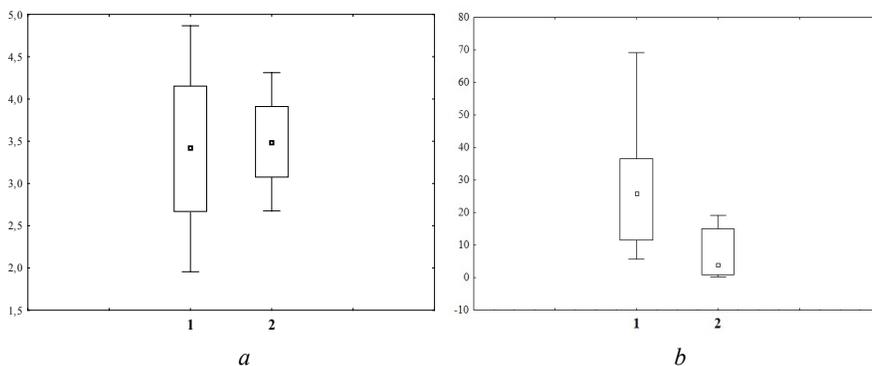
*V. myrtillus* является доминантом травяно-кустарничкового яруса изученных фитоценозов, в большинстве которых *V. myrtillus* сопутствуют следующие виды: *Vaccinium vitis-idaea*, *Rubus saxatilis*, *Juncus filiformis*, *Thelypteris palustris*, *Melampyrum sylvaticum*, *Maianthemum bifolium*. В мезофильных типах леса сплошной покров образуют зеленые мхи *Hylocomium splendens*, *Dicranum polysetum*, *Pleurozium schreberi*, *Rhytidiadelphus triquetrus*, в заболоченных мохово-лишайниковый ярус в основном формируют виды р. *Sphagnum*.

В условиях южно-таежного фрагмента своего ареала *V. myrtillus* произрастает на подзолистых глеевых и глееватых почвах, преимущественно супесчаных, реже песчаных, так же вид встречается на торфянисто-глеевых и дерново-подзолистых почвах (табл. 1).

По результатам анализа почв установлено, что *V. myrtillus* растет преимущественно на сильнокислых почвах. Кислотность солевой вытяжки лесной подстилки на глубине 0–5 см составляет от 2,5 до 4,9 ед. pH (рис. 1, а). В слое 5–15 см подзолистая глеевая супесчаная на водно-ледниковых отложениях почва (СР 1) имеет очень сильнокислую реакцию почвенного раствора (pH<sub>KCl</sub> – 2,8), менее кислая реакция среды (pH<sub>KCl</sub> – 4,2) характерна для дерново-подзолистой супесчаной почвы на водно-ледниковых отложениях, подстилаемой суглинками (СР 11). В остальных характерных местообита-

ниях (СР 2–10) исследуемого вида данный показатель варьирует от 3,1 до 3,8 ед. рН.

Содержание органического углерода в подстилке черничных типов леса может также значительно варьировать от 5,71 до 69,2% (рис. 1, *b*). На болотных почвах корневая система *V. myrtillus* размещается в органогенном горизонте, органическая масса которого находится в различной степени разложения и не смешана с минеральной частью. Для этих почв (СР 4, 6, 7) свойственно наиболее высокое содержание органического углерода в лесной подстилке – от 36,6 до 69,2%. Не одинаково его содержание в минеральном горизонте разных типов почв, где оно изменяется от 0,2 до 40,2%. Близкие эдафические предпочтения вида отмечали и исследователи Северной и Центральной Европы [30, 31].



**Рис. 1.** Химические показатели лесной подстилки и нижележащего почвенного горизонта в местообитаниях *Vaccinium myrtillus* L.: *a* – уровень  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  в лесной подстилке (1) и нижележащем горизонте (2); *b* – уровень органического углерода ( $\text{C}_{\text{орг}}$ ) в лесной подстилке (1) и нижележащем горизонте (2), %  
**[Fig. 1.** Chemical parameters of forest litter and underlying bed in *Vaccinium myrtillus* L. habitats: *a* -  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  level of forest litter (1) and underlying bed (2);  
*b* - Organic carbon ( $\text{C}_{\text{org}}$ ) level of forest litter (1) and underlying bed (2), %  
 □ Mean □ Mean±SD ⊥ Mean±1,96\*SD

В результате фитоиндикации исследуемых местообитаний *V. myrtillus* получены экологические характеристики вида в пределах рассматриваемого фрагмента ареала (табл. 2, рис. 2).

Исследованные СР отмечены в интервале между бореальными (6,6) и суббореальными (8,0) термоклиматическими показателями, что соответствует исследуемому участку ареала вида.

По шкале континентальности климата (Кн) исследуемые местообитания вида находятся в субматериковой и материковой климатических зонах (8–9).

По омброклиматической (Ом) шкале, показывающей соотношение осадков и испарения, СР разместились в условиях от субгумидного до гумидного климата (8,6–11,2). По криоклиматической шкале (Ср) вид произрастает в условиях суровых и умеренных зим (5,5–6,8).

Таблица 2 [Table 2]

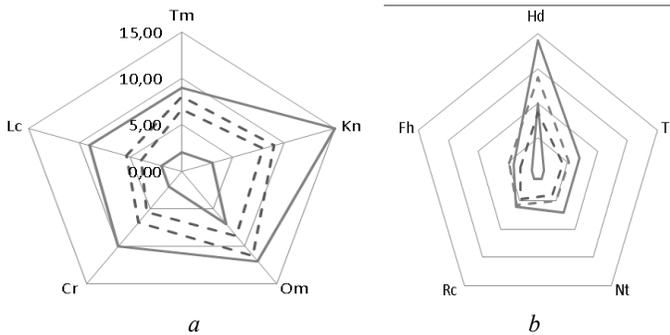
**Экологические характеристики ценопопуляций *Vaccinium myrtillus* L. в Кировской области по шкалам Д.Н. Цыганова [34]**  
**[Ecological indices in the studied habitats of *Vaccinium myrtillus* L. in Kirov region according to Dmitry Cyganov scales [34]**

Экологические шкалы [Ecological scales]		Экологическая позиция вида по шкале фактора [Environmental position of the species on the factor scale]	PEV	Реализованная экологическая позиция изученных СР [Implemented environmental position of the studied CP]	REV	Кес. eff., %
Климатические шкалы [Climate scales]	Tm	2–9	0,47	6,64–8,05	0,08	17,75
	Kn	3–15	0,87	7,95–9,00	0,07	8,15
	Om	7–12	0,40	8,58–11,24	0,18	44,50
	Cr	2–10	0,60	5,45–6,80	0,09	15,11
Почвенные шкалы [Soil scales]	Hd	10–19	0,43	8,73–13,73	0,22	50,10
	Tr	1–7	0,37	4,18–5,21	0,05	14,86
	Nt	1–7	0,64	3,83–4,97	0,10	16,43
	Rc	1–6	0,46	4,65–5,75	0,09	18,50
	fH	1–4	0,36	2,86–4,80	0,18	48,75
Шкала освещенности-затенения [Light-shading scale]	Lc	2–9	0,89	3,91–5,39	0,17	18,63

*Примечание.* PEV – потенциальная экологическая валентность; REV – реализованная экологическая валентность; Кес. eff. – коэффициент эффективности, %; Tm – термоклиматическая шкала, Kn – шкала континентальности климата, Om – омброклиматическая шкала аридности-гумидности, Cr – криоклиматическая шкала, Hd – шкала увлажнения почвы, Tr – шкала солевого режима почв, Nt – шкала богатства почв азотом, Rc – шкала кислотности почв, fH – шкала переменности увлажнения, Lc – шкала освещенности-затенения.

[Note. PEV - Potential environmental valence; REV - Implemented ecological valence; Кес. eff. - Ecological performance coefficient, %; Tm - Thermo-climatic scale, Kn - Climate continentality scale, Om - Ombroclimatic aridity-humidity scale, Cr - Cryoclimatic scale, Hd - Soil humidity scale, Tr - Soil salt regime scale, Nt - Soil nitrogen abundance scale, Rc - Soil acidity scale, fH - Water variability scale, Lc - Light-shading scale].

Анализ потенциальной экологической валентности (PEV) вида в системе экологических шкал Д.Н. Цыганова [34] показал, что по климатическим факторам вид гемизврибионтен (балл 0,58). Коэффициент экологической эффективности изученных СР колеблется от 8,15 до 44,5%. Максимально реализует свои потенции *V. myrtillus* по омброклиматической шкале (44,5%). По всем климатическим шкалам экологические условия изученных местообитаний занимают центральное положение от потенциально возможных (рис. 2, а).



**Рис. 2.** Характеристика *Vaccinium myrtillus* L. по шкалам Д.Н. Цыганова: *a* – климатические шкалы и шкала освещенности-затенения; *b* – почвенные шкалы; ———— – диапазон потенциальной позиции вида; - - - - - – диапазон реализованной позиции вида

[Fig. 2. Characteristics of *Vaccinium myrtillus* L. by scales of Dmitry Tsyganov [34] (1983): *a* - Climate scales and light-shading scale; *b* - Soil scales; ———— Potential position of the species; - - - - - Actual position of the species]

По шкале увлажнения почв (Hd) изученные СР находятся в пограничных условиях увлажнения среднестепного и луговостепного (СР 8, 9) до влажно-лесолугового (остальные СР с баллами 12,1–13,7).

По фактору солевого режима почв (Tr) наблюдается достаточно узкий диапазон значений шкалы: от 4,2 до 5,2 балла, что соответствует бедным и небогатым почвам.

По шкале богатства почв азотом (Nt) вид в пределах рассматриваемого фрагмента ареала произрастает в условиях от очень бедных азотом почв (СР 6, 7; баллы 3,8–3,9) до бедных азотом почв (все остальные СР; баллы от 4,5 до 5,0).

Для *V. myrtillus* по шкале Rc (кислотности почв) характерен узкий диапазон значений (4,7–5,6) от сильнокислых до кислых почв. Следовательно, вид в пределах исследуемого фрагмента ареала адаптирован к весьма ограниченному диапазону значений шкалы. Индикаторные значения данного фактора подтверждают и полученные лабораторные данные по кислотности почв (рис. 1, *a*). По шкале переменности увлажнения (Fh) СР разместились в экологических условиях от относительно устойчивого (СР 6, 7; балл 2,9) до слабо переменного увлажнения (3,7–4,8).

В обобщенном спектре почвенных шкал вид выступает как мезобионт (It – 0,45) и, следовательно, имеет узкие диапазоны адаптации к почвенным факторам [44]. Коэффициент экологической эффективности изученных СР колеблется от 14,86 до 50,10%. Наибольший коэффициент экологической эффективности наблюдается по шкалам увлажнения и переменности увлажнения почв (рис. 2, *b*). Меньше всего реализует свои потенциалы *V. myrtillus* по шкалам кислотности и солевого режима почв.

Диапазон эдафических условий исследованных СР смещен в сторону более влажных местообитаний – на 1,27 ступени влево, а по шкале пере-

менности увлажнения на 0,80 ступени вправо. Значения шкалы кислотности почв расположены близ максимального предела. Это объясняется произрастанием вида в условиях зоны пессимума по данному фактору в пределах зоны толерантности, где условия не оптимальны, но достаточны для жизни растений этого вида. По остальным почвенным шкалам амплитуда экологического пространства исследованных СР *V. myrtillus*. в условиях южно-таежной подзоны не выходит за пределы диапазонов экологического ареала по шкалам Д.Н. Цыганова [34] (рис. 2, б). По данным, приводимым другими исследователями [28, 36], экологический ареал вида по всем 10 шкалам соответствует лимитам значений, определенным для *V. myrtillus* по шкалам Д.Н. Цыганова [34].

По шкале освещенности – затенения (Lc) СР обитают в условиях полуоткрытых пространств / светлых лесов (СР 6, 7; балл 3,9–4,1) и светлых лесов (все остальные СР; балл 4,6–5,4). По фактору освещенности вид эвривалентен (0,85).

Обобщенный индекс толерантности равен 0,55 (вид мезовалентен). Анализ РЕV в системе экологических шкал Д.Н. Цыганова [34] показал, что по отношению к факторам омброклиматической шкалы (РЕV = 0,40), шкал увлажнения почв (РЕV = 0,43), солевого режима почв (РЕV = 0,37) и переменности увлажнения (РЕV=0,36) *V. myrtillus* является гемистеновалентным видом, т.е. может выносить лишь ограниченные изменения данных факторов, близких к критическим. По факторам термоклиматической шкалы (РЕV = 0,47) и шкале кислотности почв (РЕV = 0,46) вид можно охарактеризовать как мезовалентный. По криоклиматической шкале (РЕV = 0,60) и шкале богатства почв азотом (РЕV = 0,64) вид является гемизэвривалентом. По шкале континентальности климата (РЕV = 0,87) и шкале освещенности-затенения (РЕV = 0,89) *V. myrtillus* выступает как мезовалент.

На основе данных фитоиндикации, в соответствии со значением индекса дискомфорта, изученные СР распределены следующим образом (по уменьшению значения индекса дискомфорта – в скобках): СР8 (1,76) – СР9 (1,65) – СР5 (1,21) – СР11 (1,16) – СР4 (1,11) – СР10 (1,07) – СР3 (1,01) – СР1 (0,98) – СР2 (0,76) – СР7 (0,70) – СР6 (0,69). В большей степени соответствуют оптимальным экологическим показателям условия для произрастания вида в сфагновых типах леса (СР 2, 6, 7). Наименее благоприятные условия для развития *V. myrtillus* складываются в СР 8 и 9, здесь отмечены наибольшие значения индекса дискомфорта 1,76 и 1,65 соответственно.

Для оценки антропоустойчивости *V. myrtillus* использован показатель гемеробии (табл. 3, рис. 3). Исследование гемеробности показало, что во всех рассматриваемых местообитаниях *V. myrtillus* преобладают в равных долях олиго-мезогемеробные виды – 41%, т.е. виды с высокой чувствительностью к антропогенным факторам. А-гемеробных видов не выявлено. Во всех исследованных сообществах с-, р- и t-гемеробные виды отсутствуют.

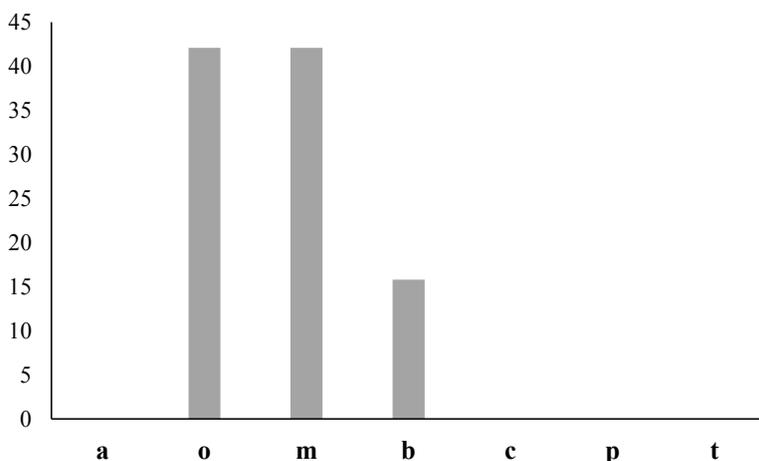
Таблица 3 [Table 3]

**Показатели гемеробии сообществ с *Vaccinium myrtillus* L.  
[Hemeroby parameters of *Vaccinium myrtillus* L. communities]**

No. CP	Всего видов [Number of species]	Критерии [Criteria]	Показатели степени гемеробии [Indicators of the degree of hemeroby]						Доля антропо- фобных видов [Part of anthropophobic species], %	Доля антрополе- рантных видов [Part of anthropotolerant species], %	Индекс апотифности [Aporphyte Index]
			a	o	m	b	c	p			
1	12	abs.	0,0	11,0	11,0	6,0	0,0	0,0	78,6	21,4	27,2
		%	0,0	91,7	91,7	50,0	0,0	0,0			
2	9	abs.	0,0	9,0	9,0	4,0	0,0	0,0	81,8	18,2	22,2
		%	0,0	100,0	100,0	44,4	0,0	0,0			
3	12	abs.	0,0	11,0	10,0	2,0	0,0	0,0	91,3	8,7	9,5
		%	0,0	91,7	83,3	16,7	0,0	0,0			
4	9	abs.	0,0	8,0	9,0	2,0	0,0	0,0	89,5	10,5	11,7
		%	0,0	88,9	100,0	22,2	0,0	0,0			
5	14	abs.	0,0	13,0	14,0	6,0	0,0	0,0	81,8	18,2	22,2
		%	0,0	92,9	100,0	42,9	0,0	0,0			
6	8	abs.	0,0	8,0	7,0	2,0	0,0	0,0	88,2	11,8	13,4
		%	0,0	100,0	100,0	25,0	0,0	0,0			
7	7	abs.	0,0	7,0	6,0	2,0	0,0	0,0	86,7	13,3	15,3
		%	0,0	100,0	85,7	28,6	0,0	0,0			
8	19	abs.	0,0	19,0	19,0	6,0	0,0	0,0	86,4	13,6	15,7
		%	0,0	100,0	100,0	31,6	0,0	0,0			
9	19	abs.	0,0	19,0	19,0	7,0	0,0	0,0	84,4	15,6	18,5
		%	0,0	100,0	100,0	36,8	0,0	0,0			
10	8	abs.	0,0	7,0	8,0	4,0	0,0	0,0	78,9	21,1	26,7
		%	0,0	87,5	100,0	50,0	0,0	0,0			
11	16	abs.	0,0	16,0	16,0	7,0	0,0	0,0	82,1	17,9	21,9
		%	0,0	100,0	100,0	43,8	0,0	0,0			

*Примечание.* abs. – абсолютное значение; % – относительное значение; а – агемеробные виды, не выносящие антропогенного влияния; о – олигогемеробные виды лесов, лугов, верховых болот и т.д., выносящие очень незначительное антропогенное влияние; m – мезогемеробные виды лесов, лугов, остепненных лугов и степей, испытывающих экстенсивное антропогенное влияние; b – эугемеробные виды лугов и лесов с интенсивным уходом, выносящие эвтрофикацию, известкование, незначительное нарушение грунта; c – эугемеробные виды удобряемых лугов, деградирующих лесов, полевые сорняки; p – полигемеробные виды, выращиваемые в культуре, и типичные рудеральные растения, выносящие сильные и частые нарушения местообитаний; t – метагемеробные виды полностью деградировавших экосистем и искусственных сообществ.

[*Note.* abs. - absolute number; % - ratio; a - Ahemerob, not tolerating human impact; o - Oligohemerobic species of forests, meadows, bogs, etc., tolerating insignificant human impact; m - Mesoherobic species of forests, meadows and steppe, experiencing extensive human impact; b - Euhemerobic species of meadows and forests under intensive management, tolerating eutrophication, liming soil disturbance, c - Euhemerobic species of fertilized meadows, degrading forests, field weeds; p - Polyherobic species of cultural habitats and typical ruderal plants, tolerating significant and frequent disturbances; t - Metahemerobic species of totally degraded habitats and artificial communities].



**Рис. 3.** Спектр гемеробии сообществ с *Vaccinium myrtillus* L.

По оси абсцисс – уровни гемеробии; по оси ординат – доля а–о–m–b–c–p–t – гемеробии, %

[Fig. 3. Hemeroby spectre of *Vaccinium myrtillus* L. communities

On the X axis - Levels of hemeroby; on the Y axis - Share of a-o-m-b-c-p-t-hemeroby, %]

В спектре гемеробии наблюдается преобладание о–m – отрезка (рис. 3). Это свидетельствует о том, что в сложении растительных сообществ с *V. myrtillus* участвуют преимущественно виды от не выносящих антропогенного воздействия до устойчивых к незначительным спорадическим влияниям.

В целом достаточно небольшой разброс и относительно высокие показатели антропофобных видов (64,2–91,3%) свидетельствуют о незначительных резервах устойчивости к антропогенным воздействиям и уязвимости вида. *V. myrtillus* выпадает из состава растительных сообществ при их лесохозяйственной трансформации. Доля антропотолерантных видов в сообществах с *V. myrtillus* не превышает 21,4%. Для всех сообществ с *V. myrtillus* индекс апофитности не превышает 30%. Низкой устойчивостью к антропогенному воздействию характеризуются и некоторые другие виды-доминанты травяно-кустарничкового яруса хвойных фитоценозов южной тайги [45, 46].

### Заключение

В условиях южнотаежного фрагмента ареала *V. myrtillus* является доминантом или содоминантом травяно-кустарничкового яруса бореальных хвойных и смешанных лесных сообществ, приуроченных преимущественно к сильнокислым подзолистым глеевым и глееватым почвам. Эдафические условия *V. myrtillus* по шкале увлажнения почв соответствуют режимам от средне-степного и лугово-степного до влажно-лесолугового; по фактору солевого режима почв – бедным и небогатым почвам; богатства почв азотом – от очень бедных до бедных азотом почв; кислотности почв – от силь-

нокислых до кислых почв; переменности увлажнения – от относительно устойчивого до слабо переменного увлажнения. Наиболее благоприятные условия эдафо- и климатотопы для *V. myrtillus* складываются в сфагновых типах фитоценозов. Изученные растительные сообщества с *V. myrtillus* являются слабогемеробиальными.

### Литература

1. Ritchie J.C. Biological flora of the British Isles: *Vaccinium myrtillus* L. // Journal of ecology. 1956. Vol. 42, No. 1. PP. 291–299.
2. Hulten E., Fries M. Atlas of North European Vascular Plants, North of the Tropic of Cancer. Konigstein, 1986. Vol. 1–3. 1172 p.
3. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. М. : ГУГК, 1976. 340 с.
4. Шабарова С.И. Ценоотические особенности черники и ее роль в повышении устойчивости сосняков Полесья УССР // Дикорастущие ягодные растения СССР : тез. докл. на Всесоюз. совещ. «Изучение, заготовка и охрана лесных дикорастущих ягодников». Петрозаводск, 1980. С. 155–156.
5. Шубин В.И. Макромицеты лесных фитоценозов таежной зоны и их использование. Л. : Наука, 1990. 197 с.
6. Mallik A.U., Pellissier F. Effects of *Vaccinium myrtillus* on spruce regeneration: testing the notion of coevolutionary significance of allelopathy // Journal of Chemical Ecology. 2000. Vol. 26. PP. 2197–2209.
7. Karczewski J. Znaszenie borowki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.) dla entomocenozy lesnej // Folia forestalia Polonic. 1962. Ser. A, Z. 9. PP. 172–195.
8. Nestby R., Percival D., Martinussen I., Opstad N., Rohloff J. The European Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the Potential for Cultivation. A Review // The European Journal of Plant Science and Biotechnology 5 (Special Issue 1). 2011. PP. 5–16.
9. Нечаев В.А., Нечаев А.А. Дикорастущие ягодные растения и птицы-карпофаги в таежной зоне юга Дальнего Востока России // Сибирский экологический журнал. 2012. No. 1. С. 97–106. doi: [10.1134/S1995425512010092](https://doi.org/10.1134/S1995425512010092)
10. Егошина Т.Л., Егорова Н.Ю., Лугинина Е.А., Оботнин С.И., Ярославцев А.В., Гудовских Ю.В., Кислицына А.В., Капустина Н.В., Сулейманова В.Н. Значение дикорастущих ягодников в питании охотничьих животных // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т. 19, No. 2-2. С. 255–260.
11. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. М. : Медицина, 1990. 400 с.
12. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года : в 2 т. М. : Медицинский совет, 2009. Т. 1. 1359 с.
13. European Pharmacopoeia. 6-th Ed. Rockville : United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008. PP. 738–739.
14. Burdulis D., Ivanauskas L., Dirse V., Kazlauskas S., Razukas A. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits // Meedicina (Kaunas). 2007. Vol. 43, No. 12. PP. 971–979.
15. Basu A., Rhone M., Lyons T.J. Berries: emerging impact on cardiovascular health // Nutrition Reviews. 2010. Vol. 14 (3). PP. 168–177. doi: [10.1111/j.1753-4887.2010.00273](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00273)
16. Рязанова Т.К., Куркин В.А. Новые подходы к комплексному использованию плодов и побегов черники обыкновенной // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, No 5(3). С. 754–757.
17. Habanova M., Haban M., Kobidova R., Schwarzova Gato J. Analysis of biologically active substances in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in selected natural localities of Slovak

- republic // Journal of Central European Agriculture. 2013. Vol. 68, No. 3. PP. 1210–1219. doi: [10.5513/JCEA01/14.3.1328](https://doi.org/10.5513/JCEA01/14.3.1328)
18. Kunz S. Uptake and bioavailability of antocyanins and phenolic acids from grape / blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo // British Journal of Nutrition. 2015. Vol. 113, No. 7. PP. 1044–1055. doi: [10.1017/S0007114515000161](https://doi.org/10.1017/S0007114515000161)
  19. Rohloff J., Uleberg E., Nes A., Krogstad T., Nestby R., Martinussen I. Nutritional composition of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) of forest fields in Norway-Effects of geographic origin, fertilization and soil properties // Journal of Applied Botany and Food Quality. 2015. Vol. 88. PP. 274–287. doi: [10.5073/JABFQ.2015.088/040](https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088/040)
  20. Riihinen K., Jaakola L., Kärenlampi S., Hohtola A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and northblue blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*) // Food Chemistry. 2008. Vol. 110. PP. 156–160. doi: [10.1016/j.foodchem.2008.01.057](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.057)
  21. Егошина Т.Л. Недревесные растительные ресурсы и их значение для населения России // Пищевые ресурсы дикой природы и экологическая безопасность населения: материалы Междунар. конф. (16–18 ноября 2004 г.). Киров, 2004. С. 14–16.
  22. Егошина Т.Л., Лугинина Е.А., Егорова Н.Ю., Гудовских Ю.В., Капустина Н.В., Кислицына А.В., Оботнин С.И. Динамика биологического запаса плодов черники в России в 2000–2015 гг. // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию ВНИИОЗ им. проф. Б.М. Житкова (22–25 мая 2017 г.). Киров : ВНИИОЗ им. проф. Б.М. Житкова, 2017. С. 489–492.
  23. Егошина Т.Л., Колупаева К.Г., Раус Л.К. Анализ особенностей плодоношения и ресурсов *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) в Кировской области (1961–2004) // Растительные ресурсы. 2006. Т. 42, No. 1. С. 57–66.
  24. Мазная Е.А., Лянгузова И.В. Эколого-популяционный мониторинг ягодных кустарничков при аэротехногенном загрязнении. СПб. : ВВМ, 2010. 195 с.
  25. Петров Н.В. Сравнительная оценка запасов ягод *Vaccinium myrtillus* и *V. vitis-idaea* (Ericaceae) в коренных и производных типах леса среднетаежных ландшафтов Карелии // Растительные ресурсы. 2019. Т. 55, No. 1. С. 23–35. doi: [10.1134/S0033994619010102](https://doi.org/10.1134/S0033994619010102)
  26. Баландина Т.П., Вахрамеева М.Г. Черника обыкновенная // Биологическая флора Московской области. М. : Изд-во МГУ, 1980. Вып. 5. С. 132–146.
  27. Timoshok E.E. The ecology of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and cowberry (*Vaccinium vitisidaea* L.) in Western Siberia // Russian Journal of Ecology. 2000. Vol. 31, No. 1. PP. 8–13. doi: [10.1007/BF02799719](https://doi.org/10.1007/BF02799719)
  28. Полянская Т.А. Экологические особенности, онтогенетическая структура и продуктивность ценопопуляций *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) в национальном парке «Марий Чодра» (Республика Марий Эл) // Растительные ресурсы. 2008. Т. 44, No. 2. С. 40–49.
  29. Егорова Н.Ю., Сулейманова В.Н., Егошина Т.Л. Экологические предпочтения некоторых доминантов травяно-кустарничкового яруса таежных фитоценозов // Сохранение лесных экосистем: проблемы и пути их решения : материалы Всерос. науч.-практ. конф. (15–19 апреля 2017 г.). Киров : Радуга-ПРЕСС, 2017. С. 218–221.
  30. Coudun C., Gégout J.-C. Quantitative prediction of the distribution and abundance of *Vaccinium myrtillus* with climatic and edaphic factors // Journal of Vegetation Science. 2007. Vol. 18. PP. 517–524.
  31. Nestby R., Hykkerud A.L., Martinussen I. Review of botanical characterization, growth preferences, climatic adaptation and human health effects of Ericaceae and Empetraceae wild dwarf shrub berries in boreal, alpine and arctic areas // Journal of Berry Research. 2019. Vol. 9. PP. 515–547. doi: [10.3233/JBR-190390](https://doi.org/10.3233/JBR-190390)

32. Методы изучения лесных сообществ / под ред. В.Т. Ярмишко, И.В. Лянгузовой. СПб. : НИИ Химии СПбГУ, 2002. 240 с.
33. The Plant List (TPL). URL: <http://www.theplantlist.org/> (дата обращения: 15.06.2020)
34. Цыганов Д.Н. Фитоиндикация режимов в подзоне хвойно-широколиственных лесов. М. : Наука, 1983. 198 с.
35. Компьютерная обработка геоботанических описаний по экологическим шкалам с помощью программы EcoScaleWin : учеб. пособие / Е.В. Зубкова, Л.Г. Ханина, Т.И. Грохлина, Ю.А. Дорогова. Йошкар-Ола, 2008. 96 с.
36. Жукова Л.А., Дорогова Ю.А., Турмухаметова Н.В., Гаврилова М.Н., Полянская Т.А. Экологические шкалы и методы анализа экологического разнообразия растений. Йошкар-Ола : Марийск. гос. ун-т, 2010. 368 с.
37. Клименко Г.О. Особливості екологічних умов у місцезростаннях рідкісних видів рослин // Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження глобальної стратегії збереження рослин : II Міжнар. наук. конф., 9–12 жовтня 2012 р. (Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України) : матеріали конф. Умань, 2012. С. 107–110.
38. Frank D. Klotz S. Biologisch-ökologische Daten zur Flora der DDR. Halle ; Wittenberg : Martin-Luther-Universität, 1990. B. 32. 167 s.
39. Ишбирдина Л.М., Ишбирдин А.Р. Урбанизация как фактор антропогенной эволюции флоры и растительности // Журнал общей биологии. 1992. Т. 53, No. 2. С. 211–224.
40. Jakowiak W. Atlas roślin naczyniowych w Poznaniu. Poznan : Uniwersytet im. Adama Mickiewicza Publ., 1993. 409 p.
41. Ишмуратова М.М., Ишбирдин А.Р., Суюндуков И.В. Использование показателя гемеробии для оценки уязвимости некоторых видов орхидей Южного Урала и устойчивости растительных сообществ // Биологический вестник. 2003. Т. 7, No. 1–2. С. 33–35.
42. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М. : Изд-во МГУ, 1970. 487 с.
43. Классификация и диагностика почв России. Смоленск : Ойкумена, 2004. 342 с.
44. Егорова Н.Ю. Особенности экологических предпочтений ягодных растений сем. Vacciniaceae Lindl. в лесных фитоценозах южной тайги // Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги : тез. докл. Всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 60-летию Ин-та леса Карел. науч. центра РАН (Петрозаводск, 11–15 сентября 2017 года). Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2017. С. 102–104.
45. Чиркова Н.Ю. Оценка устойчивости сообществ с *Vaccinium vitis-idaea* L. к антропогенным факторам // Лесные биологически активные ресурсы : материалы третьей междунар. конф. (25–27 сентября 2007 г.). Хабаровск : ФГУ «ДальНИИЛХ», 2007. С. 116–118.
46. Сулейманова В.Н., Егорова Н.Ю. Пределы устойчивости к антропогенному воздействию видов эдификаторов травяно-кустарничкового яруса лесных экосистем // Устойчивое развитие территорий: теория и практика : материалы IX Всерос. науч.-практ. конф. (24–26 мая 2018 г. г. Сибай). Сибай : Сибайский информационный центр – филиал ГУП РБ Издательский дом «Республика Башкортостан», 2018. С. 267–269.

Поступила в редакцию 26.03.2019 г.; повторно 27.01.2020 г.; 27.07.2020 г.;  
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

**Авторский коллектив:**

**Егорова Наталья Юрьевна**, канд. биол. наук, с.н.с. отдела экологии и ресурсосведения растений, Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства имени профессора Б.М. Житкова (Россия, 610000, г. Киров, ул. Преображенская, д.79).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5891-4580>

E-mail: [n\\_chirkova@mail.ru](mailto:n_chirkova@mail.ru)

**Егошина Татьяна Леонидовна**, д-р биол. наук, г.н.с. отдела экологии и ресурсосведения растений, Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства имени профессора Б.М. Житкова (Россия, 610000, г. Киров, ул. Преображенская, д.79).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4663-2332>

E-mail: [etl@inbox.ru](mailto:etl@inbox.ru)

**Ярославцев Артем Вадимович**, н.с. отдела экологии и ресурсосведения растений, Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства имени профессора Б.М. Житкова (Россия, 610000, г. Киров, ул. Преображенская, д.79).

E-mail: [mr.artemya@gmail.com](mailto:mr.artemya@gmail.com)

**For citation:** Egorova NYu, Egoshina TL, Yaroslavtsev AV. *Vaccinium myrtillus* L. in Kirov region (southern taiga subzone): phytocoenotic confinement and ecological preferences. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:68-88. doi: 10.17223/19988591/53/4 In Russian, English Summary

**Natalya Yu. Egorova, Tatiana L. Egoshina, Artem V. Yaroslavtsev**

*Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming, Kirov, Russian Federation*

***Vaccinium myrtillus* L. in Kirov region (southern taiga subzone):  
phytocoenotic confinement and ecological preferences**

*Vaccinium myrtillus* L. is an important component for forming phyto-environment in boreal forest ecosystems, in which it develops various consortium connections. Being a mycorrhizal species, *V. myrtillus* improves nutrition and stimulates the growth of plants of all layers, supporting inter- and intra-specific connections of different layers of forest communities. In order to estimate the environment-forming role of *V. myrtillus* in ecosystems it is essential to acquire data on quantitative presence of the species in plant communities composition and on ecological-phytocoenotic peculiarities within its range. The aim of the study is to define phytocoenotic parameters and ecological conditions of *V. myrtillus* habitats within the southern taiga part of its range (Kirov region).

We collected the material during the growing seasons of 2009-2015 and made 110 geobotanical descriptions according to common geobotanical methods (Methods of studies..., 2002). Ecological conditions were estimated based on species compositions in communities using 10 ecological scales by Dmitry Tsyganov (1983). The ecological discomfort index was determined for each habitat (Klimenko, 2012). Common methods of soil analyses were used for different biotopes of the studied species (Arunushkina, 1962). Hemeroby was determined by the species composition in plant communities, in which every species has individual human impact tolerance spectre (Frank and Klotz, 1990).

*V. myrtillus* acts as a dominant or codominant of the herbaceous-shrub synfolium of boreal coniferous and mixed forest communities with 30-70% cover. It is accompanied by the following species: *Vaccinium vitis-idaea* L., *Rubus saxatilis* L., *Juncus filiformis* L., *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth., *Thelypteris palustris* Schot,

*Melampyrum sylvaticum* L., and *Majanthemum bifolium* (L.) F. Schmidt. The species is found on gley and gleyic podzolic soils, mostly sabulous, rarely-sandy; and on peaty-gley and sod-podzolic soils (See Table 1). Bilberry is common on high acidity soils with pH varying from 2.54 to 4.93. The concentration of organic carbon in bilberry forest litter varies from 5.71 to 69.2% (See Fig. 1).

*V. myrtillus* is a mesobiont species whose average ecologic valency coefficient reaches 55%. In the investigated coenopopulations, the species achieves 8.15 to 50.10% of its potential capabilities regarding the studied factors. *V. myrtillus* is a hemieurybiont by climatic factors (0.58 points). It achieves its maximum on ombroclimatic scale (44.5%). According to climatic scales, ecological conditions of the studied habitats occupy the central position of all possible. The generalized spectrum of soil scales shows the species as a mesobiont (It–0.45). This allows widening *V. myrtillus* soil humidity scale 1.27 point left and soil moisture variability scale 0.80 points right. On other scales, the environmental position of the studied coenopopulations are within the data given by Dmitry Tsyganov for the species (See Table 2 and Fig. 2).

The discomfort index is also given to estimate habitat ecological conditions. Based on phytoindication data and according to the discomfort index, we defined that the most favorable conditions of edapho- and climatopes for *V. myrtillus* are formed in sphagnum phytocoenoses. The least favorable conditions were noted in bilberry pine and bilberry-pleurocarpous moss pine-spruce forest types.

The study of hemeroby showed that oligo-mesohemerob species (highly sensitive to anthropogenic factors) prevail in all *V. myrtillus* coenopopulations, i.e. 41%. A-hemerob, a-euhemerob and polyhemerob species were not noted in any of the studied CPs (See Table 3 and Fig. 3). This proves that the species is of low resistance to anthropogenic influence and can survive moderate intensity human impact. The studied plant communities with *V. myrtillus* are low-hemerobic.

*The paper contains 3 Figures, 3 Tables and 46 References.*

**Key words:** bilberry; coenopopulation; ecologic valence; phytoindication; discomfort index; hemeroby.

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. Ritchie JC. Biological flora of the British Isles: *Vaccinium myrtillus* L. *J Ecology*. 1956;42(1):291-299.
2. Hulten E, Fries M. Atlas of North European Vascular Plants, North of the Tropic of Cancer. Konigstein: Koeltz Botanical Books Publ.; 1986. 1172 p.
3. *Atlas arealov i resursov lekarstvennykh rasteniy SSSR* [Atlas of ranges and resources of medicinal plants in the USSR]. Chikov PS, editor. Moscow: Glavnoe upravlenie geodezii i kartografii Publ.; 1976. 340 p. In Russian
4. Shabarova SI. Tsenoticheskie osobennosti cherniki i ee rol' v povyshenii ustoychivosti sosnyakov Poles'ya USSR [Coenotic peculiarities of bilberry and its role in improving the stability of pine forests of Polesye, USSR]. In: *Dikorastushchie yagodnye rasteniya SSSR: Tezisy dokladov na Vsesoyuznom soveshchani* [Proceedings. Wild growing berries of the USSR]. Petrozavodsk: Karel'skiy filial AN SSSR Publ.; 1980. pp. 155-156. In Russian
5. Shubin VI. Makromitsety lesnykh fitotsenozov taezhnoy zony i ikh ispol'zovanie [Macromycetes of forest communities of the taiga zone and their use]. Leningrad: Nauka Publ.; 1990. 197 p. In Russian
6. Mallik AU, Pellissier F. Effects of *Vaccinium myrtillus* on spruce regeneration: testing the notion of coevolutionary significance of allelopathy. *J Chemical Ecology*. 2000;26:2197-2209.

