МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВЕСТНИК ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

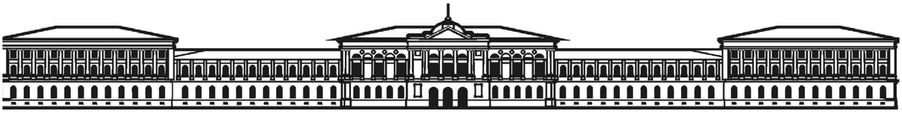
Tomsk State University Journal of Biology

Научный журнал

2013 № 3 (23)

Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС 77-29499
от 27 сентября 2007 г.

Журнал «Вестник Томского государственного университета. Биология»
входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов
и изданий, в которых должны быть опубликованы
основные научные результаты диссертаций
на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук»
Высшей аттестационной комиссии



ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Вестник Томского государственного университета. Биология
2013 № 3 (23)

СОДЕРЖАНИЕ

АГРОХИМИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

БОТАНИКА

ЗООЛОГИЯ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

ЭКОЛОГИЯ

Tomsk State University Journal of Biology

2013 № 3 (23)

CONTENTS

PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

ECOLOGY

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 7–18

АГРОХИМИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

УДК 631.47(282.256.6)
doi: 10.17223/19988591/23/1

М.В. Оконешникова

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН (г. Якутск)

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПРОГНОЗ ИЗМЕНЕНИЙ ПОЧВ ДОЛИНЫ СРЕДНЕЙ ЛЕНЫ (ЦЕНТРАЛЬНАЯ ЯКУТИЯ)

На основе результатов исследования почв и почвенного покрова в рамках выполнения инженерно-экологических изысканий для подготовки материалов по оценке воздействия на окружающую среду в составе проектной документации на строительство магистрального газопровода и мостового перехода через р. Лену получены данные, характеризующие состояние почвенного покрова и исходный / фоновый уровень загрязнения почв. По совокупности морфологических и физико-химических свойств наиболее устойчивыми к механическому воздействию и химическому загрязнению среди пойменных почв являются аллювиальные дерновые типичные почвы с мощностью дерново-гумусового горизонта до 20–30 см, оптимально увлажненные и уплотненные, и дерново-луговые незасоленные почвы среди почв низких надпойменных террас. Определены возможные изменения почв и почвенного покрова в зоне техногенного воздействия (возрастание глубины оттаивания сильнольдистой мерзлоты, термокарст, усиление эрозионных процессов, повышенная опасность устойчивого накопления элементов-загрязнителей).

Ключевые слова: *многолетняя мерзлота; почвенный покров; почвы; нарушение; загрязнение; мониторинг.*

Введение

Строительство крупных подземных и наземных линейных сооружений в долине средней Лены за последнее десятилетие приводит к нарушению естественного состояния окружающей среды (ОС). В 2003–2004 гг. для газификации сельских населенных пунктов правобережья р. Лены проведена прокладка первой (основной) нитки подводного перехода магистрального газопровода через р. Лену общей протяженностью 16,8 км, в том числе около 2 км по русловой части реки. В 2009 г. с целью обеспечения безопасности и надежности газоснабжения протянута вторая (резервная) нитка газопровода. В настоящее время завершается строительство железнодорожной линии Томмот – Якутск общей протяженностью более 370 км, обсуждается проект строительства уникального железнодорожно-автомобильного моста через р. Лену длиной около 3 км.

Техногенное воздействие на ОС в условиях зоны многолетней мерзлоты и сурового климата Центральной Якутии имеет определенную специфику и связано с активизацией криогенных явлений и существенной трансформацией почв и почвенного покрова. Сотрудниками Института биологических проблем криолитозоны СО РАН в 2002 и 2007 гг. выполнены инженерно-экологические изыскания для подготовки материалов по оценке воздействия на ОС в составе проектной документации на строительство магистрального газопровода и мостового перехода через р. Лену. В рамках проведенных работ получены данные, характеризующие состояние почвенного покрова до начала освоения.

Цель исследования – изучение исходного состояния и прогноз возможных негативных изменений почв и почвенного покрова долины средней Лены при техногенном воздействии.

Материалы и методики исследования

Район исследований расположен в центральной, прилегающей к г. Якутску, части долины р. Лены (61°5'с.ш.) и охватывает все геоморфологические уровни пойменного комплекса и низкие (I и II) надпойменные террасы на левом и правом берегах. Пойма занимает большую часть территории (84%) и имеет волнистый ложбинно-грядовый мезорельеф, местами переходящий в широкие и более ровные пространства, особенно в островной ее части. По направлению от русла реки к надпойменной террасе выделяются три уровня поймы, отличающиеся друг от друга различными высотами над меженным уровнем реки, разной продолжительностью пойменного режима и характером рельефа:

а) низкая пойма высотой до 4 м является наиболее молодым элементом долины и находится на стадии формирования. Слабо закрепленные песчаные косы, пляжи и низкие насыпные острова часто меняют очертания и местоположения, что объясняется интенсивностью русловых процессов;

б) средняя пойма (4–6 м) занимает прирусловые пространства с типичным ложбинно-грядовым рельефом. Она заливается не только в период весеннего половодья, но и водами высоких летних паводков;

в) высокая пойма (6–9 м) занимает наиболее повышенные участки поймы и заливается только в годы с высоким половодьем. За исключением русел действующих проток, рельеф имеет мягкие очертания и большую часть высокой поймы занимают ровные пространства.

Надпойменные террасы высотой 10–12 м имеют в основном слабоволнистый рельеф, относительные колебания высот не превышают 2,0–2,5 м.

На формирование рельефа большое влияние оказывает многолетняя мерзлота, мощность которой доходит до 180–360 м [1]. Залегая на небольшой глубине, она находится в тесной связи с почвенно-климатическими условиями. В среднем глубина сезонного оттаивания составляет 1,1–1,5 м, на песчаных почвах склонов южной экспозиции может доходить до 3 м. Непосредственное воздействие мерзлоты на рельеф сказывается в значительной заболоченности поймы и надпойменной террасы, в развитии мерзлотного кочкарного рельефа, форм вспучивания термокарстовых и просадочных котловин.

Почвообразующие породы сложены песками и супесями, перекрытыми лессовидными суглинками. По гранулометрическому составу суглинки неоднородны, в них встречаются прослойки песков и супесей, галька. Как правило, лессовидные суглинки насыщены карбонатами Ca и Mg, легкорастворимыми солями, гипсом, тогда как песчаные породы обычно не содержат карбонатов и в них мало солей.

Климат резко-континентальный с продолжительной суровой зимой и коротким жарким летом. Зима продолжается в среднем 210 дней (со второй декады октября по конец апреля), снежный покров достигает 30–40 см. Лето длится с конца мая до начала сентября. Среднемесячная температура воздуха самого теплого месяца года (июля) составляет +18,5°. В отдельные дни максимальная температура воздуха достигает +38°. Среднемесячная температура воздуха самого холодного месяца (января) –44,5°. Годовое количество осадков составляет 200–220 мм, из них за вегетационный период (с середины мая до середины сентября) выпадает 130–140 мм [2].

На всей территории преобладает луговая растительность. Древесно-кустарниковая растительность из различных видов ивы, красной смородины, шиповника иглистого и березы плосколистной занимает менее 1/3 части от общей площади территории. Большая часть средней и низкой поймы занята настоящими разнотравно-ячменными и разнотравно-пырейными лугами. Меньшее распространение имеют лисохвостные, кострецовые и полевицевые луга. В понижениях поймы широко встречаются кочковатые осоковые и осоково-вейниковые заболоченные луга. Биологическая продуктивность лугов на разных уровнях поймы в связи с изменением увлажнения почв в годы исследований составляла 24 ц/га сена на высокой пойме и 46–58 ц/га на ежегодно затапливаемых островах [3]. Остепненные лапчатково- и пырейно-твердоватоосочковые луга, широко распространенные на надпойменной террасе, реже на высокой пойме, частично распаханы и сильно изменены пастбищным и антропогенным воздействием.

Почвенное обследование проводилось методом маршрутов, разрезы закладывались на основных элементах рельефа и растительных группировках. Название почвенных разностей устанавливалось по региональной классификации, разработанной Л.Г. Еловской [4]. Физико-химические свойства и гранулометрический состав почв определялись общепринятыми методами в аналитической лаборатории ИБПК СО РАН: pH водный – на pH-метре Level 1 (WTW, Germany), общий углерод – по Тюрину, обменные Ca^{2+}, Mg^{2+} и Na^{+} – по Гедройцу, P_2O_5 – по Гинзбург-Артамоновой, K_2O – по Масловой, легкорастворимые соли методом водной вытяжки, гранулометрический состав – по Качинскому [5–7]. Валовое содержание тяжелых металлов определялось методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS Elan DRS II PerkinElmer (США), нефтепродуктов – методом ИК-спектрометрии (ПНДФ 16.1:2.2.22-98) в Хабаровском инновационно-аналитическом центре Института тектоники и геофизики Дальневосточного отделения РАН.

Результаты исследования и обсуждение

В зоне техногенного воздействия почвы пойменного комплекса представлены типичными, глеевыми, глееватыми, черноземовидными и перегнойными подтипами аллювиальных дерновых почв. Слаборазвитые слоистые почвы, в профиле которых не выражены генетические горизонты и отсутствует типичный для пойменных почв дерново-гумусовый горизонт, встречаются на самых молодых участках низкой поймы около русла реки и на уступах к протокам.

Аллювиальные дерновые типичные почвы составляют основной фон почвенного покрова и широко распространены под настоящими и слабо остепненными не ежегодно заливаемыми лугами средней и высокой поймы. В морфологическом строении эти почвы характеризуются наличием дернового и гумусо-аккумулятивного горизонтов суммарной мощностью до 30 см, слоистостью профиля с чередованием отложений различного гранулометрического состава, наличием пятен ожелезнения и слабых признаков оглеения в средней и нижней частях. Почвы плодородны: им свойственна нейтральная реакция среды, обусловленная значительным накоплением обменных оснований, в составе которых преобладают катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (табл. 1). Аккумуляция элементов минерального питания растений носит биогенный характер, причем фосфора намного больше, чем калия, что связано с малой растворимостью и слабой подвижностью в профиле большинства почв минеральных соединений фосфора. Эти почвы не засолены, в редких случаях содержат небольшое количество солей. Распределение пылеватых и иловатых частиц в почвенном профиле свидетельствует о накоплении их в верхних, наиболее гумусированных горизонтах и резком снижении содержания с глубиной. Подобный характер распределения вызван ограниченной прогреваемостью и особенностями мерзлотного гумусообразования [8] дополнительно с поступлением речного наилка.

По ряду морфологических и химических свойств от типичных подтипов отличаются дерновые черноземовидные почвы, развитые на наиболее повышенных участках высокой поймы под пологом остепненных злаково-твердоосочковых лугов, заливаются не чаще одного раза в десятилетие. Эти почвы высокогумусированы, пропитаны карбонатами, имеют щелочную реакцию среды и часто засолены. Отмеченные признаки на фоне легкосуглинистого гранулометрического состава указывают на слабое проявление аллювиального процесса. Почвы плодородны, хорошо оструктурены, обладают благоприятными агрофизическими свойствами и составляют основную часть освоенных почв поймы (широко используются под овощные культуры).

Таблица 1

Химические свойства мерзлотных почв

Горизонт	Глубина, см	pH водный	Гумус, %	Обменные, мг-экв./100 г почвы			Подвижные, мг/100 г почвы		Сумма солей, %
				Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^{+}	P_2O_5	K_2O	
1. Почвы поймы. Аллювиальная дерновая типичная (разрез 11)									
A	3–30	7,2	6,1	36,4	19,3	3,7	15,5	4,6	0,2
B	30–53	7,3	2,7	37,9	25,2	4,3	12,5	3,1	0,1
BC	53–100	7,2	1,8	19,4	19,4	4,2	9,7	1,5	0,1
Аллювиальная дерновая глееватая (разрез 12)									
A	0–20	7,3	5,4	25,5	20,9	3,0	6,5	5,5	0,2
B	20–61	7,2	1,8	19,6	19,6	2,8	5,5	2,1	0,1
BC_g	61–100	7,4	2,1	22,8	14,7	2,8	5,2	1,5	0,1
Аллювиальная дерновая черноземовидная (разрез 5)									
A_{ca}	3–19	7,9	8,7	26,2	25,7	3,9	12,4	10,3	0,4
AB_{ca}	19–31	7,3	2,1	16,8	24,5	2,7	7,5	4,7	0,1
B_g	31–93	7,3	0,9	14,6	16,4	2,4	6,7	4,5	< 0,1
C	93–113	6,9	0,1	8,6	8,6	2,2	4,7	1,6	< 0,1
Аллювиальная дерновая перегнойная (разрез 7)									
AO	1–18	7,6	19,7*	69,3	46,2	10,9	16,0	15,8	0,5
AB_g	18–35	7,6	10,7	46,8	24,9	4,1	5,5	3,1	0,2
B_g	35–50	7,0	7,1	23,1	18,7	2,5	7,7	4,0	0,1
2. Почвы надпойменной террасы. Дерново-луговая глееватая (разрез 3)									
A	3–23	7,1	6,9	17,5	32,7	3,8	7,5	14,6	0,2
AB_g	23–35	6,7	2,4	15,7	24,7	1,9	6,2	8,1	< 0,1
B_g	35–76	6,7	2,2	10,7	15,3	2,0	5,0	3,1	< 0,1
BC_g	76–108	6,6	1,9	11,9	13,3	1,1	7,7	4,6	< 0,1
Лугово-черноземная сильносолончаковатая (разрез 14а)									
A	0–5	7,9	6,6	–	–	–	9,7	11,2	1,0
AB	5–16	7,9	6,4	–	–	–	5,2	6,5	1,0
B_{ca}	16–84	8,4	1,9	16,2	20,2	5,2	7,5	4,6	0,4
BC	84–100	8,0	1,7	15,7	8,5	3,2	10,5	4,6	0,2
Черноземно-луговая сильносолончаковатая (разрез 13а)									
A	0–10	7,8	9,1	–	–	–	9,25	14,3	1,2
AB_{ca}	10–23	8,5	6,6	–	–	–	3,0	9,6	1,5
B_{ca}	23–90	8,5	1,5	7,6	30,6	6,6	8,0	4,6	0,2
BC	90–100	8,6	0,3	8,0	10,0	3,4	4,7	8,1	0,2
Палевая серая (разрез 1)									
AO	1–16	7,3	16,4*	70,5	24,2	5,7	4,7	14,2	0,2
B_{ca}	16–67	7,7	1,4	15,7	10,9	2,6	2,5	3,1	0,1
C	67–105	6,8	0,1	5,2	6,5	1,1	2	1,5	< 0,1

Примечание. Прочерк означает, что в данных образцах обменные катионы не определены; * Потеря при прокаливании.

Наименьшей глубиной оттаивания, сильновлажным профилем со стойкими признаками оглеения в виде сизых и ржавых тонов окраски, начиная с верхнего минерального горизонта до мерзлоты, высоким содержанием органического вещества по всему профилю отличаются дерновые перегнойные подтипы, развитые под травянисто-кустарниково-лесными ассоциациями средней и низкой поймы. Надмерзлотный оглеенный горизонт Bg в связи с большой увлажненностью слабо уплотнен (плотность сложения 1,0 г/см^3, общая порозность 58%) из-за специфики посткриогенной текстуры мерзлотных почв в связи с образованием полостей ледяными прослойками при протаивании [9].

На низких надпойменных террасах комплексность почвенного покрова обусловлена слабой дренированностью территории, неоднородностью почвообразующих пород, увалисто-лощинным характером рельефа, вследствие чего происходят значительные перераспределения влаги и тепла, неодинаковая скорость протаивания мерзлоты по элементам рельефа. На пологих склонах увалов под лугово-степной растительностью развиты лугово-черноземные почвы, в депрессиях (лощинах) – черноземно-луговые, дерново-луговые почвы и их глееватые разновидности. На пониженных участках второй надпойменной террасы под травяно-кустарниковыми ассоциациями развиты дерново-луговые почвы. На повышенных элементах рельефа второй надпойменной террасы правого берега р. Лены под сосново-березовым лесом с редкой примесью лиственницы встречаются палевые серые почвы, ранее называемые В.Г. Зольниковым [10] переходными от палевых к луговым.

Наши исследования показали, что практически все лугово-черноземные и черноземно-луговые почвы в поверхностных слоях содержат легкорастворимые соли в количествах, достаточных для отнесения их к ряду засоленных (табл. 1). Причинами широкого проявления процессов засоления в почвах низких надпойменных террас являются недостаток влаги, слабое развитие или отсутствие процессов нисходящего и бокового внутрипочвенного стока, активная трансформация восходящих растворов вверх по почвенному профилю. Вертикальная трансформация почвенных растворов в мерзлотных луговых почвах формируется не только летом в периоды интенсивного расхода воды на испарение, но и в осенне-зимний период под влиянием температурного градиента. Поскольку промерзание почвы сверху идет быстрее, чем снизу, почвенная влага с растворенными в ней солями передвигается в основном вверх по профилю, существенно увеличивая засоление верхних горизонтов. Ранее проведенными исследованиями установлено, что засоление почв происходило еще на стадии высокой поймы, когда увлажненные выше наименьшей влагоемкости на глубину сезоннопротаивающего слоя пойменные почвы, расходуя влагу на испарение и транспирацию, сингенетично накапливали соли в верхних слоях в течение сотен лет. На фазе надпойменных террас соли перераспределяются поверхностными (атмосферными) и, реже, надмерзлотными водами по элементам рельефа [11, 12]. Тип засоления хлоридно-сульфатный, что следует объяснить главенствующей ролью в солевом составе восходящих растворов сульфатов и хлоридов, так как растворимость их больше растворимости карбонатов и перемещаются они выше по самым тонким капиллярам и в виде пленок по поверхности гидрофильных частиц [13]. Реакция среды сильнозасоленных лугово-черноземных и черноземно-луговых почв щелочная, содержание гумуса в верхних горизонтах высокое, обеспеченность подвижными формами фосфора и калия средняя. Гранулометрический состав слоистый, чередуются слои суглинка, супеси и песка, в отличие от почв поймы, мощность песчаных слоев значительно уменьшается и нижележащие горизонты чаще становятся суглинистыми или супесчаными.

Менее засоленные и более плодородные дерново-луговые почвы характеризуются хорошо выраженным дерновым горизонтом с высоким содержанием гумуса. Эти почвы прошли лугово-болотную стадию почвообразования, несут признаки бывшего оглеения и периодически бывают переувлажнены, имеют и современное оглеение, так как формируются в условиях достаточного или избыточного увлажнения на пониженных элементах рельефа надпойменных террас. Они широко используются под овощные и зерновые культуры.

Наименьшую площадь на надпойменных террасах занимают лесные палевые серые почвы, имеющие благоприятные физико-химические и водные свойства. Морфологическими особенностями этих почв являются хорошо выраженный перегнойно-гумусовый горизонт, аккумуляция карбонатов в средней части профиля, наличие обильных пятен ожелезнения и признаков криотурбаций. Эти почвы обладают наиболее высоким плодородием среди всех подтипов палевых почв [4].

Оценка воздействия на почвенный покров в процессе строительства и эксплуатации объектов в зоне распространения многолетнемерзлых пород проводится с учетом всей совокупности почвенно-мерзлотных процессов и явлений, отражающих специфику региона. К основным региональным особенностям изученных почв относятся: малая мощность сезонноталого слоя, слабая оструктуренность или бесструктурность почвенных горизонтов, тиксотропность почвенной массы, щелочность и засоленность почв, близкое залегание от поверхности мощных подземных льдов, термокарстовые просадки и пучение поверхности, морозобойные растрескивания и т.д. Практически все нарушения почвенного покрова в зоне многолетней мерзлоты являются сложными, имеющими черты как прямого, так и косвенного воздействий.

В зоне техногенного воздействия долины р. Лены возможны следующие основные виды нарушений почв и почвенного покрова:

– отчуждение земельных участков под строительство объектов;
– механическое нарушение почв;
– химическое загрязнение почв.

Таблица 2

Основные характеристики мерзлотных почв зоны техногенного воздействия

Название почвы	Площадь, %	Мощность слоя сезонного оттаивания, см	Формула строения профиля	Мощность органогенного горизонта, см	Плотность сложения, г/см^3	Полевая влажность, %	Содержание фракций < 0,01 мм, %	Валовое содержание тяжелых металлов и нефтепродуктов (НП), мг/кг					
								Pb	Cd	Zn	Ni	Cu	НП
1. Почвы пойменного комплекса													
Аллювиальная дерновая типичная	50,2	>100	Ad-A-B-BC(C)	30	1,0	24,7	19,3	2,54	0,05	10,85	6,13	4,02	180
Аллювиальная дерновая глееватая	8,7	>100	Ad-A(g)-B(g)-BCg(G)	20	0,8	25,5	15,1	6,15	0,09	49,65	7,16	5,40	398
Аллювиальная дерновая перегнойная	13,5	50	AO-ABg-Bg	17	0,6	30,5	27,7	1,77	0,04	7,20	4,68	3,11	441
Аллювиальная дерновая черноземовидная	11,8	>100	Ad-Aca-AB(ca)-BC(C)	20	1,1	22,9	21,0	3,5	0,08	17,36	7,98	5,03	280
2. Почвы низких надпойменных террас													
Дерново-луговая	5,4	>100	Ad-A-ABg-Bg-BCg	20	1,0	22,8	21,6	4,50	0,11	26,53	13,63	8,20	278
Лугово-черноземная солончаковатая	5,4	>100	A-AB-Bca-BC	15	1,0	20,7	17,2	3,21	0,04	29,25	1,79	1,21	148
Черноземно-луговая солончаковатая	4,0	>100	A-ABca-Bca-BC	20	1,0	22,5	23,2	6,18	0,04	26,35	5,44	7,30	180
Палевая серая	1,0	>100	O-AO-Bca-C	15	0,7	34,7	21,0	3,11	0,10	18,89	11,51	10,62	403

В табл. 2 приведены основные (исходные) количественные показатели, необходимые для построения прогноза возможных негативных процессов и разработки предложений по охране и мониторингу изученных почв.

Глубина сезонного оттаивания в изученных почвах колеблется от 50 до 170 см, и преобладающие здесь почвы имеют хорошо развитый профиль. Практически все типы почв в верхней части состоят из среднеуплотненного дерново-гумусового горизонта супесчаного или легкосуглинистого гранулометрического состава. Механическое нарушение гумусового горизонта может вызвать ухудшение физических свойств почв, усиление или развитие процессов оглеения и тиксотропности, оттаивание мерзлоты, активизацию водной эрозии. В пределах полосы отвода землеройной техникой нарушается весь почвенный профиль, происходят перемешивание и преобразование горизонтов, усиление термоэрозионных и нежелательных криогенных явлений (термокарст, оплывание, оседание). На переувлажненных участках аллювиальных дерновых глеевых и дерновых перегнойных почв нарушение почвенно-растительного покрова может сопровождаться временным или постоянным заболачиванием территории.

Решающее значение при механическом нарушении имеет положение почв в рельефе. Смывы и размывы почв отмечаются на участках склоновых местоположений и обусловлены чаще всего стоком талых вод весной и значительно реже – летом при выпадении ливневых дождей. Неизбежное нарушение дернины и верхних горизонтов почв повлечет развитие ускоренной водной эрозии, особенно в аллювиальных дерновых черноземовидных почвах высокой поймы и лугово-черноземных почвах надпойменных террас. В аллювиальных дерновых типичных, глеевых и глееватых почвах низкой и средней поймы возможны проявления речной эрозии в виде смывов и промоин. Уничтожение березовых колок и кустарников, распыление и уплотнение почв наземным транспортом могут способствовать усилению ветровой эрозии в иссушенных почвах лугово-степных участков высокой поймы и надпойменных террас.

В целях снижения деградации почв и почвенного покрова необходимо соблюдение всех экологических, агротехнических, строительных и других требований к производству земляных работ, изложенных в строительных нормах на земляные сооружения [14, 15]. Все эти требования и правила позволяют организовать строительство и эксплуатацию крупных объектов с наименьшим ущербом для почв и ландшафтов. Кроме того, они предусматривают проведение обязательной рекультивации земель и рельефа, которая должна проходить в два этапа: этап технической рекультивации и этап биологической рекультивации.

Среднее содержание тяжелых металлов и нефтепродуктов во всех изученных почвах (см. табл. 2) существенно ниже ОДК, рекомендованных в ряде российских нормативных документов для песчаных и супесчаных почв (Pb – 32 мг/кг, Cd – 0,5 мг/кг, Zn – 55 мг/кг, Cu – 33 мг/кг, Ni – 20 мг/кг, нефтепродукты – 1 000 мг/кг). Однако недостаток тепла и близкое залегание мерзлоты (ограничивают условия разложения и вымывания) предопределяют повышенную опасность устойчивого накопления элементов-загрязнителей в изученных почвах. При соблюдении технологического регламента химическое загрязнение почв может иметь локальный характер, однако в условиях, благоприятных для миграции вещества (в почвах склоновых, пойменных ландшафтов), загрязнение почв приобретает площадные формы. В.А. Ковда с соавт. [16] способность почв Центральной Якутии к самоочищению оценили в 2 балла (слабая), Северной Якутии – в 4 балла (очень слабая), а таежной зоны европейской части России и Западной Сибири – в 1 балл (умеренная).

В зоне техногенного воздействия долины средней Лены можно ожидать загрязнение почв:

а) тяжелыми металлами, в особенности свинцом, за счет выхлопных газов автотранспорта. Считается, что наиболее сильно это влияние прослеживается в полосе шириной 8–10 м. В меньшей мере это влияние проявляется в прилегающей полосе шириной до 40–50 м;

б) нефтепродуктами за счет разлива при их транспортировке;

в) гидрокарбонатами и карбонатами кальция и натрия за счет строительных и бытовых отходов.

Для контроля состояния почвенного покрова и уровня загрязнения почв на этапе строительства и эксплуатации газопровода и мостового перехода через р. Лену на почвах различных ландшафтов следует расположить пункты периодических мониторинговых наблюдений. В дальнейшем (на период эксплуатации) на их базе должны формироваться стационарные пункты режимных почвенных мониторинговых наблюдений.

Заключение

Результаты исследований дополняют ранее опубликованные литературные данные и показывают, что морфологические и физико-химические свойства почв различных ландшафтов долины средней Лены определяются интенсивностью развития следующих почвообразовательных процессов: мерзлотного, дернового, аллювиального, глеевого и засоления. По совокупности благоприятных свойств наиболее устойчивыми к механическому воздействию и химическому загрязнению среди пойменных почв являются широко распространенные аллювиальные дерновые типичные с мощностью дерново-гумусового горизонта до 20–30 см, оптимально увлажненные и уплотненные, с нейтральной реакцией среды, среди почв надпойменных террас – дерново-луговые незасоленные почвы.

К возможным негативным изменениям при механическом нарушении почв следует отнести возрастание глубины оттаивания сильнольдистой мерзлоты, термокарст и развитие ускоренной водной (в почвах низких и склоновых участков) и ветровой (в почвах высоких иссушенных участков) эрозии. Слабая способность почв к самоочищению предопределяет повышенную опасность устойчивого накопления элементов-загрязнителей в изученных почвах.

Литература

1. *Фельдман Г.М., Тетельбаум Н.И., Шендер Н.И., Гаврильев Р.И.* Пособие по прогнозу температурного режима грунтов Якутии. Якутск : СО АН СССР, 1988. 240 с.
2. *Научно-прикладной* справочник по климату СССР. Вып. 24 : Якутская АССР. Кн. 1. Л. : Гидрометеоиздат, 1989. 607 с.
3. *Оконешникова М.В., Николаева М.Х., Десяткин А.Р.* Почвенные условия произрастания и урожайность лугов поймы Лены // Меры по реализации Президентской (государственной) программы социально-экономического развития села на период до 2006 года: материалы VI респ. науч.-практ. конф. (15 апреля 2003 г., Якутск). М. : Изд-во МСХА, 2004. С. 277–281.
4. *Еловская Л.Г.* Классификация и диагностика мерзлотных почв Якутии. Якутск : ЯФ СО АН СССР, 1987. 172 с.
5. *Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М. : Изд-во МГУ, 1970. 487 с.
6. *Гинзбург К.Е., Артамонова Л.Ф.* Определение подвижных фосфатов и обменного калия почвы в аммонийно-молибдатной вытяжке // Третий делегатский съезд почвоведов. М., 1968. С. 137–142.
7. *Качинский Н.А.* Механический и микроагрегатный состав почвы, методы его изучения. М. : Изд-во АН СССР, 1958. 191 с.
8. *Оконешникова М.В.* Гумус почв аласов Лено-Амгинского междуречья : автореф. дис. … канд. биол. наук. Новосибирск, 1994. 16 с.
9. *Коноровский А.К.* Режимы мерзлотных пойменных почв долины Лены. Новосибирск : Наука, 1974. 172 с.
10. *Зольников В.Г.* Почвы восточной половины Центральной Якутии и их использование // Материалы о природных условиях и сельском хозяйстве Центральной Якутии. М. : Изд-во АН СССР, 1954. С. 55–221.
11. *Еловская Л.Г.* Засоленные почвы Якутии // Почвоведение. 1965. № 4. С. 28–34.
12. *Еловская Л.Г., Коноровский А.К., Саввинов Д.Д.* Мерзлотные засоленные почвы Центральной Якутии. М. : Наука, 1966. 271 с.
13. *Лебедев А.Ф.* О движении солей в почвах, имеющих влажность различных категорий // Труды Института им. В.В. Докучаева. 1930. Вып. 3/4. С. 385–404.
14. СП 11-102-97. Свод правил по инженерным изысканиям для строительства. Инженерно-экологические изыскания для строительства. М., 1997. 41 с.
15. РД 51-2-95. Регламент выполнения экологических требований при размещении, проектировании, строительстве и эксплуатации подводных переходов магистральных газопроводов. РАО Газпром, 1995. 62 с.
16. *Ковда В.А., Глазовская М.А., Соколов М.С., Стрекозов Б.П.* Последействие пестицидов и прогнозирование загрязнения их остатками территории // Известия Академии наук СССР. Сер. биол. 1977. № 1. С. 120–124.

Поступила в редакцию 06.05.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 7–18
doi: 10.17223/19988591/23/1

Matrena V. Okoneshnikova

Institute for Biological Problems of Cryolithozone of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russia

CURRENT STATE AND PREDICTION OF CHANGES IN SOILS OF THE MIDDLE LENA VALLEY (CENTRAL YAKUTIA)

The data describing the state of soil and soil cover prior the anthropogenic impact were obtained during geotechnical and ecological investigations which were carried out for the assessment of potential impact on the environment caused by gas pipeline and bridge construction across the Lena River.

The studied area is located in the central part of the Lena River valley and is adjacent to the city of Yakutsk (61°5' N). It covers all geomorphological levels of the floodplain complex and includes lower fluvial terraces (I and II) on the both banks of the river. The soils of the floodplain complex are represented by typical gley, gleyic, chernozemic and muck subtypes of alluvial sod soils. On the basis of morphological, physical and chemical properties, typical alluvial sod soils with thick humus horizon (up to 20–30 cm), which are optimally moistened and packed, are the most resistant to mechanical treatment and chemical pollution of all floodplain soils.

On the lower fluvial terraces, meadow-chernozemic and chernozemic-meadow soils with different salinity are widely represented. The type of salinity is predominantly sulphatic and chloridic that is accounted for the main role of sulphates and chlorides in saline composition of the ascending solutions. Sod-meadow soils with clearly marked sod horizon and neutral pH are less saline and more fertile.

Almost all soil types in the upper part consist of packed sod-humus horizon of sandy-loam and light-loam granulometric composition. Mechanical disruption of humus horizon may cause deterioration of physical properties of soil and an increase or initiate gleization and thixotropic processes; it may also lead to thawing of permafrost and activation of water erosion. Within the right of the way of earthmoving machines, the disruption of the entire soil profile was observed, particularly mixing and transforming horizons, thermal erosion and unwanted cryogenic processes (thermokarst, mudflow and subsidence) increased as well. In over-moistened areas of alluvial sod-gley and sod-muck soils the disruption of soil and vegetation cover may be accompanied by temporal or permanent swamping of the territory.

It was also determined, that the average concentration of heavy metals and oil products in all the studied soils is significantly lower than their permissible concentrations recommended in a series of Russian regulatory documents for sandy loam soils. However, the poor ability of soils of central Yakutia to self-purification predetermines a high risk of stable accumulation of pollutants in the studied soils.

Key words: *permafrost; soil cover; soils; disruption; pollution; monitoring.*

Received May 6, 2013

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

UDK 579.64:631.46
doi: 10.17223/19988591/23/2

O.M. Minaeva[1], E.E. Akimova[1, 2]

[1] Tomsk State University, Tomsk, Russia
[2] Siberian Research Institute of Agriculture and Peat of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Tomsk, Russia

EFFECTIVENESS OF APPLYING BACTERIA *Pseudomonas* sp., STRAIN B-6798, FOR ANTI-PHYTOPATHOGENIC PROTECTION OF CROPS IN WESTERN SIBERIA

Biological method of plant protection from phytopathogens is based on applying microbial antagonists of phytopathogens. Today, domestic and foreign markets are represented by a number of bacteria-based formulations; nevertheless, more effective plant protection agents are being searched. The present work examines a possibility of applying formaldehyde-resistant bacteria Pseudomonas sp., strain B-6798, as a potential biofungicide. Different methods for estimation of antifungal activity of the strain were used, including the method linked with inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria-antagonists. Growth-promoting activity of bacteria was assessed both in laboratory and field experiments. As the test objects were used the following crops: wheat, oats, maize, potato and fiber flax. Treatment of seeds with Pseudomonas sp., strain B-6798, reduced the overall infestation of cereal crops by seed infection agents by 12–36% due to decreasing the percentage of seeds affected by Helminthosporium and Fusarium root rot causing agents. Bacterization of potato tubers reduced late blight in the period of growing season by 45–50%, rhizoctonia blight and common scab by 40–70% during storage. The optimum concentrations of the applied bacteria for plant protection were within 10^4–10^7 CFU/ml. It was established that under the activity of antagonistic bacteria in the laboratory conditions shoot length was increased in 1.5–3.5 times, dry biomass – 1.5–5 times and total root system length – 1.7–3.0 times. According to the results of field experiments, bacterization contributed to increasing the yield of cereal crops and potato by 10–40%, depending on the species and variety.

Key words: *antifungal activity; bacteria-antagonists; biofungicide; growth-promoting activity; phytopathogen.*

Introduction

At the present time, most part of microbial formulations is based on rhizosphere bacteria related to genus *Pseudomonas*. The domestic microbial industry produces numerous biological fungicides using these bacteria, including the following trademarks: such *Pseudomonas*-based formulations as Pseudobacterin 2™, Agat-25K, Planriz and others [1, 3]. Many formulations based on different species of *Pseudomonas* genus are known worldwide: Dagger G, Conquer, Victus, BioCoat, Blue Circle, Intercept [4–5]. Wide utilization of *Pseudomonas* spp. bacteria in biotechnology is linked with multifunctional properties of these bacteria, together with direct inhibition of phytopathogenic microorganisms and as a result of the synthesis of siderophores, cyanide, antibiotics, plant growth stimulation, vitamins, phosphate mobilization and nitrogen fixation [1–5]. Despite a wide range of already developed and applied microbial fungicides, there is a constant search for new strains capable of providing more stable positive effects on plant growth and development and inhibiting phytopathogens [2]. The first experiments linked with estimation of antifungal properties of bacteria *Pseudomonas* sp., strain B-6798, demonstrated high antagonistic activity of this strain to the most economically important pathogenic fungi. The antagonist is capable of active growth and multiplication in the rhizosphere of agricultural plants. The first data served as a reason for more detailed investigation of useful properties of the new bacterial strain [6–7]. It is known that a stimulating effect on the growth and development of plant vegetative mass is based on the fact that *Pseudomonas* are capable of synthesizing various growth regulators (indole-3-acetic acid – IAA, gibberellins) and vitamins [1–8]. According to Ju.A. Gushchina and I.F. Glovatskaya [9], bacteria of the strain B-6798 can secrete auxin substances to the environment, particularly, IAA in the quantity of 0.8 mg/ml.

The purpose of the present work was connected with further study and summary of the results on the properties of formaldehyde-utilizing *Pseudomonas* sp., strain B-6798, as a plant growth stimulator and a potential inhibitor of phytopathogenic fungi affecting various crops.

Material and methods

Research objects

The strain of *Pseudomonas* sp., strain B-6798, was isolated from active silt in purifying construction of Tomsk petrochemical industrial complex. These are facultative methylotrophic bacteria capable of utilizing formaldehyde as a part of poor mineral media as the only source of carbon and energy in the concentration of 250 mmol.

Fusarium oxysporum, F. oxysporum f.sp. *lini*, *F. oxysporum* f.sp. *gladioli*, *Bipolaris sorokiniana* and *Rhizoctonia solani* were examined as test objects for assessing antagonistic bacterial activity.

Evaluation of *Pseudomonas* sp., strain B-6798, growth-stimulating activity, was realized basing on the seeds of the following crops: Moldavskaya-215 maize variety (the average seed weight – 0.5 g, total germination – 75%), Tulunskaya-12 wheat variety (0.03 g, 97%), Narymsky-943 oats variety (0.05g, 93%), Tomsky-10 fiber flax variety, as well as potato tubers of Fresco, Zhukovsky early ripening, Nevsky and Lugovskoy varieties.

Media and cultivation. Bacteria *Pseudomonas* sp., strain B-6798, were cultivated in 50ml of the minimal M9 medium [10] with formaldehyde (2–4 g/l) in a 250-ml retort. Microorganisms were incubated at 30±0.5°C in thermostat until the quantity was established in the limit from 1 to $9*10^9$ CFU/ml. The quantity control was performed by direct counting of cells in a Goryaev's chamber and by inoculation in accordance with the limiting-dilution method on the solid medium with a further count of CFU.

20-% wort agar (4–6°B) was used for phytopathogenic fungi incubation.

Investigation of Fungistatic Properties

Investigation of Kinetics of Phytopathogenic Fungi Growth Inhibition by Bacteria

Analyses of antifungal activity of the strain in laboratory experiments were conducted using both standard method of co-seeding of bacteria-antagonists together with phytopathogenic fungi located on the surface of the medium with a further evaluation of mycelium development inhibition and the method of determining kinetics of phytopathogenic fungi growth inhibition by bacteria-antagonists [6]. The second method elaborated in our laboratory assessed the fungistatic effect according to reduction in the growth rate of fungal colonies on solid medium with different bacteria concentrations, using standardized inoculation procedure.

Investigation of the influence of bacterization on seeds contaminated by phytopathogens. During the experiment, the seeds, previously disinfected with 70% ethanol solution, were soaked in bacterial suspension with concentration $1–6 \times 10^6$ CFU/ml for 30 minutes. Control seeds were soaked in sterilized water. The presence of fungistatic effect with experimental strain bacteria was estimated according to reduction in seed infestation by seed infection agents when conducting a phytopathological analysis in sterile absorbent paper rolls 7 days after the setting up of the experiment [11].

Fungistatic effect assessment in field experiments was carried out according to disease incidence and index with plants treated with bacteria in comparison with plants without bacterization [11–12]. The severity of cereal crops infection with root and foot rots was estimated according to the degree of browning of the stem base and plant root system, selected among the control and experimental variants. A rating scale was used to determine plant disease index [11–12]. Root rots were examined three times during the growing season: I – the phase of germination, II – tillering and III – flowering. To evaluate the effect of the bacterial preparation on potato blight development during the growing season, inspections of bacterized and control plants were organised. The development of blight affection of plants was analyzed four times: I – during series closing, II – during budding, III – during full blossoming and IV – before top-killing. Potato late blight was estimated in percentage terms on a generally accepted scale [12]. Disease incidence and index were determined by standard methods [11–12].

Disease incidence is a number of diseased plants in percent to total number of plants observed. Disease incidence was calculated as follows:

$$Incidence = \frac{Total\ number\ of\ diseased\ plants}{Total\ number\ of\ plants\ observed} \times 100.$$

Disease index is a measure of disease damage assessment which was calculated in percent as follows:

$$Index = \frac{(0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d) + (4 \times e)}{(a + b + c + d + e)} \times \frac{100}{4},$$

a, b, c, d, e – the number of tillers examined which fall into the categories 0, 1, 2, 3 and 4, respectively

To assess bacterial influence on a phytosanitary condition of the new crop during the storage period, a number of phytopathological analyses of potato tubers treated with bacteria and control plants were conducted. At least 100 tubers from each variant were selected three times during the whole period of storage. The tubers were washed, examined and cut in order to identify external and internal symptoms of diseases.

Investigation of stimulating activity

Investigation of the influence of concentration of bacterial suspension on plant growth and development in vegetation experiments

In the experiments, a model of small terrestrial artificial systems was created, consisting of three parts: a sterile substrate, used to fill vegetation vessels, host-plant and bacterial strains at concentrations of 10^1–10^9 CFU/ml. Pre-germinated and disinfected seeds of cereal crops and fiber flax were placed in test tubes with sand (12.5 cm^3); one-centimeter long disinfected potato shoots were put in a container with sterile soil and evenly moistened with sterile Knop's solution. Inoculation was carried out by 0.1 ml of bacterial suspension at different concentrations. Plants were grown in a climate camera: 12-hour light period, illumination intensity – 3 000 lux and temperature ±22±1°C. The experiment was carried out in three replications with 35–40 plants per each variant. The experiments being terminated, the following parameters were measured: the main root length (for maize), total root system length (for oats and wheat), the number of second-order roots and plant dry biomass. For each potato plant was measured the wet vegetation mass, the number of leaves and the number of tubers together with their weight.

Investigation of the influence of bacterial culture on plant growth and development in field experiments

Field experiments lasted for 6 growing seasons. The soil in the experiments was gray, forest, podzolized and medium-loam with low humus content (4–5%) as well as a thin humus accumulation horizon (20–25 cm).

Maize seeds were planted at a distance of 10–15 cm from each other, wheat and oats were sown at 600 seeds/m^2, and potatoes were planted at 42000 tubers/ha. Bacterisation of seeds was conducted with the help of pre-planting humidification treatment by bacterial culture with a titre of no less than 10^6 CFU/ml.

Potato tubers were soaked in bacterial suspension of the same concentration for 30 minutes. Seeds and tubers treated with water in the same manner as seeds in the test variants were used as control.

In the period of the experiment, the length of the maximum potato shoot was measured in each plant in all variants during a month since sprouting. The number of stems and the intensity of plant flowering were also analyzed during the experiments. Small sheaves of other plants were selected uniformly over the whole area of the test variant. Then, the length and dry biomass of the selected plants were measured; the quantity of grains per filled ear, the number of reproductive stems and the weight of 1 000 grains were examined in cereal plants during the phase of full ripeness.

Processing experimental results

The data obtained during the experiments were processed by means of StatSoft STATISTICA 6.0. The data are presented as a mean with confidence interval, using Student's t-test for 95% significance level. Statistical significance of the obtained results of seed phytopathological expertise, the incidence of root rots and foliar infections in field experiments were assessed by comparing sampling fractions, using Student's t-test for the probabilities 25–75% inclusive and using F-test for other probability values. Growth rates of fungal colonies on solid medium were determined by linear regression analysis. The data on parameters of plant growth and development in field experiments were compared by non-parametric Mann-Whitney test ($p < 0.05$) [13].