7. Karczewski J. Znaszenie borowki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.) dla entomocenozy lesnej. *Folia Foreestalia Polonic*. Ser. A, Z. 9. 1962:172-195. In Polish
8. Nestby R, Percival D, Martinussen I, Opstad N, Rohloff J. The European Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the potential for cultivation. A Review. *The European J Plant Science and Biotechnology*. 2011;5(1):5-16
9. Nechaev VA, Nechaev AA. Wild berry plants and berry eating birds in the taiga zone of the Russian Far East]. *Contemp Prob Ecol*. 2012;1:97-106. doi: [10.1134/S1995425512010092](https://doi.org/10.1134/S1995425512010092)
10. Egoshina TL, Egorova NYu, Luginina EA, Obotnin SI, Yaroslavtsev AV, Gudovskikh Yu. Kislitsina AV, Kapustina NV, Suleimanova VN. Importance of wild-growing berries in the delivery of hunting animals. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2017;19(2-2):255-260. In Russian
11. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR: Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e* [State pharmacopoeia of the USSR: Iss. 2. Common analysis methods. Medicinal plant raw material]. Mashkovskiy MD, editor-in-chief. Moscow: Meditsina Publ.; 1990. 400 p. In Russian
12. *Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv* [State registry of medicinal substances]. Vol. 1. Moscow: Meditsinskiy sovet Publ.; 2009. 1359 p. In Russian
13. *European Pharmacopoeia*. 6<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc.; 2008. pp. 738-739.
14. Burdulis D, Ivanauskas L, Dirse V, Kazlauskas S, Razukas A. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Meedicina (Kaunas)*. 2007;43(12):971-979.
15. Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*. 2010;14(3):168-177. doi: [10.1111/j.1753-4887.2010.00273](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00273)
16. Ryazanova TK, Kurkin VA. New approaches to complex use of fruits and shoots of bilberry ordinary. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2012;14(5-3):754-757. In Russian
17. Habanova M, Haban M, Kobidova R, Schwarzova J. Analysis of biologically active substances in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in selected natural localities of Slovak republic. *J Central European Agriculture*. 2013;68(3):1210-1219. doi: [10.5513/JCEA01/14.3.1328](https://doi.org/10.5513/JCEA01/14.3.1328)
18. Kunz S. Uptake and bioavailability of antocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie *in vitro* and *in vivo*. *British J Nutrition*. 2015;113(7):1044-1055. doi: [10.1017/S0007114515000161](https://doi.org/10.1017/S0007114515000161)
19. Rohloff J, Uleberg E, Nes A, Krogstad T, Nestby R, Martinussen I. Nutritional composition of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) of forest fields in Norway-Effects of geographic origin, fertilization and soil properties. *J Applied Botany and Food Quality*. 2015;88:274-287. doi: [10.5073/JABFQ.2015.088/040](https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088/040)
20. Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and northblue blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*. 2008;110:156-160. doi: [10.1016/j.foodchem.2008.01.057](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.057)
21. Egoshina TL. Nedrevesnye rastitel'nye resursy i ikh znachenie dlya naseleniya Rossii [Non-wood plant resources and their role for Russian population]. In: *Pishchevye resursy dikoy prirody i ekologicheskaya bezopasnost' naseleniya: materialy Mezhdunarodnoy konferentsii* [Proceedings of Int. Conf. Food resources and ecological safety of the population (Kirov, Russia, 14-18 November, 2014)]. Kirov: VNIIOZ them. prof. B.M. Zhitkova Publ.; 2004. pp. 14-16. In Russian
22. Egoshina TL, Luginina EA, Egorova NYu, Gudovskikh YuV, Kislitsyna AV, Obotnin SI. Dinamika biologicheskogo zapasa plodov cherniki v Rossii v 2000-2015 [Dynamics of bilberry biological stock in Russia in 2000-2015]. In: *Sovremennye problemy*

- prirodopol'zovaniya, okhotovedeniya i zverovodstva: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Proceedings Int. Sci. and Prac. Conf. Recent Problems of Nature Use, Game Biology and Fur Farming (Kirov, Russia, 22-25 May, 2017)]. Kirov: VNIIOZ them. prof. B.M. Zhitkova Publ.; 2017. pp. 489-492. In Russian
23. Egoshina TL, Kolupaeva KG, Raus LK. Analiz osobennostey plodonosheniya i resursov *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) v Kirovskoy oblasti (1961–2004) [Analysis of *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) fructification and resources in Kirov region (1961-2004)]. *Rastitel'nye resursy*. 2006;42(1):57-66. In Russian
  24. Maznaya EA, Lyanguzova IV. Ekologo-populyatsionnyy monitoring yagodnykh kustarnichkov pri aerotekhnogennom zagryaznenii [Ecological and population monitoring of aero-technogenic pollution of berry shrubs]. St. Petersburg: VVM Publ.; 2010. 195 p.
  25. Petrov NV. Comparative estimation of the *Vaccinium myrtillus* and *V. vitis-idaea* (Ericaceae) berries stock in primary and secondary forests in middle taiga landscapes of Karelia. *Rastitel'nye resursy*. 2019;55(1):23-35. doi: [10.1134/S0033994619010102](https://doi.org/10.1134/S0033994619010102)
  26. Balandina TP, Vakhrameeva MG. Chernika obyknovennaya [Common bilberry]. *Biologicheskaya flora Moskovskoy oblasti* [Biological flora of Moscow region]. 1980;5:132-146. In Russian
  27. Timoshok EE. The ecology of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and cowberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) in Western Siberia. *Russ J Ecology*. 2000;31(1):8-13. doi: [10.1007/BF02799719](https://doi.org/10.1007/BF02799719)
  28. Polyanskaya TA. Ecological peculiarities, ontogenetic structure and productivity of *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) coenopopulations in National Park “Mary Chodra” (Mary-El Republic). *Rastitel'nye resursy*. 2008;44(2):40-49. In Russian, English Summary
  29. Egorova NYu, Suleimanova VN, Egoshina TL. Ekologicheskie predpochteniya nekotorykh dominantov travyano-kustarnichkovogo yarusa taezhnykh fitotsenozov [Ecological preferences of some dominants of the herbaceous-shrub layer in the taiga plant communities]. In: *Sokhranenie lesnykh ekosistem: problemy i puti ikh resheniya: materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Proceedings of Russ. Conf. Preservation of forest communities; problems and solutions (Kirov, Russia, 25-29 May, 2017)]. Kirov: Raduga-PRESS; 2017. pp 218-221. In Russian
  30. Coudun C, Gégout J-C. Quantitative prediction of the distribution and abundance of *Vaccinium myrtillus* with climatic and edaphic factors. *J Vegetation Science*. 2007;18:517-524.
  31. Nestby R, Hykkerud AL, Martinussen I. Review of botanical characterization, growth preferences, climatic adaptation and human health effects of Ericaceae and Empetraceae wild dwarf shrub berries in boreal, alpine and arctic areas. *J Berry Research*. 2019;9: 515-547. doi: [10.3233/JBR-190390](https://doi.org/10.3233/JBR-190390)
  32. *Metody izucheniya lesnykh soobshchestv* [Methods for studying forest communities]. Yarmishko VT and Lyanguzova IV, editors. St. Petersburg: NII Khimii SPbGU Publ.; 2002. 240 p. In Russian
  33. *The Plant List* (TPL). A working list of all known plant species. Available at: <http://www.theplantlist.org/> (accessed: 15.06.2020).
  34. Tsyganov DN. Fitoindikatsiya rezhimov v podzone khvoyno-shirokolistvennykh lesov [Phytoindication of the regimes in the sub zone of coniferous-broad-leaved forests]. Moscow: Nauka Publ.; 1983. 198 p. In Russian
  35. Zubkova EV, Khanina LG, Grokhlina TI, Dorogova YuA. Komp'yuternaya obrabotka geobotanicheskikh opisaniy po ekologicheskim shkalam s pomoshch'yu programmy EcoScaleWin: uchebnoe posobie [Computer processing of geobotanic descriptions with EcoScaleWin software]. Yoshkar-Ola: MarGU Publ.; 2008. 96 p. In Russian
  36. Zhukova LA, Dorogova YuA, Turmikhmetova NV, Gavrilova MN, Polyanskaya TA. Ekologicheskie shkaly i metody analiza ekologicheskogo raznoobraziya rasteniy

- [Ecological scales and methods of analysis of plant ecological diversity]. Yoshkar-Ola: Mariyskiy gosudarstvennyy universitet Publ.; 2010. 368 p. In Russian
37. Klimentko GO. Osoblivosti ekologichnikh umov u mistsezrostannyakh ridkisnikh vidiv roslin [Peculiarities of ecological states of rare plant species]. In: *Roslinniy svit u Chervoniy knizi Ukraïni: vprovadzhennya global'noi strategii zberezhennya roslin: II Mizhnarodna naukova konferentsiya* [Proceedings. Plant world in the Red List of Ukraine: Introduction of global strategy of plant conservation]. Uman: 2012. pp. 107-110. In Ukrainian
  38. Frank D, Klotz S. Biologisch-ökologische Daten zur Flora der DDR. Halle; Wittenberg: Martin-Luter-Universität Publ.; 1990. 167 p. In German
  39. Ishbirdina LM, Ishbirdin AR. Urbanizatsiya kak faktor antropogennoy evolyutsii flory i rastitel'nosti [Urbanization as a factor of anthropogenic evolution of flora and vegetation]. *Zhurnal obshchey biologii = Biology Bulletin Review*. 1992;53(2):211-224. In Russian
  40. Jakoviak B. Atlas roslin naczyniowych w Poznaniu [Atlas of vascular plants of Poznan]. Poznan: Uniwersytet im. Adama Mickiewicza Publ.; 1993. 409 p. In Polish
  41. Ishmuratova MM, Ishbirdin AR, Suyundukov IV. Use of indicators of gemeroby for evaluation fragility of some species orchids of South Ural and stability of the plant census. *Biologicheskij vestnik*. 2003;7(1-2):33-35. In Russian
  42. Arinushkina EV. Rukovodstvo po khimicheskomu analizu pochv [Manual on soil chemical analysis]. Moscow: Moscow University Press; 1970. 487 p.] In Russian
  43. Klassifikatsiya i diagnostika pochv v Rossii [Classification and diagnostics of soils in Russia]. Shishoff LL, Tonkonogov VD, Lebedeva II, Gerasimov MI, editors. Smolensk: Ojkumena Publishing House; 2004. 342 p. In Russian
  44. Egorova NYu. Osobennosti ekologicheskikh predpochteniy yagodnykh rasteniy sem. Vacciniaceae Lindl. v lesnykh fitotsenozakh yuzhnoy taygi [Peculiarities of ecological preferences of fam. Vacciniaceae Lindl. berry plants in forest communities of the southern taiga]. In: *Boreal'nye lesa: sostoyanie, dinamika, ekosistemnye uslugi: tezisy dokladov Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem* [Proceedings of Russ. Sci. Conf. Boreal forests: state, dynamics, ecosystem services (Petrozavodsk, Russia, 11-15 September, 2017)]. Petrozavodsk: Karel'skiy nauchnyy tsentr RAN Publ.; 2017. pp. 102-104. In Russian
  45. Chirkova NYu. Otsenka ustoychivosti soobshchestv s *Vaccinium vitis-idaea* L. k antropogennym faktorom [Estimation of the stability of plant communities with *Vaccinium vitis-idaea* L.]. In: *Lesnye biologicheski aktivnye resursy: Materialy tret'ey mezhdunarodnoy konferentsii* [Proceedings 3rd. Int. Conf. Forest biologically active resources (Khabarovsk, Russia, 25-27 September, 2007)]. Khabarovsk: Far East Forestry Research Institute Publ.; 2007. pp. 116-118. In Russian
  46. Suleimanova VN, Egorova NYu. Predely ustoychivosti k antropogennomu vozdeystviyu vidov edifikatorov travyano-kustarnichkovogo yarusa lesnykh ekosistem [Limits of the resistance of herbaceous-shrub layer edipicator species to human impact in forest communities]. In: *Ustoychivoe razvitie territoriy: teoriya i praktika: materialy IX Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Proceedings of IX Russ. Conf. Sustainable development of the territories: theory and practice (Sibai, Russia, 24-26 May, 2018)]. Sibai: Sibayskiy informatsionnyy tsentr; 2018. pp. 267-269. In Russian

Received March 26, 2019; Revised January 27, 2020 and July 27, 2020;  
Accepted February 21, 2021; Published March 31, 2021.

#### Author Info:

**Egorova Natalya Yu**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Plant Ecology and Resources, Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming, 79 Preobrazhenskaya Str., Kirov 610000, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5891-4580>

E-mail: [n\\_chirkova@mail.ru](mailto:n_chirkova@mail.ru)

**Egoshina Tatiana L**, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Plant Ecology and Resources, Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming, 79 Preobrazhenskaya Str., Kirov 610000, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4663-2332>

E-mail: [etl@inbox.ru](mailto:etl@inbox.ru)

**Yaroslavtsev Artem V**, Researcher, Department of Plant Ecology and Resources, Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming, 79 Preobrazhenskaya Str., Kirov 610000, Russian Federation.

E-mail: [mr.artemya@gmail.com](mailto:mr.artemya@gmail.com)

УДК 502.753:502.2.05  
doi: 10.17223/19988591/53/5

Л.В. Тетерюк<sup>1</sup>, О.Е. Валуйских<sup>1</sup>, О.Ф. Кирсанова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

<sup>2</sup>Печоро-Илычский природный заповедник, п. Якши, Республика Коми, Россия

## Распространение, состояние популяций и охрана редких эфемероидов в Республике Коми

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме  
«Разнообразие растительного мира западного макросклона  
Приполярного Урала» (No. AAAA-A19-119011790022-1).

Приведены данные о распространении, современном состоянии популяций и перспективах сохранения охраняемых эфемероидов (*Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, *Corydalis solida*, *Ficaria verna*, *Gagea samojedorum*) на территории Республики Коми. Показано, что на границе ареала эти виды спорадически встречаются в поймах рек и ручьев, где образуют одно-двувидовые экотопические группировки. Оценка состояния популяций *Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, *Corydalis solida*, *Ficaria verna* на основе анализа численности, онтогенетической структуры и способов самоподдержания, указывает на снижение скорости семенного и вегетативного размножения на границе распространения. Эндемик *Gagea samojedorum* образует крупные популяции с преобладанием молодых особей в предгорных и горных районах Урала. Интенсивность репродукции этого вида обеспечивается вариабельностью вегетативного размножения. Наиболее значимыми угрозами для эфемероидов на границе ареала являются значительная фрагментация популяций и климатические факторы, ослабляющие позиции видов в фитоценозах, лимитирующие их развитие и размножение. Важную роль в сохранении эфемероидов играет система ООПТ Республики Коми, включая объект Всемирного наследия ЮНЕСКО «Девственные леса Коми» и ряд региональных заказников.

**Ключевые слова:** Красная книга; ООПТ; охраняемые виды; ценопопуляции; европейский северо-восток России.

**Для цитирования:** Тетерюк Л.В., Валуйских О.Е., Кирсанова О.Ф. Распространение, состояние популяций и охрана редких эфемероидов в Республике Коми // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 89–108. doi: 10.17223/19988591/53/5

### Введение

Эфемероиды – многолетние травянистые полициклические растения с коротким циклом жизни надземных побегов, приходящимся на весну, и длительным периодом относительного покоя в летний сезон. В эту экологическую группу входят представители разных жизненных форм и таксоно-

мических групп. Представленность во флорах растений с эфемерным типом развития зависит от природных зон. В лесах умеренной зоны Японии весенние эфемероиды составляют не более 6% флоры [1], в горах Памиро-Алая (Центральная Азия) доля эфемероидов составляет около 9%, а в южных частях этой горной системы эфемеры и эфемероиды преобладают [2]. В пустынях раннецветущие эфемероиды являются одним из основных компонентов флоры, достаточно широко представлены и играют важную роль в формировании сообществ, стабилизации дюн [3]. Формирование этой экологической группы, по мнению В.И. Авдеева [4], связано с возникновением степных сообществ и является одним из возможных путей адаптации растений к режиму увлажнения в аридных экосистемах. Однако общепризнанной является точка зрения о зарождении синузии эфемероидов в третичных лиственных лесах и более позднем ее появлении в степных и луговых сообществах, сформировавшихся преимущественно в четвертичный период [5–7]. На примере некоторых эфемероидов показано, что в четвертичный период имело место неоднократное расширение границ их ареалов, связанное с теплым влажным климатом межледниковий, и сокращение области их распространения в настоящее время [8]. Основным направлением адаптаций эфемероидов считают их приспособление к световому режиму широколиственных лесов [7, 9–12]. Благодаря сходному ритму сезонной вегетации представители этой группы способны образовывать весеннюю синузию в широколиственных лесах, степях, пустынных и горных сообществах [3, 8, 10, 13]. Они эффективно используют интенсивный весенний свет для фиксации углерода [14, 15] и накопления запасных веществ в подземных органах в короткие сроки [16]. Стабильность существования эфемероидов зависит от сроков схода снежного покрова, температуры воздуха в период вегетации, влажности почвы [1]. Эфемероиды имеют ограниченные возможности развития под пологом вечнозеленых растений или в лесных сообществах с высокой сомкнутостью [17, 18]. Кроме того, лимитирующими факторами могут выступать весенние заморозки, отсутствие насекомых-опылителей в период цветения, низкая конкурентноспособность и др. Особенности популяционной структуры эфемероидов в зоне широколиственных лесов Российской Федерации детально изучены О.В. Смирновой [10].

Во флоре таежной зоны северо-востока европейской части России доля эфемероидов незначительна и составляет менее 1% от общего числа таксонов [19]. В Республике Коми растения этой экологической группы представлены видами семейств Liliaceae, Ranunculaceae и Papaveraceae. Раннецветущие виды первого семейства из рода *Gagea* (*G. minima* (L.) Ker-Gawl., *G. granulosa* Turcz. и *G. lutea* (L.) Ker-Gawl.) в пределах региона достаточно широко распространены и обильны. Только один вид – *G. samojedorum* Grossh. – включен в списки охраняемых растений региона как эндемик Уральской горной страны [20]. Представители семейств Ranunculaceae – *Anemone altaica* (C.A. Mey.) Holub [syn. *Anemonoides altaica* (C.A. Mey.)

Holub], *Anemone nemorosa* (L.) Holub [syn. *Anemonoides nemorosa* (L.) Holub], *Anemone ranunculoides* L. [syn. *Anemonoides ranunculoides* (L.) Holub], *Ficaria verna* Huds. и Papaveraceae – *Corydalis solida* (L.) Clairv. – имеют обширные ареалы и играют важную роль в сложении растительного покрова широколиственных и южнотаежных лесов [7, 10, 21]. Однако в пределах Республики Коми они находятся на периферии своих видовых ареалов, представлены изолированными и / или реликтовыми популяциями и охраняются [20]. Из-за биологических особенностей (сжатые сроки вегетации в весенний период, малозаметное присутствие в сообществах в более поздние сроки) и географического местоположения, группа растений эфемероидов нуждается в специальных исследованиях. До настоящего времени на территории региона подобные работы не проводились.

Цель исследований – оценка перспектив сохранения редких раннецветущих эфемероидов на европейском северо-востоке России. Для этого авторами проведена работа по уточнению числа местонахождений видов на территории Республики Коми, составлены карты их распространения; собраны и обобщены сведения о площади, численности и структуре популяций, выявлены лимитирующие факторы.

### Материалы и методики исследования

Республика Коми расположена на северо-востоке европейской России (между 59°12'–68°25'N и 45°25'–66°15'E) и охватывает обширную территорию Русской равнины и Урала площадью более 416 тыс. км<sup>2</sup>. На ее территории преобладают темнохвойные леса и только крайний северо-восток региона располагается в полосе кустарниковых тундр. Климат характеризуется значительной суровостью и континентальностью. Вегетационный период (температура воздуха выше 5 °C) длится на юге региона 150 дней, на севере сокращается до 100 дней, а в горных районах длится не более 70 дней. Сход устойчивого снежного покрова в южных районах Республики Коми приходится на апрель–май, а в восточных и северо-восточных – на май–июнь. Наряду с широтными различиями физико-географических условий наблюдаются изменения в направлении с запада на восток – усиливается континентальность климата, возрастает роль сибирских элементов в растительном покрове и т.д. [22].

Для оценки перспектив сохранения редких раннецветущих эфемероидов на европейском северо-востоке России авторами проведена работа по уточнению числа местонахождений видов на территории Республики Коми, составлены карты их распространения; собраны и обобщены сведения о площади, численности и структуре популяций, выявлены лимитирующие факторы. Анализ распространения эфемероидов в пределах Республики Коми проведен по данным авторов, а также сборам, хранящимися в гербариях Института биологии Коми НЦ УрО РАН (SYKO), Института экологии

растений и животных УрО РАН (SVER), Пермского государственного университета (PERM) и гербарии сосудистых растений Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE), МГУ (MW). Названия растений приведены согласно базе данных World Flora Online [23] и перечню (списку) объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу Республики Коми [20].

Всего проведено обследование 44 ценотических (СР) популяций охраняемых эфемероидов:

***Anemone altaica***. Северный Урал, верхнее течение р. Печора: СР1 – N61,9930, E58,0567, кордон Собинская Заостровка, остров, пихтово-еловый лес, 22.05.2011; СР2 – N62,0428, E58,2035, устье р. Шайтановка, разнотравно-злаковый луг, 23.05.2011; СР3 – N62,0288, E58,6017, урочище Манские Луки, разнотравно-злаковый луг, 24.05.2011; СР4 – N61,9880, E58,7680, устье р. Ёлма, пойма, разнотравно-злаковый луг, 29.05.2011; СР5 – N62,0437, E58,9958, ниже устья р. Большая Порожная, пойма, разнотравно-злаковый луг, 27.05.2011; СР6 – N62,0588, E 59,2932, ниже устья р. Юргинская, разнотравно-злаковый луг, 28.05.2011. Южный Тиман: СР7 – N62,7569, E55,8641, пойма р. Нижняя Омра, ельник травяной и ивняк крупнотравный, 25.05.2017.

***Anemone nemorosa***. Северный Урал, верхнее течение р. Печора: СР1 – N61,9960, E58,0613, кордон Собинская Заостровка, злаково-разнотравный луг, 10.06.2014; СР2 – там же, опушка елово-берёзового леса, 10.06.2014; СР3 – N61,9783, E58,0178, кордон Собинская Заостровка, разнотравный елово-берёзовый лес, 12.06.2016.; СР4 – N62,0285, E58,5985, урочище Манские Луки, злаково-разнотравный луг, 13.06.2014; СР5 – там же, опушка берёзово-елового леса, 13.06.2014; СР6 – N61,9886, E58,7671, устье р. Ёлма, разнотравно-злаковый луг, 13.06.2014; СР7 – там же, берёзово-еловый лес, 13.06.2014; СР8 – N62,0426, E58,9837, устье р. Большая Порожная, злаково-разнотравный луг, 20.06.2014; СР9 – там же, елово-березовый лес, 20.06.2014.

***Anemone ranunculoides***. Вычегодско-Мезенская равнина: СР1 – N59,3750, E49,7719, п. Якуньель, пойма р. Летка, разнотравный луг, 20.05.2018; СР2 – там же, снытево-разнотравный луг, 20.05.2018; СР3 – там же, смешанный лес, 21.05.2018; СР4 – N59,4914, E49,8383, п. Якуньель, пойма р. Летка, разнотравный луг с сосной, 21.05.2018.

***Corydalis solida***. Южный Тиман: СР1 – N62,7556, E55,8636, пойма р. Нижняя Омра, подошва известнякового склона, ивняк, 20.05.2009. Вычегодско-Мезенская равнина: СР2 – N60,3334, E49,6442, окрестности с. Объячево, бассейн р. Луза, пойма ручья, крупнотравный луг, 29.05.2017; СР3 – там же, притеррасный склон, ивняк, 29.05.2017; СР4 – там же, смешанный лес, 29.05.2017. Северный Урал: СР5 – N62,5722, E58,1860, р. Илыч, разнотравный луг, 29.05.2015. Гряда Чернышева: СР6 – N65,3599, E58,1178, пойма р. Большая Сыня, ивняк и опушка смешанного леса. 2008–2013 гг.

***Ficaria verna***. Вычегодско-Мезенская равнина: СР1 – N60,3334, E49,6425, окрестности с. Объячево, бассейн р. Луза, пойма ручья, разнотравно-зла-

ковый луг, 29.05.2017; CP2 – N60,3334, E49,6425, там же, крупнотравный луг, 29.05.2017; CP3 – N59,3750, E49,7719, окрестности п. Якунзель, пойма р. Летка, межгривное понижение, разнотравный луг, 21.05.2018; CP4 – N59,3750, E49,7719, там же, снытево-разнотравный луг, 21.05.2018.

***Gagea samojedorum***. Северный Урал, верхнее течение р. Печора: CP1 – N61,9836, E58,0306, кордон Собинская Заостровка, злаково-разнотравный луг, 02.06.2017; CP2 – N62,0282, E58,1727, кордон Шайтановка, злаково-разнотравный луг, 04.06.2017; CP3 – N61,9880, E58,7689, кордон р. Ёлма, злаково-разнотравный луг, 06.06.2017; CP4 – N62,0348, E58,9548, остров в 500 м ниже урочища Строганая доска, злаково-разнотравный луг, 08.06.2017; CP5 – N62,0266, E58,8384, выше устья р. Ёлма, злаково-разнотравный луг, 09.06.2017; CP6 – N62,0282, E58,1727, урочище Манские Луки, злаково-разнотравный луг, 09.06.2017. Северный Урал, хребет Тельпос-из: CP7 – N63,6622, E59,1159, долина р. Тельпос, ивняк, 21.05.2018; CP8 – N63,6577, E59,1162, там же, березняк аконитовый, 28.06.2017; CP9 – N63,6578, E59,1168, там же, крупнотравная луговина, 29.06.2017; CP10 – N63,6525, E59,1099, там же, травянистый бечевник, 30.06.2017; CP11 – N63,8466, E59,0182, долина р. Тельпос-ю, травянистый бечевник, 28.06.2018; CP12 – N63,8599, E59,0127, там же, березовое редколесье, 30.06.2018; CP13 – N63,8692, E59,0371, там же, каменистый крупнотравный бечевник, 27.06.2018; CP14 – N63,8643, E59,0273, там же, березовое редколесье, 01.07.2018.

Для оценки состояния ценопопуляций (CP) охраняемых эфемероидов использованы подходы и методы популяционной биологии растений [24, 25]. При выделении онтогенетических состояний использовали концепцию дискретного описания онтогенеза с учетом особенностей индивидуального развития видов [10, 26–28]. За счетную единицу у корневищных видов на ранних этапах онтогенеза принята особь, на более поздних – парциальный побег; у корнеклубневых и луковичных – особь. В каждой ценопопуляции заложены трансекты с 40 учетными площадками размером от 0,25 до 1 м<sup>2</sup>, определена площадь и численность особей. В камеральный период рассчитаны базовые онтогенетические спектры видов для региональных популяций (усредненные значения) и прослежена их изменчивость (минимальные и максимальные значения). Возобновление в популяциях характеризовали через индексы восстановления ( $I_v$ ) и замещения ( $I_z$ ) [29]. Определена средняя и экологическая плотность растений. В качестве дополнительной характеристики использован показатель максимальной плотности, отражающий наибольшее число особей на учетных площадках.

## Результаты исследования и обсуждение

В ходе полевых исследований нами получены данные о распространении, экопической и фитоценотической приуроченности, численности и состоянии популяций эфемероидов.

*Anemone altaica* – многолетнее травянистое короткокорневищное поликарпическое растение, размножение которого осуществляется вегетативным путем (неглубоко омоложенными особями) и семенами. Это бореальный евросибирский вид с дизъюнктивным ареалом. По территории Республики Коми проходит северная граница распространения вида (рис. 1, В). Произрастает в пойменных сообществах (луга, заросли кустарников, опушки хвойных, смешанных и мелколиственных лесов), на каменистых склонах.

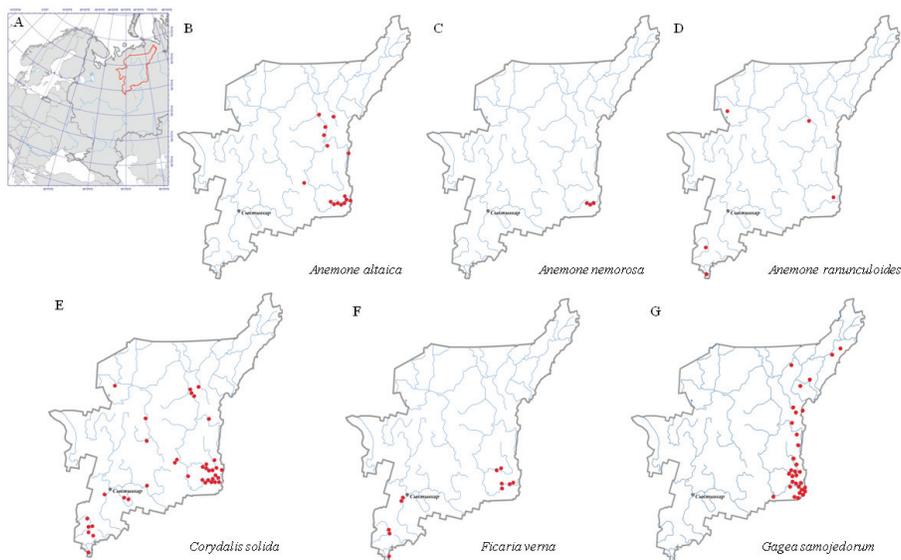
Наиболее крупные популяции *A. altaica* выявлены в верхнем течении р. Печора (на территории Печоро-Илычского заповедника). Ценопопуляции занимают площадь до 40 тыс. м<sup>2</sup> и насчитывают до нескольких сотен тысяч особей. Плотность размещения растений около 100–200 шт./м<sup>2</sup>, в некоторых местообитаниях превышает 250 шт./м<sup>2</sup>, максимальная плотность особей может достигать 1000–1300 шт./м<sup>2</sup>. Доля цветущих побегов низка (таблица).

*Anemone nemorosa* – многолетнее травянистое поликарпическое короткокорневищное растение; размножается вегетативным путем (неглубоко омоложенными особями) и семенами. Это неморально-бореальный европейский вид. На территории Республики Коми изолированная популяция на северном пределе распространения вида выявлена в 2014 г. [30]. Вид встречается в верховьях р. Печора на участке протяженностью около 90 км (от окрестностей кордона Собинская Заостровка до устья р. Большая Порожная) (рис. 1, С). Произрастает на разнотравных пойменных лугах в долине р. Печора по ее берегам и островам, на опушках берёзово-еловых травяных сообществ. Во всех обнаруженных местонахождениях *A. nemorosa* произрастает совместно с *A. altaica*, но приурочена к более тенистым местообитаниям.

Ценопопуляции *A. nemorosa* многочисленные – от тысячи до нескольких десятков и сотен тысяч побегов, занимают пойменные экотопы площадью от 5 до 70 тыс. м<sup>2</sup>. Плотность побегов составляет 20–40 шт./м<sup>2</sup>. Однако в некоторых изученных ценопопуляциях плотность не превышала 10 или составляла более 200 побегов на квадратный метр. Доля цветущих растений невелика, до 30% (см. таблицу).

*Anemone ranunculoides* – многолетнее травянистое поликарпическое короткокорневищное растение, размножается вегетативным путем (неглубоко омоложенными особями) и семенами. Неморальный европейский вид. По территории Республики Коми проходит северо-восточная граница распространения *A. ranunculoides* (рис. 1, D). Места обитания: поймы рек – смешанные и мелколиственные леса, опушки, луга.

Исследованные ценопопуляции вида на юге Республики Коми насчитывают от 150 до 300 и более особей (см. таблицу). Средняя плотность размещения особей варьировала от 1 до 8,4 шт./м<sup>2</sup>, достигая наибольших показателей на пойменных разнотравных лугах. В онтогенетическом спектре *A. ranunculoides* преобладают виргинильные особи (рис. 2). Доля особей прегенеративного периода может достигать 80% от общего числа растений.



**Рис. 1.** Местоположение Республики Коми (А) и карты распространения охраняемых видов эфемероидов на территории региона (В–Г)

**[Fig. 1.** Location of the Komi Republic (A) and distribution maps of protected ephemeroiid species in the region (B-G)]

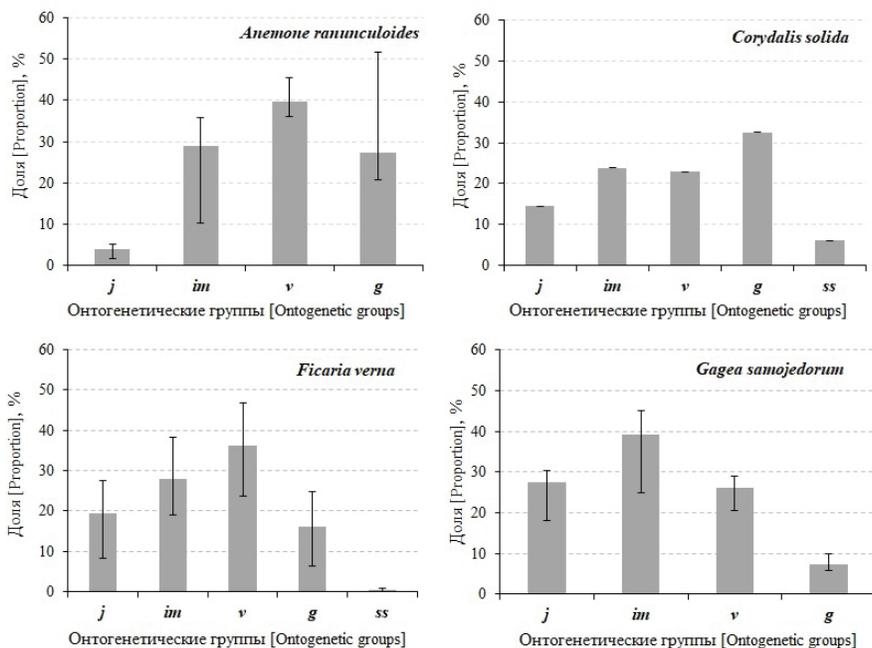
**Популяционные характеристики эфемероидов на территории Республики Коми**  
**[Population characteristics of ephemerooids in the Komi Republic]**

No. CP	Площадь цено-популяци, м <sup>2</sup> [Population area, m <sup>2</sup> ]	Численность, шт. [Population magnitude, pcs]	Плотность средняя / экологическая (максимальная), шт./м <sup>2</sup> [The average / environmental (max) density, PCs/m <sup>2</sup> ]	Доля генеративных особей, % [Percentage of generative individuals]
<i>Anemone altaica</i>				
CP1	4500	> 1000	– / – (848)	3
CP2	40 000	> 4 000 000	120,8 / – (400)	7
CP3	40 000	> 900 000	95,2 / – (544)	21
CP4	> 7000	> 1 500 000	256,0 / – (1328)	1
CP5	24 500	> 4 000 000	183,2 / – (1056)	1
CP6	15 000	> 1 000 000	74,0 / – (624)	10
CP7	3000	> 3000	200 / 670	13
<i>Anemone nemorosa</i>				
CP1	17 000	> 600 000	39,8 / – (448)	12
CP2	2100	> 110 000	56,8 / – (432)	2
CP3	5000	> 70 000	14,4 / – (52)	10
CP4	60 500	> 1 100 000	18,9 / – (528)	4
CP5	2100	> 110 000	56,8 / – (432)	2
CP6	2700	> 1300	<0,5 / – (192)	4
CP7	530	> 16 000	31,2 / – (1104)	9
CP8	1070	> 230 000	217,8 / – (848)	11
CP9	7900	> 300 000	38,4 / – (560)	33
<i>Anemone ranunculoides</i>				
CP1	300	200–300	2,8 / 4,3	48

No. CP	Площадь цено- популяци, м <sup>2</sup> [Population area, m <sup>2</sup> ]	Численность, шт. [Population magnitude, pcs]	Плотность средняя / экологическая (максимальная), шт./м <sup>2</sup> [The average / environmen- tal (max) density, PCs/m <sup>2</sup> ]	Доля генератив- ных особей, % [Percentage of gen- erative individuals]
CP2	300	200–300	5,5 / 9,8	16
CP3	160	150	1,0 / 1,2	33
CP4	300	200–300	8,4 / 9,9	26
<i>Corydalis solida</i>				
CP1	10	до 50	5,0 / –	65
CP2	34	до 50	0,3 / 0,6	40
CP3	400	> 500	8,2 / –	39
CP4	150	< 100	1,3 / 1,5	32
CP5	2400	> 10 000	4,5 / 5,6	31
CP6	3000	до 500	– / –	27–40
<i>Ficaria verna</i>				
CP1	400	> 5000	15,3 / 17,9	11
CP2	300	> 3000	35,0 / 35	11
CP3	110	> 2000	196,0 / –	19
CP4	100	> 2000	83,4 / 91	4
<i>Gagea samojedorum</i>				
CP1	11	> 1000	104,8 / –	11
CP2	63	> 1300	20,9 / –	2
CP3	1224	> 1 100 000	964,0 / –	1
CP4	12 035	> 3 900 000	327,6 / –	3
CP5	7501	> 939 000	125,2 / –	4
CP6	30 000	> 5 376 000	179,2 / –	5
CP7	50	> 1000	113,5 / –	6
CP8	24	> 2000	154,0 / –	6
CP9	600	> 10 000	161,0 / –	18
CP10	300	> 3000	122,0 / –	17
CP11	32	> 3000	168,0 / –	5
CP12	40	> 1000	92,6 / –	10
CP13	50	> 1000	116,9 / –	9
CP14	36	> 500	49,2 / –	9

*Corydalis solida* – многолетнее травянистое поликарпическое клубневое растение, размножается преимущественно семенным путем. Неморальный европейский вид. На территории Республики Коми *C. solida* находится на северо-восточном пределе распространения (рис. 2). *C. solida* встречается по берегам рек и ручьев в мелколиственных лесах, зарослях кустарников, на лугах.

Исследованные ценопопуляции *C. solida* нормальные, факультативно неполночленные, находятся в устойчивом состоянии (см. таблицу). Численность их варьирует от 50 до 500 особей, плотность размещения растений – от 0,3 до 8,2 шт./м<sup>2</sup>. Для данного вида в центральной части ареала характерен левосторонний онтогенетический спектр [10]. Преобладание генеративных особей в базовом спектре краевых популяций вида на территории Республики Коми (рис. 2) указывает на снижение активности размножения вида на Севере. Несмотря на это, многолетние наблюдения показали, что даже в самой северной на территории региона популяции *C. solida* (бассейн р. Большая Сыня) семенное возобновление происходит регулярно ( $I_{\text{в}} = 1,2–2,4$ ;  $I_{\text{з}} = 0,9–1,9$ ) (см. рис. 3).