Results and discussion

Antifungal activity of Pseudomonas sp., strain B-6798, in model experiments

In vitro experiments, the strain showed a high antagonistic activity against a number of fungal pathogens. The bacteria facilitated reduction in the growth rate of fungal colonies on solid media in Petri dishes within the limits of 5–8 times in comparison with control (fig. 1). In control, fungal colonies grew on a bacteria-free medium. It was experimentally established that the magnitude of fungistatic effect depended on the type of phytopathogens and the concentration of bacteria in dishes. Fungus *Bipolaris sorokiniana* was the most sensitive to antagonistic bacteria and *F. oxysporum* f.sp. *lini* – the least.

The ratio of antagonist concentration to the level of disease development inhibition is very important for development and application of microbial fungicides.

G.M. Raaijmakers et al [14] demonstrated that there was a “threshold” level of antagonist concentration, below which a slight decrease in bacteria concentration, expressed as a logarithm ($\log_{10}$-dose), results in a significant modification of inhibition of the development of fungi pathogens. Our experiments detected no threshold effects in relation to the growth rate of phytopathogenic fungal colonies. In order to describe kinetics of fungal colonies growth inhibition by the studied bacteria, we used N.D. Ierusalimsky modified equation [6]. Fungal colonies growth inhibition was already fixed at bacteria concentration 10^2 cells/ml in the inoculum. As bacteria concentrations in Petri dishes increased, the growth rate of fungal colonies tended to reach the limit value, not equal to zero, i.e. no total absolute fungal growth inhibition by bacteria was observed. In all the studied relationships between fungi and bacteria, concentration of 10^7–10^8 cells/ml is enough to reach the smallest limit value of fungal growth rate.

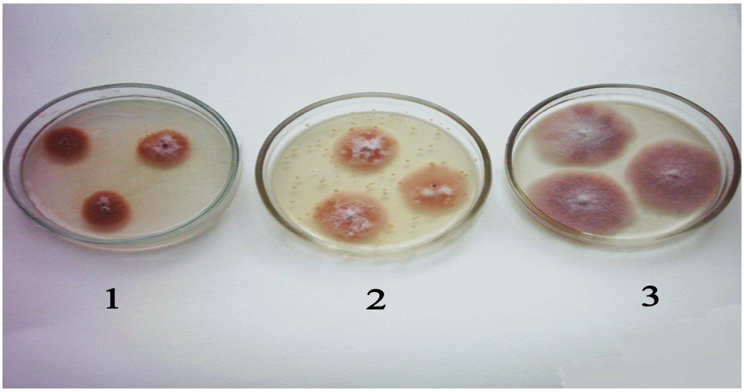


Fig. 1. *Fusarium oxysporum* fungal colonies in the experiment with bacteria *Pseudomonas,* strain B-6798, on the sixth day of the experiment
Note. 1 – concentration of bacterial suspension 10^4 cells/ml; 2 – concentration 10^2 cells/ml; 3 – control (without bacteria)

In the mechanism of fungal growth inhibition by the studied bacteria, a crucial role is, apparently, played by *Pseudomonas* sp., strain B-6798, producing yellow-green fluorescent pigments – siderophores. Siderophores are chelators, highly specific to Fe^{3+}, which are synthesized and used in an extracellular way in the conditions of low iron content [15]. The siderophores of fluorescent pseudomonades have different chemical structure and, having affinity for iron, form stable complexes together with it; thereby, they successfully compete for this element with siderophores of pathogenic fungi, which have a lower iron binding constant [8, 16]. Siderophore inhibition mechanism are testified by experimental data, showing reduction in fungistatic effect when increasing Fe^{3+} salts in the medium [17]. As it is known, the antagonism of pseudomonades against phytopathogens is largely conditioned by competition for iron and is only effective at low iron content in soil [8, 15, 18–21].

The influence of bacterization on seeds to infection agents

Phytopathological examination of bacterized seeds of wheat and oats revealed an antagonistic effect of bacteria on seed infection agents *in planta* model conditions.

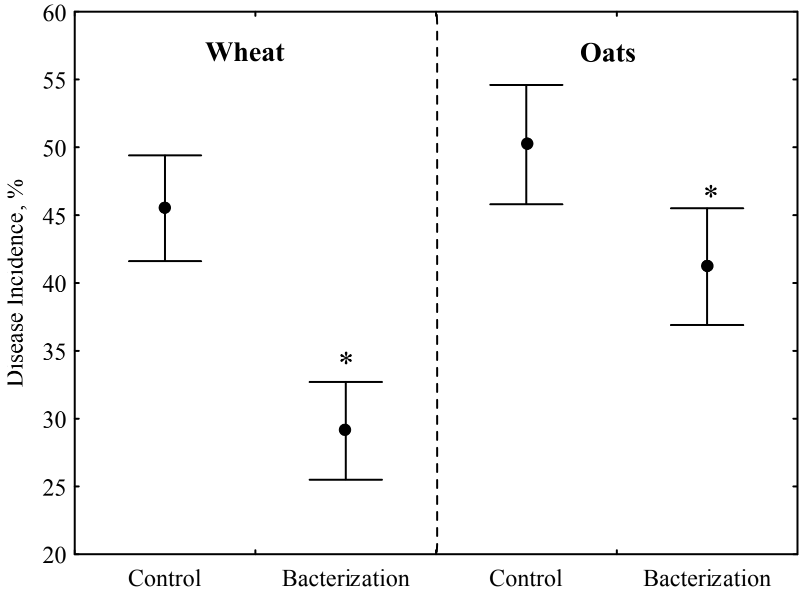


Fig. 2. Total infestation of wheat seeds by seed infection agents during seed bacterization
Note. * – statistically significant difference from the control variant ($p < 0.05$)

As it can be seen from Figure 2, a decrease in total infestation of the studied crops by seed infection agents is observed by 36% and 18% for wheat and oats correspondingly ($p < 0.05$), in comparison with control. The greatest antagonistic effect was seen on *Fusarium* and *Bipolaris* fungi, which are known to be the most noxious among root rot pathogens [22–23]. Wheat and oats seed infestation by a complex of Fusarium and Helminthosporium infection during bacterization is less than control (4.6 times for wheat and 15 times for oats).

Thus, the obtained data prove that the experimental *Pseudomonas* strain has antifungal properties, demonstrated earlier *in vitro* experiments without any vegetation component.

The influence of bacteria on plant infestation by fungal infections in field experiments

Basing on the results obtained in the laboratory conditions, the effectiveness of bacterial antagonist for prevention of plant roots infestation was investigated. Root rots of wheat and oats were examined 4 times during the growing season. Over all the counts, root rot index decreased as a result of seed bacterization (fig. 3).

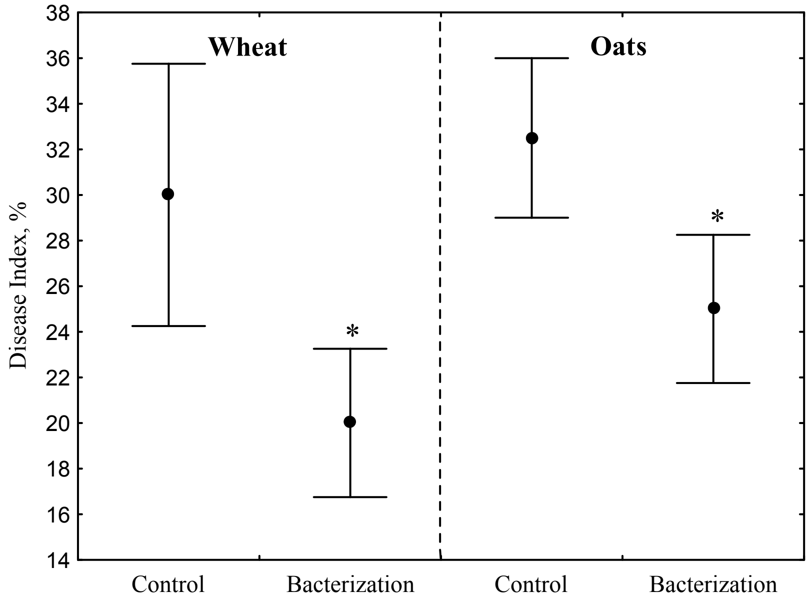


Fig. 3. Root rot index during seed bacterization in the phase of ear formation

A plant under favourable conditions and due to a balanced nutrient supply generates immunity providing resistance to pathogens [24]. Apparently, bacterization may result in systemic acquired resistance induction in plants owing to an increased production of jasmonates and salycylates [25]. So, the analysis of plant infestation by such foliar infections as rust, powdery mildew, Septoria disease, late blight and others can be indicative of a possibility of systemic resistance formation in host-plants under the influence of the studied bacterial strain.

The analysis of data on field observations, obtained during ear formation phase showed a decrease in foliar infections development in bacterized plants ($p < 0.05$). Thus, Septoria disease index decreased 2.3 times and rust – 3 times in comparison with control.

Antifungal activity of bacteria was also demonstrated when analyzing potato late blight in field experiments during the growing season. Figure 4 shows late blight index on potato leaves.

All the counts revealed a decrease in the disease incidence on bacterized plants throughout the growing season. By the end of vegetation, late blight index on bacterized plants had reached 13–22%, whereas this index was considerably higher (25–37%) on the control area (fig. 4). When analyzing the data on late blight index on Lugovskoy variety, a tendency to reduction in plant disease incidence and index was observed ($p > 0.05$). This is due to the fact that this variety is late blight resistant and late blight is not widely dispersed on this variety, even in control.

Plant systemic resistance formation during bacterization can be also demonstrated by the results of a phytopathological analysis of wheat seeds (fig. 5).

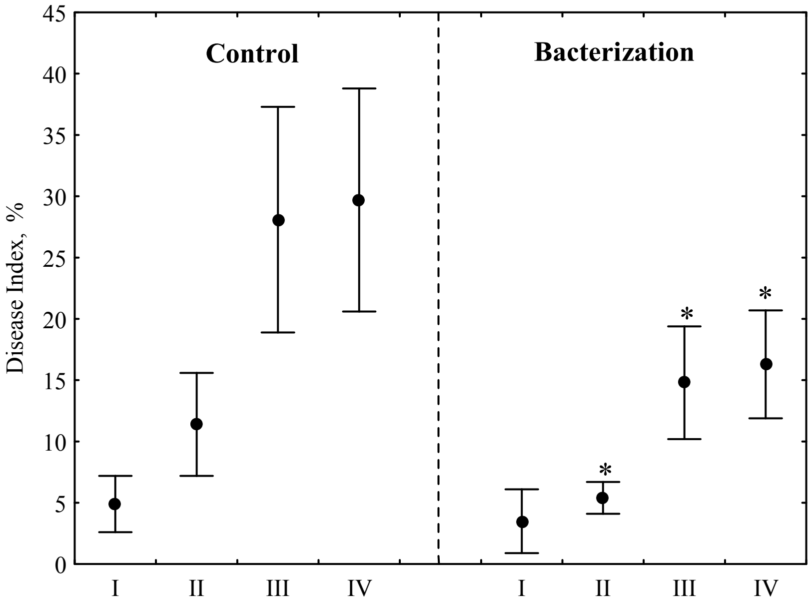


Fig. 4. Late blight index on potato leaves, Nevsky variety, in a field experiment
Note. I, II, III, IV – plant development phases

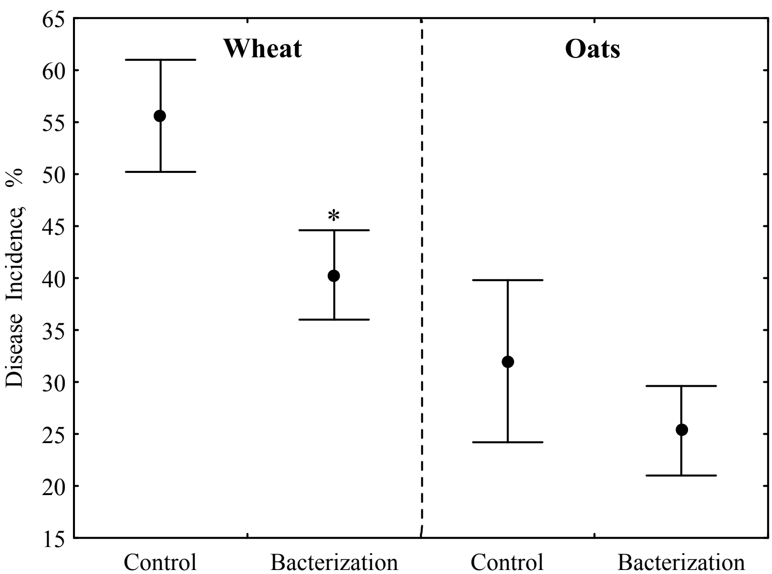


Fig. 5. Total infestation of wheat seeds, collected from control and the areas with bacterized seeds in a field experiment

According to the given data, the grains of bacterized plants are less affected by seed infection agents, by 28% and 21% for wheat and oats correspondingly times in comparison with control.

It is established that crop yield and tuber disease development during storage depend directly on potato disease severity in the growing season. The data on the development of diseases on potato tubers of new harvest yield are demonstrated in Figure 6.

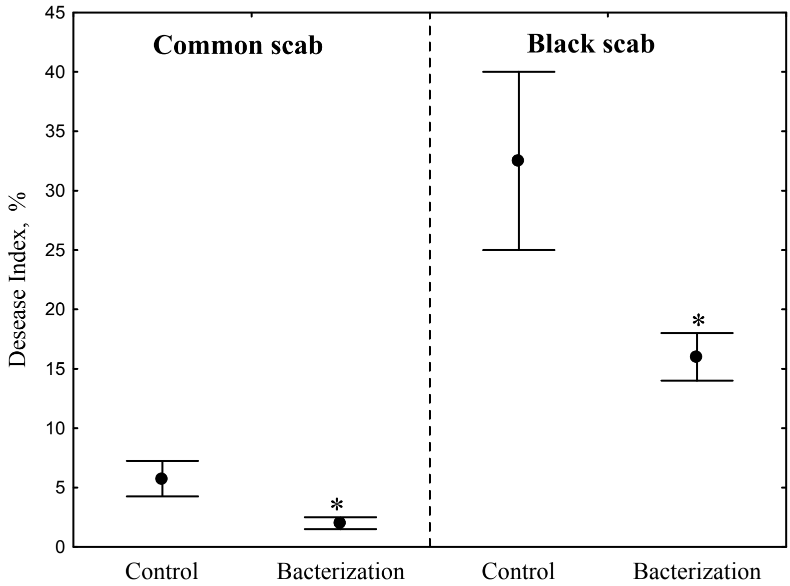


Fig. 6. The development of diseases on potato tubers, the case of Zhukovsky early variety

It should be noted that bacterial treatment of tubers reduced the disease incidence of formed tubers during storage ($p<0.05$): the development of common scab – 2 times and black scab – 4 times, compared with control. The average reduction in common scab and black scab development during bacterization was 40–50% and 50–75%, correspondingly. Disease index reduction was primarily affected by a decrease in disease intensity and, to a lesser degree, the number of infected tubers. A pre-plant seed tuber treatment and further plant spraying by formulations during vegetation reduce population density of pathogens on new crop tubers both by means of decreasing population density of phytopathogens in soil and increasing plant resistance to these microorganisms [26].

Thus, antifungal activity of bacteria can be effectively proved *in vitro* and *in planta* laboratory experiments. However, certain instability of positive effects must be considered while applying bacterial strains in field conditions, associated with the type of soil, the cultivated crop as well as prevailing climatic conditions. When analyzing the data on soil fertility and creating specifications for applying formulations for each agro-climatic zone and crop, seed bacterization may, undoubtedly, influence sanitation of cereal and other crops in a positive way.

Growth-promoting activity of bacteria Pseudomonas sp., strain B-6798, in model experiments

As it has already been mentioned, bacteria *Pseudomonas* are widely known as plant growth stimulants that increase productivity and affect plant growth dynamics through mobilizing sparingly soluble compounds and discharging a number of plant hormones [1–3, 6–8]. Our experiments demonstrated a positive impact of the studied strain on the growth and development of maize, wheat, oats, potato and fiber flax. In laboratory experiments, when assessing plant growth rate during bacterization, it was shown that kinetic parameters of plant growth vary differently under the influence of bacteria. An increase in the initial shoot growth rate within one or two days ($p < 0.05$) was observed in the experiments with maize in the presence of bacteria, that is why the plants in experimental variants have a greater length by the moment of experiment completion despite a further shoot growth rate that does not show a significant statistical difference from control. Furthermore, acceleration of the shoot root growth rate was fixed for maize.

Potato treatment with bacterial culture had a positive impact on different plant growth and development parameters: plant growth rate augmented in comparison with untreated plants ($p < 0.05$); in the variant with bacterization, the finite plant length increased 1.3 times; plant mass, the number of leaves and the number and weight of tubers increased as well; the phase of tuber formation began earlier than control.

There are a number of investigations devoted to studying the dependence of growth-promoting effects from bacteria concentration in the inoculum. As a rule, bacteria are applied within 10^5–10^7 cells/ml [2, 27–29]. However, in these investigations there is no satisfactory justification for the concentration of the used inoculum. Model experiments with plant treatment with bacterial cultures of different titre (0–10^9 cells/seed) made it possible to reveal concentrations which were optimal for plant growth and development. The table gives data on optimal concentrations of bacterial inoculum, the maximum value of the measured parameters of growth and development of certain crops and their increase in comparison with control.

As table 1 shows, bacterization has a positive effect on various parameters of plant development, increasing them 1.15–5 times depending on a host-plant type and the measured parameter in comparison with control. Of all the studied crops, maize turned out to be the most responsive to bacterization, whereas oats was affected the least. Optimal bacteria concentrations appeared to be 10^4–10^6 cells/ml.

L.A. Somova [30] also specifies in her work that the application of bacteria *Ps. putida*, with abundance for wheat within 10^4–10^8 cells/ml, stimulated seed germination and increased the shoot length; while the number of bacteria over 10^9 cells/ml inhibited seed germination, and the number of bacteria less than 10^3–10^4 cells/ml made a subtle influence on germination. According to the aforementioned author, the use of *P. fluorescens* stimulated wheat seed germination within a narrower range of concentrations: 10^5–10^7 cells/ml. M.Lacher et al [31] point out in their work that significant root system stimulation was observed at rape seed germination on solid medium in Petri dishes with various concentrations of *Phyllobacterium* (3×10^7– 3×10^8 UFC/ml). Besides, the effect of stimulation and the number of bacterial cells, found on the root surface, increased together with the applied concentration.

Table 1

Optimal concentrations of bacterial culture *Pseudomonas* sp., strain B-6798, on agricultural plants in model experiments

Crop	Parameter	Optimal concentration, cells/ml	Maximum value	Comparison with control
Maize	Main root length (mm)	10^5	100.40 ± 7.60*	2.8
	Number of secondary roots (pcs.)	10^6	17.00 ± 2.00*	2.1
	Dry biomass (g)	10^6	0.55 ± 0.03*	5.0
Wheat	Total root length (mm)	10^4	294.30 ± 55.20*	1.6
	Dry biomass (g)	10^4	0.30 ± 0.04*	2.1
Oats	Total root length (мм)	10^3	121.70 ± 12.10 *	2.2
	Dry biomass (g)	10^6	0.05 ± 0.02 *	1.4
Potato	Plant length (mm)	10^6	359.90 ± 18.30	1.15
	Dry biomass (g)	10^6	6.56 ± 1.74 *	1.3
	Formed tuber weight (g)	10^6	2.04 ± 0.37 *	3.6

Most papers that we have analyzed do not attach any importance to bacterial titre and use simultaneously different bacteria concentrations; their comparisons of the effect of bacterial impact on plants are to be examined and defined more precisely.

Thus, on the basis of the obtained data, it appears that the concentration of cells for the optimum zone of each bacterial species can vary. Moreover, the optimum concentration of the applied bacteria also depends directly on the species of a host-plant, but to a lesser degree.

The influence of bacterization on plant growth and development in field experiments

Field experiments allowed improving the influence of *Pseudomonas* sp., strain B-6798, on plant growth and development under agrocoenosis conditions. In general, a positive impact of seed bacterization on plant development was discovered. According to the obtained data, plant bacterization accelerated the growth of all the studied host-plants. Depending on a host-plant species, the length of plants in the variants with bacterization by *Pseudomonas* sp.,strain B-6798, exceeded the length of control plants since full germination phase, though, sometimes, the effect of stimulation showed itself during later phases. An increase in plant length during bacterization is, apparently, associated both with direct growth stimulation caused by plant hormones discharged by bacteria and indirect stimulation caused by a decrease in a degree of plant infestation by pathogens, including reduction in root rot index and incidence.

Figure 7 presents the lengths of maize and oats in different variants of field experiments.

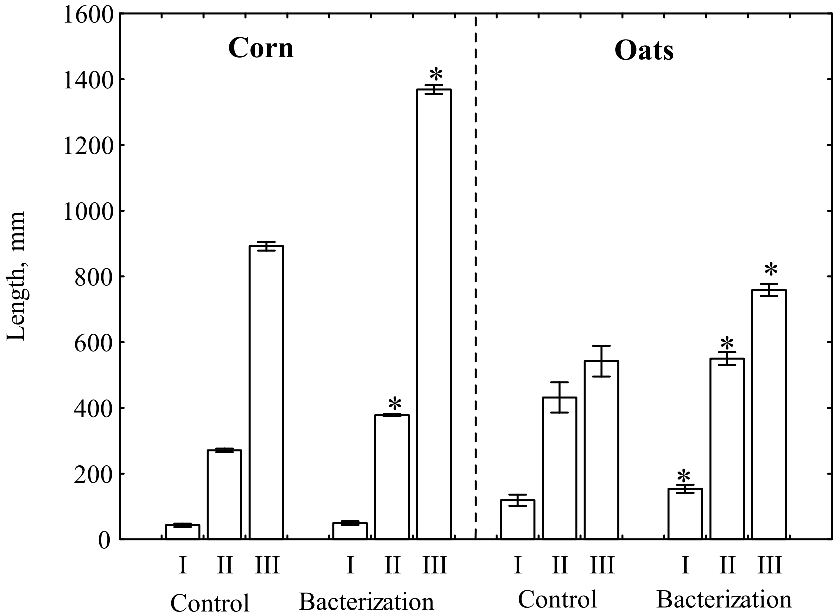


Fig. 7. The length of maize and oats in different variants of the field experiment
Note. I–III – plant development phases (for maize: I – phase 2–3 leaves, II – phase 6–8 leaves, III – panicle formation phase; for oats: I – phase 2–3 leaves, II – tillering phase, III – ear formation phase)

Table 2 shows the data on final measurements of the length of plants and absolutely dry biomass of some crops during bacterization and their comparison with plant development parameters in control.