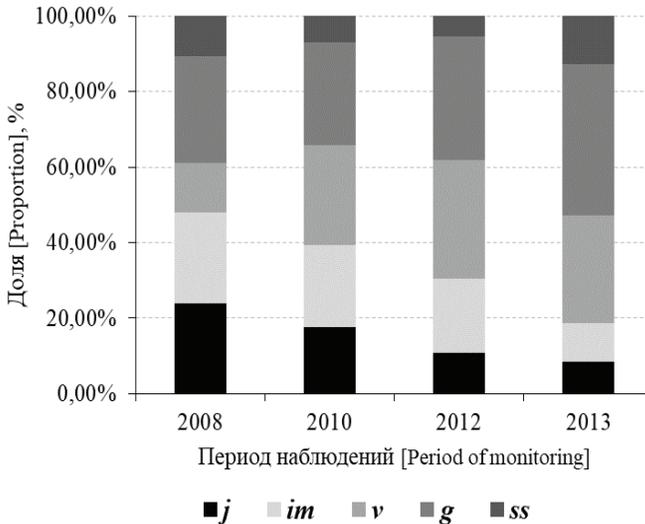
**Рис. 2.** Базовые онтогенетические спектры популяций охраняемых эфемероидов в Республике Коми. Условные обозначения онтогенетических групп: *j* – ювенильная, *im* – имматурная, *v* – виргинильная, *g* – генеративная, *ss* – субсенильная  
**[Fig. 2.** Basic ontogenetic spectra of protected ephemeroid populations in the Komi Republic. Symbols of ontogenetic groups: *j* - juvenile, *im* - immature, *v* - virginal, *g* - generative, *ss* - subsenile]

В региональной популяции на каждую генеративную особь приходится в среднем около 1,8 молодых растений. Наиболее крупные популяции характерны для верховьев рр. Печора и Илыч.

*Ficaria verna* – многолетнее травянистое поликарпическое корнеклубневое растение. Размножается преимущественно вегетативным способом за счет образования глубококомоложенных вегетативных диаспор из придаточных почек на клубнях и выводковых почек в пазухах листьев, семена образует крайне редко. Это неморальный европейский вид, в Республике Коми находится на северном пределе распространения (рис. 1, *F*). Произрастает на пойменных лугах, опушках, во влажных мелколиственных и хвойно-мелколиственных лесах, зарослях кустарников.

Ценопопуляции *F. verna* нормальные, факультативно неполночленные, с плотностью размещения особей от 15 до 196 шт./м<sup>2</sup> (в среднем – 82,4 шт./м<sup>2</sup>). Численность популяций достигает нескольких тысяч особей (см. таблицу). В базовом онтогенетическом спектре вида в регионе преобладают виргинильные особи, доля генеративных растений мала (см. рис. 2). Он отличается от спектра, характерного для дефинитивных популяций *F. verna* в зоне широколиственных лесов (в центральной части ареала), где преобладают

ювенильные особи семенного и вегетативного происхождения [10]. Возможно, это связано со снижением активности размножения вида на северной границе ареала. В целом в региональной популяции на каждую взрослую особь, способную к вегетативному и / или семенному размножению, приходится 0,9 молодых подрастающих растений.



**Рис. 3.** Динамика онтогенетического спектра наиболее северной популяции *Corydalis solida* в бассейне р. Большая Сыня (гряда Чернышева, Республика Коми).

Условные обозначения онтогенетических групп: *j* – ювенильная, *im* – иматурная, *v* – виргинильная, *g* – генеративная, *ss* – субсенильная

[Fig. 3. Dynamics of the ontogenetic spectrum of the northernmost population of *Corydalis solida* in the basin of the Bolshaya Synya river (Chernyshev ridge, Komi Republic). Symbols of ontogenetic groups: *j* - juvenile, *im* - immature, *v* - virginal, *g* - generative, *ss* - subsenile]

***Gagea samojedorum*** – травянистое многолетнее поликарпическое луковичное растение, которое размножается преимущественно вегетативными зачатками (луковичками, образующимися вместо цветков на видоизмененных цветоносах и в базальной части побега), реже – семенами. Эндемик Урала [31] описан А.А. Гроссгеймом с горы Сабля по сборам В.Б. Сочавы 1927 г. (LE). Ареал *G. samojedorum* охватывает всю цепь Уральских гор от Полярного до Южного Урала. Некоторыми исследователями рассматривается как часть полиморфного вида *G. liotardii* (Sternb.) Schult. & Schult.f. [32, 33]. На территории Республики Коми *G. samojedorum* встречается на Северном и Приполярном Урале, реже – на Полярном Урале и в Приуралье (см. рис. 1, *G*). Вид обитает на сырых высокоотравных лугах в поймах рек и ручьев или безрусловых водотоков, в высокоотравных редколесьях до верхней границы леса в горах и в предгорной таежной зоне [34].

В горах Северного Урала *G. samojedorum* образует многочисленные популяции (от 300 до нескольких тысяч особей и более) с высокой плотностью

растений, которая варьирует от 20 до 964 шт./м<sup>2</sup>. Базовый онтогенетический спектр вида в регионе левосторонний, с преобладанием особей пре-генеративного периода (см. рис. 2). Такой тип спектра в целом характерен для многих представителей рода *Gagea* [10]. При небольшой доле цветущих растений индекс восстановления ( $I_b$ ) имеет высокие значения и колеблется в разных популяциях *G. samojedorum* от 4,6 до 15,7 (см. таблицу). В среднем в региональной популяции на одну генеративную особь ( $I_3$ ) приходится 9,9 молодых растений, что указывает на активность процессов самоподдержания. Для всех представителей рода *Gagea* характерны как генеративное, так и вегетативное размножение, причем их соотношение видоспецифично [32, 33]. Для комплекса *Gagea liotardii* s.l., в объеме которого часто рассматривается *G. samojedorum*, характерна изменчивая стратегия вегетативного размножения [35]. Мы считаем, что именно вариабельность вегетативного размножения *G. samojedorum* (формирование нескольких типов лукович у особей разных возрастных групп) обеспечивает интенсивность репродукции особей при затрудненном образовании семян и способствует устойчивому поддержанию численности популяций вида на Урале. Основная часть региональной популяции находится на территории ООПТ – Печоро-Ильчского заповедника и национального парка «Югыд ва».

В связи с тем что для Республики Коми характерны низкие уровни освоенности территории и плотности населения, антропогенное воздействие на популяции эфемероидов ограничено. Прямые угрозы уничтожения местобитаний возникают при строительстве линейных сооружений, проведении сельскохозяйственных работ в окрестностях населенных пунктов. Снижению численности видов способствует сбор растений на букеты, выкапывание и пересадка эфемероидов на дачные участки. Более значимыми угрозами на границе ареала выступают естественные абиотические и биотические факторы, ослабляющие позиции видов в ценозах, лимитирующие рост и размножение растений, развитие популяций. Особое значение для устойчивого состояния популяций эфемероидов имеют процессы самоподдержания. В обследованных популяциях короткокорневищных *Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, клубнекорневого *Ficaria verna* и луковичного *Gagea samojedorum* поддержание численности осуществляется в основном за счет вегетативного размножения, с образованием клонов. Семенное размножение, играющее второстепенную роль для этих таксонов и в центральной части ареала [10, 36], на Севере затрудняет еще целый ряд факторов. Среди них – снижение числа опылителей. Это может быть критично для облигатных энтомофилов [37], поскольку для представителей рода *Anemone* самоопыление не характерно [38, 39]. Важную роль играет температурный фактор. Семена представителей родов *Anemone* и *Ficaria* имеют длительный период прорастания, для их созревания необходим теплый летний период [40]. Для некоторых видов, в частности для *Anemone nemorosa*, показано, что при продвижении на север недостаток тепла приводит к снижению мас-

сы и процента всхожих семян в популяциях [41]. С учетом того что вид не образует постоянный банк семян [42] и обладает невысокими показателями вегетативного разрастания [43], при недостаточной теплообеспеченности в течение нескольких вегетационных периодов равновесие механизмов самоподдержания периферических популяций в регионе может нарушаться. Среди охраняемых эфемероидов единственным видом, размножающимся только семенным способом, является *Corydalis solida*. Дополнительное давление на популяции этого вида в регионе связано с тем, что *C. solida* является основным кормовым растением для эндемичного подвида редкой охраняемой бабочки *Parnassius mnemosyne timanica* Eisner et Sedykh, 1964 [44]. По сравнению с эндемичным *Gagea samojedorum*, исследованным в основной части своего ареала, в пограничных популяциях эфемероидов (*Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, *Corydalis solida* и *Ficaria verna*) показатели индексов восстановления и замещения значительно ниже.

В настоящее время все вышеперечисленные виды занесены в региональные списки редких и находящихся под угрозой исчезновения растений с категорией редкости 3 (редкие) [20]. Основными критериями для их включения послужили: нахождение популяций на границе ареала, небольшое число и изолированность локалитетов, часто – реликтовый характер и малочисленность популяций, для *Gagea samojedorum* – эндемизм.

### Заключение

На территории Республики Коми *Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, *Corydalis solida* и *Ficaria verna* представлены периферическими популяциями на северной / северо-восточной границе ареала. В таежной зоне эти виды отличаются фитоценотической избирательностью, занимая наиболее благоприятные и соответствующие их экологическим требованиям местообитания. Если в центральной части ареала эти таксоны образуют синузидию эфемероидов в зональных типах растительности, то на европейском северо-востоке России их местонахождения разрозненны и часто имеют реликтовый характер. Произрастая в составе пойменных луговых и лесных сообществ, эфемероиды иногда образуют одно–двувидовые экотопические группировки.

Популяции эфемероидов преимущественно линейные, часто – с высокой численностью особей, устойчивые. Самоподдержание в популяциях короткокорневищных *Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, клубнекорневого *Ficaria verna* осуществляется в основном за счет вегетативного размножения, клубневого *Corydalis solida* – только семенным способом. Онтогенетическая структура популяций указывает на снижение интенсивности семенного и вегетативного размножения этих видов на границах распространения. Эндемик Урала *Gagea samojedorum* образует многочисленные популяции с преобладанием молодых особей. Интенсивность репродукции этого вида обеспечивается вариабельностью вегетативного размножения.

Важную роль в сохранении редких эфемероидов в регионе играет система особо охраняемых природных территорий Республики Коми. Территориальная охрана эфемероидов осуществляется в Печоро-Илычском природном заповеднике и национальном парке «Югид ва», которые входят в объект Всемирного наследия ЮНЕСКО «Девственные леса Коми». В пределах этих ООПТ на Северном Урале сохранились крупные популяции *Gagea samojedorum*, *Anemone altaica* и *Corydalis solida*. Исследованные популяции *Anemone nemorosa* на крайнем юго-востоке республики в границах Печоро-Илычского заповедника – единственные в регионе. Местонахождения охраняемых эфемероидов на Тиманском кряже и гряде Чернышева находятся в границах ряда региональных заказников («Сойвинский», «Понью-Заостренное», «Пижемский», «Сынинский», «Верхне-Локчимский»). Однако значительная часть популяций охраняемых эфемероидов, особенно в южной части Республики Коми, находится вне системы охраняемых территорий и подвержена рискам.

Авторы благодарны за помощь в выполнении работы сотрудникам Института биологии Коми НЦ УрО РАН канд. биол. наук Б.Ю. Тетерюку, канд. биол. наук Н.И. Филиппову и канд. биол. наук И.Н. Стерляговой, а также учителю Т.А. Рыбиной и учащимся общеобразовательной школы No. 56 поселка Сыня (Республика Коми).

#### Литература

1. Augspurger C.K, Salk C.F. Constraints of cold and shade on the phenology of spring ephemeral herb species // Journal of Ecology. 2016. Vol. 105. PP. 246–254. doi: [10.1111/1365-2745.12651](https://doi.org/10.1111/1365-2745.12651)
2. Сафаров Н.М. Анализ жизненных форм флоры Центрального Памиро-Алая // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. Ботаника. 2013. Т. 56, No. 8. С. 643–648.
3. Qiu Y., Liu T., Zhang C., Liu B., Pan B., Wu S., Chen X. Mapping Spring Ephemeral Plants in Northern Xinjiang, China // Sustainability. 2018. Vol. 10. P. 804. doi: [10.3390/su10030804](https://doi.org/10.3390/su10030804)
4. Авдеев В.И. Этапы формирования степных ландшафтов в Евразии. 1. Общие аспекты проблемы // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2008. No. 2(18). С. 38–42.
5. Клеопов Ю.Д. Основные черты развития флоры широколиственных лесов европейской части СССР // Материалы по флоре и растительности СССР. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1941. Т. 1. С. 183–256.
6. Федоров А.Н. История высокогорной флоры Кавказа в четвертичное время как пример автохтонного развития флористической основы // Материалы по четвертичному периоду СССР. М. ; Л. : Изд-во Акад. наук СССР, 1952. Вып. 3. С. 49–86.
7. Shorina N.I., Smirnova O.V. The Population Biology of Ephemeroïds // The Population Structure of Vegetation / ed. by J. White. Netherlands : Publisher Springer Netherlands, 1985. PP. 225–240.
8. Li Y., Zhang X.-N., Lv G.-H. Phylogeography of *Ixiolirion songaricum*, a spring ephemeral species endemic to Northwest China // Plant Systematics and Evolution. 2019. Vol. 305, No. 3. PP. 205–221. doi: [10.1007/s00606-018-1563-7](https://doi.org/10.1007/s00606-018-1563-7)
9. Горышина Т.К. Ранневесенние эфемероиды лесостепных дубрав (исследования по экологии, физиологии и фитоценологии). Л. : Изд-во ЛГУ, 1969. 232 с.

10. Смирнова О.В. Структура травяного покрова широколиственных лесов. М. : Наука, 1987. 207 с.
11. Rothstein D.E., Zak D.R. Photosynthetic adaptation and acclimation to exploit seasonal periods of direct irradiance in three temperate, deciduous-forest herbs // *Functional Ecology*. 2001. Vol.15, No. 6. PP. 722–731. doi: [10.1046/j.0269-8463.2001.00584.x](https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00584.x)
12. Мамушина Н.С., Зубкова Е.К., Буболо Л.С., Тютерева Е.В. Структурно-функциональная характеристика эфемероидов бореальной зоны // *Ботанический журнал*. 2011. Т. 96, No. 7. С. 906–917.
13. Whigham D.F. Ecology of woodland herbs in temperate deciduous forests // *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 2004. Vol. 35. PP. 583–621. doi: [10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105708](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105708)
14. Sparling J.H. Assimilation rates of some woodland herbs in Ontario // *Botanical Gazette*. 1967. Vol. 128. PP. 160–168.
15. Taylor R.J., Percy R.W. Seasonal patterns of the CO<sub>2</sub> exchange characteristics of understory plants from a deciduous forest // *Canadian Journal of Botany*. 1976. Vol. 54. PP. 1094–1103.
16. Risser P.G., Cottam G. Carbohydrate cycles in the bulbs of some spring ephemerals // *Bulletin Torrey Botanical Club*. 1968. Vol. 95. PP. 359–369.
17. Eickmeier W.G., Schussler E.E. Responses of the spring ephemeral *Claytonia virginica* L. to light and nutrient manipulations and implications for the “vernal-dam” hypothesis // *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 1993. Vol. 120. PP. 157–165.
18. Greco D.A., Schamp B.S., Mercer K.A. Canopy effects on abundance and leaf traits of a spring ephemeral: *Erythronium americanum* // *Botany*. 2019. Vol. 97, No. 12. P. 24. doi: [10.1139/cjb-2019-0083](https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0083)
19. Мартыненко В.А., Груздев Б.И. Сосудистые растения Республики Коми. Сыктывкар : Коми НЦ УрО РАН, 2008. 136 с.
20. Красная книга Республики Коми / под ред. С.В. Дёгтевой. Сыктывкар : Коми республиканская типография, 2019. 768 с.
21. Baeten L., De Frenne P., Verheyen K., Graae B.J., Hermy M. Forest herbs in the face of global change: a single-species-multiple-threats approach for *Anemone nemorosa* // *Plant Ecology and Evolution*. 2010. Vol. 143 (1). PP. 19–30.
22. Атлас Коми АССР. М. : Главное управление геодезии и картографии Государственного геологического комитета СССР, 1964. 112 с.
23. World Flora Online. 2019. URL: <http://www.worldfloraonline.org> (дата обращения: 20.10.2019).
24. Ценопопуляции растений: основные понятия и структура / под ред. А.А. Уранова, Т.И. Серебряковой. М. : Наука, 1976. 215 с.
25. Ценопопуляции растений: очерки популяционной биологии / под ред. Т.И. Серебряковой, Т.Г. Соколовой. М. : Наука, 1988. 184 с.
26. Смирнова О.В., Черемушкина В.А. Род Хохлатка – *Corydalis* Medic. // *Биологическая флора Московской области*. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1975. Вып. 2. С. 48–80.
27. Старостенкова М.М. Род Ветреница // *Биологическая флора Московской области*. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1976. Вып. 3. С. 119–129.
28. Барыкина Р.П. Чистяк весенний // *Биологическая флора Московской области*. М. : Изд-во Моск. ун-та, Аргус, 1995. Вып. 10. С. 75–82.
29. Жукова Л.А. Популяционная жизнь луговых растений. Йошкар-Ола : Ланар, 1995. 224 с.
30. Кирсанова О.Ф. Раннецветущие растения в верхнем течении реки Печора // *Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН*. 2015. No. 4 (192). С. 9–14.
31. Куликов П.В., Золотарева Н.В., Подгаевская Е.Н. Эндемичные растения Урала во флоре Свердловской области / под ред. В.А. Мухина. Екатеринбург : Голицкий, 2013. 612 с.

32. Leviceh I.G. Phytogeographical analysis of the genus *Gagea* Salisb. (Liliaceae) // Komarovia. 1999. Vol. 1. PP. 45–57.
33. Левичев И.Г. Структурные особенности побегов *Lloydia*, *Gagea*, *Kharkevichia* (Liliaceae) как эволюционная изменчивость модулей мезомной природы у однодольных // Ботанический журнал. 2013. Т. 98, No. 4. С. 409–452.
34. Лавренко А.Н., Улле З.Г. О новых и редких для Коми АССР видах растений // Ботанический журнал. 1988. Т. 73, No. 2. С. 272–279.
35. Schnittler M., Peterson A., Peterson J., Beisenova S., Bersimbaev R.I., Pfeiffer T. Minor differences with big consequences: reproductive patterns in the genus *Gagea* (Liliaceae) // Flora. 2013. Vol. 208. PP. 591–598. doi: [10.1016/j.flora.2013.09.002](https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.09.002)
36. Ямских И.Е., Чижикова М.И. Состояние ценопопуляций *Anemonoides altaica* С.А. Меу. в южной части Красноярского края // Экология. 2011. No. 4. С. 303–308. doi: [10.1134/S1067413611040205](https://doi.org/10.1134/S1067413611040205)
37. Abrol D.P. Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production. London; New York : Springer Dordrecht Heidelberg, 2012. 792 pp.
38. Muller N., Schneller J.J., Holderegger R. Variation in breeding system among populations of the common woodland herb *Anemone nemorosa* (Ranunculaceae) // Plant Systematics and Evolution. 2000. No. 221. PP. 69–76. doi: [10.1007/BF01086381](https://doi.org/10.1007/BF01086381)
39. Демьянова Е.И. О системах скрещивания у охраняемых растений Среднего Урала // Вестник Пермского университета. Биология. 2015. Вып. 2. С. 91–126.
40. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян / отв. ред. М. Ф. Данилова. Л. : Наука. 1985. 348 с.
41. De Frenne P., Graae B.J., Kolb A., Brunet J., Chabrerie O., Cousins S.A.O., Decocq G., Dhondt R., Diekmann M., Eriksson O., Heinken T., Hermy M., Jogar U., Saquez R., Shevtsova A.G., Stanton S., Zindel R., Zobel M., Verheyen K. Significant effects of temperature on the reproductive output of the forest herb *Anemone nemorosa* L. // Forest Ecology and Management. 2010. Vol. 259. PP. 809–817. doi: [10.1016/j.foreco.2009.04.038](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.04.038)
42. Eriksson O. Seedling recruitment in deciduous forest herbs – the effects of litter, soil chemistry and seed bank // Flora. 1995. Vol. 190. No. 1. PP. 65–70.
43. Verheyen K., Honnay O., Motzkin G., Hermy M., Forster D.R. Response of forest plant species to land-use change: a life-history trait-based approach // Journal of Ecology. 2003. Vol. 91. PP. 563–577. doi: [10.1046/j.1365-2745.2003.00789.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00789.x)
44. Татаринов А.Г. География дневных чешуекрылых европейского Северо-Востока России / отв. ред. М.М. Долгин. М : Товарищество научных изданий КМК, 2016. 255 с.

*Поступила в редакцию 23.06.2019 г.; повторно 26.11.2020 г.;  
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.*

**Авторский коллектив:**

**Тетерюк Людмила Владимировна**, канд. биол. наук, доцент, с.н.с. отдела флоры и растительности Севера, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (Россия, 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9573-7923>

E-mail: [tetryuk@ib.komisc.ru](mailto:tetryuk@ib.komisc.ru)

**Валуйских Ольга Евгеньевна**, канд. биол. наук, н.с. отдела флоры и растительности Севера, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (Россия, 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2359-1731>

E-mail: [valuyskikh@ib.komisc.ru](mailto:valuyskikh@ib.komisc.ru)

**Кирсанова Ольга Федоровна**, н.с., Печоро-Илычский государственный природный заповедник (Россия, 167436, Республика Коми, п. Якша, ул. Ланиной, 8).  
E-mail: okirsanowa@yandex.ru

**For citation:** Teteryuk LV, Valuyskikh OE, Kirsanova OF. Distribution, population status and protection of rare ephemerooids in the Komi Republic. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:89-108. doi: 10.17223/19988591/53/5 In Russian, English Summary

**Lyudmila V. Teteryuk<sup>1</sup>, Olga E. Valuyskikh<sup>1</sup>, Olga F. Kirsanova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Pechoro-Ilychskiy Nature Reserve, Yaksha, Komi Republic, Russian Federation*

### **Distribution, population status and protection of rare ephemerooids in the Komi Republic**

Here, we report the data on modern state and protection prospects of plant species *Anemone altaica* Fisch. ex C.A.Mey., *Anemone nemorosa* L., *Anemone ranunculoides* L., *Ficaria verna* Huds. (Ranunculaceae), *Corydalis solida* (L.) Clairv. (Papaveraceae) and *Gagea samojedorum* Grossh. (Liliaceae) in the taiga zone of the Komi Republic. These ephemerooid species require a special research due to their biological features (short periods of vegetation in the spring and subtle presence in communities at later dates) and geographic localization. One of the species, *Gagea samojedorum* is an endemic of the Urals, other species are presented by populations on the border of their distribution areas. Until recently, studies of early-flowering ephemerooids in the north-east Russia have not been performed. However, such studies become more and more important due to an active industrial development of the North.

To assess the prospects for the conservation of rare early-flowering ephemerooids, we carried out work to clarify the number of locations of species on the territory of the Komi Republic, compiled maps of their distribution (See Fig. 1), collected and summarized information about the area, the number and the structure of 44 coenopopulations (See Tables 1 and 2), as well as identified limiting factors. It is shown that at the edge of the distribution area, ephemerooid species often have fragmented habitat range due to ecological and phytocoenotical preferences. They occur sporadically in the river and stream floodplains (sometimes at limestones) where soils are moist and fertile. In the floodplain meadows and forests, ephemerooids can form one-two species ecotopical assemblages. The populations of ephemerooids are linear, often with a high number of individuals. Self-recovering of short-root *Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides* and root-tuber *Ficaria verna* is made, mainly, by vegetative reproduction. Tuber species *Corydalis solida* is propagated only by seeds. The ontogenetic structure of populations indicates a decline in seed and vegetative reproduction rate in these species at the edges of distribution areas (See Fig. 2 and 3). The Ural endemic *Gagea samojedorum* occurs in herbal habitats and sparse forests in foothill and mountain areas of the Ural Mountains, where it forms abundant populations with the prevalence of young individuals. A high reproduction rate of *Gagea samojedorum* is due to the variability of vegetative reproduction.

In the Komi Republic, the anthropogenic impact on the ephemerooid species is low due to a low level of industrial development and population. Natural abiotic and biotic factors are more significant here and may weaken species positions in plant communities, as well as limit the growth, development and self-recovering of the populations.

By now, *Anemone altaica*, *A. nemorosa*, *A. ranunculoides*, *Corydalis solida*, *Ficaria verna* and *Gagea samojedorum* have been included in regional Red Books of plants with the protection category 3 (rare). The main reasons for their inclusion are the edge location, small number, isolation of the local populations and often relic origin. *Gagea samojedorum* is also an endemic species. The object of the UNESCO World Heritage List “Virgin Komi Forests” and the number of regional reserves are important for the preservation of ephemeroïd plants in the North.

*The paper contains 3 Figures, 2 Tables and 44 References.*

**Keywords:** Red Data Book; Protected Area; protected plants; coenopopulation; European Northeast of Russia.

**Funding:** This work was carried out within the theme “Diversity of the plant world of the Western macro-slope of the Subpolar Urals” (Project No AAAA-A19-119011790022-1).

**Acknowledgments:** The authors are deeply grateful to the staff of the Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences Boris Teteryuk, Nikolay Filippov and Irina Sterlyagova, as well as to the teacher Tat'yana Rybina and pupils of Secondary School No 56 in Synya Village (Komi Republic).

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. Augspurger CK, Salk CF. Constraints of cold and shade on the phenology of spring ephemeral herb species. *J Ecology*. 2016;105:246-254. doi: [10.1111/1365-2745.12651](https://doi.org/10.1111/1365-2745.12651)
2. Safarov NM. Botanical and geographic analysis of the Central Pamir-Alai flora. *Doklady Akademii nauk Respubliki Tadjikistan = Reports of the Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan. Botanika*. 2013;56(8):643-648. In Russian
3. Qiu Y, Liu T, Zhang C, Liu B, Pan B, Wu S, Chen X. Mapping Spring Ephemeral Plants in Northern Xinjiang, China. *Sustainability*. 2018;10:804. doi: [10.3390/su10030804](https://doi.org/10.3390/su10030804)
4. Ardeev VI. Stages of steppe landscapes formation in Euroasia. General aspects of the problem. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2008;2(18): 38-42. In Russian
5. Kleopov YuD. Osnovnye cherty razvitiya flory shirokolistvennykh lesov evropeyskoy chasti SSSR [Main features of the development of broad-leaved forest flora in the European part of the USSR]. In: *Materialy po flore i rastitel'nosti SSSR* [Materials on the history of flora and vegetation of the USSR]. Komarov VL, Il'in MM, Krasheninnikov IM, Lavrenko EM and Maleev VP, editors. Moscow-Leningrad: AN SSSR Publ.; 1941. Vol. 1. pp. 183-256. In Russian
6. Fedorov AN. Istoriya vysokogornoy flory Kavkaza v chetvertichnoe vremya kak primer avtokhtonnoy razvitiya floristicheskoy osnovy [History of the high mountain flora of the Caucasus in the Quaternary as an example of autochthonous development of the tertiary floristic basis]. In: *Materialy po chetvertichnomu periodu SSSR* [Materials for the study of the Quaternary period of the USSR]. Moscow-Leningrad: AN SSSR Publ.; 1952. Vol. 3. pp. 49-86. In Russian
7. Shorina NI, Smirnova OV. The Population Biology of Ephemeroïds. In: *The Population Structure of Vegetation*. White J, editor. Netherlands: Springer Publ.; 1985. pp. 225-240.
8. Li Y, Zhang X-N, Lv G-H. Phylogeography of *Ixiolirion songaricum*, a spring ephemeral species endemic to Northwest China. *Plant Systematics and Evolution*. 2019;305(3):205-221. doi: [10.1007/s00606-018-1563-7](https://doi.org/10.1007/s00606-018-1563-7)
9. Goryshina TK. Rannevesenniy efemeroidy lesostepnykh dubrav (issledovaniya po ekologii, fiziologii i fitosenologii) [Early-spring ephemeroïds in forest-steppe oak forests (studies on the ecology, physiology and phytocenology)]. Leningrad: Leningrad State University Publ.; 1969. 232 p. In Russian

10. Smirnova OV. Struktura travyanogo pokrova shirokolistvennykh lesov [The structure of the herbaceous cover of broad-leaved forests]. Moscow: Nauka Publ.; 1987. 207 p. In Russian
11. Rothstein DE, Zak DR. Photosynthetic adaptation and acclimation to exploit seasonal periods of direct irradiance in three temperate, deciduous-forest herbs. *Functional Ecology*. 2001;15(6):722-731. doi: [10.1046/j.0269-8463.2001.00584.x](https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00584.x)
12. Mamushina NS, Zubkova EK, Bubolo LS, Tyutereva EV. Structural and functional characteristics of ephemeroïds of the Boreal Zone. *Botanicheskii zhurnal*. 2011;96(7):906-917. In Russian
13. Whigham DF. Ecology of woodland herbs in temperate deciduous forests. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 2004;35:583-621. doi: [10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105708](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105708)
14. Sparling JH. Assimilation rates of some woodland herbs in Ontario. *Botanical Gazette*. 1967;128:160-168
15. Taylor RJ, Pearcy RW. Seasonal patterns of the CO<sub>2</sub> exchange characteristics of understory plants from a deciduous forest. *Canadian J Botany*. 1976;54:1094-1103.
16. Risser PG, Cottam G. Carbohydrate cycles in the bulbs of some spring ephemerals. *Bulletin Torrey Botanical Club*. 1968;95:359-369.
17. Eickmeier WG, Schussler EE. Responses of the spring ephemeral *Claytonia virginica* L. to light and nutrient manipulations and implications for the “vernal-dam” hypothesis. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 1993;120:157-165.
18. Greco DA, Schamp BS, Mercer KA. Canopy effects on abundance and leaf traits of a spring ephemeral: *Erythronium americanum*. *Botany*. 2019;97(12):24. doi: [10.1139/cjb-2019-0083](https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0083)
19. Martynenko VA, Gruzdev BI. Sosudistye rasteniya Respubliki Komi [Vascular plants of the Komi Republic]. Syktyvkar: Komi scientific center UrB RAS Publ.; 2008. 136 p. In Russian
20. *Krasnaya kniga Respubliki Komi* [The Red Data Book of the Komi Republic]. Degteva SV, editor. Syktyvkar: Komi Republic Printing House; 2019. 768 p. In Russian
21. Baeten L, De Frenne P, Verheyen K, Graae BJ, Hermy M. Forest herbs in the face of global change: a single-species-multiple-threats approach for *Anemone nemorosa*. *Plant Ecology and Evolution*. 2010;143(1):19-30. doi: [10.5091/plecevo.2010.414](https://doi.org/10.5091/plecevo.2010.414)
22. *Atlas Komi ASSR* [Atlas of the Komi ASSR]. Moscow: Main Department of Geodesy and Cartography of the State Geological Committee of the USSR; 1964. 112 p. In Russian
23. *World Flora Online*, 2019. Available at: <http://www.worldfloraonline.org> (accessed: 20.10.2019).
24. *Tsenopopulyatsii rasteniy: osnovnye ponyatiya i struktura* [Plant coenopopulations: basic concepts and structure]. Uranov AA and Serebryakova TI, editors. Moscow: Nauka Publ.; 1976. 215 p. In Russian
25. *Tsenopopulyatsii rasteniy: ocherki populyatsionnoy biologii* [Plant coenopopulations: essays on population biology]. Uranov AA and Serebryakova TI, editors. Moscow: Nauka Publ.; 1988. 184 p. In Russian.
26. Smirnova OV, Cheremushkina VA. Rod Khokhlatka [Genus *Corydalis*]. In: *Biologicheskaya flora Moskovskoy oblasti* [Biological flora of the Moscow region]. Rabotnov VA, editor. Moscow: Moscow State Univ. Publ.; 1975. Vol. 2. pp. 48-80. In Russian
27. Starostenkova MM. Rod Vetrenitsa [Genus *Anemone*]. In: *Biologicheskaya flora Moskovskoy oblasti* [Biological flora of the Moscow region]. Rabotnov VA, editor. Moscow: Moscow State Univ. Publ.; 1976. Vol. 3. pp. 119-129. In Russian
28. Barykina RP. Chistyak vesenniy [Ficaria verna]. In: *Biologicheskaya flora Moskovskoy oblasti* [Biological flora of the Moscow region]. Pavlov VN and Tikhomirov VN, editors. Moscow: Moscow State Univ. Publ. and Argus Publ.; 1995. Vol. 10. pp. 75-82. In Russian

29. Zhukova LA. Populyatsionnaya zhizn' lugovykh rasteniy [Population life of meadow plants]. Yoshkar-Ola: Lanar Publ.; 1995. 224 p. In Russian
30. Kirsanova OF. Early-flowering plants at upstream of the river Pechora. *Vestnik Instituta Biologii Komi Scientific Center UrB RAS*. 2015;4(192):9-14. In Russian
31. Kulikov PV, Zolotareva NV, Podgaevskaya EN. Endemichnye rasteniya Urala vo flore Sverdlovskoy oblasti [Endemic plants in the flora of Sverdlovsk region]. Mukhin VA, editor. Yekaterinburg: Goshchitskiy Publ.; 2013. 612 p. In Russian
32. Levichev IG. Phytogeographical analysis of the genus *Gagea* Salisb. (Liliaceae). *Komarovia*. 1999;1:45-57
33. Levichev IG. Structural features of shoot in *Lloydia*, *Gagea*, *Kharkevichia* (Liliaceae) as evolutionary variability of the modules of mesome nature in Monocotyledonis. *Botanicheskii zhurnal*. 2013;98(4):409-452. In Russian, English Summary
34. Lavrenko AN, Ulle ZG. O novykh i redkikh dlya Komi ASSR vidakh rasteniy [On new and rare plant species for the Komi ASSR]. *Botanicheskii zhurnal*. 1988;73(2):272-279. In Russian
35. Schnittler M, Peterson A, Peterson J, Beisenova S, Bersimbaev RI, Pfeiffer T. Minor differences with big consequences: reproductive patterns in the genus *Gagea* (Liliaceae). *Flora*. 2013;208:591-598. doi: [10.1016/j.flora.2013.09.002](https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.09.002)
36. Yamskikh IE, Chizhikova MI. The state of *Anemonoides altaica* C.A. Mey cenopopulations in the Southern Krasnoyarsk region. *Russ J Ecology*. 2011;42(4):333-338. doi: [10.1134/S1067413611040205](https://doi.org/10.1134/S1067413611040205)
37. Abrol DP. Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production. London–New-York: Springer Dordrecht Heidelberg; 2012. 792 p.
38. Muller N, Schneller JJ, Holderegger R. Variation in breeding system among populations of the common woodland herb *Anemone nemorosa* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 2000;221:69-76. doi: [10.1007/BF01086381](https://doi.org/10.1007/BF01086381)
39. Dem'yanova EI. About crossing systems of protected plants of the Middle Urals. *Bulletin of Perm University. Biology*. 2015;2:91-126. In Russian, English Summary
40. Nikolaeva MG, Razumova MV, Gladkova VN. Spravochnik po prorashchivaniyu pokoyashchikhsya semyan [Handbook of dormant seed germination]. Danilova MF, editor. Leningrad: Nauka Publ.; 1985. 348 p. In Russian
41. De Frenne P, Graae BJ, Kolb A, Brunet J, Chabrierie O, Cousins SAO, Decocq G, Dhondt R, Diekmann M, Eriksson O, Heinken T, Hermy M, Jogar U, Saquez R, Shevtsova AG, Stanton S, Zindel R, Zobel M, Verheyen K. Significant effects of temperature on the reproductive output of the forest herb *Anemone nemorosa* L. *Forest Ecology and Management*. 2010;259:809-817. doi: [10.1016/j.foreco.2009.04.038](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.04.038)
42. Eriksson O. Seedling recruitment in deciduous forest herbs – the effects of litter, soil chemistry and seed bank. *Flora*. 1995;190:65-70.
43. Verheyen K, Honnay O, Motzkin G, Hermy M, Forster DR. Response of forest plant species to land-use change: a life-history trait-based approach. *J Ecology*. 2003;91:563-577. doi: [10.1046/j.1365-2745.2003.00789.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00789.x)
44. Tatarinov AG. Geografiya dnevnykh cheshuekrylykh evropeyskogo Severo-Vostoka Rossii [Geography of diurnal Lepidoptera of the European North-East of Russia]. Dolgin MM, editor. Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 2016. 255 p. In Russian

*Received 23 June, 2020; Revised 26 November, 2020;  
Accepted 21 February, 2021; Published 31 March, 2021.*

**Author info:**

**Teteryuk Lyudmila V**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Senior Researcher, Department of Flora and Vegetation of the North, Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of the

Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9573-7923>

E-mail: [tetryuk@ib.komisc.ru](mailto:tetryuk@ib.komisc.ru)

**Valuyskikh Olga E**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Department of Flora and Vegetation of the North, Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2359-1731>

E-mail: [valuyskikh@ib.komisc.ru](mailto:valuyskikh@ib.komisc.ru)

**Kirsanova Olga F**, Researcher, Pechoro-Ilychskiy Nature Reserve, 8 Laninoy Str., Yaksha, Komi Republic 169436, Russian Federation.

E-mail: [okirsanova@yandex.ru](mailto:okirsanova@yandex.ru)

## ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 502.753:502.2.05  
doi: 10.17223/19988591/53/6

**А.В. Сорокань, Г.Ф. Бурханова, В.Ю. Алексеев, И.В. Максимов**

*Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение  
Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Россия*

### **Влияние совместной обработки эндофитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**

Работа выполнена в рамках проекта РНФ «Физиологические основы формирования симбиотических взаимоотношений растений картофеля с эндофитными бактериями рода *Bacillus*», No. 20-76-00003.

*Изучено совместное влияние эндофитного штамма бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислоты (SA) на устойчивость растений картофеля к возбудителю фитофтороза оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Впервые показано увеличение численности эндофитных бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 во внутренних тканях растений под действием салициловой кислоты (SA). При этом выявлено более чем двукратное сокращение площади поражения фитофторозом на листьях картофеля при совместном действии SA и бактериального штамма, чего мы не наблюдали в случае действия только бактерий *B. thuringiensis* B-5351. Увеличение устойчивости растений в этом случае сопровождалось активацией ингибитора трипсина, накоплением перекиси водорода и транскриптов генов, кодирующих ингибиторы протеиназ (PR6), маркер развития салицилат-зависимых реакций PR1, фенилаланин-аммоний-лиазу, участвующую в биосинтезе SA. Обработка растений только бактериями *B. thuringiensis* B-5351 не способствовала развитию описанных реакций. Таким образом, в растениях картофеля обнаружена синергически развивающаяся защитная реакция против фитофтороза с участием бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и SA в условиях их совместного применения, где бактериальный штамм праймирует защитные гены, а SA характеризуется свойствами триггера их экспрессии.*

**Ключевые слова:** фитофтороз; PR-белки; ингибиторы протеиназ; перекись водорода.

**Сокращения:** PAL – Фенилаланин-аммоний-лиаза [Phenylalanine ammonia-lyase]; SA – салициловая кислота [Salicylic acid]; ISR – индуцируемая системная устойчивость [Induced systemic resistance]; PGPM – стимулирующие рост растений микроорганизмы [Plant growth-promoting microorganisms]; АФК – активные формы

кислорода [Reactive oxygen species, ROS]; TIU – активность ингибитора, выраженная в ингибиторных единицах [Trypsin inhibition units].