It was also found out that cereal crops had an increase in the number of reproductive stems during bacterization by *Pseudomonas* sp., strain B-6798, and plants underwent development phases faster, coming into bloom in a shorter time.

For fiber flax there was an increase in the number of seed cases, plant stem diameter and its technical length by 15–50%. The treatment of potato tubers by *Pseudomonas* sp., strain B-6798, resulted in seed vigour and tuber formation acceleration.

Table 2

Plant development parameters during bacterization in field experiments

Crop	Parameter	Value	Comparison with control
Oats	Plant length (cm)	75.9 ± 4.2*	1.4
	Dry biomass (gr)	2.12 ± 0.13*	1.4
Maize	Plant length (cm)	136.9 ± 13.4*	1.5
	Dry biomass (gr)	146.9 ± 3.0*	1.6
Wheat	Plant length (cm)	82.1 ± 2.2*	1.4
	Dry biomass (gr)	2.33 ± 0.14*	1.6
Potato	Plant length (cm)	52.2 ± 8.2*	1.4
Fibre flax	Plant length (cm)	71.2 ± 6.2*	1.4

As a rule, plant bacterization by the studied strain *Pseudomonas* sp., strain B-6798, led to an increase in crop yield during field experiments. The absence of statistically significant differences from the control variant in a number of growing seasons is explained by unfavorable climatic conditions for plant growing (drought or excessive soil moistening). An extremely high soil temperature had the most unfavorable impact on growth-promoting properties of bacteria during their introduction. According to literature data, optimal temperature for successful plant rhizosphere colonization by bacteria is +16…+18°C, at higher temperatures bacteria from the seed surface, where they were spread during seed treatment before sowing in the soil, do not colonize growing roots [26]. However, even during growing seasons with the most unfavourable conditions for efficient host-plant rhizosphere colonization, no inhibition of plant growth and development or a crucial reduction in the yield of bacterized crops were observed.

Bacterization did not only directly increase crop yield, but also affected significantly the structure of host-plant crops. The crop structure in field experiments is exemplified by wheat and potato crop yields in the tables (3–4) and in Figure 8 below.

Table 3

Wheat yield and crop structure in field experiments

Variant	Crop yield, dt/ha	Crop structure		
		Average number of grains per ear, pcs	Weight of 1000 grains, g	Number of reproductive stems per m^2, pcs
Control	25.1 ± 1.6	15.0 ± 1.7	31.7 ± 0.1	527 ± 13
Bacterization	30.6 ± 1.3*	17.0 ± 2.0	34.1 ± 0.1*	527 ± 10

Table 4

Potato yield and crop formation in field experiments

Variant	Number of tubers, pcs	Weight of tubers, g	Number of tubers, pcs	Weight of tubers, g	Number of tubers, pcs	Weight of tubers, g	Crop yield, dt/ha
	Initial blossom		Ceasing to flower		Harvesting		
Nevsky variety							
Control	6.00 ±5.00	6.63 ±3.1	5.0±1.5	191.0 ±99.4	7.0±1.0	458.0 ±48.0	37.8 ±4.3
Bacterization	6.00 ±2.00	15.57 ±5.6 *	7.0±3.0	228.4 ±49.6	7.3±1.0	476.0 ±41.0	40.5 ±3.5
Lugovskoy variety							
Control	2.0±2.0	21.98 ±20.2	5.0±2.2	172.0 ±37.6	4.0±1.0	388.5 ±48.0	48.9± 4.9
Bacterization	5.00 ±2.3*	54.95 ±9.7*	6.0±2.1	263.2 ±107.8	4.5±1.0	412.0 ±51.0	67.8 ±5.3*

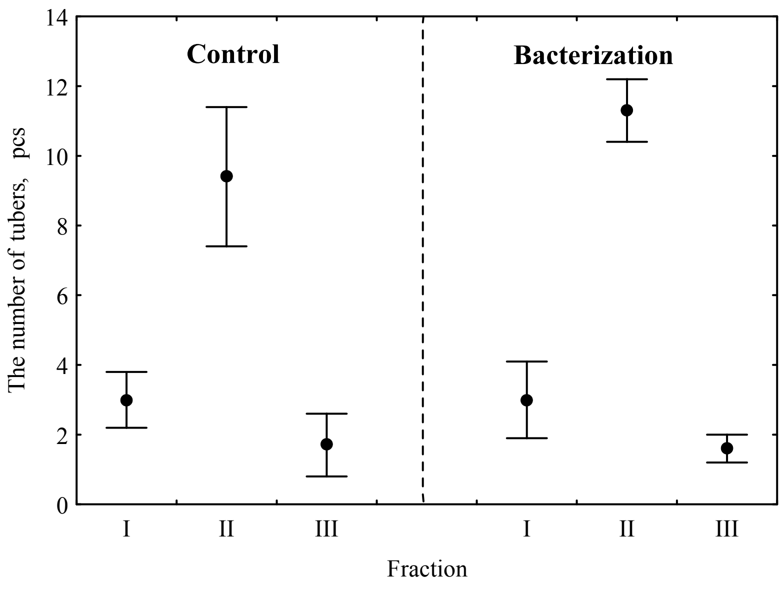


Fig. 8. The structure of potato crop yield, Lugovskoy variety, in field experiments
Note. I – small-sized tubers (up to 50 g); II – average-sized tubers (from 50 to 120 g); III – large-sized tubers (over 120 g)

The positive influence of bacterization was traced during the whole period of crop formation but it was at early stages that its stimulating effect was the best. The analysis of potato crop formation showed an increase in the weight of tubers: for Nevsky variety – 2.2 times, for Lugovskoy variety – 2.5 times and for the number of tubers – 2.8 times in comparison with control. Thereafter, the identified differences can be leveled under conditions which are favorable for crop formation (see table 4). In case of unfavourable climatic conditions, earlier and more successful crop formation of bacterized plants results in its significant increase in comparison with control at the moment of harvesting. A more rapid passage through plant development phases during bacterization is also important: for wheat and oats a phase of full ripeness began earlier than for plants without bacterization.

Conclusion

On the basis of experimental data, it can be concluded that bacteria *Pseudomonas* sp., strain B-6798, show a high antagonistic activity against fungal pathogens of cereal root rot in Western Siberia. Antifungal activity was detected both in field and *in vitro* and in *planta* laboratory experiments; *in vitro* experiments the strain was active against such fungi as *Fusarium sp.* and *Bipolaris sorokiniana.* The treatment of cereal seeds by bacteria *in planta* reduced the overall incidence of seed infection agents. In field experiments, the use of bacteria reduced the development of root rots and leaf infection manifestation; decreased the overall infestation of new seeds by seed infection pathogens. Bacterization of potato tubers had a positive impact on reducing late blight in the growing season and rhizoctonia blight and common scab during storage. One of the factors of effective activity against phytopathogenic fungi is production of special pigments-siderophores by bacterial culture.

Besides antifungal activity, bacteria *Pseudomonas* sp., strain B-6798, are able to stimulate plant growth and development. In laboratory experiments, utilization of bacteria promoted plant growth and the length and quantity of roots of maize, wheat and oats, increased plant mass, the number of leaves and the number and weight of potato tubers. In field experiments, bacteria also had a positive effect on various plant development parameters: an increase in the number of reproductive stems (cereal crops), the number of seed cases, the diameter of the plant stem and technical length (fiber flax), the area of the leaf blade (cucumber) and tuber formation (potato). Plants of all the crops passed development phases faster, which is important when an earlier crop is formed under unfavorable weather conditions. The success of bacterization was established to depend on the type of host-plants and its variety: of all the studied crops, maize turned out to be the most responsive to bacterization and oats- the least. However, it is necessary to take into consideration certain instability of positive effects when applying bacterial strains under agrocoenosis conditions, associated with the type of soil, cultivated crop and prevailing weather conditions. At the same time, bacterization may influence soil and seed sanitation in a good way. The optimum concentration of the applied bacteria of the examined strain is 10^4–10^7 cells/ml, depending on the crop species and variety.

Thus, the conducted field and model experiments showed effectiveness of applying bacteria *Pseudomonas* sp., strain B-6798, as a producer of formulation aimed at stimulating plant growth and development, decreasing the development of late blight, cereal root rots, cereal septoria leaf blotch and flax Fusarium wilt, as well as increasing crop yield in Tomsk oblast. The advantage of the isolated and studied strain *Pseudomonas* sp., strain B-6798, is demonstrated by the fact that the presence of formaldehyde in the environment, as the only source of energy and carbon, contributed both to maintaining the stability of the producer's properties and protecting the potential formulation on the basis of this strain from contamination. In the used concentrations, formaldehyde has no additional phytotoxic or fungicidal effect. These properties of the strain can be useful for economically sound biofungicide production on its basis.

The authors thank Dr. Margarita Shternshis (Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia) and Dr. Vladimir Gouli (University of Vermont, Burlington, Vermont, USA) for valuable advice, constructive remarks and helpful comments.

References

1. *Boronin A.M.* Rizosfernye bakterii roda *Pseudomonas*, sposobstvujushhie rostu i razvitiju rastenij // Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal. 1998. № 10. S. 25–31.
2. *Sidorenko O.D.* Dejstvie rizosfernyh psevdomonad na urozhajnost' sel'skohozjajstvennyh kul'tur // Agroekologia. 2001. № 8. S. 56–62.
3. *Shternshis M.V.* Trends of microbial pesticides biotechnology developed for plant protection in Russia // Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 2 (18). P. 92–100.
4. *Bellows T.S., Fisher T.W.* Handbook of Biological Control : Principles and Applications. San Diego : Academic Press, 1999. 1046 p.
5. *Sushil K.* Khetan Microbial Pest Control. New York·Basel : Marcel Dekker, Inc., 2001. 305 p.
6. *Minaeva O.M., Akimova E.E., Evdokimov E.V.* Kinetic aspects of inhibition of the phytopathogenic fungi growth by rhizosphere bacteria // Applied Biochemistry and Microbiology. 2008. Vol. 44, № 5. P. 512–517.
7. *Minaeva O.M., Akimova E.E., Semenov S.Y.* Antagonistic effect on phytopatogenic fungi and stimulation influence on growth and development of plants by bacteria Pseudomonas sp. B-6798 utilizing formaldehyde // Tomsk State University Journal of Biology. 2008. № 2(3). C. 28–42.
8. *Smirnov V.V., Kiprianova E.A.* Bakterii roda *Pseudomonas*. Kiev : Naykova Dymka, 1990. 264 p.
9. *Gushchina Ju.A., Glovackaja I.F.* Formal'degidrezistentnye psevdomonady kak stimuljatory rosta kornej l'na-dolgunca // Voprosy ustojchivogo beskrizisnogo razvitija. Novosibirsk : Izd-vo IDMI, 2001. S. 67–70.
10. *Miller J.H.* Experiments in molecular genetics / perevod s angl.pod red. Alihanjana S.I. Moscow : Mir, 1976. 438 s.
11. *Chulkina V.A., Konjaeva N.M., Kuznecova T.T.* Bor'ba s boleznjami sel'sko-hozjajstvennyh kul'tur v Sibiri. M. : Rossel'hozizdat, 1987. 252 s.
12. *Cooke B.M., Jones D.G., Kaye B.* The Epidemiology of Plant Diseases. Second Edition. Netherland : Springer, 2006. 576 p.
13. *Lakin G.F.* Biometria. Moscow : High School, 1990. 352 p.
14. *Raaijmakers J.M., Leeman M., van Orchot M.M.P., van der Sluis I. et al.* Dose-response relationship in biological control of Fusarium with radish by *Pseudomonas* spp. // J. Phytopathology. 1995. № 85. P. 1075–1081.

15. *Bellis P. de, Ercolani G.L.* Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67 (4). P. 1945–1948. URL: http://mmbr.asm.org
16. *Neilands J.B.* Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds // The Amer. Society for Biochem. and Molec. Biol. 1995. Vol. 270, № 45. Iss. 10. P. 26723–26726. URL: http://www.jbc.org
17. *Akimova E.E.* Issledovanie vlijanija bakterij *Pseudomonas* sp. B-6798 na fitopatogennye griby i vysshie rastenija : avtoref. dis. … kand. biol. nauk. Tomsk, 2007. 24 s.
18. *Djibaoui R., Bensoltane A.* Effect of iron and growth inhibitors on sideropho-res production by Pseudomonas fluorescens // African J. of Biotechnology. 2005. Vol. 4, № 7. P. 697–702. URL: http://www.academicjournals.org
19. *Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N.* Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria // Nature. 1980. № 286. P. 885–886. URL: http://www.blackwell pub-lishing.com
20. *Loper J.E.* Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain // J. Phytopathology. 1988. Vol. 78, № 2. P. 166–172. URL: http://md1.csa.com/partners
21. *Ongena M., Daayf F., Jacques P. et al.* Protection of cucumber against Pythium root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis // Pl. Path. 1999. Vol. 48. P. 66–76. URL: http://www.blackwell-synergy.com
22. *Peresypkin V.F.* Sel'skohozjajstvennaja fitopatologija. 2-e izd., pererab. i dop. M. : Kolos, 1974. 560 s.
23. *Rajlo A.I.* Griby roda Fuzarium. Moscow : Kolos, 1950. 416 s.
24. *Pavljushin V.A., Vilkova N.A., Afanasenko O.S.* Pervaja Vserossijskaja konferencija po immunitetu rastenij k boleznjam i vrediteljam, posvjashhennaja 300-letiju Sankt-Peterburga. Hronika // Vestnik zashhity rastenij. 2002. № 2. S. 73–75.
25. *Geoffrey W., Zehnder, John F. Murfy, Edward J. Sikora, Joseph W. Kloper.* Application of rhizobacteria for induced resistance wheat [Jelektron. resurs]: European journal of plant pathology. Jelektron. zhurn. 2001. Vol. 107. P. 39–50. URL: http://www.ag.auburn.edu
26. *Kulikov S.N., Alimova F.K., Zaharova N.G. et al.* Biopreparaty s raznym mehanizmom dejstvija dlja bor'by s gribnymi boleznjami kartofelja // Prikl. bioh. i mikrob. 2006. T. 42, № 1. S. 86–92.
27. *Benizri E., Baudon E., Guckert A.* Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria // Biocontrol science and technology. 2001. № 11. P. 557–574. URL: http://www.tandf.co.uk, jelektron
28. *Berg G., Fritze A., Roskot N., Smalla K.* Evaluation of potential Biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb // Journal of applied microbiology. 2001. № 91. P. 963–971. URL: http://www.blackwellpublishing.com, jelektron
29. *De Weger L.A., Van Der Bij A.J., Dekkers L.C. et al.* Colonization of the rhizosphera of crop plants by plant-beneficial pseudomonads [Jelektron. resurs]: FEMS microbiology and ecology. Jelektron. zhurn. 1995. № 17. P. 221–228. URL: http://www.fems-microbiology.com
30. *Somova L.A.* Funkcional'naja i indikatornaja rol' geterotrofnyh mikroorganizmov v iskusstvennyh jekosistemah : avtoref. dis. … doktor biol. nauk. Krasnojarsk, 1999. 86 s.
31. *Larcher M., Muller B., Mantelin S., Rapior S., Cleyet-Marel J.-C.* Early modi-fications of Brassica napus root system architecture induced by a plant growth-promoting Phyllobacterium strain // New Phytologist. 2003. Vol. 160. P. 119–129. URL: http://www.blackwell-publishing.com

Received July 15, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 19–37

doi: 10.17223/19988591/23/2

О.М. Минаева[1], Е.Е. Акимова[1, 2]

[1] *Томский государственный университет (г. Томск)*
[2] *СибНИИ сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии (г. Томск)*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙ *Pseudomonas* sp. B-6798 ДЛЯ ЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ В УСЛОВИЯХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Биологический метод защиты растений от фитопатогенов основан на применении бактерий – антагонистов фитопатогенов. На современных отечественном и зарубежном рынках существует ряд биопрепаратов на их основе, но при этом продолжается поиск более эффективных агентов защиты растений. В работе исследована возможность применения формальдегидрезистентных бактерий Pseudomonas sp. B-6798 в качестве потенциальной основы биофунгицида. Для учета антифунгальной активности штамма использовались различные методики, в том числе разработанный авторами метод определения кинетики ингибирования роста фитопатогенных грибов бактериями-антагонистами. Оценка ростостимулирующей активности бактерий проводилась как в лабораторных, так и в полевых экспериментах. В качестве тест-объектов использованы следующие сельскохозяйственные культуры: пшеница, овес, кукуруза, картофель и лен-долгунец. Установлено, что обработка семян бактериями Pseudomonas sp. B-6798 снижает общую пораженность зерновых возбудителями семенных инфекций на 12–36% за счет уменьшения процента семян, пораженных гельминтоспориозно-фузариозными возбудителями корневых гнилей. Бактеризация клубней и растений положительно сказывается на снижении развития заболеваний картофеля: фитофтороза в вегетационный период – на 45–50%, ризоктониоза и парши обыкновенной в период хранения – на 40–70%. Оптимальные для развития растений концентрации бактерий находятся в пределах 10^4–10^7 КОЕ/мл. Показано, что под действием бактерий в лабораторных тестах происходит увеличение длины проростка в 1,5–3,5 раза, сухой биомассы – 1,5–5 раз, суммарной длины корневой системы – 1,7–3,0 раза. Согласно результатам полевых испытаний, бактеризация способствует увеличению урожайности зерновых культур и картофеля на 10–40% в зависимости от вида и сорта.

Ключевые слова: *антифунгальная активность; бактерии-антагонисты; биофунгицид; ростостимулирующая активность; фитопатоген.*

Поступила в редакцию 15.07.2013 г.

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 38–45

БОТАНИКА

УДК 582.998.2:581.821
doi: 10.17223/19988591/23/3

А.Н. Воробьёва[1], Д.Д. Басаргин[2]

[1] Амурский филиал Ботанического сада-института ДВО РАН (г. Благовещенск)
[2] Горнотаёжная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН
(с. Горнотаёжное, Приморский край)

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЭПИДЕРМЫ ЛИСТА *Saussurea pulchella* (Fisch.) Fisch. И *S. neopulchella* Lipsch.

Исследование проведено при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 14.В37.21.2004).

Изучена эпидерма листа таксономически трудно дифференцируемых дальневосточных видов Saussurea pulchella и S. neopulchella. Представлены результаты морфометрического анализа основных клеток эпидермы и устьиц. Сравнительное исследование эпидермальных клеток и устьичного аппарата листа S. pulchella и S. neopulchella позволило выявить признаки, константные на уровне рода (форма околоустьичных и основных эпидермальных клеток, тип и форма устьиц), а также признаки, позволяющие идентифицировать виды (тип листа, размер основных эпидермальных клеток по продольной (длинной) оси, устьичный индекс). Выявленные особенности строения эпидермы могут использоваться в качестве дополнительных диагностических признаков при идентификации видов.

Ключевые слова: *Saussurea; эпидерма; морфометрический анализ.*

Введение

Во флористических сводках России, Кореи и Китая нет единого мнения в отношении видовой самостоятельности вида *Saussurea neopulchella*, описанного С.Ю. Липшицем в 1961 г. по сборам 1861 г. с острова Сахалин. Для Дальнего Востока России В.Н. Ворошилов [1–2] указывает *S. pulchella*, отмечая распространение вида на территории Приморья, Приамурья и острова Сахалин. M. Kitagawa [3] для Приамурья, Манчжурии, Кореи и Японии указывает *S. pulchella* f. *latifolia* (Maxim.) Kitag., а *S. neopulchella* рассматривается им как синоним этого таксона. В сводках по флоре Кореи [4–5] и Китая [6–7] приводится только *S. pulchella*. В «Определителе растений Приморья и Приамурья» [8] приводятся оба вида. В.Ю. Баркалов, обрабатывая род *Saussurea* для сводки «Сосудистые растения советского Дальнего Востока» [9], также приводит два самостоятельных вида, отмечая, однако, что на островах залива Петра Великого и на побережье материковой части встречаются растения *S. pulchella*, габитуально сходные с *S. neopulchella*. В сводке С.К. Черепанова [10] для Дальнего Востока России указываются оба вида.

Так как видовая самостоятельность *S. neopullchela* оказалась спорной, автором были предприняты исследования эпидермы листа для выявления дополнительных диагностических признаков и оценки обособленности вида от *S. pulchella*. Таксономическая ценность стоматографических признаков в семействе *Asteraceae* весьма значительна и отмечена рядом авторов [11–15]. Например, исследуя структуру эпидермиса листа различных экологических форм 23 видов *Carlina* L., A. Kästner [12] установил стойкие особенности различных видовых групп, характерные особенности строения эпидермиса листа мезоморфного и ксероморфного типа. Д. Нинова [13] описала эпидермис листа 35 видов рода *Centaurea* L. и выявила, что комбинации таких признаков, как число устьиц, их размер, форма покровных клеток эпидермы и их число характеризуют собой отдельные секции, группы видов или отдельные виды и, следовательно, имеют таксономическую ценность. K. Napp-Zinn и M. Eble [14] изучили строение устьичного аппарата у 29 видов из 15 родов трибы A*nthemideae* (*Achillea* L., *Anacyclus* L., *Anthemis* L., *Artemisia* L., *Dendranthema* (DC.) Des Moul., *Leucanthemum* Mill., *Matricaria* L.) и установили, что аномоцитный тип устьичного аппарата является преобладающим. Э.В. Бойко с соавт. [15] исследовали структуру поверхности листа дальневосточных видов родов *Atractylodes* DC., *Serratula* L., *Synurus* Iljin, *Stemmacantha* Cass., а также 10 видов рода *Serratula* из других регионов. Изучение эпидермы дальневосточных видов рода *Saussurea* ранее не проводилось.

Цель исследования – изучить строение эпидермы листа *S. pulchella* и *S. neopulchella* для выявления дополнительных диагностических признаков.

Материалы и методики исследования

Чтобы исключить зависимость строения эпидермиса листа от внешних условий местообитания, сезонных метеорологических условий и возраста, для исследования использовали растения *S. pulchella* и *S. neopulchella*, выращенные из семян на коллекционном участке Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН в одинаковых условиях и одного возраста. Семена *S. pulchella* были собраны в Забайкальском крае, в окрестностях с. Кавыкучи, на разнотравном лугу, 29.08.2007 г.; семена *S. neopulchella* собраны в Приморском крае, окрестностях г. Владивостока, на железнодорожной насыпи у моря, 16.08.2008 г.

Для изучения брали участки эпидермы средней части нижних стеблевых листьев, готовили временные препараты нижнего и верхнего эпидермисов. Изучение препаратов проводили на микроскопе «Axioskop 40» (Германия) при увеличении 10 × 40. Фотографии сделаны с помощью фотоаппарата «Canon PS G7» (Япония), измерения проведены в 20-кратной повторности с помощью программы AxioVision Rel. 4.7, статистическая обработка (среднее значение, его ошибка, коэффициент вариации) выполнена в программе Microsoft Excel. Анатомические показатели эпидермы считаются маловариабельными, если коэффициент вариации Cv менее 20%, средневариабельными – при Cv >20%, сильновариабельными – при Cv >40% [16]. Типы устьичных аппаратов определяли по классификации М.А. Барановой [17], описание эпидермальных клеток проводили по методике С.Ф. Захаревича [18], устьичный индекс рассчитывали по формуле A. Kastner [12].

Результаты исследования и обсуждение

Морфометрические характеристики эпидермальных структур видов приведены в таблице. Ниже дано подробное описание эпидермы изученных видов.

S. neopulchella. Верхний эпидермис листа (рис. 1, *А*).

Лист гипостоматный (устьица на верхней поверхности листа отсутствуют). Основные эпидермальные клетки многоугольной или неправильной формы, с прямолинейными или прямолинейно-округлыми очертаниями. Антиклинальные стенки прямые или дуговидные. Размеры эпидермальных клеток изменяются в пределах от 51,24 до 78,84 мкм длиной и от 24,52 до 51,56 мкм шириной. Проекция эпидермальных клеток в плане многоугольная или распластанная. Эпидермальные клетки тонкостенные, их количество варьирует от 362 до 474 на 1 мм^2. Углы в смежных границах тупые, заостренные или прямые. Устьица отсутствуют. Устьичный индекс 0%. Встречаются однорядные многоклеточные простые волоски. Волоски образованы клетками кубовидной формы с удлиненной апикальной клеткой. В основании волоска находится клетка округлой формы, которая окружена многоугольными эпидермальными клетками, расходящимися в радиальных направлениях.

Нижний эпидермис листа (рис. 1, *Б*).

Основные эпидермальные клетки неправильной (амебоидной) формы с извилистыми очертаниями и волнистыми антиклинальными стенками, образующими лопасти. Частота волн и их амплитуда непостоянны. Размеры эпидермальных клеток изменяется в пределах от 27,93 до 56,4 мкм длиной и от 19,01 до 42,7 мкм шириной. Проекция эпидермальных клеток в плане распластанная. Эпидермальные клетки тонкостенные, их количество варьирует от 418 до 576 на 1 мм^2. Углы в смежных границах тупые, прямые, заостренные. Устьица одиночные, располагаются хаотично. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Устьица окружены 3–7 клетками. Размеры, амплитуда и частота волн околоустьичных клеток соответствует параметрам основных эпидермальных клеток, примыкающие к замыкающим клеткам по форме и размерам не отличаются от основных эпидермальных клеток. Определенной ориентации околоустьичных клеток не наблюдается. Устьица вытянуто-округлой формы, 24,97–32,96 мкм длиной и 15,27–24,83 мкм шириной. Количество устьиц на 1 мм^2 варьирует от 71 до 158. Устьичный индекс 19,93%. Встречаются однорядные многоклеточные простые волоски. Волоски образованы клетками кубовидной формы с удлиненной апикальной клеткой. В основании волоска находится клетка округлой формы, которая окружена многоугольными эпидермальными клетками, расходящимися в радиальных направлениях.

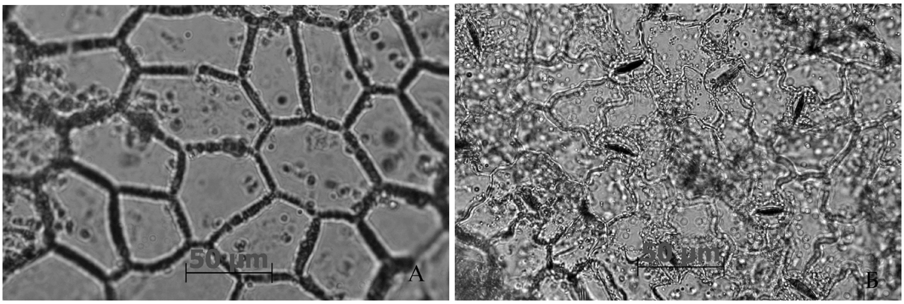


Рис. 1. Эпидерма листа *S. neopulchella*: *А* – верхний эпидермис; *Б* – нижний эпидермис. Масштабная линейка 50 мкм

S. pulchella. Верхний эпидермис листа (рис. 2, *А*).

Лист амфистоматный (устьица присутствуют на верхней и нижней поверхностях листа). Основные эпидермальные клетки многоугольной или неправильной формы, с прямолинейно-округлыми или извилистыми очертаниями, от 48,89 до 84,28 мкм длиной и от 22,66 до 50,34 мкм шириной. Антиклинальные стенки дуговидные или волнистые. Проекция эпидермальных клеток многоугольная, округлая или распластанная. Основные эпидермальные клетки тонкостенные, их количество варьирует от 331 до 479 на 1 мм^2. Углы в смежных границах тупые, закругленные, заостренные, прямые. Устьица одиночные, располагаются хаотично. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Устьица окружены 3–5, чаще 4 клетками. Околоустьичные клетки, примыкающие к замыкающим клеткам, по форме и размерам не отличаются от основных эпидермальных клеток. Определенной ориентации околоустьичных клеток не наблюдается, однако в некоторых случаях околоустьичные клетки располагаются определенным образом: две клетки примыкают к боковым сторонам замыкающих клеток (параллельно длинной оси устьица) и две – к полюсам устьица, но так как околоустьичные клетки не отличаются по структуре, форме и размерам от остальных клеток эпидермы, то в данном случае этот тип устьичного аппарата мы также относим к аномоцитному. Устьица вытянуто-округлой формы, 29,16–40,82 мкм длиной и 13,1–24,82 мкм шириной, их количество на 1 мм^2 варьирует от 25 до 51 шт. Устьичный индекс 8,48%. Встречаются однорядные многоклеточные простые волоски. Волоски образованы клетками кубовидной формы с удлиненной апикальной клеткой. В основании волоска находится клетка округлой формы, которая окружена многоугольными эпидермальными клетками, расходящимися в радиальных направлениях.

Нижний эпидермис листа (рис. 2, *Б*).

Основные эпидермальные клетки неправильной формы с нерегулярно крупно-волнистыми антиклинальными стенками и крупно-извилистыми очертаниями.

Морфометрическая характеристика эпидермальных структур *S. pulchella* и *S. neopulchella*

Признак / Вид		*S. neopulchella*		*S. pulchella*	
Поверхность листа		Верхняя	Нижняя	Верхняя	Нижняя
Тип листа		Гипостоматный		Амфистоматный	
Характер АС ЭКЛ		Прямолинейные, прямолинейно-округлые	Извилистые	Прямолинейно-округлые, извилистые	Крупно-извилистые
Характер проекции площади ЭКЛ		Многоугольный, распластанный	Распластанный	Многоугольный, распластанный, округлый	Вытянутый, распластанный
Среднее количество ЭКЛ на 1 мм^2, шт.		421,67 ± 13,23	505,76 ± 22,55	406,5 ± 26,8	451,18 ± 35,55
Коэффициент вариации, %		9,4	11,8	14,76	20,85
Средний размер ЭКЛ, мкм	Длина	59,91 ± 1,65	46,87 ± 1,45	66,92 ± 2,39	62,7 ± 2,3
	Коэф. вариации, %	12,34	13,85	15,96	16,41
	Ширина	39,42 ± 1,47	30,27 ± 1,46	36,21 ± 1,5	32,73 ± 1,74
	Коэф. вариации, %	16,64	21,63	18,5	23,72
Средняя площадь ЭКЛ, мм^2		0,002345 ± 0,000085	0,001427 ± 0,000089	0,002423 ± 0,000142	0,002039 ± 0,00013
Тип УА		–	Аномоцитный	Аномоцитный	Аномоцитный
Средний размер устьиц, мкм	Продольная ось	–	27,89 ± 0,45	35,5 ± 0,65	30,34 ± 0,43
	Коэффициент вариации, %	–	7,27	8,25	6,35
	Поперечная ось	–	20,94 ± 0,59	18,21 ± 0,72	21,66 ± 0,31
	Коэффициент вариации, %	–	12,64	17,61	6,44
Среднее число устьиц на 1 мм^2, шт.		0	125,89 ± 11,75	37,7 ± 4,14	133,17 ± 11,03
Коэффициент вариации, %		–	24,69	24,55	21,91
УИ, %		0	19,93	8,48	22,79

Примечание. АС – антиклинальные стенки эпидермальных клеток; ЭКЛ – эпидермальные клетки листа; УА – устьичный аппарат; УИ – устьичный индекс; – отсутствие признака.

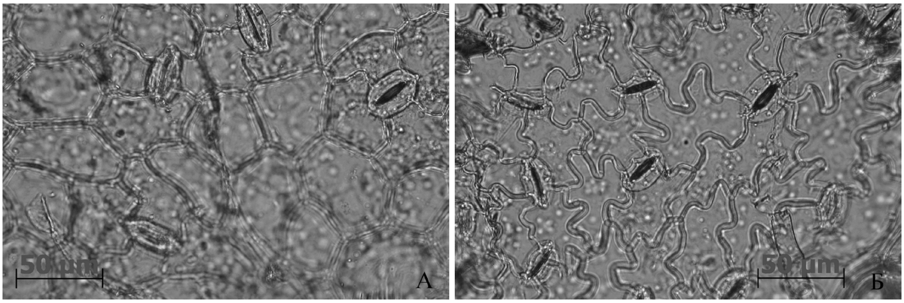


Рис. 2. Эпидерма листа *S. pulchella*: *А* – верхний эпидермис;
Б – нижний эпидермис. Масштабная линейка 50 мкм

Частота волн и их амплитуда непостоянны. Размеры эпидермальных клеток изменяются в очень широких пределах от 42,52 до 82,97 мкм длиной и от 23,19 до 47,81 мкм шириной. Проекция эпидермальных клеток в плане вытянутая или распластанная. Эпидермальные клетки тонкостенные, их количество варьирует от 357 до 627 на 1 мм^2. Углы в смежных границах тупые, заостренные, закругленные. Устьица одиночные, располагаются хаотично. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Устьица окружены 3–5, чаще 4 клетками. Околоустьичные клетки, примыкающие к замыкающим клеткам, по форме и размерам не отличаются от основных эпидермальных клеток. Определенной ориентации околоустьичных клеток не отмечено, однако в некоторых случаях околоустьичные клетки располагаются определенным образом: две клетки примыкают к боковым сторонам замыкающих клеток (параллельно длинной оси устьица) и две – к полюсам устьица, но так как околоустьичные клетки не отличаются по структуре, форме и размерам от остальных клеток эпидермы, то в данном случае этот тип устьичного аппарата мы также относим к аномоцитному. Устьица округлой формы, 26,93–33,46 мкм длиной и 19,08–24,1 мкм шириной. Количество устьиц на 1 мм^2 варьирует от 107 до 183. Устьичный индекс 22,79%. Встречаются однорядные многоклеточные простые волоски. Волоски образованы клетками кубовидной формы с удлиненной апикальной клеткой. В основании волоска находится клетка округлой формы, которая окружена многоугольными эпидермальными клетками, расходящимися в радиальных направлениях.

Сравнительное исследование эпидермальных клеток и устьичного аппарата листа *S. pulchella* и *S. neopulchella* позволило выявить признаки, константные на уровне рода (форма околоустьичных и основных эпидермальных клеток, тип и форма устьиц), а также признаки, позволяющие идентифицировать виды (тип листа, размер основных эпидермальных клеток по продольной (длинной) оси, устьичный индекс).

Заключение

Выявлены особенности строения эпидермы листа двух таксономически трудно дифференцируемых дальневосточных видов *S. pulchella* и *S. neopulchella*. Виды отличаются типом листа, устьичным индексом, размером основных эпидермальных клеток. Выявленные особенности строения эпидермы могут использоваться в качестве дополнительных диагностических признаков при идентификации видов.

Литература

1. *Ворошилов В.Н.* Определитель растений советского Дальнего Востока. М. : Наука, 1982. 672 с.
2. *Ворошилов В.Н.* Список сосудистых растений советского Дальнего Востока // Флористические исследования в разных районах СССР. М. : Наука, 1985. С. 197–198.
3. *Kitagawa M.* Neo-Lineamenta Florae Manshuricae. Vaduz : J. Cramer, 1979. 715 p.
4. *Lee T.* Illustrated Flora of Korea. Seoul : Hyang Moon Sa, 1993. 990 p.
5. *The genera* of vascular plants of Korea / ed. Chong-Wook Park. Seoul : Academy Publishing Co., 2007. 1482 p.
6. *Chu S. Saussurea* DC. // Flora Reipublicae Popularis Sinicae (Flora of China). Beijing : Science Press, 1999. Vol. 78 (2). 242 p.
7. *Higher* plants of China. Vol. 11: Angiospermae / Ed. Fu Likuo and Hong Tao. Qingdao : Qingdao Publ. House, 2005. 826 p.
8. *Определитель* растений Приморья и Приамурья / Д.П. Воробьев, В.Н. Ворошилов, П.Г. Горовой, А.И. Шретер. М. ; Л. : Наука, 1966. 491 с.
9. *Баркалов В.Ю.* Род Соссюрея – *Saussurea* DC. // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. СПб. : Наука, 1992. Т. 6. С. 254–296.
10. *Черепанов С.К.* Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб. : Мир и семья, 1995. 992 с.
11. *Pant D.D., Kidway P.* Development of stomata in *Lactuca sativa* L. // Ann. Bot. (Lond.). 1972. № 148. P. 1005–1009.
12. *Kästner A.* Blattepidermis-Strukturen bei *Carlina* // Flora. 1972. Bd. 161, № 3. S. 225–255.
13. *Нинова Д.* Сравнительно-анатомическое исследование васильков Болгарии. I. Эпидерма и устьичный аппарат // Ботанический журнал. 1973. Т. 58, № 9. С. 1357–1360.
14. *Napp-Zinn K., Eble M.* Beiträge zur Systematischen Anatomie der Anthemideae: Die Spaltöffnungsapparate // Plant. Syst. and Evol. 1977. Vol. 130, is. 1. P. 167–190.
15. *Зарембо Е.В., Бойко Э.В., Горовой П.Г.* Карпология и стоматография дальневосточных видов рода *Serratula* (Asteraceae) // Ботанический журнал. 2004. Т. 89, № 1. С. 82–99.
16. *Бутник А.А., Тимченко О.В.* Строение эпидермы листьев видов семейства Chenopodiaceae // Ботанический журнал. 1987. Т. 72, № 8. С. 1021–1030.
17. *Баранова М.А.* Классификация морфологических типов устьиц // Ботанический журнал. 1985. Т. 70, № 12. С. 1585–1595.
18. *Захаревич С.Ф.* К методике описания эпидермиса листа // Вестник Ленинградского университета. 1954. № 4. С. 65–75.

Поступила в редакцию 24.04.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 38–45
doi: 10.17223/19988591/23/3

Anna N. Vorobyeva[1], Dementii D. Basargin[2]

[1] Amur Branch of Botanical Garden-Institute of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Blagoveshchensk, Amur oblast, Russia
[2] The Mountain-Taiga Station of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Gornotaezhnoe, Ussuriysk district, Primorsky krai, Russia

STRUCTURAL FEATURES OF LEAF EPIDERMIS *Saussurea pulchella* (FISCH.) FISCH. AND *S. neopulchella* LIPSCH.

The leaf epidermis of taxonomically difficult Far East species of Saussurea pulchella and S. neopulchella were studied. The results of the morphometric analysis of the epidermal cells and stoma are presented. A comparative research of the epidermal cells and stoma of the leaf of S. pulchella and S. neopulchella allowed revealing constant parameters at the level of the genus: they are the form of around stomata and epidermal cells, the type and the form of stoma and trichomes. For both species of plants, the stomata of anomocytic type are characteristic. The stomata are of elongated and roundish form and they are surrounded by 3–7 cells. The size, the amplitude and the frequency of waves of around stomata cells correspond to the parameters of the epidermal cells. The form and the size of cells adjoining the guard cells do not differ from the epidermal cells. A certain orientation of around stomata cells is not observed. The epidermal cells are of a polygonal or wrong form with rectilinearly-roundish or twisting outlines. The projection of epidermal cells is polygonal, roundish or spread. Both species of plants have single-row multicellular simple trichomes on the upper and the lower surface of the leaf. They are formed by cells of a cubical form with the extended apical cell. In the basis of the trichome, there is a cell of a roundish form which is surrounded by polygonal epidermal cells dispersing in radial directions. The parameters identifying species are revealed; they are the type of the leaf, the size of the epidermal cells on the longitudinal (long) axis and the stomatal index. The leaf of S. neopulchella is hypostomatic (the stomata on the upper surface of the leaf are absent), whereas the leaf of S. pulchella is amfistomatic (the stomata are present on the upper and the lower surfaces of the leaf). The sizes of the epidermal cells on the longitudinal axis of S. neopulchella on the epidermis of the upper surface of the leaf change within the limits from 51.24 to 78.84 microns and on the epidermis of the lower surface of the leaf – from 27.93 to 56.4 microns. For S. pulchella, these indicators are within the limits from 48,89 to 84,28 microns for the epidermis of the upper surface of the leaf and from 42.52 to 82.97 microns for the epidermis of the lower surface of the leaf. The stomatal index of the species also differs: for the upper epidermis of S. neopulchella it is 0% and for the lower epidermis – 19.93%; for the upper epidermis of S. pulchella the index is 8.48% and for the lower epidermis – 22.79%. The researched parameters of the structure of the epidermis can be used as additional diagnostic signs at identification of species.

Key words: *Saussurea; epidermis.*

Received April 24, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 46–55

УДК 581.524.3.582.539(1–925.11)
doi: 10.17223/19988591/23/4

Б.Ф. Свириденко[1], Т.В. Свириденко[1], А.Н. Ефремов[2], О.Е. Токарь[3], К.С. Евженко[4]

[1] Сургутский государственный университет Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (г. Сургут)
[2] Проектный институт реконструкции и строительства объектов нефти и газа (г. Омск)
[3] Ишимский государственный педагогический институт им. П.П. Ершова (г. Ишим)
[4] Омский государственный педагогический университет (г. Омск)

ЭЛОДЕЯ КАНАДСКАЯ *Elodea canadensis* (Hydrocharitaceae) НА ЗАПАДНО-СИБИРСКОЙ РАВНИНЕ

Выявлены новые местонахождения инвазионного вида Elodea canadensis в 32 водных объектах Западно-Сибирской равнины. Современное распространение вида на север достигает 62° с.ш. (г. Сургут), на юг – до 52° с.ш. (г. Экибастуз). В пределах всего района распространения на Западно-Сибирской равнине E. canadensis сохраняет свойства доминанта, вытесняя аборигенные гидрофильные виды и формируя маловидовые фитоценозы с проективным покрытием до 50–100% и значительной продуктивностью (до 368–690 г/м² воздушно-сухой массы). На современном этапе сохраняется тенденция к дальнейшему расселению E. canadensis по Западно-Сибирской равнине.

Ключевые слова: *Elodea canadensis; Hydrocharitaceae; инвазионный вид; ценотическая роль; продуктивность; Западно-Сибирская равнина.*

Введение

Проблема инвазий чужеродных видов относится к важным направлениям фундаментальных и прикладных научно-исследовательских работ. Исключительную актуальность имеют информационное обеспечение оценок риска инвазий чужеродных видов и разработка современных методов мониторинга инвазийного процесса в целях оперативного контроля чужеродных организмов [1–3].

Элодея канадская *Elodea canadensis* Michx. является инвазионным видом для флоры Западно-Сибирской равнины. В Европе этот вид известен с 1836 г. как акклиматизант североамериканского происхождения, способный быстро заполнять водоемы, вытесняя из них аборигенные водные растения [4]. Завезенная в 1889 г. на Урал элодея канадская расселилась в течение нескольких десятилетий на обширном участке бассейна р. Оби, охваченном современными границами Свердловской, Челябинской, Курганской и Тюменской областей Российской Федерации [5–10]. В период с 1982 по 1985 г.

вид впервые был обнаружен на юге Западно-Сибирской равнины в северных областях Казахстана [11].

Н.К. Дексбах [8] отметил, что распространение *E. canadensis* по Уралу и Западной Сибири связано преимущественно с рыбопромысловыми водоемами. В североказахстанские водоемы *E. canadensis* также была занесена на орудиях рыболовства – сетях, неводах. Именно такой способ расселения определяет успешное продвижение вида к югу, т.е. против основного направления стока поверхностных вод [11].