**Для цитирования:** Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В. Влияние совместной обработки эндофитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 109–130. doi: 10.17223/19988591/53/6

## Введение

Необходимость разработки средств защиты растений от патогенов и вредителей, альтернативных экологически небезопасным химическим пестицидам, очевидна. В отличие от химических соединений, биопрепараты на основе живых бактериальных культур при введении в агроэкосистемы приходят во взаимодействие как с вредителями, так и с растениями-хозяевами, становясь частью растительного микробиома. В настоящее время большое внимание уделяется возможности регуляции состава и свойств растительного микробиома, в том числе для его обогащения стимулирующими рост растений микроорганизмами (PGPM) в составе биопрепаратов с целью увеличения устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды [1, 2].

Настоящую революцию в исследовании растительно-микробных взаимодействий произвело открытие эндофитных микроорганизмов (непатогенных грибов и бактерий), колонизирующих внутренние ткани растений [3]. Действие эндофитных бактерий, которых можно отнести к факультативным мутуалистам растений, может основываться не только на антибиотическом действии их метаболитов, но и на стимуляции защитных механизмов растений [2]. Бактериальные эндофиты рассматривают в качестве альтернативных химическим средствам защиты и перспективных агентов биоконтроля комплекса вредных организмов [3,4]. Возможно предположить, что эндофитные штаммы бактерий будут лишены ряда недостатков известных коммерческих штаммов, в том числе требовательности к условиям окружающей среды, таким как температура и смывание атмосферными осадками [1]. В этом случае можно подобрать такую форму микроорганизма, который, вероятно, будет обладать целым спектром возможностей по защите растений и обеспечит интегрированную комплексную защиту от патогенов и вредителей. По нашему мнению, ответ на этот вопрос представляет как теоретическую, так и практическую значимость. Например, бактерии *Bacillus thuringiensis* преобладают на рынке биопестицидов, но используется только их инсектицидный потенциал [1–3]. К сожалению, механизмы регуляции защитных реакций от патогенов и вредителей в растениях, инокулированных эндофитами, в том числе и бактериями *B. thuringiensis*, пока не ясны.

Литературные данные о штаммах бактерий рода *Bacillus*, в том числе и *B. thuringiensis*, способных индуцировать системную устойчивость растений к патогенам, а также обладающих фунгицидным, бактерицидным и

даже антивирусным эффектом, обобщены в обзоре [1]. В работе А. Тао с соавт. [4] показано, что выделенные из листьев пшеницы эндофитные штаммы бактерий *B. thuringiensis* 58-2-1, 37-1 и YC-1 подавляли развитие гриба *Urocystis agropyri*, вызывающего стеблевую головню. Интересно, что устойчивость растений томата против гриба *Ralstonia solanacearum* (возбудитель бактериального вилта), которую наблюдали исследователи под действием *B. thuringiensis*, зависела от салициловой кислоты (SA) [5]. Ранее мы показали, что штамм бактерии *B. thuringiensis* B-5351, продуцирующий CryIIa инсектотоксин, обладал слабой (по сравнению со штаммом бактерий *B. subtilis* 26Д) антибиотической активностью против оомицета *P. infestans* [6] *in vitro*. Кроме того, мы наблюдали увеличение транскрипционной активности SA-зависимого гена PR1 после инфицирования возбудителем фитофтороза в обработанных суспензией клеток бактерий *B. thuringiensis* B-5351 растениях картофеля [6], что также способствует развитию защитных реакций от патогена. В связи с этим встает вопрос о возможности регулирования защитной активности штамма бактерий *B. thuringiensis* B-5351 с использованием сигнальных молекул, таких как, например, SA.

Роль SA в развитии защитных реакций растений против патогенов связана с регуляцией активности ряда ферментов фенилпропаноидного биосинтеза, например фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL, КФ 4.3.1.5), и про-/антиоксидантной системы, например НАДФ-оксидазы и пероксидазы, а также связанной с ними генерации / утилизации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, перекиси водорода [7] и лигнификации пораженных тканей [8]. Значительная роль в защитных системах растений принадлежит ингибиторам гидролаз микроорганизмов, например трипсиноподобных экзопротеиназ оомицета *P. infestans* [9].

Цель данной работы – исследование совместного влияния салициловой кислоты и эндофитного штамма бактерий *B. thuringiensis* B-5351 на физиолого-биохимические изменения в растениях картофеля, связанные с формированием их устойчивости к возбудителю фитофтороза оомицета *P. infestans*.

### Материалы и методики исследования

В работе использованы 20-суточные пробирочные стерильные (без видимых признаков развития бактерий на среде культивирования, отсутствие вирусов протестировано методами ИФА и ПЦР) растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя роза, культивируемые на агаризованной среде Мурасиге–Скуга при 16-часовой освещенности 8 000–10 000 лк (лампы L 36W/77, «Osram» (Германия)), в климатокамере с установленными дополнительными лампами КС200 («Смоленский СКТБ СПУ», Россия). Дневная температура – 22 °С, ночная – 20 °С. Влажность воздуха в пробирках для культивирования растений (при закрытой пробке) – 95–100 % (термометригмометр комнатно-уличный DC-103 («Digital», Китай)). Все процедуры со

стерильными объектами проведены в ламинар-боксе II класса защиты Бокс БАВп-01 «Ламинар-С»-1,5 («Lamsystems», Россия).

Исследуемый штамм бактерий *B. thuringiensis* В-5351 хранится в коллекции Лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН (г. Уфа, Россия). Суспензию бактерий для инокуляции растений получали путем внесения в воду (или раствор SA) бактериальной массы микробиологической петлей непосредственно перед нанесением на растения. Титр бактерий устанавливали спектрофотометрически (с использованием калибровочной кривой). Плазмолитиз бактериальных клеток в воде отсутствовал, что является необходимым условием при разработке биопрепаратов [4] (для исключения внесения солей в почву).

Использованный для инфицирования растений картофеля изолят возбудителя фитофтороза оомицета *P. infestans* ИСМ выделен из пораженных фитофторозом клубней картофеля сорта Удача (Башкортостан, Бирский район, с. Старобурново, 55°26'06.0 N 55°36'22.9 E) в 2018 г. Клубни с видимыми симптомами фитофтороза поверхностно стерилизовали 3%-ным раствором гипохлорита натрия (средство «Белизна») (15 мин), затем, после двукратного промывания стерильной водой, обрабатывали 15%-ным раствором перекиси водорода (10 мин). Высечки из клубней помещали в стерильные чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и выдерживали в термостате при температуре 18 °С до появления мицелия (1–2 суток). Затем мицелий переносили в чашки Петри на КГА. Идентификацию патогена проводили по морфологическим признакам мицелия, зооспорангиев и зооспор (Biozero BZ-X700, «Keuence», Japan) а также по способности вызывать симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля после инокуляции. Хранение патогена в лабораторных условиях на КГА. Для восстановления агрессивности изолята участки мицелия в асептических условиях переносили на вырезанные из средней части клубней картофеля (сорт Ранняя Роза) бруски, которые помещали в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой. Часть тканей из пораженных участков клубня через 7–10 дней после инокуляции переносили на КГА. Через 7 суток после помещения на КГА поверхность мицелия в чашках Петри заливали стерильной водой, после чего инкубировали при 4 °С в течение 30 мин для выхода спор; титр спор подсчитывали в камере Фукса-Розенталя.

Растения картофеля на 20-е сутки после посадки на свежую среду инокулировали суспензией клеток *B. thuringiensis* В-5351 ( $10^8$  клеток/мл) в дистиллированной воде, либо в 1 мМ растворе SA путем нанесения 5 мкл суспензии на 4 верхних листа (20 мкл/растение). Контрольные растения обрабатывали дистиллированной водой; часть растений (дополнительный контроль) обрабатывали 1 мМ раствором SA в том же объеме. Через 7 суток после инокуляции бактериями часть экспериментальных растений картофеля инфицировали (непосредственно в пробирках), нанося на каждый лист по 5 мкл суспензии зооспор оомицета *P. infestans* ( $10^5$  спор/мл) при помощи пипетки с удлиненным носиком.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в тканях растений определяли через 7 дней после инокуляции растений *B. thuringiensis* B-5351 (либо обработки водой и SA) [6, 10]. Для этого навески по 100 мг экспериментальных растений (из верхушечной части 3 разных растений) поверхностно стерилизовали по следующей схеме: 70% этанол – 1 мин; 0,1%-ный диоксид – 3 мин; дистиллированная вода. Навески растений гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Гомогенат разбавляли в 10 и в 100 раз. Аликвоты гомогената после разбавления (100 мкл) распределяли по поверхности картофельно-глюкозного агара (КГА) микробиологической петлей до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28 °С в термостате ТС–1/20 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ производили во втором и третьем разведении, и их количество пересчитывали на 1 г сырой массы растений [11]. Чашки Петри, в которых мы наблюдали колонии, отличные по морфологии от колоний исследуемого штамма, не учитывали. Во всех вариантах производился подсчет КОЕ не менее чем в 20 чашках Петри.

Экстракция высокомолекулярной бактериальной ДНК из растений картофеля проведена с помощью 1%-ного лизирующего раствора (1 % тритона X100, 1 % твина-20, 1 % Chelex 100). Для подтверждения идентичности полученных реинокулятов исходному штамму применяли метод RAPD-анализа [11], используя праймер Lmbd8 5'-GGGCGCTG-3'.

Видимые симптомы фитофтороза наблюдали в течение 12 суток после инфицирования изолированных листьев, помещенных во влажные камеры с ватой, смоченной 0,04%-ным раствором бензимидазола. Степень развития симптомов оценивали по величине площади поражения (%) листовой пластинки. Для определения площади фотографии листьев анализировали в программе ImageJ («RSB», США) [6].

Для анализа активности ингибиторов протеиназ растений и содержания перекиси водорода пробирочные растения (листья со стеблем) гомогенизировали в 0,025 М фосфатном буфере (ФБ), pH 6,2, в соотношении 1 : 5 через 6, 24 и 48 ч после инфицирования *P. infestans*. Полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 10 000 g на центрифуге («Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для определения активности ингибитора протеиназ. К 25 μл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 8,2, добавляли 50 μл растительного экстракта, полученного вышеописанным методом, 25 μл трипсина (1 мг/мл), а затем 50 μл (1 мг/мл) раствора п-нитроанилид-N,α-бензоил-DL-аргинина (БАПНА) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали 25 μл 30%-ной уксусной кислоты. В качестве контроля использовали смесь, состоящую из всех описанных компонентов, но уксусную кислоту добавляли в лунки планшет перед их внесением. Оптическую плотность полученных растворов определяли на планшетном спектрофотометре EnSpire® («PerkinElmer», США) при 405 нм.

Активность ингибитора выражали в ингибиторных единицах (ТИУ). В стандартных условиях за 1 ед. ингибиторной активности принимали такое его количество, которое необходимо для подавления 1 ед. активности трипсина на 100 %.

Содержание пероксида водорода оценивали спектрофотометрически (EnSpire<sup>®</sup>; «PerkinElmer» (США) [12]. Реагент содержал 0,074 % соли Мора в 5,81%-ной серной кислоте и 0,009 % ксиленолового оранжевого в 1,82%-ном сорбите (в соотношении 1:100). К 250 мкл реагента добавляли 25 мкл супернатанта, полученного так, как описано выше. Реакционную смесь инкубировали в течение 45 мин в термостате при 30 °С, затем центрифугировали 10 мин при 10 000 g и переносили 200 мкл супернатанта в лунки плоскодонных планшетов. Измеряли оптическую плотность реакционной смеси на планшетном спектрофотометре EnSpire<sup>®</sup> («PerkinElmer», США) при 560 нм.

Экстракция тотальной РНК из растений проведена через 24 ч после инфицирования растений картофеля спорами возбудителя фитофтороза с использованием тризола, согласно протоколу фирмы-поставщика («Sigma», Германия), из листьев и стеблей растений картофеля, зафиксированных в жидком азоте. Содержание нуклеиновых кислот установлено по A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus «Bio-Rad» (США), предварительно растворив образцы в трис-ЭДТА буфере.

Таблица 1 [Table 1]

**Праймеры, использованные для исследования транскрипционной активности генов растений картофеля**  
[Primers used to study the transcriptional activity of potato plant genes]

Продукт гена [Gene product]	Номер гена в NCBI [NCBI access number]	Последовательность праймера [Primer sequence]	Эффективность праймеров [Primer efficacy], %
Ингибитор трипсина [Tripsin inhibitor, PR6]	AY089962	St_PR6_F 5'-gct-gag-gat-tgg-tga-gag-gta-3' St_PR6_R 5'-cca-cat-cac-cat-aat-cca-act-3'	99,46
Основной антимикробный белок [Basic antimicrobial protein, PR1]	AY050221	St_PR1_F 5'-tgg-gtg-gtg-gtt-cat-ttc-ttg-t-3' St_PR1_R 5'-cat-tta-att-cct-tac-aca-tca-taa-g-3'	102,05
PAL	X63104	St_PAL_F 5'-gct-gat-tct-ttg-aga-ggg-agt-aa-3' St_PAL_R 5'-gca-act-tgt-gca-aca-gtc-aa-3'	105,67
Актин [Actin]	X55749	St-act_F 5'-gat-ggt-gtc-agc-cac-ac-3' St act R 5'-att-cca-gca-gct-tcc-att-cc-3'	101,1

Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проведена реакция обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика «Синтол» (Россия). Анализ экспрессии генов PR-белков проведен методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX Connect Real-Time PCR Detection System «Bio-Rad» (США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Синтол», Россия). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка числа копий мРНК для каждого гена) определены относительно референсного гена актина с помощью программного обеспечения CFX Connect Real-Time System («Bio-Rad», (США)). Используемые в работе нуклеотидные последовательности приведены в табл. 1.

Все опыты проведены в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях. При обработке результатов использована программа StatSoft STATISTICA 12.0. Статистическая значимость различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. В таблицах и на рисунках представлены данные в виде средней по повторностям и их стандартные отклонения ( $M \pm SD$ ).

### Результаты исследования

На 7-е сутки после инокуляции стерильных пробирочных растений картофеля суспензией клеток бактерий исследуемого штамма в растительных тканях присутствовало до  $7,3 \pm 1,6 \times 10^5$  КОЕ *B. thuringiensis* B-5351 /г сырой массы побегов (табл. 2). В этих же условиях при совместной обработке суспензией бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и СА мы обнаружили  $2,3 \pm 1,5 \times 10^6$  КОЕ *B. thuringiensis* B-5351/г сырой массы побегов. В контрольных растениях, обработанных водой или СА, мы не обнаружили жизнеспособных бактерий. RAPD-анализ полученных после реинокуляции бактерий показал их полную идентичность с исходным штаммом бактерий *B. thuringiensis* B-5351 (рис. 1).

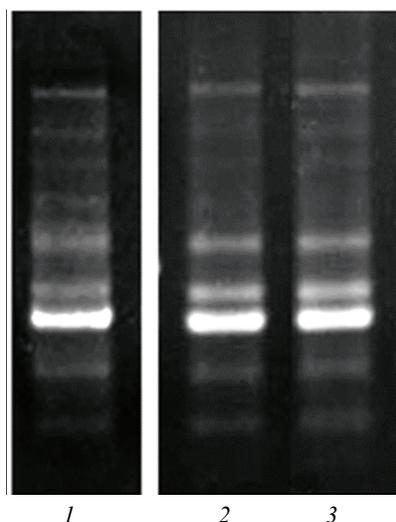
Таблица 2 [Table 2]

**Количество эндофитных клеток *Bacillus thuringiensis* B-5351 через 7 суток после обработки растений индивидуально или совместно с салициловой кислотой (СА)**

[The number of endophytic cells of *Bacillus thuringiensis* B-5351 on the 7<sup>th</sup> day after the treatment of plants individually or in combination with salicylic acid (SA)],  $M \pm SD$

Количество КОЕ/г сырой массы [Number of CFU/g of wet mass]	Контроль [Control]*		<i>Bacillus thuringiensis</i> B-5351	
	H <sub>2</sub> O	SA	H <sub>2</sub> O	SA
	0	0	$7,3 \pm 1,6 \times 10^5$	$2,3 \pm 1,5 \times 10^6$

*Примечание.* \* Не инокулированные *Bacillus thuringiensis* B-5351 растения картофеля.  
[Note. \* Non-inoculated with *Bacillus thuringiensis* B-5351 potato plants].

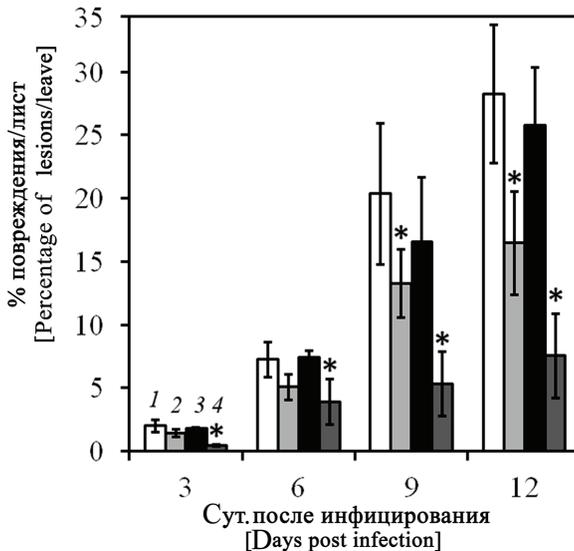


**Рис. 1.** Фотография полиакриламидного геля после RAPD-анализа бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 (1) и бактерий, выделенных из растений картофеля, инокулированных *B. thuringiensis* B-5351 в отдельности (2) и *B. thuringiensis* B-5351 в сочетании с салициловой кислотой (3)

**[Fig. 1.** Photo of polyacrylamide gel after RAPD analysis of bacteria *Bacillus thuringiensis* B-5351 (1) and bacteria, isolated from potato plants, treated with *B. thuringiensis* B-5351 individually (2), and with *B. thuringiensis* B-5351 in combination with SA (3)

На рис. 2 видно, что на листьях контрольных растений и растений, обработанных суспензией клеток штамма *B. thuringiensis* B-5351, развитие симптомов фитофтороза происходило наиболее активно. На 12-е сутки после инфицирования *P. infestans* мы наблюдали в среднем 30%-ное поражение листьев растений в этих вариантах. SA при индивидуальном применении снизила интенсивность проявления симптомов на 9-е и 12-е сутки после инфицирования. Под действием бактерий *B. thuringiensis* B-5351 совместно с SA мы наблюдали меньшую площадь распространения симптомов фитофтороза на листьях, чем в остальных вариантах, уже на 3-и сутки после инфицирования. Через 12 суток после инфицирования *P. infestans* интенсивность проявления симптомов в 4 раза ниже относительно обработанных водой растений, что говорит об эффективности индуцированных иммунных реакций растений в этом случае.

Из рис. 3, А видно, что применение SA и бактерии *B. thuringiensis* B-5351 не оказали статистически значимого влияния на активность ингибиторов протеиназ в здоровых растениях ( $p > 0,05$ ). Инфицирование обработанных водой растений вызвало снижение активности ингибиторов трипсина уже через 6 ч после нанесения суспензии спор патогена. В таких растениях мы наблюдали увеличение ингибиторной активности только через 24 ч после контакта с возбудителем фитофтороза.



**Рис. 2.** Повреждение листьев картофеля фитофторозом в различных вариантах эксперимента: 1 – вода; 2 – салициловая кислота; 3 – *Bacillus thuringiensis* B-5351; 4 – *B. thuringiensis* B-5351 + салициловая кислота.

\* – Статистически значимые отличия от контрольного варианта (обработка водой) в соответствующей временной точке ( $p < 0,05$ )

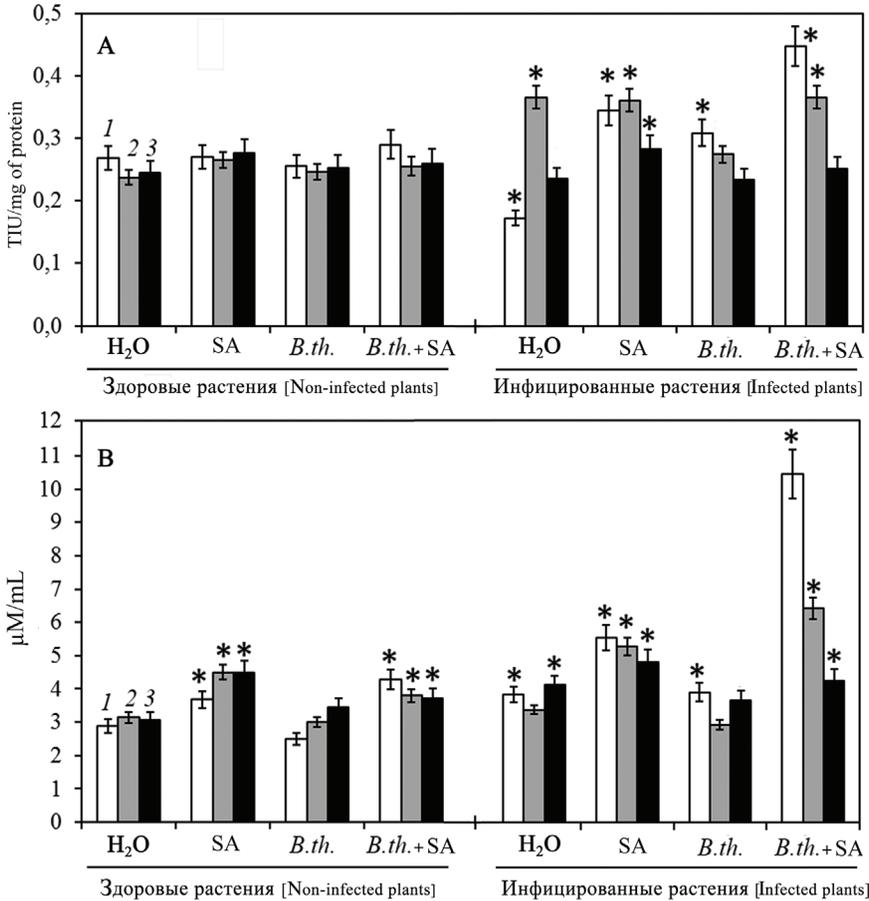
[Fig. 2. Development of late blight (% of leaves with visible symptoms) on potato plants under the influence of *B. thuringiensis* B-5351 and salicylic acid. 1 – control (water);

2 - Salicylic acid; 3 - *Bacillus thuringiensis* B-5351; 4 - *B. thuringiensis* B-5351 with Salicylic acid] [Note: \* Statistically significant differences from water-treated plants at the same time point ( $p < 0.05$ )]

Под воздействием SA высокая активность ингибитора трипсина сохранялась и на 6, и на 24 ч после инфицирования. Если обработка бактериальными клетками штамма *B. thuringiensis* B-5351 увеличила активность ингибиторов протеиназ в растениях картофеля только через 6 ч после инфицирования патогеном, то в растениях, обработанных совместно клетками бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и SA, происходило почти двукратное увеличение активности ингибиторов протеиназ через 6 и 24 ч после инфицирования оомицетом *P. infestans* (рис. 3, А).

В обработанных SA (как в отдельности, так и в сочетании с *B. thuringiensis* B-5351) неинфицированных растениях содержание перекиси водорода превосходило показатели в обработанных водой растениях. Инфицирование возбудителем фитофтороза обработанных водой растений картофеля приводило к увеличению содержания  $H_2O_2$  на 25%, по сравнению с контролем на 6 и 48 ч после нанесения спор патогена (рис. 3, В). Аналогичные результаты мы наблюдали после инфицирования растений, инокулированных клетками *B. thuringiensis* B-5351, но не обработанных SA. Под действием SA в инфицированных растениях содержание перекиси превышало контрольные показатели более чем на 40%. В обработанных суспензией бакте-

рий *B. thuringiensis* B-5351 и SA растениях присутствие патогена вызывало резкое кратковременное накопление  $H_2O_2$  через 6 ч после инфицирования. Последнее соответствует данным о том, что ранняя генерация АФК, приводящая к реакции сверхчувствительности, – определяющий фактор в формировании устойчивости растений картофеля к оомицету *P. infestans* [13].

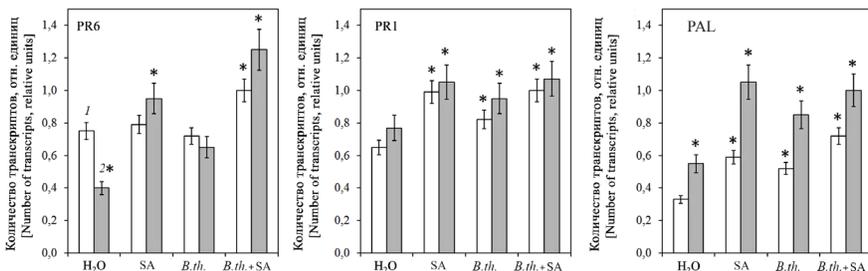


**Рис. 3.** Влияние салициловой кислоты (SA) и бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) на активность ингибиторов трипсина (А) и содержание перекиси водорода (В) в здоровых и инфицированных возбудителем фитофтороза оомицетом *Phytophthora infestans* растениях картофеля. 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования патогеном.  
\* – Статистически значимые отличия от показателей, наблюдаемых в обработанных водой неинфицированных растениях

в соответствующей временной точке ( $p < 0,05$ )

**[Fig. 3.** Influence of Salicylic acid (SA) and bacteria *Bacillus thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) on the activity of trypsin inhibitors (A) and hydrogen peroxide content (B) in non-infected and infected with *Phytophthora infestans* potato plants. 1 - 6 hours, 2 - 24 hours, 3 - 48 hours after inoculation with pathogen spores. [Note: \* - Statistically significant differences from the means observed in water-treated, non-infected plants at the same time point ( $p < 0.05$ )]

Анализ транскрипции гена *PR6*, кодирующего ингибиторы трипсина, показал, что в неинфицированных растениях, обработанных водой, SA и бактериями *B. thuringiensis* B-5351 в отдельности, мы не наблюдали значительных изменений в накоплении транскриптов этого гена (рис. 4). В варианте с совместной обработкой SA и бактериями *B. thuringiensis* B-5351 неинфицированных растений этот показатель превышал контрольный на 25%, так же как инфицирование растений, обработанных SA. Обработка растений SA совместно с бактериями *B. thuringiensis* B-5351 увеличивала количество транскриптов гена *PR6* более чем на 50% относительно обработанных водой неинфицированных растений. Инфицирование обработанных водой растений не влияло на транскрипционную активность гена *PR1*. Интересно, что обработки растений SA, бактериями *B. thuringiensis* B-5351 или суспензией SA + *B. thuringiensis* B-5351 индуцировали более чем 40% накопление мРНК этого гена как в здоровых, так и в инфицированных растениях. При инфицировании в растениях, обработанных водой, более чем на 30% увеличилось содержание транскриптов гена, кодирующего PAL, относительно показателей, наблюдаемых в обработанных водой неинфицированных растениях. Следует отметить, что под воздействием SA и бактерий *B. thuringiensis* B-5351 транскрипционная активность этого гена в здоровых растениях соответствовала уровню инфицированных контрольных растений.



**Рис. 4.** Влияние салициловой кислоты (SA) и бактерий *B. thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) на относительное количество транскриптов генов, кодирующих PR6 (ингибитор трипсина), PR1 (основной защитный белок) и PAL (фенилаланин-аммоний-лиаза) в здоровых (1) и инфицированных возбудителем фитофтороза (2) растениях картофеля (24 ч после нанесения спор патогена). Транскрипционная активность каждого исследуемого гена нормализована относительно референсного гена актина картофеля.

\* – Статистически значимые отличия от показателей, наблюдаемых в обработанных водой неинфицированных растениях ( $p < 0,05$ )

**[Fig. 4.** Influence of salicylic acid (SA) and bacteria *B. thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) on the activity of transcription of genes encoding PR6 (trypsin inhibitor), PR1 (basic protective protein) and PAL (phenylalanine ammonium-lyase) in non-infected (1) and infected with *Phytophthora infestans* (2) potato plants (24 hours after inoculation with pathogen spores).

The expression of each target gene is presented as fold change normalized to the reference gene encoding potato actin. [\* - Statistically significant differences from the means observed in water-treated, non-infected plants at the same time point ( $p < 0.05$ )]

В присутствии патогена мы наблюдали более чем двукратное (относительно этого показателя в обработанных водой неинфицированных растениях) увеличение содержания мРНК гена *PAL* в растениях картофеля как при индивидуальном, так и при совместном применении SA и клеток бактерий *B. thuringiensis* B-5351.

### Обсуждение результатов исследования

В последние десятилетия практическое применение PGPM, в том числе эндофитных, привлекает большое внимание исследователей [1–3]. Однако, очень мало работ объясняющих физиолого-биохимические особенности регуляции взаимоотношений между эндофитными микроорганизмами и растениями-хозяевами. Колонизация внутренних тканей растений бактериями – один из наиболее важных факторов, от которых может зависеть эффективность биологического средства защиты растений, который пока не учитывается их производителями [3]. Вместе с тем известно, что наряду с другими видами микроорганизмов из внутренних тканей растений выделяются штаммы бактерий *B. thuringiensis* [3, 4, 14]. Вегетативные клетки, споры и белковые кристаллы четырех бразильских штаммов бактерий *B. thuringiensis* [15] наблюдали методом электронной сканирующей микроскопии в проростках капусты как вблизи устьиц, через которые бактерии могут проникать в ткани, так и в сосудах ксилемы. В нашей работе показано, что добавление SA к суспензии клеток бактерий *B. thuringiensis* B-5351 перед обработкой растений привело к увеличению числа клеток исследуемого штамма в тканях растений по сравнению с индивидуальной обработкой бактериальным штаммом. Интересно, что описанное нами впервые в этой работе увеличение колонизационной активности клеток *B. thuringiensis* B-5153 при использовании в композиции с SA достигало порядковых значений, характерных для штамма *B. subtilis* 26Д, эффективность которого в укреплении устойчивости растений картофеля к фитофторозу [6] и септориозу [10] мы описали ранее.

Механизм, лежащий в основе увеличения численности бактерий *B. thuringiensis* B-5351 в тканях растений картофеля под действием SA, неизвестен. Но не исключено, что это происходит вследствие подавления жасмонат-зависимых реакций в растениях под влиянием SA [7]. Например, в закрывании устьиц, через которые *B. thuringiensis* могут проникать внутрь растения [15], происходящем посредством активации киназного комплекса CBL1-CIPK5, участвует жасмоновая кислота [16]. В то же время мутанты арабидопсиса *cpr22*, накапливающие большое количество SA, проявляли неспособность закрывать устьица [17]. Известно о снижении колонизационной активности корней риса эндофитными азотфиксирующими бактериями *Azoarcus olearius* BH72 под воздействием жасмоновой кислоты [18], тогда как 100 мкг SA усиливала адгезию клеток в биопленках, формируемых бакте-

рии *Bacillus cereus* [19]. По-видимому, такой регулируемый растениями титр бактериальных клеток в тканях является важным фактором формирования их устойчивости впоследствии. В нашем исследовании совместная обработка растений SA и бактериальной суспензии *B. thuringiensis* B-5351 снизила интенсивность развития симптомов фитофтороза на листьях растений. Подобное совместное высокое защитное действие SA и бактерий *B. subtilis* ранее исследователи обнаружили, например, на растениях огурца, подвергнутых инфицированию возбудителем фузариоза [20].

Отличительная особенность ISR, опосредованной PGPM, – отсутствие прямой активации экспрессии PR-генов и развитие устойчивости по механизму прайминга [21]. СИУ, вызываемая PGPM, эффективна против оомицетов, грибов, бактерий и вирусов и даже насекомых и травоядных животных [1, 3]. Защитные реакции при развитии СИУ, опосредованной PGPM, характеризуются быстрым и ранним накоплением АФК, активирующих редокс-чувствительные транскрипционные факторы и гены PR-белков [21, 22]. Как и ожидалось, обработка SA привела к более раннему и интенсивному накоплению  $H_2O_2$ . В нашем исследовании штамм бактерий *B. thuringiensis* B-5351 индивидуально не оказал влияния на содержание перекиси водорода в инфицированных растениях, хотя ранее показано, что ряд штаммов бактерий *B. thuringiensis* способен индуцировать окислительный взрыв в растениях сурепицы *Brassica campestris* [23]. Весьма неожиданный факт, что совместное действие и SA и клеток бактериального штамма обеспечило более чем двукратное увеличение содержания  $H_2O_2$  на ранних этапах после контакта растительных тканей с патогеном, что, как мы предполагаем, привело к развитию устойчивости растений к фитофторозу.

Одним из основных факторов агрессивности патогенов являются продуцируемые ими гидролазы, обеспечивающие внедрение гриба в ткани, например, за счет разрушения клеточных стенок растений и деградации защитных белков [9]. Ранее показано, что протеолитическая активность в бесклеточном препарате, полученном из суспензии спор оомицета *P. infestans*, коррелирует с развитием некрозов при инъекции в ткани растений картофеля [24]. Цистеиновые протеазы PpCys44 и PpCys45 оомицета *P. parasitica* запускают NPK1-зависимую гибель клеток у различных видов растений табака *Nicotiana* spp. [25]. Ответная защитная реакция растений сопровождается синтезом ингибиторов этих ферментов. Повышение содержания ингибиторов гидролаз в растении происходит, как правило, за счет экспрессии их генов [26]. Снижение интенсивности проявления симптомов фитофтороза на листьях растений картофеля, обработанных SA и бактериальным штаммом, в которых мы обнаружили накопление транскриптов гена *PR6*, как и активность его белкового продукта, говорит о важности ингибиторов протеиназ в защите картофеля от фитофтороза.

Исследователи показали, что обработка растений картофеля бактериями *Bacillus thuringiensis* способствует развитию их устойчивости к возбудите-

лю бурой гнили грибу *Ralstonia solanacearum*, индуцируя транскрипционную активность SA-зависимых генов [5]. Нами также ранее показано, что штамм бактерий *B. thuringiensis* В-5351 увеличил транскрипционную активность гена *PR1* (маркера SA-зависимого пути) при заселении растений пшеницы злаковыми тлями, что сопровождалось снижением жизнеспособности вредителя [10]. В данной работе мы обнаружили, что исследуемый штамм эндофитной бактерии способствует накоплению транскриптов генов, кодирующих белки PR1 и PAL в той же степени, что и SA. С. Zhang с соавт. [27] показали, что трансгенные растения сои с увеличенной экспрессией гена *GmPAL2.1*, кодирующего PAL, более устойчивы к оомицету *P. sojae*, а также содержали высокий уровень SA, чем растения дикого типа. Штамм бактерий *B. thuringiensis* 199 так же способствовал активации фермента PAL в растениях томата при инфицировании грибом *Fusarium oxysporum lycopersici*, вызывающим развитие фузариоза [28]. Обработка растений табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* продуцентами SA – ризосферными бактериями *Pseudomonas tremae* EB-44 и *Curtobacterium herbarum* EB-47, повышала содержание этого гормона в растениях и индуцировало их устойчивость к патогенным бактериям *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [29]. Бактерии *B. amyloliquefaciens* MBI600 стимулировали SA-зависимые реакции (в том числе транскрипционную активность *PR1* гена) в растениях томатов, что снизило их пораженность вирусом картофеля Y [30]. О. Lastochkina с соавт. [31] показали, что совместная обработка клубней картофеля *B. subtilis* 10-4 и SA перед закладкой на хранение увеличила их устойчивость к оомицету *P. infestans* и грибу *F. oxysporum*, снижая патоген-индуцированное накопление пролина и интенсивность перекисного окисления липидов, что способствовало сохранности клубней. Кроме того, *B. subtilis* 10-4 и SA снижала пораженность фузариозом растений пшеницы, что свидетельствует о возможности проявления защитного эффекта подобных композиций на многих культурах [32].

Поскольку в растениях картофеля штамм бактерий *B. thuringiensis* В-5351 совместно с SA индуцирует салицилат-зависимые защитные реакции, можно подумать, что это единственный путь формирования устойчивости. Однако при совместной обработке наблюдается также увеличение транскрипционной активности гена *PR6*, который, согласно литературным данным [33], является жасмонат-зависимым геном. Соответственно, полученные нами данные говорят о возможности параллельного синергического запуска компонентов защитной системы в растениях, регулируемых, с одной стороны, SA, а с другой – эндофитами, например бактериальным штаммом *B. thuringiensis* В-5351. Принимая во внимание инсектицидную активность исследуемого штамма против злаковых тлей *Schizaphis graminum* [10] и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* [5], а также эффективность применения SA против вирусных заболеваний растений [34], возможность увеличения устойчивости растений к фитотрофу путем совместной обра-

ботки бактериями *B. thuringiensis* B-5351 и SA может открыть один из подходов в комплексной защите растений от биотических воздействий.

### Заключение

Проведенные нами работы показали эффективность сформированных на основе живых бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и SA композиций в защите растений картофеля от фитофтороза, который, с одной стороны способствует непосредственному подавлению роста и развития патогенов в тканях растений, а с другой – опосредованному индуцированию ими неспецифического защитного ответа растений. Это заключалось в раннем увеличении содержания перекиси водорода в растениях, увеличении транскрипционной активности генов, кодирующих маркер салицилат-зависимого ответа *PR1*, ген биосинтеза SA (фенилаланин-аммоний-лиаза) и ингибитора трипсина, а также активности белкового продукта последнего. Полученные данные могут быть использованы для разработки биопрепаратов с комплексной активностью против патогенов и насекомых-вредителей.

### Литература

1. Jouzani G.S., Valijanian E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings // Applied microbiology and biotechnology. 2017. No. 101. PP. 2691–2711.
2. Lopes R., Tsui S., Gonçalves P.J.R.O. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants // World journal of microbiology and biotechnology. 2018. No. 34. PP. 94–100.
3. Rana K.L., Kour D., Kaur T. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. No. 113. PP. 1075–1107.
4. Tao A., Panga F., Huang S., Yu G., Li B., Wang T. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut // Biocontrol Science and Technology. 2014. No. 24. PP. 901–924.
5. Takahashi H., Nakaho K., Ishihara T., Ando S., Wada T., Kanayama Y., Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Hyakumachi M. Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum* // Plant cell reports. 2014. No. 33(1). PP. 99–110.
6. Sorokan A.V., Benkovskaya G.V., Burkhanova G.F., Blagova D.K., Maksimov I.V. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS producing CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and pest *Leptinotarsa decemlineata* Say // Plants. 2020. No. 9. PP. 1115–1123.
7. Kamle M., Borah R., Bora H., Jaiswal A.K., Singh R.K., Kumar P. Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens Cham : Springer, 2020. 356 p.
8. Pallas J.A., Paiva N.L., Lamb C., Dixon R. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by *Tobacco mosaic virus* // The plant journal. 1996. No. 10(2). PP. 281–293.
9. Kudriavtseva N.N., Sofin A.V., Revina T.A., Gvozdeva E.L., Ievleva E.V., Valueva T.A. Secretion of proteolytic enzymes by three phytopathogenic microorganisms // Applied biochemistry and microbiology. 2013. No. 49 (5). PP. 513–21.

10. Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Rummyantsev S.D., Alekseev V.Y., Khayrullin R.M. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene *BtcryIIa* encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. // Biological control. 2020. No. 144. PP. 326–338.
11. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. ; под ред. А.И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
12. Bindschedler L.M., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signaling events in apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve camp and Ca<sup>2+</sup> // New phytologist. 2001. No. 151. PP. 185–194.
13. El Komy M.H., Saleh A.A., Ibrahim Y.E., Molan Y.Y. Early production of reactive oxygen species coupled with an efficient antioxidant system play a role in potato resistance to late blight // Plant pathology. 2020. No. 45. PP. 44–55.
14. Mishra P.K., Bisht S.C., Ruwari P., Subbanna A.R.N.S., Bisht J.K., Bhatt J.C., Gupta H.S. Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from the North Western Indian Himalayas // Annual review of microbiology. 2017. No. 67. PP. 143–155.
15. Praca L.B., Gomes A.C.M.M., Cabral G., Martins E.S., Sujji E.H., Monnerat R.G. Endophytic colonization by brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro* // Bt Research. 2012. No. 3. PP. 11–19.
16. Förster S., Schmidt L.K., Kopic E., Anschütz U., Huang S., Schlücking K., Köster P., Waadt R., Larrieu A., Batistić O., Rodriguez P.L., Grill E., Kudla J., Becker D. Wounding-induced stomatal closure requires jasmonate-mediated activation of GORK K<sup>+</sup> channels by a Ca<sup>2+</sup> sensor-kinase CBL1-CIPK5 complex // Developmental cell. 2019. No. 48. PP. 87–99.
17. Mosher S., Moeder W., Nishimura N., Jikumaru Y., Joo S.H., Urquhart W., Klessig D.F., Kim S.K., Nambara E., Yoshioka K. The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner // Plant Physiology. 2010. No. 152. PP. 1901–1913.
18. Chen X., Marszałkowska M., Reinhold-Hurek B. Jasmonic acid, not salicylic acid restricts endophytic root colonization of rice // Frontiers in plant science. 2020. No. 10. PP. 3–15.
19. Lemos M., Borges A., Teodósio J., Araújo P., Mergulhão F., Melo L., Simões M. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms // International Biodeterioration & Biodegradation. 2014. No. 86. PP. 42–51.
20. Yousefi H., Sanebani N., Mirabolfathy M. The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices cucumerinum* // Iranian journal of plant pathology. 2011. No. 4. PP. 85–87.
21. Compant S., Samad A., Faist H., Sessitsch A. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application // Journal of advanced research. 2019. No. 19. PP. 29–37.
22. Wang X., Wang J., Jin P., Zheng Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit // International journal of food microbiology. 2013. No. 164. PP. 141–147.
23. Wang M., Geng L., Sun X., Shu C., Song F., Zhang J. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. // Biological control. 2020. No. 145. PP. 104–115.
24. Paris R., Lamattina L. *Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato // European journal of plant pathology. 1999. No. 105. PP. 753–760.

25. Zhang Q., Li W., Yang J., Xu J., Meng Y., Shan W. Two *Phytophthora parasitica* cysteine protease genes, PpCys44 and PpCys45, trigger cell death in various *Nicotiana* spp. and act as virulence factors // Molecular plant pathology. 2020. No. 21. PP. 541–554.
26. Ревина Т.А., Кладнищкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. Ингибитор химотрипсина и трипсина из клубней картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. No. 7. С. 46–51.
27. Zhang C., Wang X., Zhang F., Dong L., Wu J., Cheng Q., Qi D., Yan X., Jiang L., Fan S., Li N., Li D., Xu P., Zhang S. Phenylalanine ammonia-lyase 2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection // Scientific reports. 2017. No. 7. PP. 1–13.
28. Akram W., Mahbo A., Javed A.A. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt // European journal of microbiology and immunology. 2013. No. 3. PP. 275–280.
29. Islam N., Ali S., Choi S., Park Y., Baek K. Salicylic acid-producing endophytic bacteria increase nicotine accumulation and resistance against wildfire disease in tobacco plants // Microorganisms. 2020. No. 8. PP. 3–18.
30. Beris D., Theologidis I., Skandalis N., Vassilakos N. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and potato virus Y // Science reports. 2018. No. 8. PP. 103–120.
31. Lastochkina O., Baymiev A., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpirnaya I., Pusenkova L., Mardanshin I., Kasnak C., Palamutoglu R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers // Plants. 2020. No. 9. PP. 76–81.
32. Lastochkina O., Garshina D., Allagulova C., Fedorova K., Koryakov I., Vladimirova A. Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and *Fusarium* root rot stresses // Agronomy. 2020. No. 10. PP. 1343–1350.
33. Pauw B., Memelink J. Jasmonate-responsive gene expression // Journal of plant growth regulation. 2004. No. 23. PP. 200–210.
34. Zhang K., Wang Y., Sun W., Han K., Yang M., Si Z., Li G., Qiao Y. Effects of exogenous salicylic acid on the resistance response of wild soybean plants (*Glycine soja*) infected with Soybean mosaic virus // Canadian journal of plant pathology. 2020. No. 42. PP. 84–93.

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.; повторно 17.11.2020 г.;  
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

#### Авторский коллектив:

**Сорокань Антонина Вячеславовна**, канд. биол. наук, н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>

E-mail: [fourtyanns@googlemail.com](mailto:fourtyanns@googlemail.com)

**Бурханова Гузель Фанилевна**, канд. биол. наук, н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2346-3502>

E-mail: [guzel\\_mur@mail.ru](mailto:guzel_mur@mail.ru)

**Алексеев Валентин Юрьевич**, м.н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4441-3360>

E-mail: [valentin-1994@yandex.ru](mailto:valentin-1994@yandex.ru)

**Максимов Игорь Владимирович**, профессор, д-р биол. наук, заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>

E-mail: [igor.mak2011@yandex.ru](mailto:igor.mak2011@yandex.ru)

**For citation:** Sorokan AV, Burkhanova GF, Alekseev VYu, Maksimov IV. The influence of co-treatment with *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:109-130. doi: 10.17223/19988591/53/6 In Russian, English Summary

**Antonina V. Sorokan, Guzel F. Burkhanova, Valentin Yu. Alekseev, Igor V. Maksimov**

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation*

### **The influence of co-treatment with *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**

Biocontrol agents based on strains of microorganisms that participate in mutualistic relationships with host plants, including those based on strains of endophytic bacteria, can be an alternative to chemical pesticides. There are endophytic *B. thuringiensis* strains that produce insect-toxic proteins and induce systemic resistance of plants to pathogens. An important issue is the possibility of regulation of the relationship of endophytic bacterial strains with the host-plant and their ability to induce plant defense reactions against pathogens by signaling molecules, including salicylic acid (SA). The aim of this work was to study the effect of SA and the endophytic bacterial strain *B. thuringiensis* B-5351 on the activity of potato plants reactions associated with signaling and biosynthesis of SA, as well as the activity of a potato trypsin inhibitor upon infection with the late blight pathogen.

We used sterile test tube potato plants (*Solanum tuberosum* L.) of the Early Rose cultivar. 20-days-old potato plants were inoculated with a bacterial suspension of *B. thuringiensis* B-5351 ( $1 \times 10^8$  cells / ml) in distilled water, or in 1  $\mu$ M SA solution by applying 5  $\mu$ l of bacterial suspension to 4 upper leaves (20  $\mu$ l / plant). Control plants were treated with distilled water, and some plants were treated with 1  $\mu$ M SA solution in the same volume. On the 7<sup>th</sup> day after inoculation with *B. thuringiensis* B-5351, the plants were infected with oomycete *P. infestans* spores (5  $\mu$ l of  $1 \times 10^5$  spore/ml suspension per leaf). To assay the damaged area, leaves were photographed; the images were analyzed using the ImageJ software. 24 h after infection with late blight pathogen spores, plants were fixed to assess the transcriptional activity of *PR6*, *PR1* and *PAL* genes (See Table 1) (using CFX Connect Real-Time PCR Detection System Bio-Rad (USA)), and after 6, 24 and 48 h - to analyze the activity of plant proteinase inhibitors and the content of hydrogen peroxide. We estimated the number of colony-forming units (CFU) of microorganisms in plant tissues after their surface sterilization on the 7<sup>th</sup> day after inoculation of plants with *B. thuringiensis* B-5351 bacteria. The significance of the differences between the samples was accessed using Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Tables and Figures show data as the mean of the replicates and their standard

deviations ( $M \pm SD$ ). All experiments were conducted in three-five biological and three analytical replicates.

In this work, we showed that SA presence increased the content of living cells of *B. thuringiensis* B-5351 bacteria in the internal tissues of plants ( $2,3 \pm 1,5 \times 10^6$  CFU/g) as compared to individual treatment with the bacterial strain under investigation ( $7,3 \pm 1,6 \times 10^5$  CFU/g) (See Table 2). Using the method of RAPD analysis, we established the identity of bacteria isolated from internal tissues of potato plants and the initial strain of *B. thuringiensis* B-5351 (See Fig. 1). Apparently, such titer of bacterial population regulated by plant signaling molecules in plant tissues is an important factor in the formation of plant resistance. Thus, we did not observe a decrease in the area of late blight symptoms on the leaves of potato plants treated only with *B. thuringiensis* B-5351, while under the individual action of SA this parameter decreased by half, and upon combined treatment of plants with SA and bacteria *B. thuringiensis* B-5351 - almost 4 times as compared to water-treated plants (See Fig. 2). Treatment with bacteria *B. thuringiensis* B-5351 increased the activity of proteinase inhibitors in potato plants only 6 h after infection with the late blight pathogen; in plants treated with bacteria cells of *B. thuringiensis* B-5351 together with SA, there was an almost a twofold increase in the activity of proteinase inhibitors after 6 and 24 h after infection with oomycete *P. infestans*. Under the influence of SA, a 15-20% increase in the content of  $H_2O_2$  in intact plants was observed in all variants. In infected plants treated with SA, the  $H_2O_2$  content exceeded the control values by more than 40%. In plants treated with a suspension of bacteria *B. thuringiensis* B-5351 and SA plants, the presence of the late blight pathogen caused a threefold increase in the  $H_2O_2$  content 6 h after infection (See Fig. 3). In the variant with combined treatment with SA and bacteria *B. thuringiensis* B-5351 of non-infected plants, the content of PR6 gene transcripts exceeded the control level by 25%, as in infected plants treated with SA. Treatment of plants with SA together with bacteria *B. thuringiensis* B-5351 increased the number of PR6 gene transcripts by more than 50% relative to water-treated non-infected plants (See Fig. 4). In this work, we found that the strain of endophytic bacteria under investigation promoted the accumulation of transcripts of genes encoding PR1 and PAL proteins to the same extent as SA, both individually and when used together. In the presence of the late blight pathogen, more than a twofold (relative to this level in water-treated intact plants) increase in the content of PAL gene mRNA in potato plants was observed in cases of both individual and combined application of SA and *B. thuringiensis* B-5351 cells. Thus, treatment with *B. thuringiensis* B-5351 bacteria together with SA induces salicylate-dependent defense reactions (PR1, PAL), as well as an increase in the transcriptional activity of the PR6 gene, which, according to the literature, is a jasmonate-dependent gene.

Our results showed the effectiveness of the composition based on live bacteria *B. thuringiensis* B-5351 and SA in protecting potato plants from late blight by inducing systemic defense responses in plants. Taking into account the insecticidal activity of the strain under investigation against Russian wheat aphids and Colorado potato beetle, which we previously described, the possibility of increasing plant resistance to late blight by biocontrol agent combining *B. thuringiensis* B-5351 with SA can open one of the approaches to the development of multifunctional protection of plants from biotic influences.

*The paper contains 4 Figures, 2 Tables and 34 References.*

**Key words:** late blight; PR proteins; proteinase inhibitor; hydrogen peroxide.

**Funding:** This work was supported by the Russian Science Foundation grant "Physiological basis of the formation of symbiotic relationships of potato plants with endophytic bacteria of the genus *Bacillus*" (Project No. 20-76-00003).

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101:2691-2711. doi: [10.1007/s00253-017-8175-y](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y)
2. Lopes R, Tsui S, Gonçalves PJRO. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World J Microbiology and Biotechnology*. 2018;34:94-100. doi: [10.1007/s11274-018-2479-7](https://doi.org/10.1007/s11274-018-2479-7)
3. Rana KL, Kour D, Kaur T. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020;113:1075-1107. doi: [10.1007/s10482-020-01429-y](https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y)
4. Tao A, Panga F, Huang S, Yu G, Li B, Wang T. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. *Biocontrol Science and Technology*. 2014;24:901-924. doi: [10.1080/09583157.2014.904502](https://doi.org/10.1080/09583157.2014.904502)
5. Takahashi H, Nakaho K, Ishihara T, Ando S, Wada T, Kanayama Y, Asano S, Yoshida S, Tsushima S, Hyakumachi M. Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis* - induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports*. 2014;33(1):99-110. doi: [10.1007/s00299-013-1515-1](https://doi.org/10.1007/s00299-013-1515-1)
6. Sorokan AV, Benkovskaya GV, Burkhanova GF, Blagova DK, Maksimov IV. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS producing CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and pest *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Plants*. 2020;9:1115-1123. doi: [10.3390/plants9091115](https://doi.org/10.3390/plants9091115)
7. Kamle M, Borah R, Bora H, Jaiswal AK, Singh RK, Kumar P. Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): Role and mechanism of action against phytopathogens. Cham: Springer Publ.; 2020. 356 p.
8. Pallas JA, Paiva NL, Lamb C, Dixon R. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by Tobacco mosaic virus. *The Plant J*. 1996;10(2):281-293. doi: [10.1046/j.1365-313X.1996.10020281.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10020281.x)
9. Kudriavtseva NN, Sofin AV, Revina TA, Gvozdeva EL, Ievleva EV, Valueva TA. Secretion of proteolytic enzymes by three phytopathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013;49(5):513-21. doi: [10.1134/S0003683813050074](https://doi.org/10.1134/S0003683813050074)
10. Maksimov IV, Blagova DK, Veselova SV, Sorokan AV, Burkhanova GF, Cherepanova EA, Sarvarova ER, Rumyantsev SD, Alekseev VYu, Khayrullin RM. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene BtcryIIa encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. *Biological Control*. 2020;144:34-39. doi: [10.1016/j.biocontrol.2020.104242](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242)
11. *Praktikum po mikrobiologii: Uchebnoe posobie dlya stud. vyssh. ucheb. zavedenij* [Workshop on microbiology. Textbook for students of higher study institutions]. Netrusov AI, Egorova MA, Zaharchuk LM et al.; Netrusov AI, editor. Moscow: Akademiya Publ.; 2005. 608 p. In Russian
12. Bindschedler LM, Minibaeva FV, Gardner SL, Gerrish C, Davies DR, Bolwell GP. Early signaling events in apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve camp and Ca<sup>2+</sup>. *New Phytologist*. 2001;151:185-194. doi: [10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x)
13. El Komy MH, Saleh AA, Ibrahim YE, Molan YY. Early production of reactive oxygen species coupled with an efficient antioxidant system play a role in potato resistance to late blight. *Plant Pathology*. 2020;45:44-55. doi: [10.1007/s40858-019-00318-8](https://doi.org/10.1007/s40858-019-00318-8)
14. Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, Subbanna ARMS, Bisht JK, Bhatt JC, Gupta HS. Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from

- the North Western Indian Himalayas. *Annual Review of Microbiology*. 2017;67:143-155. doi: [10.1007/s13213-016-1244-0](https://doi.org/10.1007/s13213-016-1244-0)
15. Praca LB, Gomes ACMM, Cabral G, Martins ES, Sujii EH, Monnerat RG. Endophytic colonization by brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro*. *Bt Research*. 2012;3:11-19. doi: [10.5376/bt.2012.03.0003](https://doi.org/10.5376/bt.2012.03.0003)
  16. Förster S, Schmidt LK, Kopic E, Anshütz U, Huang S, Schlücking K, Köster P, Waadt R, Larriau A, Batistič O, Rodriguez PL, Grill E, Kudla J, Becker D. Wounding-induced stomatal closure requires jasmonate-mediated activation of GORK K<sup>+</sup> channels by a Ca<sup>2+</sup> sensor-kinase CBL1-CIPK5 complex. *Developmental Cell*. 2019;48:87-99. doi: [10.1016/j.devcel.2018.11.014](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.014)
  17. Mosher S, Moeder W, Nishimura N, Jikumaru Y, Joo SH, Urquhart W, Klessig DF, Kim SK, Nambara E, Yoshioka K. The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner. *Plant Physiology*. 2010;152:1901-1913. doi: [10.1104/pp.109.152603](https://doi.org/10.1104/pp.109.152603)
  18. Chen X, Marszałkowska M, Reinhold-Hurek B. Jasmonic acid, not salicylic acid restricts endophytic root colonization of rice. *Frontiers in Plant Science*. 2020;10:1758-1770. doi: [10.3389/fpls.2019.01758](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01758)
  19. Lemos M, Borges A, Teodósio J, Araújo P, Mergulhão F, Melo L, Simões M. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. *Int Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;86:42-51. doi: [10.1016/j.ibiod.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.011)
  20. Yousefi H, Sanebani N, Mirabolfathy M. The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices cucumerinum*. *Iranian J Plant Pathology*. 2011;4(184):85-87. doi: [10.3389/fimmu.2019.00564](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00564)
  21. Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Advanced Research*. 2019;19:29-37. doi: [10.1016/j.jare.2019.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004)
  22. Wang X., Wang J, Jin P, Zheng Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *Int J Food Microbiology*. 2013;164:141-147. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010)
  23. Wang M, Geng L, Sun X, Shu C, Song F, Zhang J. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. *Biological Control*. 2020;145:104-115. doi: [10.1016/j.biocontrol.2020.104262](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104262)
  24. Paris R, Lamattina L. *Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato. *European J Plant Pathology*. 1999;105(8):753-760. doi: [10.1023/A:1008734527651](https://doi.org/10.1023/A:1008734527651)
  25. Zhang Q, Li W, Yang J, Xu J, Meng Y, Shan W. Two *Phytophthora parasitica* cysteine protease genes, PpCys44 and PpCys45, trigger cell death in various *Nicotiana* spp. and act as virulence factors. *Molecular Plant Pathology*. 2020;21(4):541-554. doi: [10.1111/mpp.12915](https://doi.org/10.1111/mpp.12915)
  26. Revina TA, Parfenov IA, Gvozdeva EL, Gerasimova NG, Valueva TA. Chymotrypsin and trypsin inhibitor isolated from potato tubers. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(3):239-244. doi: [10.1134/S0003683811030112](https://doi.org/10.1134/S0003683811030112)
  27. Zhang C, Wang X, Zhang F, Dong L, Wu J, Cheng Q, Qi D, Yan X, Jiang L, Fan S, Li N, Li D, Xu P, Zhang S. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. *Science Reports*. 2017;7:1-13. doi: [10.1038/s41598-017-07832-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07832-2)
  28. Akram W, Mahboob A, Javed AA. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European J Microbiology and Immunology*. 2013;3:275-280. doi: [10.1556/eujmi.3.2013.4.7](https://doi.org/10.1556/eujmi.3.2013.4.7)

29. Islam N, Ali S, Choi S, Park Y, Baek K. Salicylic acid-producing endophytic bacteria increase nicotine accumulation and resistance against wildfire disease in tobacco plants. *Microorganisms*. 2020;8:64-78. doi: [10.3390/microorganisms8010031](https://doi.org/10.3390/microorganisms8010031)
30. Beris D, Theologidis I, Skandalis N, Vassilakos N. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. *Science Reports*. 2018;8:103-120. doi: [10.1038/s41598-018-28677-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28677-3)
31. Lastochkina O, Baymiev A, Shayahmetova A, Garshina D, Koryakov I, Shpirmaya I, Pusenkova L, Mardanshin I, Kasnak C, Palamutoglu R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants*. 2020;9:76-81. doi: [10.3390/plants9010076](https://doi.org/10.3390/plants9010076)
32. Lastochkina O, Garshina D, Allagulova C, Fedorova K, Koryakov I, Vladimirova A. Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and *Fusarium* root rot stresses. *Agronomy*. 2020;10:1343-1352. doi: [10.3390/agronomy10091343](https://doi.org/10.3390/agronomy10091343)
33. Pauw B, Memelink J. Jasmonate-responsive gene expression. *J Plant Growth Regulation*. 2004;23:200-210. doi: [10.1007/s00344-004-0033-3](https://doi.org/10.1007/s00344-004-0033-3)
34. Zhang K, Wang Y, Sun W, Han K, Yang M, Si Z, Li G, Qiao Y. Effects of exogenous salicylic acid on the resistance response of wild soybean plants (*Glycine soja*) infected with Soybean mosaic virus. *Canadian J Plant Pathology*. 2020;42:84-93. doi: [10.1080/07060661.2019.1641750](https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1641750)

*Received 31 August 2020; Revised 17 November, 2020;  
Accepted 21 February 2021; Published 31 March, 2021.*

**Author info:**

**Sorokan Antonina V**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation  
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>  
E-mail: [fourtyanns@googlemail.com](mailto:fourtyanns@googlemail.com)

**Burkhanova Guzel F**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation.  
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2346-3502>  
E-mail: [guzel\\_mur@mail.ru](mailto:guzel_mur@mail.ru)

**Alekseev Valentin Yu**, Junior Researcher, Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation.  
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4441-3360>  
E-mail: [valentin-1994@yandex.ru](mailto:valentin-1994@yandex.ru)

**Maksimov Igor V**, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation.  
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>  
E-mail: [igor.mak2011@yandex.ru](mailto:igor.mak2011@yandex.ru)

## ЭКОЛОГИЯ

УДК 502.753:502.2.05  
doi: 10.17223/19988591/53/7

**Л.В. Головатюк, Р.А. Михайлов**

*Самарский федеральный исследовательский центр РАН,  
Институт экологии Волжского бассейна РАН г. Тольятти, Россия*

### **Анализ пространственного распределения сообществ макрозообентоса в равнинной реке полупустынной зоны**

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ No. 15-04-03341, а также в рамках государственного задания ФГБУН Институт экологии Волжского бассейна РАН, тема (проект) No. АААА–А17–117112040040–3 «Оценка современного биоразнообразия и прогноз его изменения для экосистем Волжского бассейна в условиях их природной и антропогенной трансформации» (направление 51 «Экология организмов и сообществ»).*

*На основе исследований таксономического состава и структурных показателей макрозообентоса проведен анализ особенностей пространственного распределения донных сообществ равнинной р. Еруслан, протекающей в полупустынной области Русской равнины (бассейн Нижней Волги). Установлено, что бентофауна реки представлена исключительно лимнофильными видами, что обусловлено небольшим уклоном Еруслана, а также наличием постоянных и временных плотин. По продольному профилю водотока не происходит закономерных изменений видового разнообразия гидробионтов в соответствии с концепцией «речного континуума». Показано, что распределение сообществ макрозообентоса от истока до устья р. Еруслан объясняется сочетанием двух широко известных концепций: «динамики пятен» и «функциональных зон».*

**Ключевые слова:** макрозообентос; лотическая система; концепции пространственного распределения; бассейн Нижней Волги.

**Для цитирования:** Головатюк Л.В., Михайлов Р.А. Анализ пространственного распределения сообществ макрозообентоса в равнинной реке полупустынной зоны // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 131–150. doi: 10.17223/19988591/53/7

### **Введение**

Изучение структурных показателей и распределения сообществ гидробионтов в естественных или нарушенных антропогенным воздействием речных экосистемах является одной из важных составляющих гидробиологических и экологических исследований [1]. Особенности пространственного распределения макрозообентоса в лотических системах сформулированы в широко известных концепциях «речного континуума» [2, 3], «динамики

пятен» [4, 5], «функциональных зон» [1] и некоторых других [6–9]. Многочисленные обзоры и анализ аспектов влияния речного потока на гидробионтов представлены в работах [10–17].

Оценка приложимости различных концепций к распределению беспозвоночных в речных сетях особенно сложна, поскольку физическая структура водотоков постоянно меняется в пространственном и временном масштабах. В связи с существенными изменениями геоморфологических условий области протекания лотических систем, определяющих их гидролого-гидрохимический режим, предполагается, что видовая структура сообществ макрозообентоса может либо закономерно меняться от истоков к устью, либо виды по течению могут быть распределены случайно, либо в реке выделяются различающиеся между собой «процессные зоны» [18], каждая из которых в своих пределах имеет однородный видовой состав. Помимо выполнения сравнительного анализа динамики таксономической структуры водотоков от истоков к устьевым участкам, необходимо установить, отличаются ли статистически значимо найденные специфические закономерности от случайного процесса формирования сообществ [19]. Другая проверяемая гипотеза, проводимая с использованием статистических методов, связана с оценкой пространственной неоднородности сообщества: можно ли выделить «барьеры», т.е. границы зон водотока, относительно которых видовой состав гидробионтов претерпевает резкие характерные изменения.

Решению данной задачи посвящен ряд научных работ отечественных ученых, в которых рассмотрена динамика донных сообществ по продольному профилю рек разного типа, расположенных в различных природно-климатических зонах [20–22]. В пределах бассейна Нижней Волги статистический анализ особенностей распределения донных макробеспозвоночных выполнен только для рек лесостепной природно-климатической зоны [20, 21], поэтому представляет интерес изучить структурные показатели и динамику сообществ макрозообентоса в реках полупустынной зоны Русской равнины как одних из наименее исследованных лотических объектов Волжского бассейна.

Происходящие климатические изменения [23] требуют особого внимания к осуществлению природоохранной деятельности в засушливых регионах, поэтому изучение биотической составляющей водных объектов таких экосистем, в том числе закономерностей пространственного распределения гидробионтов, является важным направлением научных исследований.

Среди водотоков, формирующих речную сеть полупустынной зоны бассейна Нижней Волги, наибольшую протяженность и площадь водосбора имеет равнинная р. Еруслан, во многом определяющая экологические характеристики территории. Это обусловило выбор р. Еруслан в качестве объекта для выполнения настоящей работы.

Цель данного исследования – изучение таксономического состава, структурных и количественных показателей макрозообентоса от истока до устья

р. Еруслан, определение концептуальной принадлежности динамики донных сообществ равнинной реки полупустынной зоны к определенному типу распределения.

### Материалы и методики исследования

*Характеристика района исследований.* Река Еруслан берет начало на юго-западной окраине Общего Сырта, на водоразделе рр. М. Узень и Б. Караман, и впадает в Волгоградское водохранилище, образуя Ерусланский залив. Длина реки – 282 км, площадь водосбора – 5,57 тыс. км<sup>2</sup>, высота истока – 104 м, средний уклон – 0,34‰, среднемноголетний расход воды в 12 км от устья – 3,47 м<sup>3</sup>/с. Водный режим отличается резкими колебаниями уровня. Весной вода поднимается на 5–6 м, и на этот период приходится около 70% годового стока. Летняя межень низкая, после окончания половодья река приобретает вид отдельных плесов, которые к концу лета сильно мелеют [26]. Бассейн реки отличается равнинным характером и прорезан редкой сетью малых речек, долины которых не имеют развитых склонов. Высота берегов на протяжении реки колеблется довольно значительно. В верхнем течении Еруслан представляет собой неглубокую плоскую балку с пологими берегами, но уже у с. Ивановка имеет ясно выраженную плоскую террасу с руслом в крутых берегах. Вниз по течению до с. Усатово высота берегов то понижается до 2–3 м, то повышается, достигая 10 м. По мере приближения к устью высота берегов постепенно снижается. Русло реки извилистое, грунт ложа в верхнем течении иловатый, глинистый, в нижнем – песчаный.

Климат территории континентальный, с холодной малоснежной зимой и продолжительным жарким сухим летом. Наиболее жаркий месяц – июль со среднемесячной температурой воздуха 24,2 °С, наиболее холодный – февраль (–5,9 °С). Количество выпадающих осадков в среднем составляет 360–370 мм в год. Испаряемость превышает осадки, т.е. регион характеризуется дефицитом водных ресурсов [27].

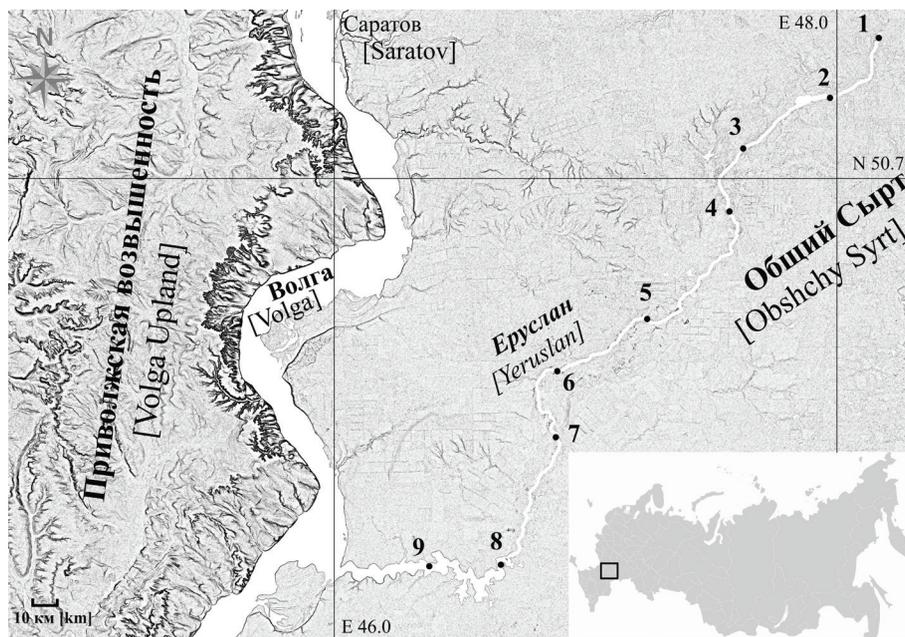
*Методы сбора материала.* Отбор проб макрозообентоса проведен на 9 постоянных станциях р. Еруслан в июне 2015 г. и июле 2016 г. (рис. 1). Образцы грунта в рипали собраны штанговым дночерпателем с площадью захвата 1/400 м<sup>2</sup> по 8 повторностей на каждой станции и гидробиологическим скребком (0,2 м × 0,5 м). На глубоководных участках для сбора бентоса использован дночерпатель Экмана-Берджи с площадью захвата 1/40 м<sup>2</sup>. Грунт промывали через газ с размером ячеек 300–310 мкм и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида с последующей камеральной обработкой и определением систематической принадлежности гидробионтов [24]. Собранный материал включал 41 пробу макрозообентоса.

В каждой точке отбора образцов бентоса измерены глубина, ширина и скорость течения реки, рН воды (HI 98127, HANNA, Германия) и содержание растворенного кислорода (HI9146, HANNA, Германия). Для проведения

гидрохимического анализа отбор проб воды произведен в верхнем, среднем и нижнем участках реки. Определение ионного состава растворенных в воде солей, содержание органических, биогенных веществ и тяжелых металлов выполнены в аккредитованной гидрохимической лаборатории ООО «Центр мониторинга водной и геологической среды» (г. Самара).

Гранулометрический состав донных отложений определен лазерным гранулометром «Fritsch Analysette 22» (Fritsch, Germany) при мелкофракционном составе и с помощью ситования для наносов крупностью более 2 мм.

Видовая структура донных сообществ оценена на основе индекса доминирования Палия–Ковнацки [25].



**Рис. 1.** Карта-схема расположения станций отбора проб на р. Еруслан:  
 1 – Плес, 2 – Семеновка, 3 – Лебедевка, 4 – Красный Кут, 5 – Дьяковка,  
 6 – Луговское, 7 – Верхний Еруслан, 8 – Валуевка, 9 – Беляевка  
**[Fig. 1.** Map of the study area. The location of stations on the Yeruslan River:  
 1 - Ples, 2 - Semenovka, 3 - Lebedevka, 4 - Krasny Kut, 5 - Dyakovka,  
 6 - Lugovskoe, 7 - Verkhny Yeruslan, 8 - Valuevka, 9 - Belyaevka]

*Статистическая обработка результатов.* Для изучения изменений видовой структуры макрозообентоса (численность отдельных таксонов) от истока до устья р. Еруслан в реальных географических координатах использовали модель «изоляции расстоянием» (isolation by distance) с применением геометрических подходов [28]. Чтобы найти границы областей, вдоль которых расстояния между исследованными станциями являются наибольшими, применяли алгоритм максимума различий Монмюньера [29, 30]. Для вы-

явления закономерностей динамики гидробиологических характеристик по продольному профилю реки и определения математической значимости гипотезы о нестационарности рядов численностей таксономических групп осуществляли расчеты с использованием теста Дики-Фуллера [31]. Для оценки статистической значимости результатов нестационарности ряда рассчитали нулевую гипотезу ( $t$ -критерий) и ее значимость ( $p < 0,05$ ) [32]. Все вычисления выполнены с использованием статистической среды R v. 3.02 и ее пакетов *vegan* и *mgcv* [33, 34].

### Результаты исследования и обсуждение

За период исследований на всем протяжении Еруслана наблюдалась низкая скорость течения (табл. 1), обусловленная небольшими уклонами речного дна (0,09–1,7‰) (см. рис. 2), а также зарегулированием реки постоянными и временными плотинами. На основе гидрологических характеристик все участки р. Еруслан следует отнести к зонам «потамали», тогда как зона «критрали», обычная для рек с высокой скоростью течения, отсутствует. В верховьях русло потока не находится под пологом леса, поэтому донные сообщества на этом участке мало зависят от аллохтонного органического вещества, как это постулирует концепция речного континуума [2]. Дно водотока, как в прибрежье, так и на русле, на большинстве обследованных участков покрыто водной и прибрежно-водной растительностью. Анализ гранулометрического состава показал, что русловые наносы в верховьях реки представлены мелко- и крупнопылеватыми частицами, их средний размер изменялся в диапазоне 0,046–0,065 мм. В среднем течении преобладали песчаные отложения (песок мелкий, средний и крупный с размером частицы 0,146–0,545), а в устьевом участке – песок крупный (0,756–0,788) и гравий средний (4,878 мм), т. е. вниз по течению происходило увеличение крупности частиц в связи с возрастанием транспортирующей способности потока.

Еруслан протекает в пределах геохимической провинции континентального засоления, которой свойствен испарительный тип режима природных вод, ведущий к прогрессивному накоплению солей. На отдельных станциях (51°10'N, 47°35'E, 50°21'N, 46°25'E) установлен повышенный (1250, 1420 мг/л соответственно представленным координатам) уровень минерализации за счет дренирования водами засоленных почв. Локально зарегистрировано загрязнение реки соединениями азота (азот нитритный, станция 1) и фосфора (станции 4, 8).

Содержание суммарного органического вещества (по ХПК) находилось в диапазоне 15–16 мгО/л, а концентрации азота аммонийного, азота нитратного и таких тяжелых металлов, как кадмий, медь, цинк и свинец, не превышали ПДК.

От истока до устья р. Еруслан наблюдалось последовательное снижение площади зарастаемости речного дна макрофитами и увеличение размера частицы русловых отложений. В то же время по профилю реки не происходило

существенных изменений скорости течения воды, а физико-химические условия были специфичны для отдельных станций водотока.

Таблица 1 [Table 1]

**Некоторые гидрологические и гидрохимические показатели  
на участках р. Еруслан в 2015–2016 гг.  
[Some hydrological and hydrochemical indicators  
in the sections of the Yeruslan River in 2015 and 2016]**

Показатель [Indicator] (min–max)	Участок реки [Sections of the river]		
	Верхний (станции 1–3) [Upper reaches (stations 1-3)]	Средний (станции 4–7) [Middle reaches (stations 4-7)]	Нижний (станции 8–9) [Lower reaches (stations 8-9)]
Глубина, м [Depth, m]	0,2–1,5	0,3–2,5	0,4–3,0
Зарастаемость [Overgrowth], %	50–95	10–50	5–10
Скорость течения, м/с [Current velocity, m/s]	0,01–0,02	0,01–0,02	0,01–0,02
Температура [Temperature], °C	23,0–28,5	20,0–29,6	24,0–30,3
pH	7,8–8,6	7,9–9,2	7,7–8,3
Растворенный кислород, мг/л [Dissolved O <sub>2</sub> , mg/l]	4,5–9,1	4,6–9,3	4,9–12,4
Тип грунта [Soil type]	*s+cl+so+pr, s+cl+pr, s+ pr, pr+so+s	*s+cl, s+cl+pr, s+sd, s+pr, pr+ sd+s	*s+p, s+pr, p+s+pr, sd, pr+sd+s
Минерализация, мг/л [Mineralization, mg/l]	235–1250	520–1340	360–1420
Фосфор общий, мг/л [P <sub>total</sub> , mg/l]	0,045–0,047	0,09–0,17	0,09–1,12
N-NH <sub>4</sub> , mg/l	0,047–1,0	0,23–0,25	0,23–0,24
N-NO <sub>3</sub> , mg/l	1,0–1,0	1,0–1,0	0,48–1,8
N-NO <sub>2</sub> , mg/l	0,007–0,008	0,009–0,009	0,009–0,009
ХПК, мгО/л [COD, mgO/l]	15–16	16–16	16–16
Основные загрязняющие вещества (кратность превышения **ПДК) [Major pollutants (multiplicity of excess **MPC)]	Минерализация [Mineralization] (1,2), N-NO <sub>2</sub> (50), ХПК [COD] (1.1)	ХПК [COD] (1,1)	Минерализация [Mineralization] (1,2), ХПК [COD] (1,1), P <sub>total</sub> (5,6)

*Примечание.* \* s – ил, cl – глина, so – почва, pr – растительные остатки, sd – песок; \*\* ПДК – предельно допустимая концентрация загрязняющих веществ (для рыбохозяйственных водоемов)

[Note. \* s - Silt, cl - Clay, so - Soil, pr - Plant residues, sd - Sand; \*\* MPC - maximum permissible concentration of pollutants (for fishery reservoirs); COD - Chemical oxygen demand].