Экологический ареал *E. canadensis* по материалам, полученным при изучении североказахстанских местообитаний, включает гидрокарбонатно-натриевые и хлоридно-натриевые воды, имеющие минерализацию 0,3–0,7 г/дм^3, общую жесткость 1,7–5,7 мг-экв/дм^3, кальциевую жесткость 1,0–1,1 мг-экв/дм^3, pH 7,2–8,5, прозрачность в течение вегетационного периода 0,5–3,8 м [11–13]. С учетом экологии *E. canadensis* нами было высказано предположение о ее распространении в ближайшие годы в других рыбохозяйственных водоемах юга Западно-Сибирской равнины. По гидрохимическим условиям более всего соответствуют экологическим требованиям *E. canadensis* пресноводные озера Ишимской равнины и Казахского мелкосопочника, а также водохранилища и каналы, построенные в долинах рр. Иртыш, Ишим, Тобол и их притоков [11, 12]. Более поздние данные полностью подтвердили этот прогноз: вид расселился по долинам этих рек и отдельным водоемам Тобол-Ишимского, Ишим-Иртышского и Иртыш-Обского водоразделов [14–24], в том числе проник на восток в Новосибирскую область и Алтайский край [25–27] и на юг до северной окраины Казахского мелкосопочника [28] (рис. 1). Однако состояние инвазии вида в регионе остается не исследованным.

Цель настоящей работы – обобщение собственных материалов о распространении, продуктивности и ценотическом значении *E. canadensis* на Западно-Сибирской равнине.

Материалы и методики исследования

Материал собран в ходе изучения гидрофильной растительности обширной территории, расположенной в основном между 52–62° с.ш. и 62–76° в.д. В 1982–2012 гг. сбор материала выполнялся в северных областях Республики Казахстан и Российской Федерации (Тюменская, Омская). В Казахстане обследовано свыше 200 водных объектов в бассейнах Убагана, Тобола, Ишима, Иртыша и в некоторых бессточных районах. В России на севере Тюменской области изучение проводилось на 80 участках акваторий разнотипных водных объектов Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) в бассейнах Пура и Таза, а также на 170 участках акваторий в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре (ХМАО) в бассейне Оби. На юге Тюменской области обследовано свыше 90 участков акваторий озер, рек, временных водоемов в бассейне Ишима. В Омской области обследовано более 100 водных объектов в бассейне Иртыша. Сбор и обработку гидроботанических материалов проводили в соответствии с традиционными методиками [29, 30].

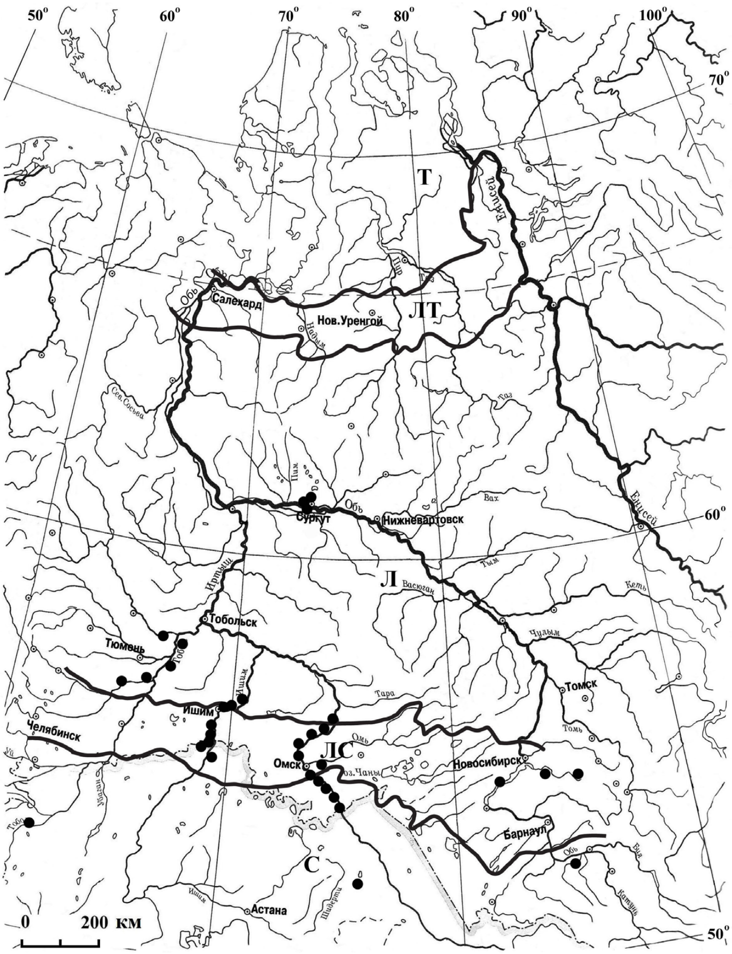


Рис. 1. Распространение *Elodea canadensis* на Западно-Сибирской равнине.
Ботанико-географические зоны: Т – тундровая, ЛТ – лесотундровая,
Л – лесная, ЛС – лесостепная, С – степная.
Жирной линией показаны границы зон

В Республике Казахстан и Ханты-Мансийском автономном округе Тюменской области материал по *E. canadensis* собран Б.Ф. Свириденко и Т.В. Свириденко, в южных районах Тюменской области – О.Е. Токарь, в Омской области – А.Н. Ефремовым (в отдельных пунктах вид обнаружен также К.С. Евженко, И.В. Бекишевой, Р.Г. Зариповым, Б.Ф. Свириденко). Образцы хранятся в Научном центре экологии природных комплексов НИИ экологии Севера СурГУ (Сургут), в гербарии кафедры биологии Омского государственного педагогического университета (Омск), на кафедре экологии, географии и методики их преподавания Ишимского государственного педагогического института им. П.П. Ершова (Ишим).

Результаты исследования и обсуждение

За период исследований авторами были зарегистрированы популяции *E. canadensis* в 32 из 640 обследованных водных объектов (5%), в том числе в Тюменской области – в 14 (из них в ХМАО – в 4), в Омской области – в 12, в Республике Казахстан – в 6. Приводим обнаруженные нами местонахождения *E. canadensis* в пределах Западно-Сибирской равнины. Административные области и районы приведены в соответствии с их названиями на период исследований. В целях фитоценотической характеристики местообитаний вида указаны доминанты ценозов и их проективное покрытие (ПП, %). Латинские названия гидрофильных видов сосудистых растений даны по «Флоре Сибири» [31], водорослей – по «Определителю…» [32].

Россия: Тюменская обл., ХМАО, г. Сургут, Сургутское водохранилище (61°19′ с.ш., 73º24′ в.д. – самое северное местонахождение из известных на Западно-Сибирской равнине), глубина 0,4–1,0 м, грунты – опесчаненный серый ил, суглинок, песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 10%), 09.06.2012; там же, правобережная пойма р. Оби, пойменное озеро (61°15′ с.ш., 73º09′ в.д.), глубина 0,1–0,9 м, грунт – заиленный песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 40%), 15.07.2012; Нефтеюганский р-н, протока Кривая (61°10′ с.ш., 73°02′ в.д.), глубина до 0,3 м, грунт – песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 40–80%), 15.09.2011; там же, левобережье долины р. Оби, проточные озера (61º07′ с.ш., 73°10′ в.д.), глубина 0,1–2,0 м, грунты – опесчаненный серый ил, суглинок, песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 100%) 23.05.2012; Казанский р-н, долина р. Ишим, окрестности пос. Огнево, оз. Полай (55°46′ с.ш., 69°18′ в.д.), глубина 0,7 м, грунт – заиленный песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 60–100%), 29.07.2003; там же, 3 км севернее пос. Баландино, оз. Хомутинка (55°30′ с.ш., 69°21′ в.д.), глубина 0,7 м, грунт – темно-серый ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 40–50%) + *Ceratophyllum demersum* L. (ПП 50%); там же, ценоз *E. canadensis* (ПП 60–70%) + *Potamogeton friesii* Rupr. (ПП 30%), 21.07.2004; там же, 3 км восточнее пос. Селезнево, старица Поповская (55º40′ с.ш., 69º15′ в.д.), глубина 0,3 м, грунт – заиленный песок, ценоз *Nymphaea candida* J. Presl (ПП 50–80%), там же, ценоз *C. demersum* (ПП 20–70%), 23.07.2004; там же, старица Сухая (55º41′ с.ш., 69°16′ в.д.), глубина 0,6 м, грунт – тонкодетритный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 40–50%) + *C. demersum* (ПП 50%), там же, ценоз *E. canadensis* (ПП 50–70%) + *Chara fragilis* Desv. (30–50%), 23.07.2004; там же, 2 км южнее пос. Гагарье, р. Большая Алабуга (56°00′ с.ш., 69°24′ в.д.), глубина 0,6 м, грунт – тонкодетритный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 80–100%), там же, ценоз *Sagittaria sagittifolia* L. (ПП

10%) – *Nymphoides peltata* (S.G. Gmelin) O. Kuntze (ПП 20–30%) – *E. canadensis* (ПП 60%), 07.08.2007; там же, 1,3 км восточнее пос. Шадринка (55°42′ с.ш., 69°14′ в.д.), глубина 0,6 м, грунт – тонкодетритный ил, ценоз *Sparganium erectum* L. (ПП 10–20%) – *Hydrocharis morsus-ranae* L. (ПП 20%) – *E. canadensis* (ПП 50%), 07.08.2007; Ишимский р-н, 1,5 км восточнее пос. Кошкарагай, оз. Кривое (56°07′ с.ш., 69°51′ в.д.), глубина 0,1–0,5 м, грунт – тонкодетритный ил, ценоз *C. demersum* (ПП 40%) + *Potamogeton pusillus* L. (ПП 30%), 06.08.2004; там же, оз. Кривое, 5,3 км юго-восточнее пос. Налимово (56°08’ с.ш., 69º55’ в.д.), глубина 0,5 м, грунт – тонкодетритный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 60–100%), 06.08.2004; там же, 0,3 км юго-восточнее пос. Макарово, р. Убьенная (56°10′ с.ш., 69°51′ в.д.), глубина 0,3–0,8 м, грунт – темно-серый ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 60%), 15.08.2007; там же, окрестности пос. Большой Остров, старица (56º06′ с.ш., 69°37′ в.д.), глубина 0,2 м, грунт – заиленный песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 30–40%) + *C. demersum* (ПП 40%), 14.08.2010; Омская обл., Большереченский р-н, окрестности пос. Шипицино, долина р. Иртыш, озеро (56°00′ с.ш., 74°39′ в.д.), глубина 0,4–1,0 м, грунт – детритный ил, ценоз *Stratiotes aloides* L. (ПП 30%) – *E. canadensis* (ПП 70%), 06.07.2010; Саргатский р-н, окрестности пос. Верблюжье, долина р. Иртыш, протока (55°22′ с.ш., 73°11′ в.д.), глубина 0,3–0,6 м, грунт – глинистый ил, ценоз *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel (ПП 50%) – *H. morsus-ranae* (ПП 5%) – *E. canadensis* (ПП 35%) + *Potamogeton perfoliatus* L. (ПП 5%), 15.06.2010; там же, окрестности пос. Увальная Бития, протока (55°29′ с.ш., 73°22′ в.д.), глубина 0,4–1,0 м, грунт – глинистый ил, ценоз *S. aloides* (ПП 40%) + *H. morsus-ranae* (ПП 30%) – *Hydrilla verticillata* (L. fil.) Royle (ПП 20%) + *E. canadensis* (ПП 10%), 20.06.2010; Любинский р-н, долина р. Иртыш, устье р. Авлуха при впадении в протоку (55°19′ с.ш., 73°00′ в.д.), глубина 0,2–0,6 м, грунт – глинистый ил с детритом, ценоз *E. canadensis* (ПП 85%) + *C. demersum* (ПП 10%), 22.09.2006; там же, окрестности пос. Авлы, пойменный водоем (55°19′ с.ш., 73°01′ в.д.), глубина 1,0–1,7 м, грунт – детритный ил, ценоз *N. candida* (ПП 35%) + *S. aloides* (ПП 35%) – *E. canadensis* (ПП 25%), 17.06.2007; там же, окрестности пос. Любино-Малороссы, водоотводный канал (55°12′ с.ш., 73°00′ в.д.), глубина 0,3–0,5 м, грунт – детритный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 80%) + *P. perfoliatus* (ПП 10%) + *C. demersum* (ПП 5%) + *Myriophyllum verticillatum* L. (ПП 5%), 22.09.2006; там же, протока (55°12′ с.ш., 72°59′ в.д.), глубина 0,8–1,5 м, грунты – детритный ил, заиленный песок, ценоз *N. candida* (ПП 35%) + *S. aloides* (ПП 35%) – *E. canadensis* (ПП 20%) + *H. morsus-ranae* (ПП 5%), 20.07.2008; там же, глубина 0,4–1,0 м, грунт – заиленный песок, ценоз *N. peltata* (ПП 35%) – *H. verticillata* (ПП 40%) + *E. canadensis* (ПП 20%), 24.07.2012; там же, окрестности пос. Политотдел, водоем (55°12′ с.ш., 73°10′ в.д.), глубина 0,7–1,8 м, грунт – глина, ценоз *S. aloides* (ПП 25%) – *E. canadensis* (ПП 65%) + *Lemna trisulca* L. (ПП 5%) + *P. perfoliatus* (ПП 5%), 18.06.2009; там же, глубина 0,4–1,0 м, грунт – заиленный песок, ценоз *H. morsus-ranae*

(ПП 5%) – *E. canadensis* (ПП 85%) + *P. perfoliatus* (ПП 5%) + *C. demersum* (ПП 5%), 18.06.2009; Таврический р-н, долина р. Иртыш, окрестности пос. Прииртышье, р. Ачаирка (54°32′ с.ш., 74°06′ в.д.), глубина 0,4–0,8 м, грунт глинистый ил, ценоз *P. australis* (ПП 55%) – *E. canadensi*s (ПП 40%), 20.07.2010; там же, протока р. Ачаирка (54°32′ с.ш., 74°06′ в.д.), глубина 1,0–1,5 м, грунт – глинистый ил, ценоз *S. aloides* (ПП 20%) – *E. canadensis* (ПП 70%), 20.06.2010; там же, окрестности пос. Пристанское, р. Ачаирка (54°28′ с.ш., 74°21′ в.д.), глубина 0,4–1,0 м, грунт – заиленный песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 80%) + *P. perfoliatus* (ПП 10%) + *C. demersum* (ПП 5%), 20.06.2010; Омский р-н, долина р. Иртыш, окрестности пос. Новоомский, пойменный водоем (54°50′ с.ш., 73°19′ в.д.), глубина 0,5–1,2 м, грунт – заиленный песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 85%) + *P. perfoliatus* (ПП 5%) + *Potamogeton lucens* L. (ПП 5%) + *C. demersum* (ПП 5%), 20.06.2010; Кормиловский р-н, долина р. Омь, окрестности пос. Корниловка, пруд (55°01′ с.ш., 73°56′ в.д.), глубина 0,2–2,0 м, грунт – глинистый ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 30%) + *Potamogeton crispus* L. (ПП 10%), 26.06.2010; там же, глубина 1,0–2,0 м, грунт – глинистый ил, ценоз *Potamogeton pectinatus* L. (ПП 10%) + *E. canadensis* (ПП 30%), 26.06.2010.

Казахстан: Северо-Казахстанская обл., Соколовский р-н, оз. Большое Пеньково (55°21′ с.ш., 69°05′), глубина 0,2–3,0 м, грунты – песок, заиленной песок, темно-серый и черный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 80–100%), 15.07.1984; там же, оз. Круглое (55°21′ с.ш., 69°08′ в.д.), глубина 0,4–1,0 м, грунты – темно-серый и черный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 30%) + *P. crispus* (ПП 5%), 10.08.1984; там же, г. Петропавловск, оз. Пестрое (54°50′ с.ш., 69°06′ в.д.), глубина 0,1–2,0 м, грунты – песок, темно-серый и черный ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 30–80%) + *P. crispus* (ПП 5–10%), 25.09.1985; Кустанайская обл., Орджоникидзевский р-н, Верхнетобольское водохранилище, заливы в средней левобережной части (52°30′ с.ш., 62°07′ в.д.), глубина 0,3–2,5 м, грунты – заиленный песок, темно-серый ил, ценоз *E. canadensis* (ПП 10%) + *P. crispus* (ПП 5%), 15.07.1985; Павлодарская обл., Экибастузский р-н, водохранилище-охладитель Экибастузской ГРЭС–2 (52°01′ с.ш., 75°22′ в.д. – наиболее южное местонахождение вида из известных на Западно-Сибирской равнине), глубина 0,1–1,0 м, грунты – глина, песок, заиленный песок, ценоз *E. canadensis* (ПП 80–100%), 25.09.2012; там же, глубина 1,0–2,5 м, грунт – темно-серый ил, ценоз *P. pectinatus* (ПП 40–50%) + *E. canadensis* (ПП 5–10%), 25.09.2012; там же, глубина 1,5–2,5 м, грунты – темно-серый и черный ил, ценоз *Myriophyllum spicatum* L. (ПП 50–100%) + *E. canadensis* (ПП 5%), 25.09.2012; там же, водоподводящий канал (52°02’ с.ш., 75°26’ в.д.), глубина 0,1–4,0 м, грунты – бетон, заиленный щебень, ценоз *C. demersum* (ПП 15%) + *E. canadensis* (ПП 50–100%), 25.09.2012.

Современное распространение *E. canadensis* в пределах Западно-Сибирской равнины достигает на севере 61°19′ с.ш., на юге – 52°01′ с.ш. Большинство местонахождений расположено на широтном участке, охватывающем север степной зоны, лесостепную зону и юг лесной зоны. В связи с тем что на этой территории по водоразделам поверхностные воды часто имеют минерализацию более 1 г/дм^3, *E. canadensis* расселилась преимущественно по долинам рр. Тобол, Ишим, Иртыш, Обь, где распространены водные объекты, имеющие минерализацию воды до 0,7 г/дм^3, что совпадает с экологическими требованиями вида. В последние годы обращает внимание значительное продвижение вида также на север до средней части лесной зоны (Сургут), где поверхностные воды как в долинах рек, так и на водоразделах имеют малую минерализацию (до 0,1–0,3 г/дм^3) и не ограничивают распространение *E. canadensis*.

Многолетние наблюдения показали, что инвазионный вид *E. canadensis* после вселения быстро достигает высокого проективного покрытия, проявляя свойства доминанта, и вытесняет из гидроэкотопов аборигенные виды погруженных гидромакрофитов. Считается, что *E. canadensis* имеет аллелопатическое влияние на некоторые виды водных растений [33]. Среднее проективное покрытие *E. canadensis* в изученных западносибирских ценозах достигает 52%. Проективное покрытие *E. canadensis* свыше 80% зарегистрировано более чем в 30% ценозов с участием этого вида. В первую очередь из естественных ценозов в водных объектах Западно-Сибирской равнины вытесняются такие виды, как *Ceratophyllum demersum, Myriophyllum spicatum, Potamogeton crispus, P. friesii*, а также *Hydrilla verticillata* – вид, включенный в «Красную книгу Омской области» [34]. Продуктивность ценозов с доминирующим участием *E. canadensis* на Западно-Сибирской равнине значительна. В лесостепной зоне Казахстана (бассейн Ишима) ценозы с доминированием *E. canadensis* образуют сырую фитомассу в количестве до 7 336 г/м^2, на юге Тюменской области в долине Ишима – до 6 133 г/м^2, на юге Омской области в долине Иртыша – до 3 700 г/м^2, что эквивалентно 690, 569 и 368 г/м^2 воздушно-сухой массы соответственно [11, 19, 24].

Заключение

На исследованной части Западно-Сибирской равнины *Elodea canadensis* расселилась в течение 90-летнего периода первоначально из лесостепной части Зауралья (бассейн Тобола), куда вид проник из европейской части России. Расселение проходило преимущественно по долинам крупных рек и их притоков, а также по пресноводным объектам водораздельных пространств на север до Сургута (61°19’ с.ш., 73°24’ в.д.) и на юг до Экибастуза (52°01’ с.ш., 75°22’ в.д.). Авторами зарегистрированы популяции *E. canadensis* в 32 из 640 обследованных водных объектов (5%), в том числе в Тюменской области – в 14 (из них в ХМАО – в 4), в Омской области – в 12, на севере Республики Казахстан – в 6. На территории расселения инвазионный вид *E. canadensis* проявляет свойства доминанта и вытесняет из гидроэкотопов аборигенные виды погруженных гидромакрофитов (*Ceratophyllum demer-*

sum, Myriophyllum spicatum, Potamogeton crispus, P. friesii, Hydrilla verticillata). Среднее проективное покрытие *E. canadensis* в изученных западносибирских ценозах достигает 52%. Проективное покрытие *E. canadensis* свыше 80% зарегистрировано более чем в 30% ценозов с участием этого вида. В лесостепной ботанико-географической зоне ценозы с доминированием *E. canadensis* образуют сырую фитомассу в количестве до 3 700–7 336 г/м^2, что эквивалентно 368–690 г/м^2 воздушно-сухой массы. На современном этапе сохраняется тенденция к дальнейшему расселению *E. canadensis* по Западно-Сибирской равнине.