*Состав и распределение макрозообентоса.* За период исследований зарегистрировано 132 вида и таксона более высокого систематического ранга: 37 – Chironomidae, 10 – прочих Diptera, 20 – Oligochaeta, по 11 видов Mollusca, Grustacea и Coleoptera, по 7 – Trichoptera и Heteroptera, 6 – Hirudinea, по 4 – Odonata и Ephemeroptera, по одному виду Lepidoptera, Hydracarina, Polychaeta и Megaloptera. Большинство видов, обитающих в р. Еруслан, широко распространены в средних равнинных реках Волжского бассейна [35–37].

Таблица 2 [Table 2]

**Число видов в таксономических группах макрозообентоса на разных участках р. Еруслан в 2015–2016 гг.**  
 [The number of species in taxonomic groups of macrozoobenthos communities in different sections of the Yeruslan River in 2015 and 2016]

Таксономическая группа [Taxonomic group]	Верхний (станции 1–3) [Upper reaches (stations 1–3)]		Средний (станции 4–7) [Middle reaches (stations 4–7)]		Нижний (станции 8–9) [Lower reaches (stations 8–9)]	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016
Oligochaeta	10	10	11	8	7	5
Hirudinea	1	–	1	–	2	1
Mollusca	–	–	3	3	5	3
Crustacea	1	1	1	1	10	3
Ephemeroptera	2	1	2	3	1	1
Odonata	2	1	1	2	–	–
Heteroptera	4	3	6	2	1	1
Trichoptera	1	–	7	4	2	1
Coleoptera	8	2	6	3	–	–
Chironomidae	23	18	28	24	16	16
Прочие [Other] Diptera	3	–	8	–	1	–
Hydracarina	–	–	1	–	–	–
Прочие [Other]: Megaloptera, Polychaeta, Lepidoptera	–	–	2	–	1	1
Всего [Total]	55	36	77	50	46	32
Число проб [Number of samples]	6	6	8	9	6	6
Удельное видовое богатство [Relative species richness]	9	6	10	6	8	5

Общее таксономическое разнообразие макрозообентоса достигало наибольших показателей в среднем течении р. Еруслан, в то время как удельное видовое богатство на всех участках реки сопоставимо. Это объясняется большей частотой отбора проб на станциях 4–7 (табл. 2).

В верхнем течении р. Еруслан донная фауна представлена исключительно фитофильными и пелофильными видами, в отличие от средних равнинных рек лесостепной природно-климатической зоны бассейна Нижней Волги [37], где преобладают реофильные таксоны макрозообентоса. По числу видов в р. Еруслан лидируют личинки хирономид (25 видов) и олигохеты (10 видов). Среди зарослей макрофитов прибрежья и руслового участка обитают поденки *Caenis robusta* (Eaton, 1884), *Cloeon simile* Eaton, 1870,

ручейники *Leptocerus tineiformis* Curtis, 1834, пиявки *Helobdella stagnalis* (Linnaeus, 1758), стрекозы *Sympsecta fusca* (Vanderlinden., 1823) и *Sympetrum depressiusculum* (Sélys, 1841), ракообразные *Asellus aquaticus* (Linne, 1758). Из представителей отряда Coleoptera наибольшее распространение получают *Acilius canaliculatus* (Nicolai, 1822) и *Berosus* sp., Heteroptera – *Sigara* sp., Oligochaeta – *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862, Chironomidae – *Polypedilum nubeculosum* (Meigen, 1804) и *Paratanytarsus* sp.

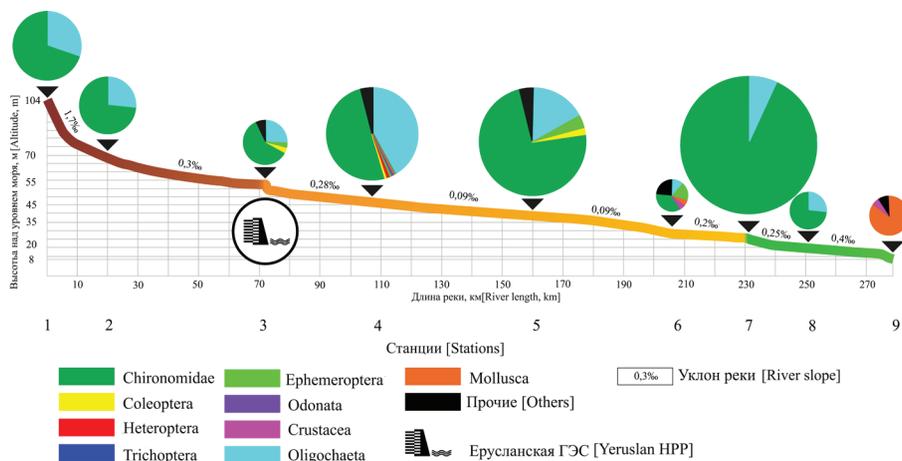
Распределение макрозообентоса от истока до устья на русловых станциях р. Еруслан показано на примере результатов исследований 2015 г. (рис. 2). В верховьях наибольшее видовое богатство (13 видов) наблюдалось в истоке реки, расположенном на охраняемой природной территории (государственный природный заказник «Саратовский»). Численность бентоса в этом участке изменялась в пределах 1350–3020 экз./м<sup>2</sup>, составляя в среднем 2223 экз./м<sup>2</sup> и достигая максимальных показателей на станции 1 (рис. 2). Плотность гидробионтов на всех станциях отбора проб определяли личинки хирономид (59–70% от общей численности) и олигохеты (26–30%). Доминирующими таксонами в верхнем течении являлись олигохеты *L. hoffmeisteri* и хирономиды *Cladotanytarsus mancus* (Walker, 1856), *P. nubeculosum*.

В среднем течении все зарегистрированные виды также относятся к типичным обитателям малопроточных водоемов. Как и в верхнем участке реки, таксономически наиболее разнообразны личинки хирономид (32 вида) и олигохеты (14 видов). Увеличивается число видов ручейников, среди которых чаще встречаются фитофильные *L. tineiformis* и пелофильные *Ecnomus tenellus* (Rambur, 1842), а в отряде Ephemeroptera, наряду *C. robusta* (Eaton, 1884) и *C. simile* Eaton, 1870, зарегистрированы личинки *Cloeon* gr. *dipterum*. К числу наиболее распространенных видов относятся моллюски *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), жуки *Pelodytes caesus* (Duftschmid, 1805), клопы *Plea minutissima* Leach, 1817, стрекозы *S. fusca*, хирономиды *P. nubeculosum* и малощетинковые черви *L. hoffmeisteri*.

Число видов в местах отбора проб на русле реки в июне 2015 г. изменялось от 8 до 32, а средняя численность организмов, по сравнению с верхним течением, возрастала до 7032 экз./м<sup>2</sup>. Наибольшая численность регистрировалась на станции 7 за счет развития личинок хирономид *C. mancus* и *P. scabraenum*. Преобладающими группами гидробионтов на всех обследованных станциях, так же, как и в верховьях, являются личинки хирономид (35–93%) и олигохеты (7–42%). В состав доминантов этого участка входят хирономиды *C. mancus*, *P. nubeculosum* и олигохеты *L. hoffmeisteri*.

В нижнем течении р. Еруслан, в зоне подпора водами Волгоградского водохранилища структурные показатели макрозообентоса на станции 8 формируются за счет развития личинок хирономид и олигохет, а на станции 9 – за счет вселенцев понто-каспийского и понто-азовского комплексов, среди которых наибольшая частота встречаемости отмечена для корофиид *Chelicorophium curvispinum*, мизид *Paramysis lacustris*, моллюсков *Dreissena*

*bugensis* (Andrusov, 1897), хирономид *Cladotanytarsus mancus* (Walker, 1856), олигохет *L. hoffmeisteri*, полихет *Hypania invalida* (Grube, 1860).



**Рис. 2.** Динамика численности (цифрами указана средняя численность, экз./м<sup>2</sup>) таксономических групп макрозообентоса на русле р. Еруслан в июне 2015 г.  
**[Fig. 2.** Population dynamics (average number is indicated by figures, ind./m<sup>2</sup>) of macrozoobenthos taxonomic groups on the riverbed of the Yeruslan River in June 2015]

Число видов на отдельно взятой станции русла реки в июне 2015 г. не превышало 8, а показатели численности – 1052 экз./м<sup>2</sup>. Основу численности и биомассы на станции 8 обеспечивают личинки хирономид (73% от общей численности) и олигохеты (27%), тогда как в устьевом участке реки преобладают двустворчатые моллюски (83%). Доминирующий комплекс видов макрозообентоса на станции 8 формируется за счет хирономид *C. mancus*, *Chironomus* gr. *plumosus*, *P. nubeculosum* и олигохет *L. hoffmeisteri*, а на станции 9 он складывается из чужеродных таксонов *D. polymorpha*, *H. invalida*, *P. lacustris*.

Таким образом, на всем протяжении водотока развиваются лимнофильные виды – обитатели зарослей макрофитов и заиленных биотопов, реофильные таксоны в донных сообществах не отмечены. Обращает на себя внимание сходство доминирующего состава видов макрозообентоса в верхнем, среднем участках реки и на станции 8, включающего хирономид *C. mancus*, *P. nubeculosum* и олигохет *L. hoffmeisteri*. Особенностью фауны устьевого участка (станция 9) является развитие видов-вселенцев понто-каспийского и понто-азовского комплексов. Численность гидробионтов достигает максимальных показателей в среднем течении и минимальных – в устьевом участке реки.

*Статистический анализ закономерностей распределения макрозообентоса.* Проведенный статистический анализ последовательностей гидроби-

экологических характеристик по продольному градиенту с использованием теста Дики–Фуллера (табл. 3) показал наличие стационарного линейного тренда рядов общей численности макрозообентоса, численности малощетинковых червей семейства Tubificidae, личинок хирономид подсемейства Tanyparsini и поденок семейства Baetidae. Для остальных рядов наблюдений отмечается случайная вариация значений обилия гидробионтов при наличии стохастического дрейфа в неопределенном направлении.

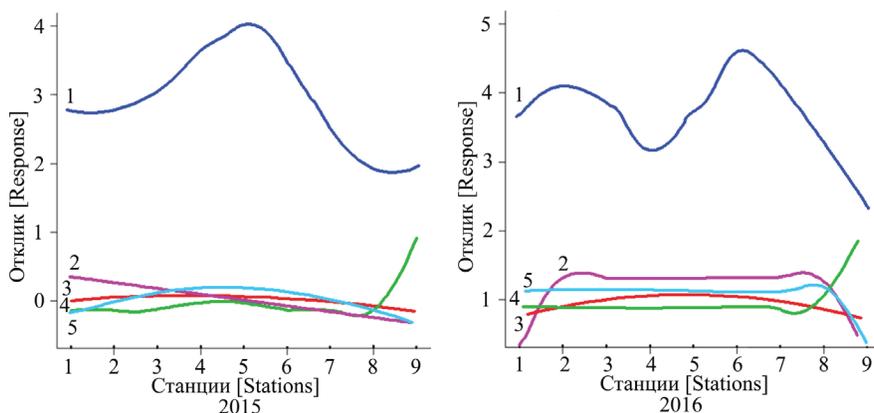
Таблица 3 [Table 3]

**Результаты проверки гипотезы о нестационарности рядов гидробиологических показателей и численности отдельных таксонов макрозообентоса (экз./м<sup>2</sup>) по продольному градиенту руслового участка р. Еруслан с использованием теста Дики–Фуллера в 2015–2016 гг.**  
**[Results of testing the hypothesis of non-stationary series of hydrobiological indicators and the number (ind./m<sup>2</sup>) of individual macrozoobenthos taxa along the longitudinal gradient of the riverbed section of the Yeruslan River using the Dickey-Fuller test in 2015 and 2016]**

Наименование показателя [Indicator]	2015			2016		
	<i>M</i> ± <i>SD</i>	<i>t</i> -test	<i>p</i> -values	<i>M</i> ± <i>SD</i>	<i>t</i> -test	<i>p</i> -values
Общая численность макрозообентоса, экз./м <sup>2</sup> [Total abundance of macrozoobenthos, ind./m <sup>2</sup> ]	4081±1433	-3,309	0,009	5396±1825	-2,984	0,005
Общая биомасса, г/м <sup>2</sup> [Total biomass, g/m <sup>2</sup> ]	3,69±3,149	-0,022	0,99	5,12±4,521	-0,014	0,851
Индекс видового разнообразия Шеннона, бит/экз. [Shannon diversity index, bit/ind.]	2,83±0,641	-1,782	0,655	2,42±0,565	-1,414	0,782
Bivalvia	102±96,767	-0,689	0,959	405±187,164	-0,452	0,874
Crustacea	16±8,246	-1,583	0,731	76±25,234	-2,841	0,745
Naididae	100±65,595	-1,891	0,613	141±54,654	-3,194	0,554
Tubificidae	687±206,065	-4,489	0,01	516±252,854	-5,235	0,01
Caenidae	39±30,570	-2,066	0,547	9±3,254	-1,94	0,254
Baetidae	16±9,734	-3,048	0,01	2	–	–
Leptoceridae	40±4,444	-2,589	0,347	0	–	–
Orthocladiinae	49±14,855	-2,289	0,462	14±3,895	-3,049	0,01
Tanypodinae	133±85,179	-2,314	0,452	79±59,657	-4,156	0,345
Chironomini	1502±632,878	-2,862	0,244	689±364,925	-3,124	0,541
Tanytarsini	1167±821,95	-6,895	0,01	948±795,864	-7,452	0,001

Общий характер нестационарности распределения экологических последовательностей некоторых групп макрозообентоса р. Еруслан по отношению к индексу видового разнообразия показан на рис. 3. Динамика значений индекса в разные годы исследований не имеет общих закономерностей. Так, в 2015 г. установлено возрастание видового разнообразия от верхнего

течения к среднему, тогда как в 2016 г. высокие показатели индекса наблюдались как в верхнем (станции 2, 3), так и в среднем (станции 6, 7) участках реки. Полученные данные противоречат концепции «речного континуума», согласно которой наиболее низким видовым разнообразием отличаются верховья рек [2].



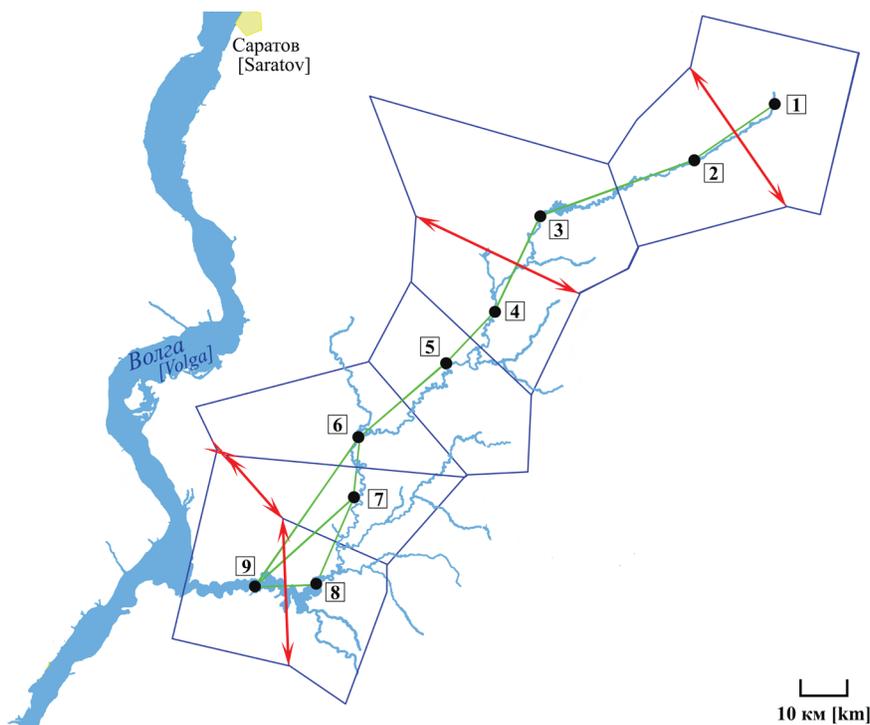
**Рис. 3.** Сглаженные модели распределения индекса видового разнообразия Шеннона и трансформированной численности некоторых таксономических групп макрозообентоса по продольному профилю р. Еруслан

[Fig. 3. Smoothed distribution models of the Shannon's Diversity Index and the transformed number of some taxonomic groups of macrozoobenthos along the longitudinal profile of the Yeruslan River]:

1 – Индекс Шеннона [Shannon's Diversity Index],  
2 – Tubificidae, 3 – Caenidae, 4 – Bivalvia, 5 – Chironomini

Очевидно, что доминирование по численности малощетинковых червей подсемейства Tubificidae в верхнем течении реки (станции 1, 2) и двустворчатых моллюсков рода *Dreissena* в устье (станция 9) приводит к существенному снижению значений индекса, тогда как более равномерное распределение плотности таксономических групп в среднем участке обуславливает их возрастание.

Выделение последовательности границ (barrier) между сообществами реки внутри экосистемы методом Монмюьера с использованием матрицы видовых дистанций методом Брея–Кертиса позволил выделить в качестве одной из специфических областей исток (станция 1, уровень сходства с сообществами на других станциях составил 27% при  $p = 0,033$ ) с высоким уровнем содержания в воде азота нитритного. Вторая по значимости граница отделяет станцию 3 в зарегулированном участке реки с низким (57% насыщения) содержанием растворенного кислорода (21%,  $p = 0,012$ ), а третья выделяет в качестве самостоятельной области устьевой участок (15%,  $p = 0,021$ ), где наблюдается совместное обитание речных и водохранилищных видов (рис. 4).



**Рис. 4.** Выделение «барьеров» (показаны красными линиями) с наибольшим расстоянием между станциями, имеющими специфические структурные показатели донных сообществ, с использованием триангуляции Делоне и алгоритма Монмюнье (июнь 2015 г)  
**[Fig. 4.** Selecting the “barriers” (shown in red lines) with the largest distance between stations that have specific structural indicators of bottom communities, using the Delaunay triangulation and Monmonier’s algorithm (June 2015)]

На основе проведенного анализа фауны и применения статистических методов не выявлено закономерных изменений видового разнообразия гидробионтов от истока до устья реки в соответствии с концепцией «речного континуума». Распределение таксонов находилось в зависимости от локальных абиотических и биотических факторов, складывающихся на отдельных станциях водотока. Поскольку концепция «динамики пятен» постулирует, что видовую структуру сообщества на каждом конкретном участке определяет совокупность локальных экологических условий и видовой состав речных сообществ формируется в значительной степени случайно, то следует предположить, что распределение таксонов макрозообентоса р. Еруслан в общих чертах соответствует данному типу распределения. В то же время на отдельных участках р. Еруслан (станции 1, 3, 9) формировались достаточно изолированные гидрогеоморфологические области, которые и определяли видовой и функциональный состав сообществ гидробионтов, что постули-

рует концепция «функциональных зон». По-видимому, пространственное распределение таксонов макрозообентоса экосистемы р. Еруслан может быть объяснено сложным сочетанием двух концепций: «динамики пятен» и «функциональных зон». Такой тип распределения существенно отличается от установленного в равнинной р. Сок, протекающей в лесостепной природно-климатической зоне бассейна Нижней Волги [37] и реках Дальнего Востока России [38, 39], где распределение гидробионтов в общих чертах соответствует концепции речного континуума. Ранее также было показано, что распределение макрозообентоса в равнинных реках может быть объяснено механизмами объединения трех различных концепций [21, 22].

### **Заключение**

В результате проведенных исследований установлено, что все участки р. Еруслан по гидрологическим показателям относятся к зонам «потамали». Это обусловлено небольшим уклоном речного дна, низкой скоростью течения и наличием постоянных и временных плотин. В донных сообществах зарегистрированы исключительно лимнофильные виды, последовательной смены экологических групп бентофауны от истока до устья реки не наблюдалось. Применение статистических методов не выявило закономерных изменений видового разнообразия гидробионтов по профилю водотока в соответствии с концепцией «речного континуума», однако на отдельных участках р. Еруслан формировались достаточно изолированные гидрогеоморфологические области, которые и определяли видовой и функциональный состав сообществ гидробионтов. Предполагается, что динамика таксономического состава и структурных показателей макрозообентоса р. Еруслан определяется сочетанием двух широко известных концепций: «динамики пятен» и «функциональных зон». Подобным типом распределения, по-видимому, характеризуются реки, гидрологический режим которых обнаруживает сходство со стоячими водоемами, так как турбулентность потока признана одним из руководящих факторов пространственного распределения макрозообентоса в лотических системах [40].

*Авторы благодарят за помощь в идентификации личинок и имаго жуков и клопов в.н.с., канд. биол. наук А.А. Прокина (ИБВВ РАН, пос. Борок, Россия), за определение видового состава малоцетинковых червей – м.н.с. Т.В. Попченко (Самарский федеральный исследовательский центр РАН, ИЭВБ РАН, г. Тольятти, Россия), за идентификацию клещей – в.н.с. профессора, д-ра биол. наук П.В. Тузовского (ИБВВ РАН, пос. Борок, Россия), за определение видового состава ракообразных – н.с., канд. биол. наук Е.М. Курину (ИПЭЭ РАН, г. Москва, Россия), за определение гранулометрического состава грунта – м.н.с., канд. геогр. наук Е.В. Белозерову (МГУ им. Ломоносова, г. Москва, Россия).*

*Литература*

1. Thorp J.H., Thoms M.C., DeLong M.D. The riverine ecosystem synthesis: biocomplexity in river networks across space and time // *River Research & Applications*. 2006. Vol. 22. PP. 123–147. doi: [10.1002/rra.901](https://doi.org/10.1002/rra.901)
2. Vannote R.L., Minshall G.W., Cummins K.W., Sedell J. R., Cushinget C.E. The river continuum concept // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1980. Vol. 37. PP. 130–137. doi: [10.1139/f80-017](https://doi.org/10.1139/f80-017)
3. Dokulil M.T. Potamoplankton and primary productivity in the River Danube // *Hydrobiologia*. 2014. Vol. 729. PP. 209–227. doi: [10.1139/f80-017](https://doi.org/10.1139/f80-017)
4. Townsend C.R. The patch dynamics concept of stream community ecology // *Journal of the North American Benthological Society*. 1989. Vol. 8. PP. 36–50. doi: [10.2307/1467400](https://doi.org/10.2307/1467400)
5. Yodzis P. Competition, mortality, and community structure // *Community ecology* / eds by J. Diamond, T. Case. New York : Harper and Row; 1986. PP. 480–491.
6. Junk W.J., Wantzen K.M. The flood pulse concept: new aspects, approaches and applications-an update // *Proceedings of the second international symposium on the management of large rivers for fisheries*. Bangkok : Food and Agriculture Organization and Mekong River Commission, FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 2004. PP. 117–149.
7. Gomi T., Sidle R.C., Richardson J.S. Understanding processes and downstream linkages of headwater streams // *BioScience*. 2002. Vol. 52, No. 10. PP. 905–916.
8. Benda L., Poff L.R., Miller D., Dunne T., Reeves G., Pollock M., Pess G. Network dynamics hypothesis: spatial and temporal organization of physical heterogeneity in rivers // *BioScience*. 2004. Vol. 54. PP. 413–427.
9. Thoms M.C., Parsons M. Identifying spatial and temporal patterns in the hydrological character of the Condamine-Balonne River, Australia, using multivariate statistics // *River Research and Applications*. 2003. Vol. 19. PP. 443–457.
10. Ward J.V., Tockner K. Biodiversity: towards a unifying theme for river ecology // *Freshwater Biology*. 2001. Vol. 46. PP. 807–819.
11. Melles S.J., Jones N.E., Schmidt B. Review of theoretical developments in stream ecology and their influence on stream classification and conservation planning // *Freshwater Biology*. 2012. Vol. 57. PP. 415–434. doi:[10.1111/j.1365-2427.2011.02716.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02716.x)
12. Vyas V., Bharose S., Yousuf S., Kumar A. Distribution of Macrozoobenthos in River Narmada near Water Intake Point // *Journal of Natural Sciences Research*. 2012. Vol. 2, No. 3. PP. 18–24.
13. Sharma R., Kumar A., Vyas V. Diversity of Macrozoobenthos in Morand River- A Tributary of Ganjal River in Narmada Basin // *International Journal of Advanced Fisheries and Aquatic Science*. 2013. Vol. 1, No. 1. PP. 57–65.
14. Ihtimanska M., Varadinova E., Kazakov S., Hristova R., Naumova S., Pehlivanov L. Preliminary Results about the Distribution of Macrozoobenthos along the Bulgarian Stretch of the Danube River with Respect to Loading of Nutrients, Heavy Metals and Arsenic // *Acta Zoologica Bulgarica*. 2014. Vol. 7. PP. 165–171.
15. Woodward G., Hildrew A.G. Food web structure in riverine landscapes // *Freshwater Biology*. 2002. Vol. 47. PP. 777–798.
16. Winemiller K.O. Floodplain river food webs: generalizations and implications for fisheries management // *Proceedings of the second international symposium on the management of large rivers for fisheries*. Bangkok : RAP Publication, 2004. PP. 285–309.
17. Батурина Н.С. Закономерности организации речных экосистем: ретроспектива становления современных концепций (обзор) // *Биология внутренних вод*. 2019. No. 1. С. 3–11. doi: [10.1134/S0320965219010042](https://doi.org/10.1134/S0320965219010042)
18. Montgomery D.R. Process domains and the river continuum concept // *American Water Resources Association*. 1999. Vol. 35. PP. 397–410. doi: [10.1111/j.1752-1688.1999.tb03598.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1999.tb03598.x)

19. Connor E.F., Simberloff D. The assembly of species communities: chance or competition? // *Ecology*. 1979. Vol. 60. PP. 1132–1140.
20. Шитиков В.К., Зинченко Т.Д. Статистический анализ структурной изменчивости донных сообществ и проверка гипотезы речного континуума // *Водные ресурсы*. 2014. Т. 41, No. 5. С. 530–540.
21. Головатюк Л.В., Шитиков В.К., Зинченко Т.Д. Особенности пространственного распределения видовой структуры донных сообществ средней равнинной реки // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2017. No. 40. С. 163–180. doi: [10.17223/19988591/40/10](https://doi.org/10.17223/19988591/40/10)
22. Gladyshev M.I., Kolmakova O.V., Tolomeev A.P., Anishchenko O.V., Makhutova O.N., Kolmakova A.A., Kravchuk E.S., Kolmakov V.I., Sushchik N.N., Glushchenko I.A. Differences in organic matter and bacterioplankton between sections of the largest Arctic river: Mosaic or continuum? // *Limnology and Oceanography*. 2015. Vol. 60. PP. 1314–1331. doi: [10.1002/lno.10097](https://doi.org/10.1002/lno.10097)
23. Доклад об особенностях климата на территории Российской Федерации за 2016 год. М. : Росгидромет, 2017. 70 с.
24. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем. СПб. : Гидрометеиздат, 1992. 318 с.
25. Шитиков В.К., Розенберг Г.С., Зинченко Т.Д. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации. Тольятти : Изд-во Самарского НЦ РАН, 2003. 463 с.
26. Энциклопедия Волгоградской области / под ред. О.В. Иншакова. Волгоград : Издатель, 2007. 446 с.
27. Научно-прикладной справочник : Основные гидрологические характеристики рек бассейна Нижней Волги / под ред. В.Ю. Георгиевского. Ливны : Издатель Мухаметов Г.В., 2015. 129 с.
28. Malécot G. Les mathématiques de l'hérédité. Paris : Masson & Cie, 1948. 63 p.
29. Шитиков В.К., Зинченко Т.Д., Розенберг Г.С. Макроэкология речных сообществ: концепции, методы, модели. Тольятти : Кассандра, 2011. 255 с.
30. Manni F., Guérard E., Heyer E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm” // *Human Biology*. 2004. Vol. 76, No. 2. PP. 173–190. doi: [10.1353/hub.2004.0034](https://doi.org/10.1353/hub.2004.0034)
31. Dickey D.A., Fuller W.A. Distribution of the estimators for autoregressive time series with a unit root // *Journal of the American Statistical Association*. 1979. Vol. 74. PP. 427–431. doi: [10.2307/2286348](https://doi.org/10.2307/2286348)
32. Legendre P., Legendre L. Numerical Ecology. Amsterdam : Elsevier Sci. BV, 2012. 1006 p.
33. Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., O’Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Henry M., Stevens H., Wagner H. vegan: Community Ecology Package // R package version. 2011. PP. 1–10.
34. Wood S.N. Generalized Additive Models: An Introduction with R, Second Edition. USA : CRC Press, 2017. 496 p.
35. Яковлев В.А., Ахметзянова Н.Ш., Кондратьева Т.А. Зообентос реки Казанка // *Экологические проблемы малых рек Республики Татарстан* / под ред. В.А. Яковлева. Казань : Фэн, 2003. С. 181–184.
36. Зинченко Т.Д., Головатюк Л.В., Загорская Е.П. Структурная организация сообществ макрозообентоса равнинных рек при антропогенном воздействии // *Биоиндикация экологического состояния равнинных рек*. М. : Наука, 2007. С. 113–128.
37. Головатюк Л.В. Видовой состав и структура сообществ макрозообентоса реки Сок // *Особенности пресноводных экосистем малых рек Волжского бассейна* / под ред. Г.С. Розенберга, Т.Д. Зинченко. Тольятти : Кассандра, 2011. С. 128–146.
38. Хаменкова Е.В., Тесленко В.А. Структура сообществ макрозообентоса и динамика их биомассы в реке Ола (северное побережье Охотского моря, Магаданская область) // *Зоологический журнал*. 2017. Т. 96, No. 1. С. 619–630. doi: [10.7868/S0044513417060071](https://doi.org/10.7868/S0044513417060071)

39. Богатов В.В., Никулина Т.В., Вшивкова Т.С. Соотношение биоразнообразия фито- и зообентоса в континууме модельной горной реки Комаровки (Приморский край, Россия) // Экология. 2010. No. 2. С. 134–140.
40. Gegužis R. Impact of flow energy distribution on the ecological status of rivers. Summary of doctoral dissertation. Kaunas : Akademija, 2013. 24 p.

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.; повторно 06.07.2020 г.;  
принята 21.01.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

#### Авторский коллектив:

**Головатюк Лариса Владимировна**, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории малых рек, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН (Россия, 445003, г. Тольятти, ул. Комзина, 10).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4773-5277>

E-mail: [gollarisa@mail.ru](mailto:gollarisa@mail.ru)

**Михайлов Роман Анатольевич**, канд. биол. наук, н.с. лаборатории популяционной экологии, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН (Россия, 445003, г. Тольятти, ул. Комзина, 10).

E-mail: [roman\\_mihaylov\\_1987@mail.ru](mailto:roman_mihaylov_1987@mail.ru)

**For citation:** Golovatyuk LV, Mikhailov RA. Spatial distribution of macrozoobenthos communities in a plain river of a semi-desert zone. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:131-150. doi: 10.17223/19988591/53/7 In Russian, English Summary

#### Larisa V. Golovatyuk, Roman A. Mikhailov

*Samara Federal Research Scientific Center, Russian Academy of Sciences*

*Institute of Ecology of the Volga River Basin, Russian Academy of Sciences, Tolyatti, Russian Federation*

#### Spatial distribution of macrozoobenthos communities in a plain river of a semi-desert zone

Current climate changes require special attention to the implementation of environmental activities in arid regions. The study of the biotic component of water bodies of such ecosystems and the patterns of their spatial distribution is an important area of scientific research. The river network of the semi-desert zone of the Russian Plain is one of the least studied lotic systems in the Lower Volga basin. In this river network, the plain Yeruslan River is of the greatest importance because it largely determines the environmental characteristics of this arid territory. Therefore, it is important to study the structural indicators and spatial dynamics of macrozoobenthos communities in the Yeruslan River. The aim of the work was to study species composition, the structural and quantitative indicators of macrozoobenthos from the source to the mouth of the Yeruslan River and to determine the conceptual belonging of the bottom communities of the plain river of the semidesert zone to a certain type of distribution.

The Yeruslan River (51°18'3"N, 47°46'19"E) flows through the semi-desert zone of the Russian Plain (Volograd region, Russia) and it is a tributary of Volgograd reservoir. The length of the Yeruslan River is 282 km, with a catchment area of 55700 km<sup>2</sup>. We collected samples of macrozoobenthos at 9 stations of the Yeruslan River (See Fig. 1) in June 2015 and July 2016. In the ripal zone, the integrated samples for quantitative macrozoobenthos analysis were taken using an Ekman-type grab sampler (surface area 25 cm<sup>2</sup>) in replicates (8X) and a handle blade trawl (0.2 m × 0.5 m). In the medial zone, samples were taken by an Ekman-type grab sampler (surface area 250 cm<sup>2</sup>) in replicates (2X). Samples were washed in the field using a mesh screen with 300-310-µm mesh

size and preserved in 4% formaldehyde. At each station of the Yeruslan River, we used field analytical instruments for measuring pH and oxygen content. Water samples were taken for hydrochemical analysis at different sections of the river (*See Table 1*). We used the model of isolation by distance (Malécot, 1948), Monmonier's maximum difference algorithm (Manni et al., 2004) and the Dickey-Fuller test (Dickey and Fuller, 1979) to perform statistical analysis of changes in the species structure of macrozoobenthos.

The Yeruslan River flows within the geochemical province of continental salinity, which is characterized by an evaporative type of natural water regime, leading to progressive accumulation of salts. In this research, we found out that water was brackish at several stations of the river (1250-1420 mg l<sup>-1</sup>) due to water drainage of saline soils. We revealed that the Yeruslan River is polluted with nitrite nitrogen (at station 1) and phosphorus compounds (at stations 4 and 8) but concentrations of ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, cadmium, copper, zinc and lead did not exceed the MPC. Comparative analysis has shown that from the source to the mouth of the river there are no significant changes in the speed of water velocity flow, and the physical and chemical conditions are specific for each station. In the river, we collected 132 species: 47 - Diptera, 20 - Oligochaeta, 11 - Mollusca, 11 - Grustacea, 11 - Coleoptera, 7 - Trichoptera, 7 - Heteroptera, 6 - Hirudinea, 4 - Odonata, 4 - Ephemeroptera, 1 - Lepidoptera, Hydracarina, Polychaeta and Megaloptera. The macrozoobenthos of the river is represented by limnophilic species in the upper, middle and lower reaches. This is due to the small slope of the Yeruslan River and the presence of permanent and temporary dams. In the mouth reaches, the macrozoobenthos communities included species of the Ponto-Caspian and Ponto-Azov zoogeographic complexes. At all stations of the river, Oligochaeta and Chironomidae were of high density. Also, in the river mouth, Mollusca were of high density (*See Fig. 2*). Statistical analysis of sequences of hydrobiological characteristics along the longitudinal gradient of the Yeruslan River using the Dickey-Fuller test showed that the presence of a stationary distribution trend with random "wandering" is typical of the series of total density and biomass of macrozoobenthos, the number of worms of the family Tubificidae, larvae of chironomids of the subfamily Tanytarsini and mayflies of the family Baetidae. For the other series of observations, the presence of a nonlinear trend is noted (*See Table 3 and Fig. 3*). The selection of a sequence of borders (barrier) between river communities within the ecosystem by Montmonier's method using a matrix of species distances by the Bray-Curtis method made it possible to identify the source (station 1) with a high level of nitritic nitrogen in the water as one of the specific areas. The second most important border separates station 3 with a low content of dissolved oxygen, and the third one allocates the mouth reaches (station 9) as an independent area, where there is a cohabitation of river and reservoir species (*See Fig. 4*). Based on the analysis of fauna and using statistical methods, we found out that macrozoobenthos communities do not change from the source to the mouth of the river in accordance with the "the river continuum concept". The habitat of taxa depends on local abiotic and biotic factors at each river station, therefore, we can assume that the distribution of macrozoobenthos communities, generally, corresponds to "the patch dynamics concept". At the same time, stations 1, 3 and 9 form fairly isolated hydrogeomorphological areas, which is postulated by the concept of "the functional process zones". It seems that the spatial distribution of macrozoobenthos communities in the Yeruslan River can be explained by a complex combination of two concepts: "the patch dynamics concept" and "the functional process zones". This type of distribution seems to be typical of plain rivers with very low water velocity and the presence of dams.

*The paper contains 4 Figures, 3 Tables and 40 References.*

**Keywords:** macrozoobenthos; lotic system; spatial distribution concepts; the Lower Volga basin.

**Funding:** This research was supported by Russian Foundation for Basic Research (Project No. 17-04-00135) and financed by the state contract of the Institute of Ecology of the Volga river basin, Russian Academy of Sciences (Project No. AAAA–A17-117112040040-3 “Assessment of modern biodiversity and forecast of its changes for the Volga basin ecosystems in the conditions of their natural and anthropogenic transformation») (direction 51 “Ecology of organisms and communities”)

**Acknowledgments:** The authors thank Alexander Prokin, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher of the IBIW RAS (Borok, Russia), for his help in identifying larvae and imago of Coleoptera and Heteroptera; Timur Popchenko, Researcher of the Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS (Samara, Russia), for determining the species composition of Oligochaeta; Peter Tuzovskiy, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher of the IBIW RAS (Borok, Russia), for identifying Hydrachnidia; Ekaterina Kurina, Cand. Sci. (Biol.), Researcher of the Institute of Ecology and Evolution RAS (Moscow, Russia), for identifying Crustacea; Ekaterina Belozerova, Cand. Sci. (Geogr.), Researcher of Moscow State University (Moscow, Russia), for determining soil particle size distributions.

*The Authors declare no conflict of interest.*

### References

1. Thorp JH, Thoms MC, DeLong MD. The riverine ecosystem synthesis: Biocomplexity in river networks across space and time. *River Research & Applications*. 2006;22:1216-1231. doi: [10.1002/rra.901](https://doi.org/10.1002/rra.901)
2. Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, Sedell JR, Cushing CE. The river continuum concept. *Can J Fisheries and Aquatic Sciences*. 1980;37:130-137. doi: [10.1139/f80-017](https://doi.org/10.1139/f80-017)
3. Dokulil MT. Potamoplankton and primary productivity in the River Danube. *Hydrobiologia*. 2014;729:209-227. doi: [10.1007/s10750-013-1589-3](https://doi.org/10.1007/s10750-013-1589-3)
4. Townsend CR. The patch dynamics concept of stream community ecology. *J North American Benthological Society*. 1989;8:36-50. doi: [10.2307/1467400](https://doi.org/10.2307/1467400)
5. Yodzis P. Competition, mortality, and community structure. *Community ecology*. Diamond J and Case T, editors. New York: Harper and Row Publ.; 1986. pp. 480-491.
6. Junk WJ, Wantzen KM. The flood pulse concept: new aspects, approaches and applications-an update. In: *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries*. Welcomme RL and Petr T, editors. Bangkok: Food and Agriculture Organization and Mekong River Commission, FAO Regional Office for Asia and the Pacific; 2004. pp. 117-149.
7. Gomi T, Sidle RC, Richardson JS. Understanding processes and downstream linkages of headwater streams. *BioScience*. 2002;52(10):905-916.
8. Benda L, Poff LR, Miller D, Dunne T, Reeves G, Pollock M, Pess G. Network dynamics hypothesis: Spatial and temporal organization of physical heterogeneity in rivers. *BioScience*. 2004;54:413-427. doi: [doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0413:TNDHHC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0413:TNDHHC]2.0.CO;2)
9. Thoms MC, Parsons M. Identifying spatial and temporal patterns in the hydrological character of the Condamine-Balonne River, Australia, using multivariate statistics. *River Research and Applications*. 2003;19:443-457. doi: [10.1002/rra.737](https://doi.org/10.1002/rra.737)
10. Ward JV, Tockner K. Biodiversity: towards a unifying theme for river ecology. *Freshwater Biology*. 2001;46:807-819. doi: [10.1046/j.1365-2427.2001.00713.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00713.x)
11. Melles SJ, Jones NE, Schmidt B. Review of theoretical developments in stream ecology and their influence on stream classification and conservation planning. *Freshwater Biology*. 2012;57:415-434. doi: [10.1111/j.1365-2427.2011.02716.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02716.x)
12. Vyas V, Bharose S, Yousuf S, Kumar A. Distribution of Macrozoobenthos in River Narmada near Water Intake Point. *J Natural Sciences Research*. 2012;2(3):18-24.

13. Sharma R, Kumar A, Vyas V. Diversity of Macrozoobenthos in Morand River - A Tributary of Ganjal River in Narmada Basin. *Int J Advanced Fisheries and Aquatic Science*. 2013;1(1):57-65.
14. Ihtimanska M, Varadinova E, Kazakov S, Hristova R, Naumova S, Pehlivanov L. Preliminary results about the distribution of macrozoobenthos along the Bulgarian stretch of the Danube river with respect to loading of nutrients, heavy metals and arsenic. *Acta Zoologica Bulgarica*. 2014;7:165-171.
15. Woodward G, Hildrew AG. Food web structure in riverine landscapes. *Freshwater Biology*. 2002;47:777-798.
16. Winemiller KO. Floodplain river food webs: generalizations and implications for fisheries management. In: *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries*. Welcomme RL and Petr T, editors. Bangkok: Food and Agriculture Organization and Mekong River Commission, FAO Regional Office for Asia and the Pacific; 2004. pp. 285-309.
17. Baturina NS. Functional structure of river ecosystem: the retrospective of the development of contemporary concepts (Review). *Biologiya vnutrennikh vod = Inland Water Biology*. 2019;1:3-11. doi: [10.1134/S0320965219010042](https://doi.org/10.1134/S0320965219010042) In Russian
18. Montgomery DR. Process domains and the river continuum concept. *American Water Resources Association*. 1999;35:397-410. doi: [10.1111/j.1752-1688.1999.tb03598.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1999.tb03598.x)
19. Connor EF, Simberloff D. The assembly of species communities: chance or competition? *Ecology*. 1979;60:1132-1140.
20. Shitikov VK, Zinchenko TD. Statistical analysis of structural variations of benthic communities and testing the hypothesis of river continuum. *Vodnye resursy = Water Resources*. 2014;41(5):543-552. doi: [10.7868/S0321059614050137](https://doi.org/10.7868/S0321059614050137)
21. Golovatyuk LV, Shitikov VK, Zinchenko TD. Spatial distribution features of bottom communities of a plain river in the Middle Volga river basin. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology* 2017;1:163-180. doi: [10.17223/19988591/40/10](https://doi.org/10.17223/19988591/40/10) In Russian, English Summary
22. Gladyshev MI, Kolmakova OV, Tolomeev AP, Anishchenko OV, Makhutova ON, Kolmakova AA, Kravchuk ES, Kolmakov VI, Sushchik NN, Glushchenko IA. Differences in organic matter and bacterioplankton between sections of the largest Arctic river: Mosaic or continuum? *Limnology and Oceanography*. 2015;60:1314-1331. doi: [10.1002/lno.10097](https://doi.org/10.1002/lno.10097)
23. *Doklad ob osobennostyakh klimata na territorii Rossiyskoy Federatsii za 2016 god* [Report on climate features in the Russian Federation for 2016]. Moscow: Roshidromet Publ.; 2017. 70 p. In Russian
24. *Rukovodstvo po gidrobiologicheskomu monitoringu presnovodnykh ekosistem* [Guidelines for hydrobiological monitoring of freshwater ecosystems]. Saint Petersburg: Hydrometeoizdat Publ.; 1992. 318 p. In Russian
25. Shitikov VK, Rosenberg GS, Zinchenko TD. Kolichestvennaya gidroekologiya: metody sistemnoy identifikatsii [Quantitative hydroecology: methods of system identification]. Togliatty: SamSC RAS Publ.; 2003. 463 p. In Russian
26. *Entsiklopediya Volgogradskoy oblasti* [Encyclopedia of the Volgograd region]. Inshakova OV, editor. Volgograd: Publ.; 2007. 446 p. In Russian
27. *Nauchno-prikladnoy spravochnik: Osnovnye gidrologicheskie kharakteristiki rek basseyna Nizhney Volgi* [Scientific and applied reference: Basic hydrological characteristics of rivers of the Lower Volga basin]. Georgievsky VY, editor. Livny: Mukhametov GV Publ.; 2015. 129 p.
28. Malecot G. *Matematika nasledstvennosti* [Mathematics of heredity]. Paris: Masson & Cie Publ.; 1948. 63 p. In France
29. Shitikov VK, Zinchenko TD, Rozenberg GS. Makroekologiya rechnykh soobshchestv: kontseptsii, metody, modeli [Macroecology of river communities: concepts, methods and models]. Togliatty: Cassandra Publ.; 2011. 255 p. In Russian

30. Manni F, Guérard E, Heyer E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology*. 2004;76(2):173-190. doi: [10.1353/hub.2004.0034](https://doi.org/10.1353/hub.2004.0034)
31. Dickey DA, Fuller WA. Distribution of the estimators for autoregressive time series with a unit root. *J American Statistical Association*. 1979;74:427-431. doi: [10.2307/2286348](https://doi.org/10.2307/2286348)
32. Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier Science; 2012. 1006 p.
33. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H, Wagner H. *Vegan: Community Ecology Package. R package version*. 2011:1-10.
34. Wood SN. *Generalized Additive Models: An Introduction with R*, Second Edition. USA: CRC Press; 2017. 496 p.
35. Yakovlev VA, Akhmetzyanova NSh, Kondrateva TA. Zoobentos reki Kazanka [Zoobentos of the Kazanka river]. In: *Ecological Problems of Small Rivers of the Republic of Tatarstan*. Yakovlev VA, editor. Kazan: FEN Publ.; 2003. pp. 181-184. In Russian
36. Zinchenko TD, Golovatyuk LV, Zagorskaya EP. Strukturnaya organizatsiya soobshchestv makrozoobentosa ravninnykh rek pri antropogennom vozdeystvi [Structural organization of communities of macrozoobenthos of lowland rivers under anthropogenic impact]. In: *Bioindikatsiya ekologicheskogo sostoyaniya ravninnykh rek* [Bioindication of the ecological state of lowland rivers]. Buharina OV and Rosenberg GS, editors. Moscow: Nauka Publ.; 2007. pp. 113-128. In Russian
37. Golovatyuk LV. Vidovoy sostav i struktura soobshchestv makrozoobentosa reki Sok [Species composition and structure of communities of macrozoobenthos of the Sok river]. In *Osobennosti presnovodnykh ekosistem malykh rek Volzhskogo basseyna* [Features of freshwater ecosystems of small rivers of the Volga basin]. Rosenberg GS and Zinchenko TD, editors. Togliatty: Cassandra Publ.; 2011. pp 128-146. In Russian
38. Khamenkova EV, Teslenko VA. Structure of macrozoobenthos communities and their biomass dynamics in the Ola river, northern coast of the Sea of Okhotsk, Magadan region. *Zoologicheskij zhurnal = Russian J Zoology*. 2017;96(1):619-630. doi: [10.7868/S0044513417060071](https://doi.org/10.7868/S0044513417060071) In Russian, English Summary
39. Bogatov VV, Nikulina TV, Vshivkova TS. Relationship between the biodiversity of phyto- and zoobenthos in the continuum of the model mountain river Komarovka (Primorye, Russia). *Russian J Ecology*. 2010;41(2):167-172. doi: [10.1134/S1067413610020098](https://doi.org/10.1134/S1067413610020098)
40. Geguzis R. Impact of flow energy distribution on the ecological status of rivers. Summary of doctoral dissertation. Kaunas: Aleksandras Stulginskis University, Akademija Publ.; 2013. 24 p. Available at: [https://www.vdu.lt/cris/bitstream/20.500.12259/114382/1/ramunas\\_geguzis\\_dd.pdf](https://www.vdu.lt/cris/bitstream/20.500.12259/114382/1/ramunas_geguzis_dd.pdf) (access: 11.03.2021)

*Received 16 April 2020; Revised 06 July, 2020;  
Accepted 21 January 2021; Published 31 March, 2021.*

#### Author Info:

**Golovatyuk Larisa V**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Samara Federal Research Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; Institute of Ecology of the Volga River Basin of the Russian Academy of Sciences, 10 Komzina Str., Tolyatti 445003, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4773-5277>

E-mail: [gollarisa@mail.ru](mailto:gollarisa@mail.ru)

**Mikhailov Roman A**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Samara Federal Research Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; Institute of Ecology of the Volga River Basin of the Russian Academy of Sciences, 10 Komzina Str., Tolyatti 445003, Russian Federation.

E-mail: [roman\\_mihaylov\\_1987@mail.ru](mailto:roman_mihaylov_1987@mail.ru)

УДК 574.583(28):581  
doi: 10.17223/19988591/53/8

Н.М. Минеева

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, Россия

## Оценка связи содержания хлорофилла и биогенных элементов в крупных равнинных водохранилищах

Исследование выполнено в рамках государственного задания No. АААА-А18-118012690096-1.

Приведены новые данные о соотношении содержания хлорофилла, общего фосфора и общего азота (откликах фитопланктона,  $Chl/P_{tot}$  и  $Chl/N_{tot}$ ) в водохранилищах Верхней Волги, полученные при проведении полевых исследований в летний период 2015–2018 гг. Установлено, что в Ивановском, Угличском и Рыбинском водохранилищах средние величины  $Chl/P_{tot}$  составляют  $0,48 \pm 0,06$ ,  $0,42 \pm 0,04$  и  $0,38 \pm 0,07$ ,  $Chl/N_{tot}$  –  $31,8 \pm 3,5$ ,  $31,4 \pm 2,8$  и  $24,9 \pm 2,7$  соответственно. Показано, что  $Chl/P_{tot}$  и  $Chl/N_{tot}$  тесно связаны между собой ( $R^2=0,67$ ), с содержанием хлорофилла ( $R^2 = 0,72$  и  $0,80$ ) и меняются в водах разной трофики, достигая максимальных значений в эвтрофных и высокоэвтрофных условиях. Отклики в незначительной степени зависят от гидрологических факторов, а также от содержания  $P_{tot}$  и  $N_{tot}$ , но закономерно изменяются по градиенту  $N_{tot}/P_{tot}$ . Ретроспективный анализ демонстрирует увеличение  $Chl/P_{tot}$  и  $Chl/N_{tot}$  в Ивановском и Угличском водохранилищах и значительные межгодовые колебания в Рыбинском водохранилище. Полученные результаты позволяют проанализировать связь развития фитопланктона с содержанием биогенных элементов, оценить эффективность их использования и обеспеченность ими клеток водорослей, сделать заключение, что фитопланктон Верхней Волги менее чувствителен к наличию азота и в большей степени зависим от присутствия соединений фосфора.

**Ключевые слова:** фитопланктон; хлорофилл; общий азот; общий фосфор; водохранилища Верхней Волги.

**Сокращения.**  $Chl a$  – хлорофилл  $a$ , мкг/л [Chlorophyll  $a$ ];  $Chl_{Cyan}$  – хлорофилл  $a$  цианопрокариот, мкг/л [Chlorophyll  $a$  of cyanoprokaryotes];  $Chl_{Bac}$  – хлорофилл  $a$  диатомовых водорослей, мкг/л [Chlorophyll  $a$  of diatoms];  $Chl_{Chl}$  – хлорофилл  $a$  зеленых водорослей, мкг/л [Chlorophyll  $a$  of green algae]; БЭ – биогенные элементы [Biogenic elements];  $N_{tot}$  – общий азот, мг/л [Total nitrogen];  $P_{tot}$  – общий фосфор, мкг/л [Total phosphorus];  $Cv$  – коэффициент вариации [the coefficient of variation];  $r$  – коэффициент корреляции [correlation coefficient];  $R^2$  – коэффициент детерминации [Coefficient of determination].

**Для цитирования:** Минеева Н.М. Оценка связи содержания хлорофилла и биогенных элементов в водохранилищах Верхней Волги // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 151–168. doi: 10.17223/19988591/53/8

## Введение

Водоросли планктона продуцируют основной фонд автохтонного органического вещества, играя ключевую роль в трансформации вещества и энергии в экосистеме водохранилищ Верхней Волги, которые являются объектами многолетних экологических исследований [1]. К главным факторам развития и функционирования фитопланктона относится обеспеченность клеток минеральным питанием. Вместе с содержанием фотосинтетических пигментов БЭ служат маркерами трофического статуса водоемов (см. сводку [2]). Многочисленные исследования влияния соединений азота и фосфора на фитопланктон проводились во второй половине XX в. при возросших темпах эвтрофирования водоемов. В результате получены необходимые для оценки состояния и прогноза изменений озерных экосистем универсальные количественные соотношения между содержанием БЭ и основного пигмента зеленых растений  $\text{Chl } a$  – показателя биомассы фитопланктона и трофического статуса водоемов [3, 4]. В последние годы на фоне процессов, происходящих в водных экосистемах в условиях глобального потепления, отмечен новый всплеск интереса к влиянию элементов минерального питания на развитие водорослей [5–9]. Большинство этих публикаций, как и ранее, посвящено озерам, данных для водохранилищ значительно меньше. Однако выявленные для озер зависимости и соотношения не всегда соблюдаются в водохранилищах – молодых импульсно-стабилизированных системах с высокой антропогенной нагрузкой, искусственным регулированием стока и своеобразием гидрологических условий [10].

Нашими исследованиями на водохранилищах Волги показано, что содержание  $\text{Chl } a$  редко и при невысоких коэффициентах корреляции связано с содержанием  $N_{\text{tot}}$  и  $P_{\text{общ}}$ , а также их минеральных форм [11, 12], что свидетельствует о сложном и многокомпонентном характере влияния БЭ на водоросли. В этих условиях более успешной оказалась попытка косвенной оценки этой связи через соотношение концентраций  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$ , названное «отклик фитопланктона» [13] и соответствующее термину «efficiency» [14]. Эти показатели, отражающие обеспеченность водорослей БЭ и эффективность использования последних [15], представляются полезными для получения количественных зависимостей при анализе состояния водоемов и прогнозировании изменений их трофического статуса. Первые сведения о соотношениях  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$  в водохранилищах Верхней Волги, относящиеся к 1980–1990 гг., приведены в наших публикациях [11, 12, 16]. К настоящему времени получены новые данные по содержанию хлорофилла и БЭ, позволившие проследить многолетние тенденции в развитии фитопланктона и вариации трофического статуса водохранилищ [17, 18].

Цель работы – проанализировать современные данные о соотношении хлорофилла и БЭ в водохранилищах Верхней Волги, оценить на их основе связь развития фитопланктона с содержанием БЭ и эффективность их использования в зависимости от факторов среды.

### Материалы и методики исследования

Материалом работы послужили 104 пробы, отобранные на 26 станциях Ивановского, Угличского и Рыбинского водохранилищ в августе 2015–2018 гг. Водохранилища Верхней Волги, крупные относительно мелководные водоемы (средняя глубина 3,4–5,6 м), расположены между 56°51' и 58°22' N, 35°55' и 38°25' E в лесной зоне в подзонах от хвойно-широколиственных лесов до южной тайги. Русловые Ивановское и Угличское водохранилища характеризуются сезонным регулированием стока и высокой интенсивностью водообмена (10,6 и 10,1 год<sup>-1</sup>), озеровидное Рыбинское – многолетним регулированием стока и замедленным водообменном (1,9 год<sup>-1</sup>) [1]. Водохранилища существенно различаются по степени зарастания высшей водной растительностью, занимающей 7,4 % акватории в Угличском водохранилище, 4,1 % – в Рыбинском и 29,2 % – в Ивановском (персональное сообщение В.Г. Папченкова).

Годы наблюдения в многолетнем ряду характеризовались как теплые. Температура воды, превышавшая средние многолетние показатели для августа [1], составляла 19,9–23,7 °С, и только в Рыбинском водохранилище в 2015 и 2017 гг. снижалась до 16,6 и 17,7 °С. При этом прохладный и дождливый летний сезон 2017 г. выделялся низкой средней температурой воздуха (12,1 против 13,5–14,6 °С в остальные годы). Средние величины прозрачности (0,8–1,1 м) и цветности воды (40–60 град.) типичны для водохранилищ, лишь в дождливом 2017 г. цветность увеличивалась до 70 град.

Анализ Chl *a* выполнен флуоресцентным методом [19] в интегральных пробах, для получения которых смешивали равные объемы воды, отобранной батометром Элморка из каждого метра водной толщи от поверхности до дна. Метод позволяет определять суммарное количество Chl *a* непосредственно в природной воде по его содержанию у основных представителей пресноводного фитопланктона – синезеленых (цианопрокариот), диатомовых и зеленых водорослей (Chl<sub>Цуан?</sub>, Chl<sub>Вас?</sub>, Chl<sub>Сhl</sub> соответственно). Данные по содержанию БЭ, полученные в те же сроки на тех же станциях И.Э. Степановой, приведены в совместной публикации [18]. При статистической обработке материала (расчете средних показателей, их погрешностей, коэффициентов корреляции и вариации, уравнений регрессии и построения графиков) использованы стандартные программные пакеты MS Excel и StatSoft STATISTICA. Для оценки тесноты связи показателей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия средних величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при его значениях, превосходящих табличные при 95%-ном уровне значимости ( $p < 0,05$ ).

### Результаты исследования и обсуждение

Гидрохимический режим в каскаде водохранилищ, образованных на реках, текущих в меридиональном направлении и пересекающих различные природные зоны, формируется при взаимодействии зональных и азональ-

ных факторов. Водохранилища Верхней Волги характеризуются высоким содержанием БЭ [1]. В годы исследования оно изменялось в близких пределах при одинаковом соотношении  $N_{tot}/P_{tot}$  и снижении средних величин  $P_{tot}$  и  $N_{tot}$  в Рыбинском водохранилище на 11 и 42 % соответственно (табл. 1).

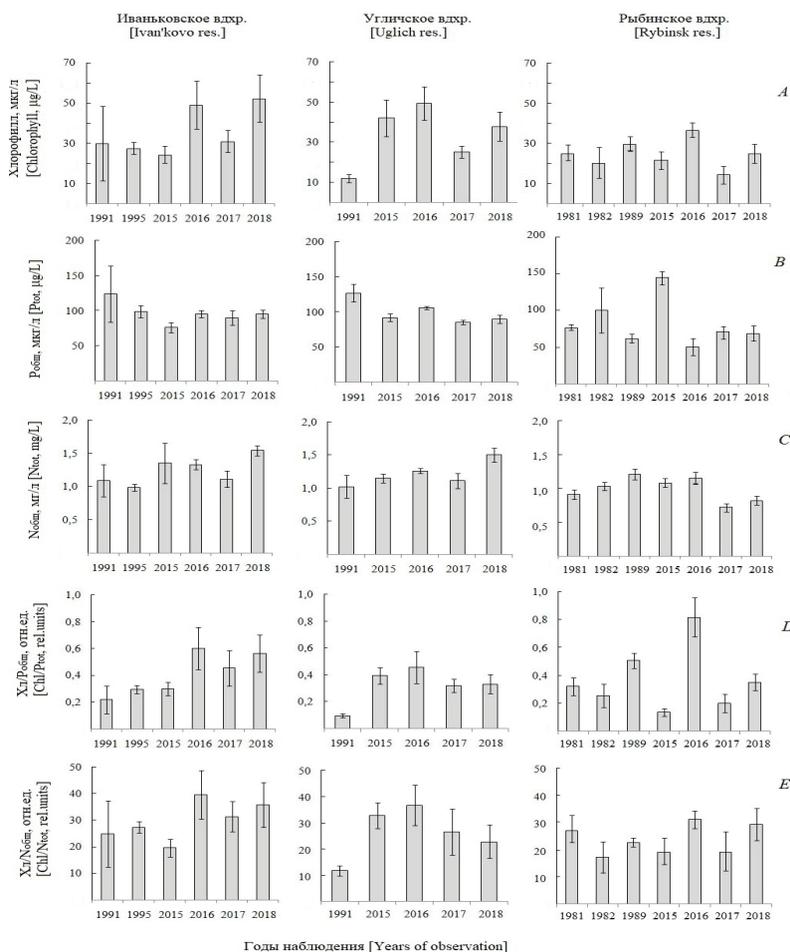
Таблица 1 [Table 1]

**Предельные (1) и средние (2) значения исследованных показателей  
в водохранилищах Верхней Волги (2015–2018 гг.)**  
[The limit (1) and mean ( $M \pm m_M$ ) (2) values of the studied parameters  
in the Upper Volga reservoirs (2015–2018)]

Показатель [Parameters]	Иваньковское вдхр. [Ivankovo Reservoir]		Угличское вдхр. [Uglich Reservoir]		Рыбинское вдхр. [Rybinsk Reservoir]	
	1	2	1	2	1	2
Chl <i>a</i> , µg/L	7,5–172	41,7±5,4	11,9–96,7	38,5±3,6	2,7–46,5	23,0±2,6
Chl <sub>Cyan</sub> , µg/L	0,5–137	26,2±4,4	4,0–82,1	27,4±3,0	<1–42,1	16,4±2,3
Chl <sub>Bac</sub> , µg/L	0,5–71,0	13,3±1,9	<1–53,8	9,7±1,6	<1–28,1	6,2±1,6
Chl <sub>Chl2</sub> , µg/L L	0,3–8,5	2,2±0,2	<1–3,8	1,4±0,1	<1–1,8	0,6±0,1
$P_{tot}$ , µg/L	31–153	90±3,0	63–124	93±3	31–165	84±9,0
$N_{tot}$ , mg/L	0,69–1,90	1,34±0,08	0,59–1,93	1,27±0,05	0,52–1,42	0,94±0,05
$N_{tot}/P_{tot}$	8–57	16±1,0	8–30	14±1,0	5–36	14±2,0
Chl/ $P_{tot}$	0,07–2,13	0,48±0,06 (0,33)	0,13–1,17	0,42±0,04 (0,41)	0,03–1,13	0,38±0,07 (0,23)
Chl/ $N_{tot}$	3–123	31,8±3,5 (23,1)	8–79	31,4±2,8 (31,0)	4–49	24,9±2,7 (24,7)

Концентрация  $P_{tot}$  незначительно менялась в Иваньковском и Угличском водохранилищах, в Рыбинском она увеличивалась в 2015 г. и снижалась в 2016 г. Более стабильное количество  $N_{tot}$  повсеместно снижалось в прохладном 2017 г. Содержание хлорофилла (рис. 1) типично для летнего максимума в сезонном цикле фитопланктона водохранилищ Верхней Волги [12].

Основной вклад в фонд Chl *a* вносит Chl<sub>Cyan</sub> (53–92% в Рыбинском водохранилище, 40–85 % в Угличском и 28–67 % в Иваньковском), вторую позицию занимает Chl<sub>Bac</sub> (6–40, 10–55 и 25–60 % соответственно), что согласуется с составом летних альгоценозов [20]. Минимальное содержание Chl<sub>Cyan</sub> и максимум Chl<sub>Bac</sub> повсеместно отмечены летом 2017 г. Межгодовые различия в развитии фитопланктона водохранилищ обусловлены гидрометеорологическими особенностями лет наблюдения и локальными погодными условиями [12, 17, 18]. Концентрации Chl *a* 20–30 мкг/л, полученные в Рыбинском водохранилище в 2015 и 2018 гг., в Угличском – в 2017 г., в Иваньковском – в 2015 г., соответствуют эвтрофной категории; 35–52 мкг/л (Рыбинское водохранилище в 2016 г., Угличское – в 2015, 2016, 2018 гг., Иваньковское – в 2016–2018 гг.) – гипертрофной, и только в 2017 г. в Рыбинском водохранилище они снижались до умеренно эвтрофного уровня – 13 мкг/л (рис. 1).



**Рис. 1.** Многолетние изменения исследованных показателей в водохранилищах Верхней Волги ( $(M \pm m_M)$ ); данные 1981–1995 гг. приведены по [11, 12])

[Fig. 1. Long-term changes of the studied parameters in the Upper Volga reservoirs ( $(M \pm m_M)$ ); data for 1981–1995 are given in [11, 12]]

$A - \text{Chl } a$ ,  $B - P_{\text{tot}}$ ,  $C - N_{\text{tot}}$ ,  $D - \text{Chl}/P_{\text{tot}}$ ,  $E - \text{Chl}/N_{\text{tot}}$

На этом фоне содержание Chl *a* на единицу общего фосфора и общего азота изменяется в широком диапазоне:  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  – от 0,03 до 2,13,  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$  – от 2,55 до 123 при максимальных в высоко эвтрофном Шошинском плесе Иваньковского водохранилища (август 2018 г.). Среднее для всего массива данных отношение  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  составляет  $0,43 \pm 0,03$ ,  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$  –  $29,8 \pm 1,9$  с коэффициентами вариации 77,0 и 63,9%. Преобладающие значения обоих индексов ограничены более узкими пределами:  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  – 0,10–0,50 (67% величин),  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$  – 10–40 (51%) (табл. 2). Эти показатели сопоставимы с полученными в водохранилищах Днепра [21], озерах Великобритании [15] и США [13], водохранилищах Миссури [22], озерах Флориды [23].

Таблица 2 [Table 2]

**Частота встречаемости (% общего числа наблюдений  $n$ )  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  в водохранилищах Верхней Волги (2015–2018 гг.)**  
**[Occurrence rate (% of total observations  $n$ ) of  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  and  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  in the Upper Volga reservoirs (2015–2018)]**

Показатель [Parameters]	Интервал [Limits]	Иваньковское вдхр. [Ivankovo Reservoir]	Угличское вдхр. [Uglich Reservoir]	Рыбинское вдхр. [Rybinsk Reservoir]
$n$	–	44	36	24
$\text{Chl/P}_{\text{tot}}$	<0,2	18,0	14,0	42,0
	0,2–0,5	48,0	64,0	33,0
	0,5–1	25,0	19,0	21,0
	>1	9,0	3,0	4,0
$\text{Chl/N}_{\text{tot}}$	<20	9,0	3,0	8,0
	20–50	73,0	19,0	33,0
	50–100	16,0	67,0	47,0
	>100	2,0	11,0	12,0

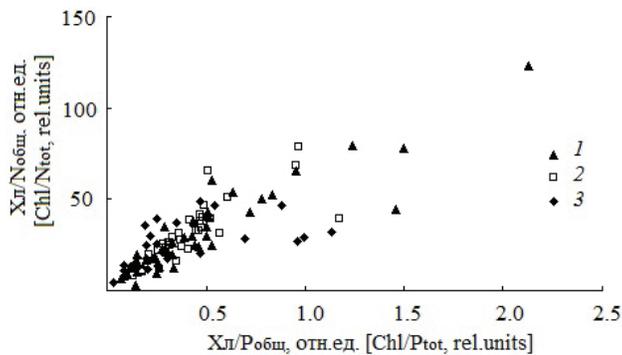
Осредненное за четыре года наблюдение  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$ , мало различается в Иваньковском и Угличском водохранилищах, но увеличивается в Рыбинском;  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  убывает в ряду Иваньковское, Угличское, Рыбинское водохранилища (см. табл. 1). Средние значения обоих откликов в Угличском водохранилище и  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  в Рыбинском равны своей медиане и характеризуются умеренной степенью изменчивости ( $C_v \sim 50\%$ ). Оба средних показателя в Иваньковском и  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  в Рыбинском водохранилище более вариабельны ( $C_v = 76\text{--}89\%$ ) и выше, чем их медианы, что свидетельствует о значительном разбросе данных под воздействием неконтролируемых или неучтенных факторов.

В каждом водохранилище прослеживаются межгодовые изменения  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  (см. рис. 1). Все максимальные показатели получены в 2016 г., а минимальные в Иваньковском водохранилище – в 2015 г., в Рыбинском – в 2015 и 2017 гг., в Угличском – в 2017 и 2018 гг. Средние величины откликов различаются в 1,4–2 раза и только  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  в Рыбинском водохранилище – шестикратно. Эти различия статистически значимы в Иваньковском и Рыбинском водохранилищах, но не значимы в Угличском водохранилище. Существенная вариабельность  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  в Рыбинском водохранилище может быть обусловлена его неустойчивым гидрологическим режимом – частым ветровым перемешиванием обширной мелководной акватории, меняющим внутреннюю фосфорную нагрузку.

Корреляционный анализ показывает, что  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  тесно связаны между собой (рис. 2). Коэффициенты корреляции составляют 0,73 в Рыбинском водохранилище, 0,91 – в Угличском, и 0,92 – в Иваньковском, а для трех водохранилищ в каждый год наблюдения (2015–2018) – соответственно 0,79, 0,76, 0,87 и 0,81. Оба отклика зависят от содержания хлорофилла – показателя развития фитопланктона, что объясняет их временные (межгодовые) и пространственные (по акватории каждого водохранилища) различия. Наиболее тесно  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  связаны с суммарным количеством  $\text{Chl } a$  и с

$\text{Chl}_{\text{Cyan}}$ , при этом коэффициенты корреляции в Рыбинском и Угличском водохранилищах выше, чем в Ивановском (табл. 3). В этом водоеме обильно развиваются макрофиты, которые могут конкурировать с водорослями за БЭ (влияние зарастаний на отклики установлено для датских озер [24]). Теснота связи не меняется в годы наблюдения, хотя в прохладном 2017 г. снижается содержание  $\text{Chl}_{\text{Cyan}}$  (обилие цианопрокариот) и увеличивается доля  $\text{Chl}_{\text{Bac}}$  (обилие диатомовых). Последний лишь умеренно коррелирует с обоими откликами, а коэффициенты регрессии для зависимости  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  от  $\text{Chl}_{\text{Bac}}$  выше, чем от  $\text{Chl}_{\text{Cyan}}$  (рис. 3). Это свидетельствует о более интенсивном потреблении БЭ диатомовым комплексом или более высоком выходе биомассы диатомей (хлорофилла) на единицу БЭ, особенно заметном для азота. Данная тенденция находит объяснение в экспериментах с культурами, показавших различную потребность в источниках минерального питания диатомовых водорослей и цианопрокариот [25] и более низкое поглощение азота на единицу биомассы последних [26]. Известно, что цианопрокариоты могут преодолевать дефицит азота за счет развития азотфиксирующих видов, а также характеризуются меньшей, по сравнению с диатомеями, потребностью в соединениях фосфора [27].

Из связи с хлорофиллом следует, что  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  меняются в водах разной трофии, которую считают важным фактором изменчивости откликов [28, 29]. Изменение откликов по трофическому градиенту установлено для водохранилищ Миссури [30]. Известно, что речные системы не испытывают дефицита БЭ [31], и водохранилища, созданные на крупных реках, сохраняют эту особенность. За счет значительной внешней и внутренней нагрузки волжские водохранилища характеризуются высоким содержанием БЭ, с которым редко коррелируют показатели развития фитопланктона, в частности содержание хлорофилла [11, 12, 18].



**Рис. 2.** Взаимосвязь  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  в водохранилищах Верхней Волги (1 – Ивановское, 2 – Угличское, 3 – Рыбинское.  $R^2 = 0,67$ )

[Fig. 2. Correlation between  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  and  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  in the Upper Volga reservoirs (1 – Ivankovo Reservoir, 2 – Uglich Reservoir, 3 – Rybinsk Reservoir.  $R^2 = 0,67$ )]

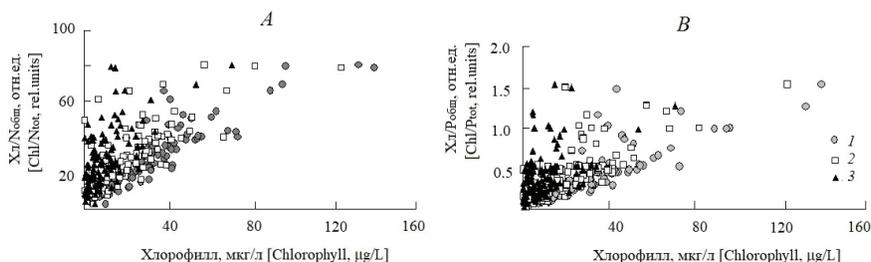
Таблица 3 [Table 3]

**Коэффициенты ранговой корреляции  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  (над чертой) и  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  (под чертой) с факторами среды в водохранилищах Верхней Волги [Rank correlation coefficients of  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  (above the line) and  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  (under the line) with environmental factors in the Upper Volga reservoirs]**

Показатель [Parameters]	Водохранилище [Reservoir]			Все водохранилища [All three reservoirs]			
	Иваньковское [Ivankovo]	Угличское [Uglich]	Рыбинское [Rybinsk]				
Годы [Years]	2015–2018			2015	2016	2017	2018
$n$	44	36	24	26	26	26	26
$r_{0,05}$	0,30	0,35	0,38	0,37	0,37	0,37	0,37
$\text{Chl } a$	<u>0,45</u> 0,44	<u>0,68</u> 0,73	<u>0,81</u> 0,87	<u>0,83</u> 0,97	<u>0,76</u> 0,98	<u>0,93</u> 0,88	<u>0,83</u> 0,80
$P_{\text{tot}}$	<u>-0,17</u> 0,05	<u>0,07</u> 0,21	<u>-0,75</u> -0,20	<u>-0,43</u> 0,13	<u>-0,60</u> -0,19	<u>-0,26</u> -0,12	<u>-0,01</u> 0,17
$N_{\text{tot}}$	<u>0,21</u> 0,05	<u>-0,12</u> -0,27	<u>0,23</u> -0,09	<u>0,34</u> 0,20	<u>0,25</u> 0,17	<u>0,11</u> -0,23	<u>0,07</u> -0,22
$N_{\text{tot}}/P_{\text{tot}}$	<u>0,36</u> 0,05	<u>-0,04</u> -0,39	<u>0,72</u> 0,11	<u>0,51</u> -0,04	<u>0,79</u> 0,31	<u>0,29</u> -0,14	<u>0,16</u> -0,35
Глубина [Depth]	<u>0,40</u> 0,31	<u>0,18</u> 0,14	<u>0,18</u> 0,01	<u>0,23</u> 0,12	<u>0,21</u> 0,26	<u>0,35</u> 0,23	<u>0,08</u> -0,21
Температура [Temperature]	<u>0,19</u> 0,13	<u>0,29</u> 0,33	<u>0,75</u> 0,39	<u>0,50</u> 0,28	<u>0,08</u> 0,30	<u>0,60</u> 0,56	<u>0,23</u> 0,14
Прозрачность [Transparency]	<u>-0,13</u> -0,19	<u>-0,33</u> -0,31	<u>0,04</u> -0,16	<u>-0,02</u> -0,38	<u>0,14</u> -0,12	<u>-0,44</u> -0,37	<u>-0,38</u> -0,29
Цветность [Color]	<u>-0,17</u> -0,13	<u>-0,13</u> -0,17	<u>-0,10</u> -0,18	<u>0,01</u> 0,07	<u>-0,28</u> -0,46	<u>-0,44</u> -0,43	<u>0,02</u> 0,09

Примечание.  $n$  – число наблюдений,  $r_{0,05}$  – табличное значение коэффициента корреляции ( $p < 0,05$ ).

[Note.  $n$  - Number of observations,  $r_{0,05}$  - Tabular value of the correlation coefficient ( $p < 0.05$ )].



**Рис. 3.** Связь  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$  (A) и  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  (B) с суммарным содержанием  $\text{Chl } a$  (1),  $\text{Chl}_{\text{Cyan}}$  (2) и  $\text{Chl}_{\text{Bac}}$  (3) в водохранилищах Верхней Волги в 2015–2018 гг. ( $n = 104$ ).

[Fig. 3. Relation of  $\text{Chl}/N_{\text{tot}}$  (A) and  $\text{Chl}/P_{\text{tot}}$  (B) to the total Chl content (1),  $\text{Chl}_{\text{Cyan}}$  (2), and  $\text{Chl}_{\text{Bac}}$  (3) in the Upper Volga reservoirs in 2015–2018 ( $n = 104$ )

$$\begin{aligned} \text{Chl}/N_{\text{tot}} &= 7,28 + 0,63 \text{Chl} \quad (R^2 = 0,80) \\ \text{Chl}/N_{\text{tot}} &= 13,3 + 0,69 \text{Chl}_{\text{Cyan}} \quad (R^2 = 0,64) \\ \text{Chl}/N_{\text{tot}} &= 19,3 + 1,04 \text{Chl}_{\text{Bac}} \quad (R^2 = 0,38) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Chl}/P_{\text{tot}} &= 0,059 + 0,010 \text{Chl} \quad (R^2 = 0,72) \\ \text{Chl}/P_{\text{tot}} &= 0,142 + 0,012 \text{Chl}_{\text{Cyan}} \quad (R^2 = 0,64) \\ \text{Chl}/P_{\text{tot}} &= 0,290 + 0,014 \text{Chl}_{\text{Bac}} \quad (R^2 = 0,21) \end{aligned}$$

В этих условиях именно хлорофилл адекватно отражает трофический статус водоемов и служит его маркером.

В водохранилищах Верхней Волги, как и в предыдущие годы [12], величины  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  увеличиваются с ростом трофии (табл. 4). Оба показателя статистически значимо не различаются в мезотрофных и умеренно эвтрофных водах, но становятся существенно выше в эвтрофных и высоко эвтрофных, свидетельствуя о более эффективном использовании БЭ. Можно предположить, что количество последних не ограничивает рост фитопланктона при его невысоком ( $<15$  мкг/л  $\text{Chl } a$ ) обилии, т.е. в мезотрофных и умеренно эвтрофных условиях, но усиливает конкуренцию за минеральное питание при интенсивном развитии водорослей, соответствующем эвтрофным и высоко эвтрофным условиям. При этом само содержание БЭ мало меняется по градиенту трофии: для общего азота в гипертрофных водах оно увеличивается на 9 %, в политрофных – еще на 19 %, а общего фосфора – на 10% и только в политрофных условиях (табл. 4). Известно, что в водах с разным трофическим статусом меняются трофические взаимодействия, которые также влияют на изменение откликов. Более низкие коэффициенты корреляции откликов с  $\text{Chl } a$  получены нами для Ивановского водохранилища, где обильно развивается высшая водная растительность. Верхний порог  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  отражает вариации биомассы фитопланктона [29], высокие  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  наблюдаются при «цветении» водоемов и увеличении обилия нитчатых цианопрокариот, а также при снижении пресса зоопланктона [15, 23].