Литература

1. *Дгебуадзе Ю.Ю.* Проблемы инвазий чужеродных организмов // Экологическая безопасность и инвазии чужеродных организмов. М. : МСОП, ИПЭЭ РАН, 2002. С. 11–14.
2. *Дгебуадзе Ю.Ю.* Национальная стратегия, состояние, тенденции, исследования, управление и приоритеты в отношении инвазий чужеродных видов на территории России // Инвазии чужеродных видов в Голарктике. Борок, 2003. С. 26–34.
3. *Дгебуадзе Ю.Ю., Петросян В.Г., Бессонов С.А. и др.* Общая концепция создания проблемно-ориентированного интернет-портала по инвазиям чужеродных видов в Российской Федерации // Российский журнал биологических инвазий. 2008. № 2. С. 10–20.
4. *Цвелев Н.Н.* Порядок частуховые *(Alismatales)* // Жизнь растений. М. : Просвещение, 1982. Т. 6. С. 9–24.
5. *Крылов П.Н.* Флора Западной Сибири. Томск : Изд-во ТГУ, 1927. Т. 1. 134 с.
6. *Федченко Б.А.* Сем. Hydrocharitaceae // Флора СССР. Л. : Изд-во АН СССР, 1934. Т. 1. С. 293–298.
7. *Дексбах Н.К.* Экология среднеуральской и западноуральской элодеи (*Elodea canadensis* Rich.) и элодейные водоемы // Доклады АН СССР. 1947. Т. 55, № 4. С. 359–362.
8. *Дексбах Н.К.* Элодея канадская в водоемах Среднего Урала и Зауралья // Труды Всесоюзного гидробиологического общества. 1951. Т. 3. С. 204–216.
9. *Дексбах Н.К.* Шестидесятилетие акклиматизации элодеи канадской на Среднем Урале и в Зауралье // Труды Томского университета. 1956. Т. 142. С. 77–82.
10. *Тимохина С.А.* Семейство Hydrocharitaceae – Водокрасовые // Флора Сибири. Новосибирск : Наука, 1988. С. 118–119.
11. *Свириденко Б.Ф.* Находки *Elodea canadensis (Hydrocharitaceae)* в Северном Казахстане // Ботанический журнал. 1986. Т. 71, № 12. С. 1686–1688.
12. *Свириденко Б.Ф.* Флора и растительность водоемов Северного Казахстана. Омск : Изд-во ОмГПУ, 2000. 196 с.
13. *Свириденко Б.Ф., Мамонтов Ю.С., Свириденко Т.В.* Использование гидромакрофитов в комплексной оценке экологического состояния водных объектов Западно-Сибирской равнины. Омск : Амфора, 2011. 231 с.
14. *Науменко Н.И., Волков Д.Б.* Определитель сосудистых растений Южного Зауралья. 2. Цветковые. Класс однодольные: *Alismatidae, Aridae* (*Typhaceae – Hydrocharitaceae, Araceae – Lemnaceae*). Курган, 2001. 87 с.
15. *Бабушкин А.А.* Изучение причин, путей и условий расширения ареалов адвентивных водных растений на примере *Elodea canadensis* Michx. *(Hydrocharitaceae)* // Гидроботаника (методология, методы) : материалы школы по гидроботанике. Рыбинск : Рыбинский Дом печати, 2003. С. 151–153.

16. *Бекишева И.В., Свириденко Б.Ф., Зарипов Р.Г. и др.* Флористические находки в Омской области // Ботанический журнал. 2003. Т. 88, № 4. С. 146–150.
17. *Токарь О.Е.* Флористический и ценотический состав макрофитной растительности пойменных водоемов р. Ишим // Естественные науки и экология. Омск : Изд-во ОмГПУ, 2004. Вып. 8, кн. 1. С. 1–15.
18. *Токарь О.Е. Elodea canadensis* Michx. как интродуцируемый вид в Тюменской области // Исследования молодых ботаников Сибири : тезисы докладов II молодежной конференции. Новосибирск, 2004. С. 67–68.
19. *Токарь О.Е.* Флора, растительность и фитоиндикация состояния водных экотопов реки Ишим и пойменных озер в пределах Тюменской области. Ишим : Изд-во ИГПИ им. П.П. Ершова, 2006. 207 с.
20. *Токарь О.Е.* Анализ флоры макрофитов притоков реки Ишим Казанского района (Тюменская область) // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники XXI века : материалы Всерос. конф. Ч. 4: Сравнительная флористика. Урбанофлора. Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2008. С. 125–126.
21. *Токарь О.Е.* Водная флора и растительность притоков реки Ишим // Экосистемы малых рек: экология, разнообразие и охрана : лекции и материалы докл. Всерос. школы-конф. Борок : Принтхаус, 2008. С. 294–298.
22. *Евженко К.С.* Флора и растительность водоемов долин правобережных притоков реки Иртыш: Омская область : автореф. дис. … канд. биол. наук. Омск, 2011. 14 с.
23. *Бекишева И.В., Свириденко Б.Ф., Зарипов Р.Г. и др.* Флористические находки в Омской области и в Ханты-Мансийском автономном округе // Бюллетень МОИП. Отдел. биол. 2009. Т. 114, вып. 3. С. 63–65.
24. *Ефремов А.Н., Свириденко Б.Ф.* Ценокомплекс *Stratiotes aloides* L. (Hydrocharitaceae) южной части Западно-Сибирской равнины // Вестник СПбГУ. Сер. биол. 2011. № 2. С. 28–38.
25. *Шауло Д.Н.* Сем. Водокрасовые – *Hydrocharitaceae* // Определитель растений Новосибирской области. Новосибирск : Наука, 2000. С. 368–370.
26. *Пяк А.И., Эбель А.Л., Эбель Т.В.* Новые и редкие виды растений во флоре Алтайского края и Республики Алтай // Krylovia. 2000. Т. 2, № 1. С. 67–72.
27. *Доронькин В.М., Положий А.В., Курбатский В.И. и др.* Флора Сибири. Т. 14: Дополнения и исправления. Алфавитные указатели. 2003. 188 с.
28. *Свириденко Б.Ф., Убаськин А.В., Свириденко Т.В.* Водная макрофитная растительность водохранилища – охладителя Экибастузской ГРЭС-2 : сб. трудов биол. факультета. Сургут : ИЦ СурГУ, 2012. Вып. 9. С. 17–36.
29. *Катанская В.М.* Высшая водная растительность континентальных водоемов СССР. Методы изучения. Л. : Наука, 1981. 187 с.
30. *Катанская В.М., Распопов И.М.* Методы изучения высшей водной растительности // Руководство по методам гидробиологического анализа вод и донных отложений. Л. : Наука, 1983. С. 129–218.
31. *Флора* Сибири. Новосибирск : Наука, 1988–2003. Т. 1–14.
32. *Определитель* пресноводных водорослей СССР. Л. : Наука, 1951–1983. Т. 1–14.
33. *Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В.* Черная книга флоры Средней России. М. : Изд-во ГЕОС, 2009. 494 с.
34. *Красная* книга Омской области. Омск : ОмГПУ, 2005. 460 с.

Поступила в редакцию 15.04.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 46–55
doi: 10.17223/19988591/23/4

Boris F. Sviridenko[1], Tatyana V. Sviridenko[1], Andrew N. Efremov[2], Olga E. Tokar[3], Konstantin S. Evzhenko[4]

[1]*Surgut State University, Khanty-Mansiiskiy Autonomous Area-Ugra, Russia*
[2]*Design Institute for Oil and Gas Projects Construction and Rehabilitation, Omsk, Russia*
[3]*Ishim State Pedagogical Institute im. P.P. Ershova, Ishim, Russia*
[4]*Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia*

CANADIAN PONDWEED *Elodea canadensis* (Hydrocharitaceae) IN THE WEST SIBERIAN PLAIN

In the West Siberian Plain, for a 90-year period Elodea canadensis has spread initially from the forest-steppe part of the Transurals (the Tobol River basin) mainly along the valleys of large rivers and their feeders as well as in freshwater objects in dividing areas up to Surgut (61°19'N, 73°24'E) in the north and Ekibastuz (52°01'N, 75°22'E) in the south. The authors have found populations of E. canadensis in 32 of the 640 studied water bodies (5%), including 14 in Tyumen Region (4 of them in the Khanty-Mansijsk Autonomous District), 12 in Omsk Region, 6 in the northern part of the Republic of Kazakhstan. In the covered territory, the invasion species E. canadensis exhibits dominating behavior and displaces indigenous species of immersed hydromacrophytes (Ceratophyllum demersum, Myriophyllum spicatum, Potamogeton crispus, P. friesii, Hydrilla verticillata) from the hydroecotopes. The average projective cover by E. canadensis in the studied West Siberian coenoses is up to 52%. Projective cover by E. canadensis over 80% has been registered in more than 30% coenoses where this species occurs. In the forest-steppe botanical-geographical belt, coenoses with dominating E. canadensis form a wet phytomass in the amount up to 3 700–7 336 g/m^2, which is equivalent to 368–690 g/m^2 of air-dry weight. Today, the trend towards further spreading of E. canadensis across the West Siberian Plain remains.

Key words: *Elodea canadensis; Hydrocharitaceae; invasion species; coenotic role; productivity; West Siberian Plain.*

Received April 15, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 56–72

УДК 582.594.2:581.14
doi: 10.17223/19988591/23/5

Г.Я. Степанюк, Л.В. Хоцкова

Сибирский ботанический сад Томского государственного университета (г. Томск)

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВ РОДА *Dendrobium* Sw., ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В СИБИРСКОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ТГУ

Приведены феноритмологические особенности семи видов рода Dendrobium Sw. при выращивании в оранжереях Сибирского ботанического сада Томского государственного университета. Представлены биометрические характеристики плодов видов данного рода и сроки их созревания, определены морфологические особенности развития проростков на питательных средах in vitro. Подобраны оптимальные субстраты, а также минеральные и органические подкормки, ускоряющие рост и развитие сеянцев D. phalaenopsis и D. nobile. Приведены результаты семилетних наблюдений за ростом и развитием сеянцев D. phalaenopsis, выращиваемых в условиях Сибирского ботанического сада. Установлено, что сеянцы D. phalaenopsis и D. nobile вступают в генеративную фазу развития на шестом году жизни. Проведена апробация способа ускоренного размножения «живыми детками» четырех видов дендробиумов. Авторами установлено, что растения дендробиумов, размноженные данным способом, в теплицах ботанического сада зацветают на третий год.

Ключевые слова: *Dendrobium; интродукция; феноритмика; репродуктивная биология; размножение in vitro.*

Введение

Одним из путей сохранения биологического разнообразия растений в ботанических садах является их интродукция. Интродукция, или введение в культуру, растений тропической и субтропической флоры в Сибири имеет свои особенности и складывается из нескольких этапов: строительство оранжерей, создание оптимальных температурных режимов, влажностных и других параметров для успешного роста и развития интродуцентов с учетом их природных экологических требований и т.п. Работы по введению в культуру тропических и субтропических представителей семейства Orchidaceae Juss. в Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета (СибБС ТГУ) были начаты в 1951 г., и первые орхидеи были привезены из Главного ботанического сада АН СССР (г. Москва). Они были представлены 4 видами: *Calanthe vestita* Wall. ex Lindl., *Coelogyne cristata* Lindl., *Coelogyne massangeana* Rchb. f., *Thunia marschaliana* Rchb. f. В настоящее время коллекция тропических и субтропических орхидей СибБС ТГУ насчитывает 124 вида, относящихся к 51 роду.

При выращивании орхидей в искусственно созданных условиях важной задачей является повышение их репродуктивного потенциала. Известно, что семена орхидных имеют своеобразные признаки, отличающие их от семян других цветковых растений. Это, в частности, небольшие размеры (0,25–1,5 мм в длину и 0,09–0,27 мм в ширину) и масса (0,3–14 мкг) [1]. Зародыш занимает всего 4–21% от общего объема семени, остальное пространство составляет воздушная полость. В природных условиях семена распространяются ветром, и такая структура обеспечивает им легкость и летучесть. Наличие большого количества семян (до 3–6 млн в плоде) является полезным приспособлением для их распространения. Однако, как показали исследования А. Рао [2], семенное воспроизведение орхидных затруднено и даже в природных условиях прорастает всего 5% семян. Преодоление этих трудностей становится возможным при искусственном опылении цветков, получении семян и размножении их в культуре *in vitro*.

Цель исследований – изучение репродуктивных особенностей видов рода *Dendrobium* Sw. (дендробиум) при выращивании в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ.

Материалы и методики исследования

Род *Dendrobium* Sw. насчитывает более тысячи видов и около тысячи садовых гибридов, весьма разнообразных по своим вегетативным признакам [3–5]. Все виды – эпифитные растения, часто поселяющиеся на стволах и ветвях деревьев, что нашло отражение в названии рода (греч. dendron – дерево, bios – жизнь). Одни виды дендробиумов имеют длинные стебли, по всей длине покрытые листьями, – часто листопадные; цветки в парах или одиночные на коротких цветоножках по всей длине стебля. Другие виды с короткими стеблями – вечнозеленые, образуют листья и соцветия на верхушках стебля; цветки в парах или по три, иногда образуют поникающие многоцветковые соцветия. Некоторые виды образуют цветки на безлистных стеблях. Наибольшее распространение дендробиумов наблюдается в тропических и некоторых субтропических областях Юго-Восточной Азии, на островах Малайского архипелага, а также в Австралии, Новой Гвинее, Новой Зеландии, в Океании и даже в Японии.

Род *Dendrobium* Sw. в коллекционных фондах тропических и субтропических растений СибБС ТГУ представлен 13 видами: *D. aduncum* Lindl., *D. aphyllum* Roxb., *D. chrysotoxum* Lindl., *D. chrysanthum* Wall. ex Lindl., *D. delicatum* Bidw., *D. fimbriatum* Hook., *D. hercoglossum* Rchb. f., *D. kingianum* Bidw., *D. loddigesii* Rolfe, *D. moschatum* Sw., *D. nobile* Lindl., *D. phalaenopsis* Fitzg., *D. unicum* Seidenf. Кроме того, в коллекции имеется 10 сортов дендробиумов, представляющих собой межвидовые гибриды *D. nobile, D. phalaenopsis* и *D. unicum*.

Дендробиум фаленопсис (*D. phalaenopsis* Fitzg.) родом из Восточной Австралии. Стебли коленчатые, зеленые, одетые светло-зелеными чешуями.

Листья ланцетные, мясистые, острые. Соцветие конечное, многоцветковое. Окраска цветков варьирует от розовой до розово-фиолетовой или фуксиевой. Лепестки ромбические, острые, слегка завернутые. Губа трехлопастная, у основания переходящая в тупой, охваченный чашелистиками шпорец (рис. 1).

Рис. 1. Дендробиум фаленопсис (*D. phalaenopsis* Fitzg.)
в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

Дендробиум мускатный (*D. moschatum* Sw.) родом из Индии. Стебли цилиндрические, продольножелобчатые. Листья двурядные, продолговато-ланцетные, тупые с загнутым краем, слегка килеватые. Соцветие верхушечное, многоцветковое. Лепестки ромбически-яйцевидные, оранжево-желтые. Губа туфельковидная, по краю сильно волнистая, бахромчатая, интенсивно желтая, в зеве с двумя темно-коричневыми крупными пятнами (рис. 2).

Рис. 2. Дендробиум мускатный (*D. moschatum* Sw.)
в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

Дендробиум золотистый (*D. chrysotoxum* Lindl.) родом из Китая, Бирмы. Стебли веретенообразные, ветвистые, на верхушке трех-четырехлистные. Листья кожистые, продолговато-ланцетные, на верхушке слегка двунадрезанные. Цветонос верхушечный, многоцветковый. Цветки светло-желтые. Лепестки ромбически-обратнояйцевидные, на верхушке выемчато-остроконечные. Губа тускло-оранжево-желтая, ворончато-блюдцеобразная, в зеве с тонкими пурпурно-красноватыми полосками и сильно волнистым краем (рис. 3).

Дендробиум деликатный (*D. delicatum* Bidw.) родом из Восточной Австралии. Стебли цилиндрические, к основанию утолщенные. Листья ланцетные. Цветки мелкие, кремово-белые (рис. 4).

Рис. 3. Дендробиум золотистый (*D. chrysotoxum* Lindl.)
в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

Рис. 4. Дендробиум деликатный (*D. delicatum* Bidw.)
в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

Дендробиум бахромчатый (*D. fimbriatum* Hook.) родом из Гималаев. Стебель до 1,5 м высоты. Листья ланцетные, острые. Соцветие рыхлое, многоцветковое, поникающее. Цветки блестящие, оранжево-желтые. Чашелистики и лепестки широкоэллиптические, тупые. Губа округлая, густо бархатистая, по краю тонко рассеченная (рис. 5).

Дендробиум Кинга (*D. kingianum* Bidw.) родом из Западной Австралии. Стебли цилиндрические, к основанию утолщенные. Листья продолговато-ланцетные. Цветонос верхушечный с малоцветковым соцветием. Цветки мелкие. Лепестки ромбически-обратноланцетные, острые, белые с лиловато-розовой верхушкой и жилками (рис. 6).

Рис. 5. Дендробиум бахромчатый (*D. fimbriatum* Hook.) в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

Рис. 6. Дендробиум Кинга (*D. kingianum* Bidw.) в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

Дендробиум благородный (*D. nobile* Lindl.) родом из Гималаев и Южного Китая. Стебли многочисленные, мясистые, коленчатые, слегка изогнутые в междоузлиях. Цветки одиночные или по 2–3 в кистях. Чашелистики продолговатые, на верхушке лиловато-красные, у основания белые. Верхний чашелистик продолговатый, тупой, выемчатый на верхушке, нижние чашелистики асимметрично-продолговатые. Лепестки эллиптические, заостренные, слегка волнистые, той же окраски, что и чашелистики. Губа бархатисто-опушенная, воронковидно-завернутая; зев воронки губы темно-вишнево-лиловый, отгиб чисто белый с лиловым краем на верхушке (рис. 7).

Рис. 7. Дендробиум благородный (*D. nobile* Lindl.)
в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ (фото авторов)

В зависимости от условий произрастания в естественной среде дендробиумы, выращиваемые в СибБС ТГУ, разделены на две группы: теплолюбивые и умеренного содержания. К теплолюбивым относятся виды *D. nobile* и *D. phalaenopsis*, в ботаническом саду они выращиваются при температуре 20–24°С, остальные – при температуре 14–17°С, при интенсивности освещения в летний период 7–10 кЛк. Продолжительность светового периода зимой составляет 10–12 ч и достигается путем искусственного досвечивания люминесцентными лампами PHILIPS 36W, интенсивность освещения составляет 5–7 кЛк.

Период адаптации молодых сеянцев дендробиумов после стерильных условий и последующее их выращивание в постоянном субстрате проходили в тепличных условиях при температуре 19–22°С, относительной влажности воздуха 80–85% и естественном освещении 5 кЛк. В период адаптации сеянцев дендробиумов, а также в эксперименте о влиянии состава субстратов на рост и развитие подрастающих растений проводили попеременные корневые и внекорневые подкормки раствором минеральных солей по прописи Мурасиге – Скуга [4], регулярно – один раз в две недели. В эксперименте о влиянии органических и минеральных подкормок на рост и развитие растений дендробиумов полив испытуемыми растворами проводили с той же регулярностью.

Фенонаблюдения за исследуемыми видами и биометрические замеры проводили по общепринятой для ботанических садов методике [6]. Стерилизацию плодов осуществляли по методике Г.Я. Степанюк [7]. Подготовку питательных сред и их стерилизацию проводили по методике Т.М. Черевченко [8]. В качестве питательных сред при семенном размножении орхидей *in vitro* были использованы модифицированные среды Мурасиге – Скуга и Кнудсона [9]. Питательные среды стерилизовали в автоклаве при 0,12 МПа в течение 40 мин.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программных пакетов StatSoft STATISTICA 6.0 и MS Excel 2003. В табл. 1, 2 данные по биометрическим показателям представлены в виде средних арифметических ± стандартное отклонение по выборке (n = 5 – для табл. 1; n = 10 – для табл. 2). На рис. 8–11 данные представляют собой средние арифметические (n = 10) изученных биометрических показателей с доверительными интервалами с учетом критерия Стьюдента для 95%-ного уровня значимости [10]. При сравнении групп растений, различающихся по влиянию минеральных и органических подкормок (рис. 10, 11), выявили статистически значимые отличия (отмечены звездочкой) изученных параметров по сравнению с контролем ($p < 0,05$) [10].

Результаты исследований и обсуждение

Наблюдения за ритмом сезонного развития дендробиумов показали, что в оранжереях сада *D. fimbriatum* цветет зимой, *D. kingianum* и *D. delicatum* цветут в зимне-весенний период, *D. moschatum* и *D. chrysotoxum* – в летний, а *D. phalaenopsis* и *D. nobile* – в осенне-зимний период.

Начало цветения *D. fimbriatum* приходится на вторую декаду декабря. Продолжительность цветения одного соцветия составляет 20 дней. Длина цветоноса 14 см. Цветонос несет обычно 5 цветков со средним диаметром 7 см.

Начало цветения *D. kingianum* в оранжереях сада приходится на вторую декаду февраля. Продолжительность цветения одного соцветия 50–60 дней. У данного вида цветонос несет в среднем 5–7 цветков розовато-сиреневого цвета. Диаметр цветка составляет в среднем 1,5 см.

Начало цветения у *D. delicatum* наблюдается в первой декаде марта. Продолжительность цветения одного цветоноса 30 дней. Цветонос обычно несет 11–15 цветков кремово-белого цвета диаметром 1,5–2 см.

Начало цветения у *D. moschatum* в оранжереях сада приходится на вторую декаду июня. Продолжительность цветения одного цветоноса составляет всего 5–6 дней. На цветоносе обычно 7–9 цветков. Диаметр цветка в среднем 5,5 см.

Начало цветения *D. chrysotoxum* приходится на третью декаду июня. Продолжительность цветения одного цветоноса 18 дней. Цветонос обычно состоит из 9 цветков желтого цвета с коричневым мазком на губе. Диаметр цветка 5 см.

D. nobile в оранжереях сада начинает цвести со второй декады ноября. Продолжительность цветения одного соцветия колеблется от 28 до 30 дней. Диаметр цветка в среднем 4,2 см.

D. phalaenopsis в оранжереях сада начинает цвести со второй декады ноября. Цветонос длиной в среднем 38 см несет обычно от 4 до 7 цветков сиреневато-малинового цвета. Продолжительность цветения одного соцветия колеблется от 50 до 60 дней. Диаметр цветков в среднем равняется 5,7 см.