Таблица 4 [Table 4]

**Изменение исследованных показателей в водах разной трофии, оцененной по  $\text{Chl } a$**   
[Changes in the studied parameters in waters of different trophy estimated by  $\text{Chl } a$ ]

Трофический статус [Trophic state]	$\text{Chl } a$ , $\mu\text{g/L}$	$\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$	$\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$	$\text{P}_{\text{tot}}$ , $\mu\text{g/L}$	$\text{N}_{\text{tot}}$ , $\text{mg/L}$	$\text{N}_{\text{tot}}/\text{P}_{\text{tot}}$
Мезотрофный [Mesotrophic]	$<10$	$0,15\pm 0,02$	$11,1\pm 1,3$	$79\pm 6$	$1,19\pm 0,22$	$16\pm 3$
Умеренно эвтрофный [Moderate eutrophic]	$10-15$	$0,19\pm 0,02$	$14,5\pm 1,8$	$90\pm 10$	$1,19\pm 0,10$	$13\pm 2$
Эвтрофный [Eutrophic]	$15-30$	$0,36\pm 0,02$	$25,8\pm 1,4$	$87\pm 4$	$1,16\pm 0,04$	$15\pm 1$
Гипертрофный [Hypertrophic]	$30-60$	$0,53\pm 0,03$	$35,7\pm 1,5$	$91\pm 5$	$1,29\pm 0,06$	$15\pm 1$
Политрофный [Polytrophic]	$>60$	$1,03\pm 0,12$	$66,2\pm 6,0$	$100\pm 13$	$1,54\pm 0,12$	$17\pm 3$

При значительном диапазоне  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  их максимальные значения должны отмечаться при повышенном содержании фосфора (по данным [22],  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}} > 1$  в основном при  $\text{P}_{\text{tot}} > 150$  мкг/л). В этой ситуации ведущей становится роль других лимитирующих факторов [23], в частности обеспеченность азотом или световые условия [29]. Однако в водохранилищах Верх-

ней Волги в реальном диапазоне  $P_{tot}$ , треть концентраций которого превышает 100 мкг/л, максимальные  $Chl/P_{tot}$  получены при  $P_{tot} < 50$  мкг/л. С ростом последнего до 100 мкг/л величины  $Chl/P_{tot}$  снижаются вдвое, а выше 100 мкг/л – еще на 20% (табл. 5). Такая тенденция естественным образом вытекает из способа расчета  $N_{tot}/P_{tot}$ .

К важным факторам изменчивости  $Chl/P_{tot}$  относят и содержание общего азота [23]. Но наши результаты указывают лишь на незначительное увеличение  $Chl/P_{tot}$  с ростом  $N_{tot}$ : в 1,3 раза при 1,0–1,5 мг/л и еще на 11% при более высоких концентрациях. Интересно отметить, что  $Chl/N_{tot}$  не меняется во всем диапазоне  $P_{tot}$  и  $N_{tot}$ . В то же время оба отклика демонстрируют выраженные изменения по градиенту  $N_{tot}/P_{tot}$ , который служит не только показателем биогенного лимитирования фитопланктона [32, 33], но и самостоятельным фактором, регулирующим развитие водорослей [34]. Несмотря на высокие концентрации  $N_{tot}$  и  $P_{tot}$  в водохранилищах Волги, рост водорослей может быть ограничен наличием доступных форм БЭ. Минимальная величина  $Chl/P_{tot}$  отмечена при вероятном азотном лимитировании ( $Chl/P_{tot} < 10$  по массе), а максимум  $Chl/P_{tot}$  и минимум  $Chl/N_{tot}$  – при дефиците фосфора ( $N_{tot}/P_{tot} > 15$ ) (табл. 5). Следовательно, эффективность использования БЭ определяется обеспеченностью ими клеток водорослей. При этом фитопланктон Верхней Волги, вероятно, менее чувствителен к наличию азота и в большей степени зависим от соединений фосфора.

Таблица 5 [Table 5]

**Изменение  $Chl/P_{tot}$  и  $Chl/N_{tot}$  по градиенту общего азота,  
общего фосфора и их соотношения  
[Changes in  $Chl/P_{tot}$  and  $Chl/N_{tot}$  along the gradient  
of total nitrogen, total phosphorus and their ratio]**

$N_{tot}$ , mg/L	$Chl/P_{tot}$	$Chl/N_{tot}$	$P_{tot}$ , $\mu$ g/L	$Chl/P_{tot}$	$Chl/N_{tot}$	$N_{tot}/P_{tot}$	$Chl/P_{tot}$	$Chl/N_{tot}$
<1	0,26± 0,03	24,2± 3,0	<50	0,76± 0,12	24,3±2,6	<10	0,20±0,03	24,4±3,8
1–1,5	0,35± 0,04	23,3± 2,2	50–100	0,34± 0,04	23,0±2,4	10–15	0,29±0,02	22,9±1,8
>1,5	0,39± 0,07	21,2± 4,0	>100	0,27± 0,03	23,0±2,3	15–20	0,45±0,10	25,9±6,1
						>20	0,52±0,10	18,5±2,8

От обобщенной картины отличается ситуация как в отдельных водоемах, так и во всех трех в разные годы наблюдения (см. табл. 3). В Рыбинском водохранилище  $Chl/P_{tot}$  тесно связан с содержанием  $P_{tot}$  и соотношением  $N_{tot}/P_{tot}$ ; в Угличском и Иваньковском водохранилищах от  $N_{tot}/P_{tot}$  статистически значимо зависят соответственно  $Chl/N_{tot}$  и  $Chl/P_{tot}$ . В межгодовом аспекте статистически значимая связь  $Chl/P_{tot}$  с  $P_{tot}$  и  $N_{tot}/P_{tot}$  выявлена в 2015 и 2016 гг., тогда как влияние  $N_{tot}$  на оба отклика не прослеживается. Корреляция откликов между собой и в ряде случаев с  $N_{tot}/P_{tot}$  подтверждает предположение

об их зависимости от обеспеченности водорослей биогенным питанием. В богатых фосфором озерах и водохранилищах низкие  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  и высокие  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  могут быть обусловлены также наличием минеральной взвеси, азотным лимитированием или трофическими взаимодействиями [15, 22]. При высоком содержании БЭ фитопланктон может не реагировать на их изменение и в большей степени испытывать влияние других факторов [35], однако таких сведений немного. Отклики могут зависеть от морфометрических показателей – глубины и площади водоемов, седиментационной нагрузки, от световых и температурных условий, цветности [15, 22, 36]. В водохранилищах Верхней Волги оба отклика в незначительной степени связаны с гидрологическими факторами (см. табл. 3). Эта тенденция прослеживается по 4-летним данным для каждого водохранилища, а также в межгодовом аспекте – по данным, объединенным для трех водохранилищ по годам наблюдения. Умеренная отрицательная корреляция с глубиной, отражающей условия перемешивания, для обоих показателей получена в Ивановском водохранилище. От температуры они зависят только в Рыбинском водохранилище ( $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  – тесно,  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  – умеренно), прозрачность и цветность на отклики не влияют. В межгодовом аспекте ситуация меняется. В 2015, 2016 и 2018 гг. получены отдельные статистически значимые коэффициенты корреляции  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  с температурой и прозрачностью воды,  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  – с прозрачностью и цветностью. В 2017 г. при прохладной погоде, большом количестве осадков и повышенной цветности воды [18] оба отклика зависят от температурных и подводных световых условий.

Ретроспективный анализ (см. рис. 1) показывает, что в Ивановском водохранилище в 2015 г. оба отклика сравнимы с показателями предыдущих лет, а в 2016–2018 гг. стали существенно выше. По-видимому, более высокая интенсивность потребления БЭ фитопланктоном водохранилища в последние годы связана с возросшей конкуренцией с макрофитами. В Угличском водохранилище оба отклика, как и содержание хлорофилла [17], значительно выросли за 25-летний период, что соответствует повышению трофического статуса и переходу мезотрофного ранее водохранилища в разряд эвтрофных [12]. В Рыбинском водохранилище средние величины  $\text{Chl/P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl/N}_{\text{tot}}$  сопоставимы с данными предыдущих лет [11] и лишь максимальные в 2016 г. превосходят их. Значительные межгодовые колебания откликов в этом водоеме обусловлены чередованием периодов с разными погодными условиями. Повышенная гидродинамическая активность, характерная для многоводных лет с преобладанием циклональной погоды, приводит к поступлению БЭ из донных отложений, тогда как при преобладании штилевых условий в жаркие маловодные годы их запас в толще воды может быть исчерпан.

### Заключение

В водохранилищах, созданных на крупных реках и не испытывающих биогенного дефицита, не всегда прослеживается непосредственная связь

между развитием фитопланктона (содержанием хлорофилла) и БЭ, что свидетельствует о сложном и многокомпонентном характере их влияния на водоросли. В этих условиях полезным инструментом для получения количественных зависимостей между Chl *a* и БЭ при анализе состояния водоемов и прогнозировании изменений их трофического статуса служат «отклики фитопланктона» – отношение концентраций  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$ . В Ивановском, Угличском и Рыбинском водохранилищах (Верхняя Волга) при широком диапазоне обоих показателей средние значения  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  составляют  $0,48 \pm 0,06$ ;  $0,42 \pm 0,04$  и  $0,38 \pm 0,07$ ,  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  –  $31,8 \pm 3,5$ ;  $31,4 \pm 2,8$  и  $24,9 \pm 2,7$  соответственно. В каждом водохранилище прослеживаются межгодовые изменения  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  тесно связанных между собой ( $R^2 = 0,67$ ), а также с содержанием Chl *a* ( $R^2 = 0,72$  и  $0,80$ ). Из связи с хлорофиллом следует, что отношения  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  меняются в водах разной трофии. Статистически значимо не различаясь в мезотрофных и умеренно эвтрофных условиях, отклики становятся существенно выше в эвтрофных и высоко эвтрофных, свидетельствуя о более эффективном использовании БЭ с ростом трофического статуса. Оба отклика в незначительной степени зависят от гидрологических факторов, а также от содержания  $\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{N}_{\text{tot}}$ , но демонстрируют выраженные изменения по градиенту  $\text{N}_{\text{tot}}/\text{P}_{\text{tot}}$ , который служит показателем биогенного лимитирования фитопланктона и фактором, регулирующим развитие водорослей. Ретроспективный анализ демонстрирует увеличение в последние годы  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  в двух русловых водохранилищах, что свидетельствует о возросшей интенсивности потребления БЭ фитопланктоном при конкуренции с макрофитами в Ивановском водохранилище и сопровождается повышением трофического статуса Угличского водохранилища, перешедшего из мезотрофного состояния в эвтрофное. Значительные межгодовые колебания откликов в озеровидном Рыбинском водохранилище обусловлены его неустойчивым гидрологическим режимом при чередовании периодов с разными погодными условиями, что приводит к поступлению БЭ из донных отложений при ветровом перемешивании и исчерпанию их запаса в толще воды при штилях. Таким образом, отношения  $\text{Chl}/\text{P}_{\text{tot}}$  и  $\text{Chl}/\text{N}_{\text{tot}}$  позволяют проанализировать связь развития фитопланктона с содержанием БЭ, оценить эффективность их использования и обеспеченность ими клеток водорослей, а также заключить, что фитопланктон Верхней Волги менее чувствителен к наличию азота и в большей степени зависим от соединений фосфора.

#### Литература

1. Экологические проблемы Верхней Волги / под ред. А.И. Копылова. Ярославль : ЯрГУ, 2001. 427 с.
2. Китаев С.П. Основы лимнологии для гидробиологов и ихтиологов. Петрозаводск : КарНЦ РАН, 2007. 394 с.
3. Vollenweider R.A. Das Nährstoffbelastungskonzept als Grundlage für den externen in den Eutrophierungsprozess stehender Gewässer und Talsperren // Z. Wasser und Abwasser Forsch. 1979. Bd. 12 (2). SS. 46–56.

4. Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. Paris : OECD, 1982. 155 p.
5. Havens K.E., Anneville O., Carvalho L., Coveney M.F., Deneke R., Dokulil M.T., Foy B., Gerdeaux D., Hampton S.E., Hilt S., Kangur K., Köhler J., Lammens E.H.H.R., Lauridsen T.L., Manca M., Miracle M.R., Moss B., Nöges P., Persson G., Phillips G., Portielje R., Romo S., Schelske C.L., Straile D., Tatrai I., Willén E., Winder M. Lake responses to reduced nutrient loading – an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies // *Freshwater Biol.* 2005. Vol. 50, No. 9. PP. 1747–1771. doi: [10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x)
6. Zhukova T.V. Long-term dynamics of phosphorus in the Narochanskies Lakes and factors determining it // *Water Resources*. 2013. Vol. 40, No. 5. PP. 510–517. doi: [10.1134/S0097807813050072](https://doi.org/10.1134/S0097807813050072)
7. Hao Y., Yu R., Zhang U., Yanget H. The relationship of chlorophyll-*a*, total nitrogen and total phosphorus in Wuliangshuai Lake // *Advanced Materials Research*. 2014. Vols. 955–959. PP. 1393–1396. doi: [10.4028/www.scientific.net/AMR.955-959.1393](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.955-959.1393)
8. Burson A., Stomp M., Greenwell E., Grosse J., Huisman J. Competition for nutrients and light: testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community // *Ecology*. 2018. Vol. 99, No. 5. PP. 1108–1118. doi: [10.1002/ecy.2187](https://doi.org/10.1002/ecy.2187)
9. Xiao W., Liu X., Irwin A.J., Laws E.A., Wang L., Chen B., Zeng Y., Huang B. Warming and eutrophication combine to restructure diatoms and dinoflagellates // *Water Research*. 2018. Vol. 128, No. 1. PP. 206–216. doi: [10.1016/j.watres.2017.10.051](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.051)
10. Одум Ю. Основы экологии. М. : Мир, 1975. 740 с.
11. Минеева Н.М., Разгулин С.М. О влиянии биогенных элементов на содержание хлорофилла в Рыбинском водохранилище // *Водные ресурсы*. 1995. Т. 22, No. 2. С. 218–223.
12. Минеева Н.М. Растительные пигменты в воде волжских водохранилищ. М. : Наука, 2004. 156 с.
13. Винберг Г.Г. Сравнительные биолимологические исследования, их возможности и ограничения // *Продукционно-гидробиологические исследования на внутренних водоемах*. Л. : Гидрометеиздат, 1986. С. 4–18.
14. Kalf J., Knoechel R. Phytoplankton and their dynamics in oligotrophic and eutrophic lakes // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1978. Vol. 9. PP. 475–495. doi: [10.1146/annurev.es.09.110178.002355](https://doi.org/10.1146/annurev.es.09.110178.002355)
15. Spears B.M., Carvalho L., Dudley B., May L. Variation in chlorophyll to total phosphorus ratio across 94 UK and Irish lakes: implications for lake management // *J. Environmental Management*. 2013. Vol. 115. PP. 287–294. doi: [10.1016/j.jenvman.2012.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.011)
16. Mineeva N.M. Evaluation of nutrient-chlorophyll relationships in the Rybinsk Reservoir // *Water Sci. Technol.* 1993. Vol. 28, No. 6. PP. 25–28. doi: [10.2166/wst.1993.0125](https://doi.org/10.2166/wst.1993.0125)
17. Mineeva N.M. Content of photosynthetic pigments in the upper Volga reservoirs (2005–2016) // *Inland Water Biology*. 2019. Vol. 12, No. 2. PP. 161–169. doi: [10.1134/S199508291902010X](https://doi.org/10.1134/S199508291902010X)
18. Mineeva N.M., Stepanova I.E., Semadeni I.V. Biogenic elements and their significance in the development of phytoplankton in reservoirs of the Upper Volga // *Inland Water Biology*. 2021. No. 14 (1). PP. 32–42. doi: [10.1134/S1995082921010089](https://doi.org/10.1134/S1995082921010089)
19. Гольд В.М., Гаевский Н.А., Шatrov И.Ю., Попельницкий В.А., Рыбцов С.А. Опыт использования флуоресценции для дифференциальной оценки содержания хлорофилла у планктонных водорослей // *Гидробиологический журнал*. 1986. Т. 22, No. 3. С. 80–85.
20. Корнева Л.Г. Фитопланктон водохранилищ бассейна Волги. Кострома : Костромской печатный дом; 2015. 284 с.
21. Kureyshevich A.V., Medved' V.A. Assessment of relationship between the content of chlorophyll *a* and the content of phosphorus in the water of the Dnieper reservoir // *Hydrobiol. Journ.* 2006. Vol. 42, No. 3. PP. 33–43. doi: [10.1615/HydrobJ.v42.i3.30](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v42.i3.30)
22. Jones J.R., Obrecht D.V., Perkins B.D., Knowlton M.F., Thorpe A.P., Watanabe S., Bacon R.R. Nutrients, seston and transparency of Missouri reservoirs and oxbow lakes: an

- analysis of regional limnology // *Lake Reserv. Manage.* 2008. Vol. 24, No. 6. PP. 155–180. doi: [10.1080/07438140809354058](https://doi.org/10.1080/07438140809354058)
23. Brown C.D., Hoyer M.V., Bachmann R.W., Canfield D.E. Nutrient-chlorophyll relationships: an evaluation of empirical nutrient-chlorophyll models using Florida and north-temperate lake data // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2000. Vol. 57. PP. 1574–1583. doi: [10.1139/f00-090](https://doi.org/10.1139/f00-090)
  24. Søndergaard M., Lauridsen T.L., Johansson L.S., Jeppesen E. Nitrogen or phosphorus limitation in lakes and its impact on phytoplankton biomass and submerged macrophyte cover // *Hydrobiologia.* 2017. Vol. 795. PP. 35–48. doi: [10.1007/s10750-017-3110-x](https://doi.org/10.1007/s10750-017-3110-x)
  25. Domingues R.B., Barbosa A.B., Sommer U., Galvao H.M. Ammonium, nitrate and phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural eutrophication // *Aquat. Sci.* 2011. Vol. 73, No. 3. PP. 331–343. doi: [10.1007/s00027-011-0180-0](https://doi.org/10.1007/s00027-011-0180-0)
  26. Marinho M.M., de Oliveira e Azevedo S.M.F. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans* // *Aquat. Ecol.* 2007. Vol. 41. PP. 525–533. doi: [10.1007/s10452-007-9118-y](https://doi.org/10.1007/s10452-007-9118-y)
  27. Suttle C.A., Harrison P.J. Ammonium and phosphate uptake rates, N : P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes // *Limnol. Oceanogr.* 1988. Vol. 33, No. 2. PP. 186–202. doi: [10.4319/lo.1988.33.2.0186](https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.2.0186)
  28. Seip K.L., Jeppesen E., Jensen J.P., Faafeng B. Is trophic state or regional location the strongest determinant for Chl-a/TP relationships in lakes? // *Aquat. Sci.* 2000. Vol. 62. PP. 195–204. doi: [10.1007/PL00001331](https://doi.org/10.1007/PL00001331)
  29. Filstrup C.T., Downing J.A. Relationship of chlorophyll to phosphorus and nitrogen in nutrient-rich lakes // *Inland Waters.* 2017. Vol. 7, No. 4. PP. 385–400. doi: [10.1080/20442041.2017.1375176](https://doi.org/10.1080/20442041.2017.1375176)
  30. Jones J.R., Obrecht D.V., Thorpe A.P. Chlorophyll maxima and chlorophyll: total phosphorus ratios in Missouri reservoirs // *Lake Reserv. Manage.* 2011. Vol. 27. PP. 321–328. doi: [10.1080/07438141.2011.627625](https://doi.org/10.1080/07438141.2011.627625)
  31. Vannote R.L., Minshall G.W., Cummins K.W., Sedell J.R., Cushing C.E. The river continuum concept // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1980. Vol. 37, No. 1. PP. 130–137. doi: [10.1139/f80-017](https://doi.org/10.1139/f80-017)
  32. Sakamoto M. Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake depth // *Arch. Hydrobiol.* 1966. Vol. 62, No. 1. PP. 1–28. doi: [10.1371/journal.pone.0095757](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095757)
  33. Claesson A. Research on recovery of polluted lakes. Algal growth potential and the availability of limiting nutrients // *Acta University Uppsala.* 1978. No. 61. PP. 1–7.
  34. Булгаков Н.Г., Левич А.П. Биогенные элементы в среде и фитопланктон: соотношение азота и фосфора как самостоятельный фактор регулирования структуры альгоценоза // *Успехи современной биологии.* 1995. Т. 115, No. 1. С. 13–23.
  35. Seip K.L., Sas H., Vermij S. Nutrient-chlorophyll trajectories across trophic gradient // *Aquatic Sci.* 1992. Vol. 54, No. 1. PP. 58–76.
  36. Havens K.E., Nürnberg G.K. The phosphorus-chlorophyll relationship in lakes: potential influences of color and mixing regime // *Lake and Reservoir Management.* 2004. Vol. 20, No. 3. PP. 188–196. doi: [10.1080/07438140409354243](https://doi.org/10.1080/07438140409354243)

*Поступила в редакцию 06.06.2020 г.; повторно 01.12.2020 г.;  
принята 21.01.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.*

**Авторский коллектив:**

**Минеева Наталья Михайловна**, д-р биол. наук, г.н.с. лаборатории альгологии, Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (Россия, 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок, д. 109).

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-4009-6217>

E-mail: [mineeva@ibiw.ru](mailto:mineeva@ibiw.ru)

**For citation:** Mineeva NM. Assessment of the relationship between chlorophyll content and biogenic elements in large lowland reservoirs. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:151-168. doi: 10.17223/19988591/53/8 In Russian, English Summary

**Natalya M. Mineeva**

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Russian Federation*

### **Assessment of the relationship between chlorophyll content and biogenic elements in large lowland reservoirs**

In the second half of the 20th century, with increased rates of eutrophication, universal quantitative relationships between the content of biogenic elements and chlorophyll (Chl) were obtained, which serves as a marker of algae biomass, as well as an indicator of the trophic status of water bodies. Most of these studies were performed on lakes, however, the patterns and ratios found for lakes were not always observed in reservoirs, young ecosystems with high development dynamics. Long-term studies of phytoplankton productivity are carried out in the reservoirs of the Upper Volga. These studies have shown that a direct relationship of Chl with total nitrogen ( $N_{tot}$ ) and phosphorus ( $P_{tot}$ ) is rarely found and is at low correlation coefficients. A more successful attempt was to indirectly assess this relationship using the ratios of  $Chl/P_{tot}$  and  $Chl/N_{tot}$ , which was named “phytoplankton response” (Vinberg, 1987) corresponding to the term “efficiency” (Kalf, Knoechel, 1978). Our first data on  $Chl/P_{tot}$  and  $Chl/N_{tot}$  in the Upper Volga reservoirs refer to 1980-1990 (Mineeva and Razgulin, 1995; Mineeva, 1993; Mineeva, 2004). At present, new data have been obtained, which have made it possible to follow long-term trends in the development of phytoplankton in the reservoirs of the Upper Volga in connection with the availability of biogenic elements under variations in the trophic status of the reservoirs.

Samples were collected in August 2015-2018 at 26 stations in three large reservoirs of the Upper Volga (56°51'-58°22'N, 35°55'-38°25'E): Ivankovo, Uglich and Rybinsk reservoirs. Chlorophyll content was determined by the fluorescence method (Gol'd et al., 1986) in integral water samples taken from the surface to the bottom. Data on biogenic elements obtained at the same time by Dr Irina Stepanova are given in our joint publication (Mineeva et al., 2021). The standard software packages for a personal computer were used for statistical processing (calculation of mean values and standard error of the mean ( $M \pm m_M$ ), correlation and variation coefficients, regression equations and graphing).

In this research, we revealed that nutrient content in the Upper Volga reservoirs varied within similar limits, the average  $N_{tot}/P_{tot}$  ratio was the same, and the average values of  $P_{tot}$  and  $N_{tot}$  decreased in Rybinsk reservoir. Chl content was typical of the summer phytoplankton maximum in the Upper Volga reservoirs (See Table 1).  $P_{tot}$  content did not change much in Ivankovo and Uglich reservoirs, but in Rybinsk reservoir it increased in 2015 and decreased in 2016. The more stable content of  $N_{tot}$  decreased a little in the cool 2017. Chl concentrations of 20-30  $\mu\text{g/L}$  obtained in Rybinsk reservoir in 2015 and 2018, in Uglich reservoir in 2017 and in Ivankovo reservoir in 2015 correspond to the eutrophic category; concentrations of 35-52  $\mu\text{g/L}$  (Rybinsk reservoir in 2016, Uglich reservoir in 2015, 2016 and 2018, Ivankovo reservoir in 2016-2018) - to hypertrophic category, and only in 2017 in Rybinsk reservoir did they decrease to a moderately eutrophic level of 13  $\mu\text{g/L}$  (See Fig. 1). It was found out that under these conditions Chl content per unit of biogenic elements varied in a wide range:

Chl/P<sub>tot</sub> from 0,03 to 2,13, Chl/N<sub>tot</sub> from 2,55 to 123, with maximum values in the highly eutrophic Shosha reach in Ivankovo reservoir (August 2018). Chl/N<sub>tot</sub> slightly differed in Ivankovo and Uglich reservoirs, but increased in Rybinsk reservoir; Chl/P<sub>tot</sub> decreased in the range of Ivankovo, Uglich and Rybinsk reservoirs (See Table 1). Most of both ratios belong to narrower limits: 0.10-0.50 for Chl/P<sub>tot</sub> (67% of all values) and 10–40 for Chl/N<sub>tot</sub> (51%) (See Table 2). The average Chl/P<sub>tot</sub> ratio for the entire data set is 0.43±0.03, and Chl/N<sub>tot</sub> is 29.8±1.9 with variation coefficients of 77.0 and 63.9%. The interannual changes (See Fig. 1) show that all the maximum ratios were obtained in 2016, while the minimum in Ivankovo reservoir was in 2015, in Rybinsk reservoir in 2015 and 2017 and in Uglich reservoir in 2017 and 2018. Our results demonstrate that both ratios correlate with each other (See Fig. 2), as well as with the Chl content (See Fig. 3). The correlation of both ratios with Chl weakens in Ivankovo reservoir, probably due to the abundant development of macrophytes. We can observe the same in all reservoirs in the cool 2017 with a decrease in Chl<sub>Cyan</sub> (the abundance of cyanoprokaryotes) and an increase in the proportion of Chl<sub>Bac</sub> (the abundance of diatoms). Both ratios are insignificantly dependent on hydrological factors as well as on P<sub>tot</sub> and N<sub>tot</sub> content, but the situation can change in individual reservoirs and in different years of observation (See Table 3). As it was demonstrated, both ratios increase with the growth of trophy estimated by Chl. They do not significantly differ in mesotrophic and moderately eutrophic waters, but become much higher in eutrophic and highly eutrophic waters, indicating a more efficient consumption of nutrients in the latter. At the same time, P<sub>tot</sub> and N<sub>tot</sub> change little along the Chl gradient (See Table 4). Chl/P<sub>tot</sub> decreases with the increase in P<sub>tot</sub> and grows slightly with the increase in N<sub>tot</sub>; Chl/N<sub>tot</sub> does not change over the entire range of P<sub>tot</sub> and N<sub>tot</sub>; but both ratios vary along the gradient of N<sub>tot</sub>/P<sub>tot</sub> (See Table 5) that serves as an indicator of the biogenic limitation of phytoplankton and a factor regulating the development of algae. A retrospective analysis shows significant interannual fluctuations of both ratios in Rybinsk reservoir and a tendency to increase them in Uglich and Ivankovo reservoirs (See Fig. 1).

Thus, Chl/P<sub>tot</sub> and Chl/N<sub>tot</sub> ratios are useful for analyzing the relationship between the development of phytoplankton and nutrient supply that is necessary in order to assess the efficiency of their use and their availability to algae cells. The results obtained allow us to conclude that phytoplankton in the Upper Volga reservoirs is less sensitive to the presence of nitrogen and more dependent on phosphorus.

*The paper contains 3 Figures, 5 Tables and 31 References.*

**Key words:** phytoplankton; chlorophyll; total nitrogen; total phosphorus; Chl/P<sub>tot</sub> and Chl/N<sub>tot</sub> ratios; reservoirs of the Upper Volga.

**Funding:** The work was carried out in the framework of the state task No. AAAA-A18-118012690096-1.

*The Author declares no conflict of interest.*

### References

1. *Ekologicheskie problemy Verhney Volgi* [Ecological Problems of the Upper Volga]. Kopylov AI, editor. Yaroslavl: YaGTU Publ.; 2001. 427 p. In Russian
2. Kitaev SP. *Osnovy limnologii dlya gidrobiologov i ixtiologov* [Basics of Limnology for Hydrobiologists and Ichthyologists]. Petrozavodsk: Karelskiy nauchniy centr RAN; 2007. 394 p. In Russian
3. Vollenweider RA. Das Nährstoffbelastungskonzept als Grundlage für den externen in den Eutrophierungsprozess stehender Gewässer und Talsperren. *Z. Wasser und Abwasser Forsch.* 1979;12(2):46-56.
4. *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control.* Paris: OECD Publ.; 1982. 155 p.

5. Jeppesen E, Sondergaard M, Jensen JP, Havens KE, Anneville O, Carvalho L, Coveney MF, Deneke R, Dokulil MT, Foy B, Gerdeaux D, Hampton SE, Hilt S, Kangur K, Köhler J, Lammens EHHR, Lauridsen TL, Manca M, Miracle MR, Moss B, Nöges P, Persson G, Phillips G, Portielje R, Romo S, Schelske CL, Straile D, Tatrai I, Willén E, Winder M. Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshwater Biol.* 2005;50(9):1747-1771. doi: [10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x)
6. Zhukova TV. Long-term dynamics of phosphorus in the Narochanskies Lakes and factors determining it. *Water Resources.* 2013;40(5):510-517. doi: [10.1134/S0097807813050072](https://doi.org/10.1134/S0097807813050072)
7. Hao Y, Yu R, Zhang U, Yanget H. The relationship of chlorophyll-a, total nitrogen and total phosphorus in Wuliangshuai Lake. *Advanced Materials Research.* 2014;955-959:1393-1396. doi: [10.4028/www.scientific.net/AMR.955-959.1393](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.955-959.1393)
8. Burson A, Stomp M, Greenwell E, Grosse J, Huisman J. Competition for nutrients and light: testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community. *Ecology.* 2018;99(5):1108-1118. doi: [10.1002/ecy.2187](https://doi.org/10.1002/ecy.2187)
9. Xiao W, Liu X, Irwin AJ, Laws EA, Wang L, Chen B, Zeng Y, Huang B. Warming and eutrophication combine to restructure diatoms and dinoflagellates. *Water Research.* 2018;128(1):206-216. doi: [10.1016/j.watres.2017.10.051](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.051)
10. Odum Yu. Osnovy ekologii [Fundamentals of Ecology]. Moscow: Mir Publ.; 1975. 740 p. In Russian
11. Mineeva NM, Razgulin SM. O vliyanií biogennyh elementov na soderzhanie hlorofilla v Rybinskom vodohranilishche [On the effect of nutrients on the content of chlorophyll in Rybinsk reservoir]. *Vodnye resursy.* 1995;22(2):218-223. In Russian
12. Mineeva NM. Rastitelnyie pigmenty v vode volzhskih vodohranilishch [Plant pigments in the waters of the Volga River Reservoirs] Moscow: Nauka Publ.; 2004. 158 p. In Russian
13. Vinberg GG. Sravnitel'nye biolimnologicheskie issledovaniya, ih vozmozhnosti i ogranicheniya [Comparative biolimnological studies, their possibilities and limitations]. In: *Produkcionno-gidrobiologicheskoe issledovaniya na vnutrennih vodoemah* [Production and hydrobiological studies in inland waters]. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ.; 1986. pp. 4-18. In Russian
14. Kalf J, Knoechel R. Phytoplankton and their dynamics in oligotrophic and eutrophic lakes. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1978;9:475-495. doi: [10.1146/annurev.es.09.110178.002355](https://doi.org/10.1146/annurev.es.09.110178.002355)
15. Spears BM, Carvalho L, Dudley B, May L. Variation in chlorophyll to total phosphorus ratio across 94 UK and Irish lakes: implications for lake management. *J Environmental Management.* 2013;115:287-294. doi: [10.1016/j.jenvman.2012.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.011)
16. Mineeva NM. Evaluation of nutrient-chlorophyll relationships in the Rybinsk Reservoir. *Water Sci Technol.* 1993;28(6):25-28. doi: [10.2166/wst.1993.0125](https://doi.org/10.2166/wst.1993.0125)
17. Mineeva NM. Content of Photosynthetic Pigments in the Upper Volga Reservoirs (2005-2016). *Inland Water Biology.* 2019;12(2):161-169. doi: [10.1134/S199508291902010X](https://doi.org/10.1134/S199508291902010X)
18. Mineeva NM, Stepanova IE, Semadeni IV. Biogenic elements and their significance in the development of phytoplankton in reservoirs of the Upper Volga. *Inland Water Biology.* 2021;14(1):32-42. doi: [10.1134/S1995082921010089](https://doi.org/10.1134/S1995082921010089)
19. Gold VM, Gaevskiy NA, Shatrov IYu, Popel'nickiy VA, Rybtsov SA. Opyit ispolzovaniya fluorestsentsii dlya differentsialnoy otsenki soderzhaniya khlorofilla a u planktonnyikh vodorosley [Experience of using fluorescence for differential evaluation of chlorophyll contents in planktonic algae]. *Gidrobiologicheskiiy zhurnal = Hydrobiological J.* 1986;22(3):80-85. In Russian
20. Korneva LG. Fitoplankton vodohranilishch basseyna Volgi [Phytoplankton of the Volga River Basin Reservoirs]. Kostroma: Dom pečati Publ.; 2015. 284 p. In Russian
21. Kureyshevich AV, Medved' VA. Assessment of relationship between the content of chlorophyll a and the content of phosphorus in the water of the Dnieper reservoirs. *Hydrobiological J.* 2006;42(3):33-43. doi: [10.1615/HydrobJ.v42.i3.30](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v42.i3.30)
22. Jones JR, Obrecht DV, Perkins BD, Knowlton MF, Thorpe AP, Watanabe S, Bacon RR. Nutrients, seston and transparency of Missouri reservoirs and oxbow lakes: An

- analysis of regional limnology. *Lake Reserv Manage.* 2008;24(6):155-180. doi: [10.1080/07438140809354058](https://doi.org/10.1080/07438140809354058)
23. Brown CD, Hoyer MV, Bachmann RW, Canfield DE. Nutrient-chlorophyll relationships: an evaluation of empirical nutrient-chlorophyll models using Florida and north-temperate lake data. *Can J Fish Aquat. Sci.* 2000;57:1574-1583. doi: [10.1139/f00-090](https://doi.org/10.1139/f00-090)
  24. Søndergaard M, Lauridsen TL, Johansson LS, Jeppesen E. Nitrogen or phosphorus limitation in lakes and its impact on phytoplankton biomass and submerged macrophyte cover. *Hydrobiologia.* 2017;795:35-48. doi: [10.1007/s10750-017-3110-x](https://doi.org/10.1007/s10750-017-3110-x)
  25. Domingues RB, Barbosa AB, Sommer U, Galvao HM. Ammonium, nitrate and phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural eutrophication. *Aquat Sci.* 2011;73(3):331-343. doi: [10.1007/s00027-011-0180-0](https://doi.org/10.1007/s00027-011-0180-0)
  26. Marinho MM, de Oliveira e Azevedo SMF. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. *Aquat Ecol.* 2007;41:525-533. doi: [10.1007/s10452-007-9118-y](https://doi.org/10.1007/s10452-007-9118-y)
  27. Suttle CA, Harrison PJ. Ammonium and phosphate uptake rates, N : P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes. *Limnol. Oceanogr.* 1988;33(2):186-202. doi: [10.4319/lo.1988.33.2.0186](https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.2.0186)
  28. Seip KL, Jeppesen E, Jensen J, Faafeng B. Is trophic state or regional location the strongest determinant for Chl-a/TP relationships in lakes? *Aquat Sci.* 2000;62:195-204. doi: [10.1007/PL00001331](https://doi.org/10.1007/PL00001331)
  29. Filstrup CT, Downing JA. Relationship of chlorophyll to phosphorus and nitrogen in nutrient-rich lakes. *Inland Waters.* 2017;7(4):385-400. doi: [10.1080/20442041.2017.1375176](https://doi.org/10.1080/20442041.2017.1375176)
  30. Jones JR, Obrecht DV, Thorpe AP. Chlorophyll maxima and chlorophyll: total phosphorus ratios in Missouri reservoirs. *Lake Reserv Manage.* 2011;27:321-328. doi: [10.1080/07438141.2011.627625](https://doi.org/10.1080/07438141.2011.627625)
  31. Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, Sedell JR, Cushing E. The river continuum concept. *Can J Fish. Aquat Sci.* 1980;37(1):130-137. doi: [10.1139/f80-017](https://doi.org/10.1139/f80-017)
  32. Sakamoto M. Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake depth. *Arch. Hydrobiol.* 1966;62(1):1-28. doi: [10.1371/journal.pone.0095757](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095757)
  33. Claesson A. Research on recovery of polluted lakes. Algal growth potential and the availability of limiting nutrients. *Acta University Uppsala.* 1978;61:1-7.
  34. Bulgakov NG, Levich AP. Biogennyye elementy v srede i fitoplankton: sootnoshenie azota i fosfora kak samostoyatel'nyy faktor regulirovaniya struktury al'gocenoz [Biogenic elements in the environment and phytoplankton: The ratio of nitrogen and phosphorus as an independent factor in regulating the structure of algocenosis]. *Uspekhi Sovremennoj Biologii = Biology Bulletin Reviews.* 1995;115(1):13-23. In Russian
  35. Seip KL, Sas H, Vermij S. Nutrient-chlorophyll trajectories across trophic gradient. *Aquatic Sci.* 1992;54(1):58-76.
  36. Havens KE, Nürnberg GK. The phosphorus-chlorophyll relationship in lakes: Potential influences of color and mixing regime. *Lake and Reservoir Management.* 2004;20(3):188-196. doi: [10.1080/07438140409354243](https://doi.org/10.1080/07438140409354243)

Received June 03, 2020; Revised December 01, 2020;  
Accepted January 21, 2021; Published March 31, 2021

#### Author info:

**Mineeva Natalya M**, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher of the Laboratory of Algology, Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, 109, Borok 152742, Nekouz region, Yaroslavl obl., Russian Federation.

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-4009-6217>

E-mail: [mineeva@ibiw.ru](mailto:mineeva@ibiw.ru)