С целью изучения репродуктивных особенностей дендробиумов и разработки технологий их ускоренного размножения проводилось искусственное опыление цветков исследуемых видов. У опыленного цветка околоцветник начинал завядать на 5–7-й день после опыления. После успешного оплодотворения образовывались плоды-коробочки. Характеристика плодов изучаемых видов дендробиумов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика плодов видов рода *Dendrobium* Sw., выращиваемых в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ

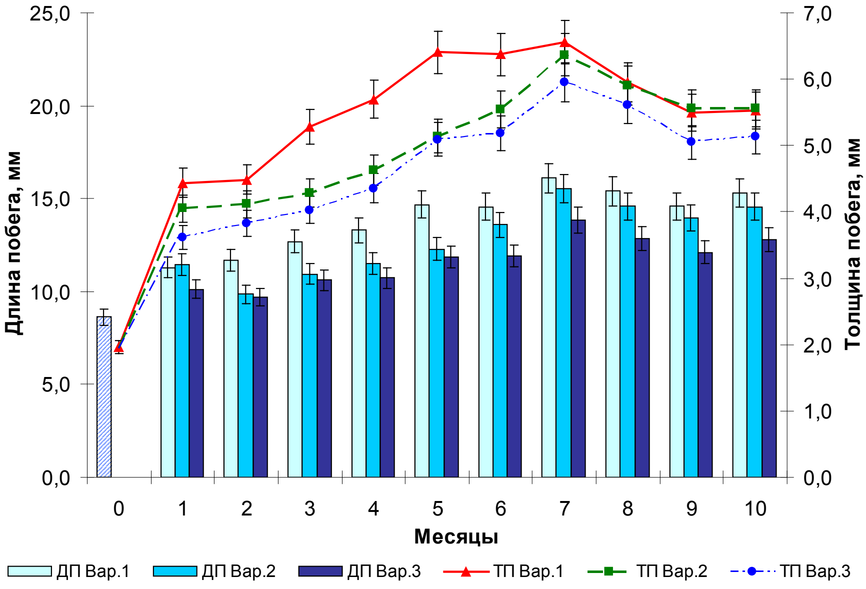
Вид	Масса плода, г	Длина плода, мм	Ширина плода, мм	Длительность созревания плодов, сут.
D. kingianum	0,102 ± 0,03	10,0 ± 1,1	7,2 ± 0,5	67,0 ± 2,4
D. nobile	4,52 ± 1,36	44,1 ± 6,1	19,5 ± 2,6	247,3 ± 31,1
D. phalaenopsis	2,05 ± 0,40	25,0 ± 1,7	10,5 ± 1,6	155,5 ± 15,25

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что самые крупные плоды и наибольшая продолжительность созревания семян отмечались у *D. nobile*.

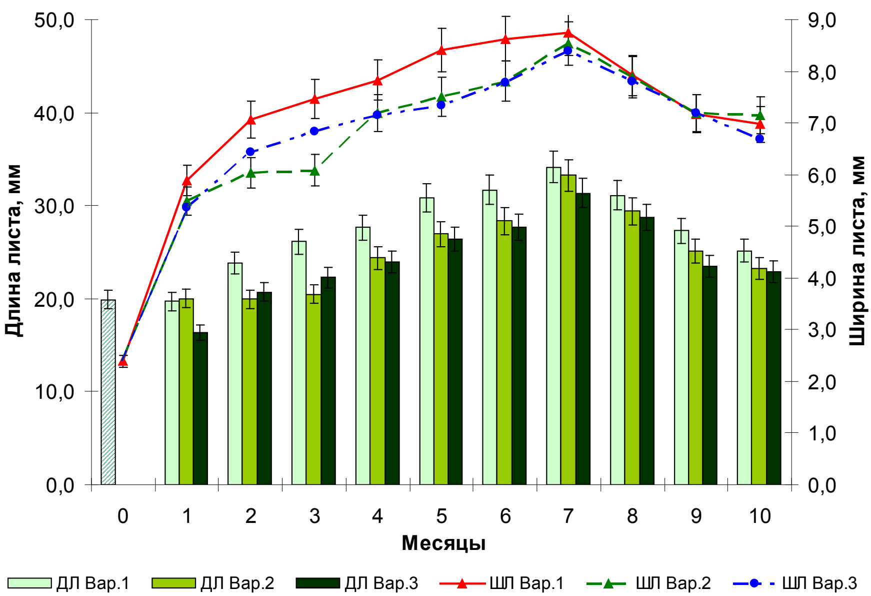
Были изучены этапы роста и развития проростков дендробиумов на питательных средах *in vitro*. После созревания семена высеивали на агаризованные питательные среды Мурасиге – Скуга и Кнудсона. Прорастание семян дендробиумов наблюдали через 30–35 дней после посева на безгормональной питательной среде Кнудсона с добавлением гумата натрия. Активное деление протокормов наблюдали на 50–60-е сут после посева. Образовавшиеся протокормы имели веретеновидную форму, 1,0 ± 0,05 мм в диаметре. Активный рост протокормов наблюдался в течение 10–12 недель, после чего проводилась пересадка на свежие питательные среды. Нами было отмечено, что начальные этапы прорастания семян и образования протокормов лучше происходили на питательной среде Кнудсона, в то время как питательная среда Мурасиге – Скуга способствовала росту и развитию самих проростков. Последующие пересадки осуществляли через каждые три-четыре месяца. Через 90–100 дней после посева семян на протокормах наблюдали образование апекса побега. Спустя 40–50 дней после начала образования побегов у проростков началась закладка листьев в виде несомкнутых валиков. Через 8–9 месяцев после посева семян начался этап образования корня. Вначале этот процесс напоминал образование меристематических бугорков в пазухах нижних листьев. Увеличиваясь в размерах, молодые корни росли в направлении питательной среды (базипетально). Они имели шнуровидную форму и серовато-зеленую окраску. Через 11–12 месяцев после посева семян сеянцы видов дендробиумов были готовы к пересадке из стерильных условий в промежуточный субстрат, в качестве которого использовали свежий сфагновый мох. При этом молодые растения имели хорошо развитую корневую и побеговую систему с 3–5 листочками и корешками. Было установлено, что в условиях СибБС ТГУ проростки дендробиумов лучше приживаются в промежуточном субстрате, если дочерние побеги (второго и далее порядков) не отделять от материнского побега (первого порядка) и выращивать их «семейками». Период адаптации сеянцев происходил в течение 10–15 месяцев. Средняя приживаемость сеянцев дендробиумов в промежуточном субстрате составила 72,5 ± 6,5%.

После периода адаптации молодых растений *D. phalaenopsis* в течение 15 месяцев в сфагновом мхе производили их пересадку в постоянный субстрат. Было использовано три варианта постоянных субстратов: 1) смесь коры сосны, сфагнового мха, верхового торфа и древесного угля в соотношении 1:2/3:2/3:1/2; 2) смесь верхового торфа, земли из-под хвойных пород и сосновой коры в соотношении 1/2:1/2:1 и 3) смесь коры сосны, сфагнового мха и древесного угля в соотношении 3:1:1. Через 10 месяцев эксперимента нами были получены следующие результаты (рис. 8, 9).

У сеянцев *D. phalaenopsis* влияние субстратов разного состава, главным образом, отразилось на ростовых характеристиках побегов и листьев. При смене условий обитания сеянцев (мох – постоянный субстрат) наблюдали увеличение ростовых параметров побегов, что свидетельствовало об их успешной адаптации в постоянном субстрате (рис. 8, *A*, месяцы 0–1).



А



Б

Рис. 8. Влияние субстратов на рост и развитие сеянцев *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg., выращиваемых в оранжереях СибБС ТГУ: *А* – динамика ростовых параметров побегов (ДП – длина побега, мм; ТП – толщина побега, мм); *Б* – динамика ростовых параметров листьев (ДЛ – длина листа, мм; ШЛ – ширина листа, мм)

Для *D. phalaenopsis* как растений с симподиальным ростом наблюдалось развитие новых листьев только на молодых побегах, что привело к уменьшению средних показателей ростовых параметров (рис. 8, *А, Б*; месяцы 7–10). Более интенсивное изменение ростовых параметров побега и листа происходило на субстрате 1-го варианта. Однако, в конечном итоге, колебания ростовых параметров сеянцев дендробиума фаленопсис в течение периода исследования привели к увеличению массы растения примерно в 1,5 раза от начала к концу эксперимента. Более выраженное накопление биомассы сеянцев *D. phalaenopsis* наблюдалось в 1-м варианте субстрата (рис. 9).

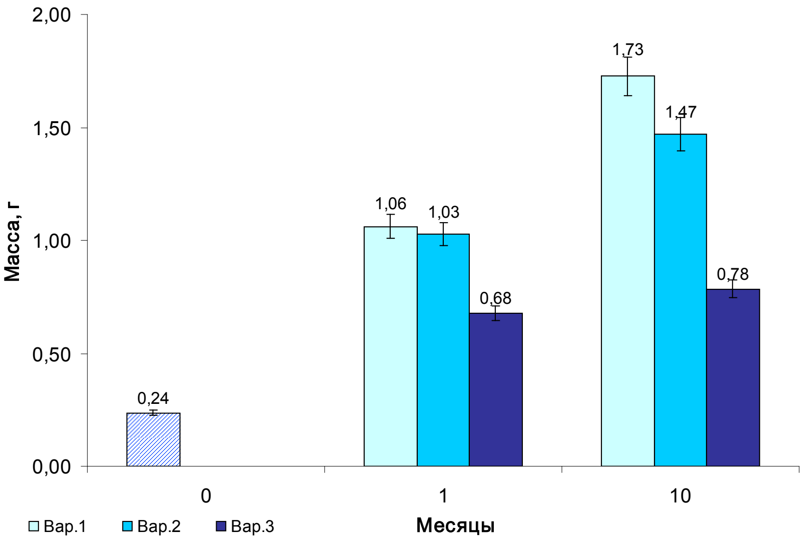


Рис. 9. Влияние субстратов на динамику массы растений *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg., выращиваемых в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ

С целью ускорения роста и развития трех-четырехлетних сеянцев дендробиумов проводилось исследование влияния минеральных и органических подкормок. В опыте было задействовано 4 группы растений *D. nobile* и *D. phalaenopsis* по 10 экземпляров в каждой. Подкормки проводили тремя разными растворами с периодичностью один раз в две недели. Первую группу растений подкармливали раствором Мурасиге – Скуга в концентрации 1 мл матричного раствора на 1 л дистиллированной воды. Вторую группу растений подкармливали раствором биоорганического удобрения «Идеал» в той же концентрации. Третью группу растений дендробиумов подкармливали раствором «Кемиры» в концентрации 0,25 г на 1 л дистиллированной воды. В качестве контроля были использованы растения вышеупомянутых видов, которые в это время поливали обычной водопроводной водой. Эксперимент проводился в течение двух лет (рис. 10, 11).

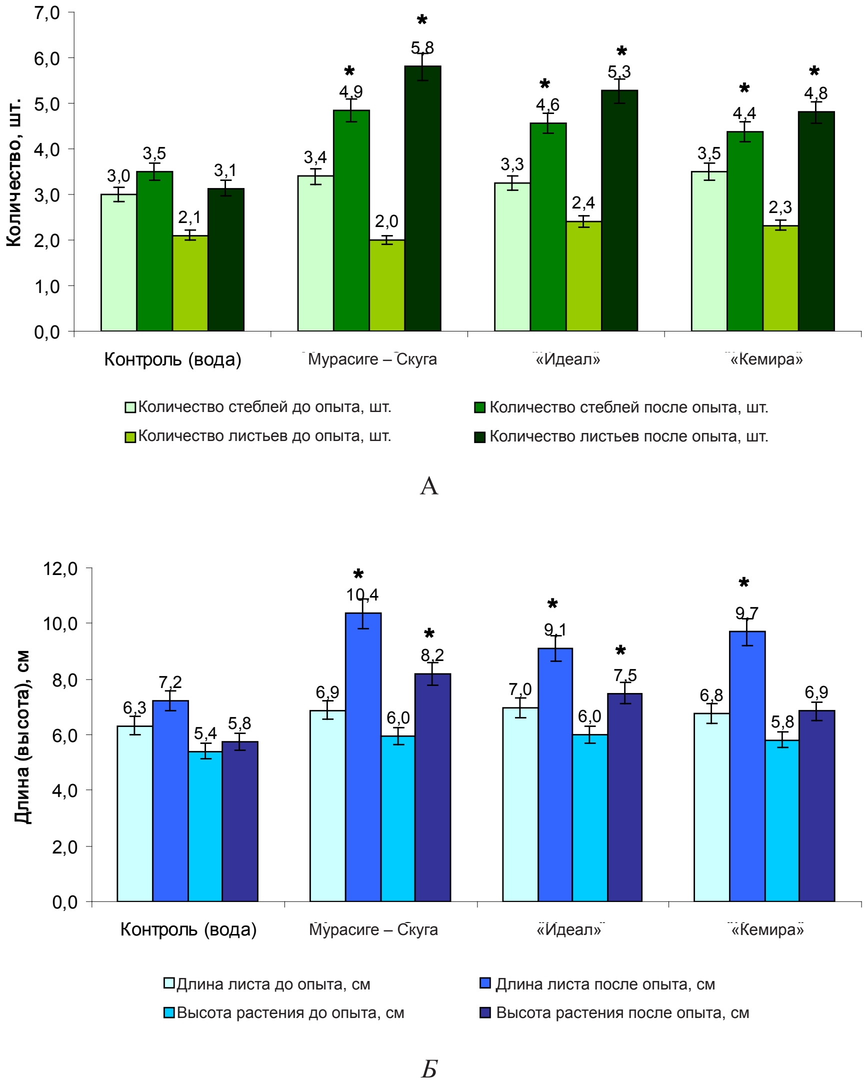
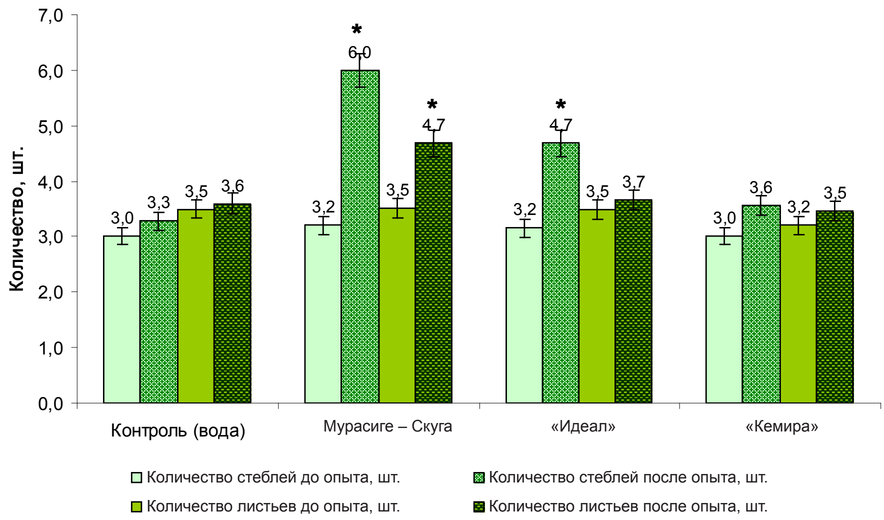
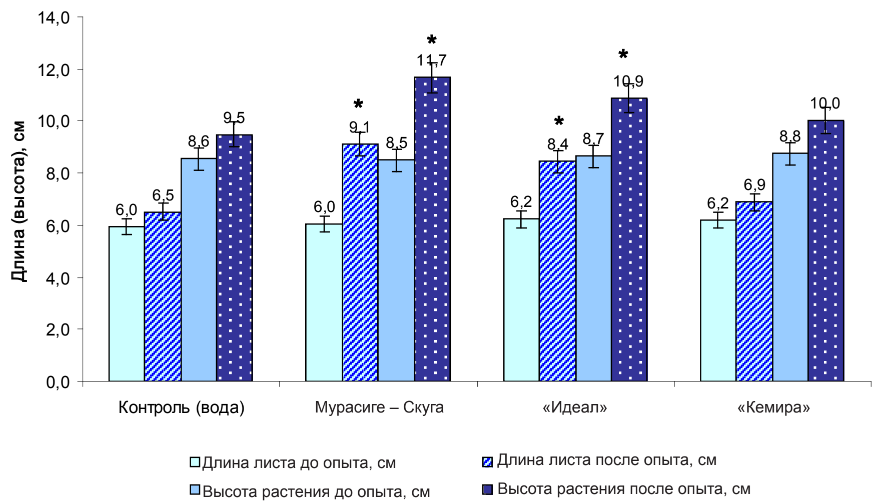


Рис. 10. Влияние минеральных и органических подкормок на динамику ростовых параметров сеянцев *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg., выращиваемых в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ: *А* – динамика количества стеблей и листьев, шт.; *Б* – динамика длины листа, см, и высоты растения, см

Результаты эксперимента показали, что наибольшим приростом характеризовались растения, подкармливаемые раствором Мурасиге – Скуга. Средний прирост высоты четырехлетнего сеянца *D. nobile* и *D. phalaenopsis* за период наблюдения составил 3,2 и 2,2 см соответственно. Высота растения *D. nobile* и *D. phalaenopsis* в среднем равнялась 11,7 и 8,2 см соответственно.



А



Б

Рис. 11. Влияние минерального и органического питания на динамику ростовых параметров сеянцев *Dendrobium nobile* Lindl., выращиваемых в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ: *А* – динамика количества стеблей и листьев, шт.; *Б* – динамика длины листа, см, и высоты растения, см

Эта группа выделялась и по количеству побегов, и по длине листа. Так, длина листа *D. nobile* составила 9,1 см, а *D. phalaenopsis* – 10,4 см против «контрольных» 6,5 см и 7,2 см соответственно. В ходе изучения влияния минерального питания на рост и развитие растений дендробиумов было установлено, что наиболее оптимальным является раствор Мурасиге – Скуга. При подкормке этим раствором наблюдалось даже первое цветение отдельных экземпляров.

Результаты дальнейших наблюдений за ростом и развитием сеянцев *D. phalaenopsis*, проведенных в течение семи лет, отражены в табл. 2.

Таблица 2

Биометрические характеристики сеянцев *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg., выращиваемых в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ

Возраст сеянцев	Высота сеянцев, см	Количество стеблей, шт.	Количество листьев, шт.	Длина листа, см
Однолетние	3,61 ± 0,15	1,9 ± 0,05	3,0 ± 0,19	3,32 ± 0,24
Двухлетние	4,24 ± 0,12	2,4 ± 0,02	3,6 ± 0,14	6,38 ± 0,32
Трехлетние	6,85 ± 0,14	3,6 ± 0,09	4,1 ± 0,12	8,46 ± 0,25
Четырехлетние	10,38 ± 0,13	4,8 ± 0,12	5,8 ± 0,16	10,35 ± 0,17
Пятилетние	12,17 ± 0,18	5,1 ± 0,11	6,1 ± 0,12	10,74 ± 0,21
Шестилетние	18,83 ± 0,11	6,0 ± 0,15	6,0 ± 0,08	10,85 ± 0,15
Семилетние	24,47 ± 0,09	6,2 ± 0,17	6,0 ± 0,14	10,89 ± 0,17

Из данных табл. 2 следует, что дендробиумы растут довольно медленно и высота четырехлетних экземпляров не превышает 10,38 см. Прирост стебля у данного вида к четырехлетнему возрасту составляет 2,25 см в год, а средняя скорость роста листа – 2,34 см в год. На шестой год наблюдается усиление роста стеблей, что, возможно, связано с переходом растений в генеративный период развития. Замедление роста листьев, возможно, связано с достижением ими своей максимальной длины. Зацветают молодые растения *D. phalaenopsis* в оранжереях СибБС на шестом году жизни.

Наряду с семенным размножением *in vitro* нами были опробованы и другие способы ускоренного размножения орхидей. Из исследуемых видов рода *Dendrobium* способность к образованию верхушечных побегов-отпрысков («живых деток») наблюдалась у четырех видов: *D. phalaenopsis*, *D. nobile*, *D. kingianum* и *D. delicatum*. Сущность этого способа размножения заключается в следующем: после цветения трогаются в рост пазушные почки и из них формируются молодые «детки», которые представляют собой миниатюрные растения, имеющие несколько листьев и хорошо развитую корневую систему. Эти побеги-отпрыски отделяли от материнского растения и пересаживали в постоянный субстрат, минуя этап адаптации в промежуточном субстрате. Экспериментальным путем установлено, что с одного побега дендробиума фаленопсисовидного и дендробиума благородного можно получить до 5 деток, а с одного побега дендробиума Кинга или дендробиума деликатного – 3 детки в год. Приживаемость деток у данных видов составила 85,5; 82,3; 77,1 и 80,4% соответственно. Установлено, что растения, размноженные данным методом, зацветают на третий год жизни.

Заключение

Наблюдения за ростом и развитием дендробиумов, интродуцированных в Сибирском ботаническом саду ТГУ, показали, что все виды в оранжереях сада проходят полный цикл развития. Самым продолжительным периодом цветения характеризуются *D. nobile*, *D. phalaenopsis* и *D. kingianum*, а наибольший диаметр цветка имеют *D. fimbriatum*, *D. moschatum* и *D. phalaenopsis*. По наблюдениям за сроками цветения нами было выяснено, что *D. fimbriatum* цветет в оранжереях сада в зимний период, *D. kingianum* и *D. delicatum* цветут в зимне-весенний период, *D. moschatum* и *D. chrysotoxum* – в летний, а *D. phalaenopsis* и *D. nobile* – в осенне-зимний период. Эти особенности цветения видов рода *Dendrobium* можно учитывать при создании садов непрерывного цветения. Отработана методика искусственного опыления цветков орхидей. При выращивании дендробиумов в оранжереях Сибирского ботанического сада продолжительность созревания плодов у *D. phalaenopsis* составляет 155 сут, у *D. nobile* – 247 сут и *D. kingianum* – 67 сут. Получены полноценные семена исследуемых видов.

Изучение этапов развития сеянцев *D. phalaenopsis* на питательных средах показало, что растения готовы к высадке в субстрат через 330 дней после посева семян. Установлено, что в условиях СибБС сеянцы дендробиума фаленопсисовидного лучше приживаются в промежуточном субстрате при выращивании их группами. Средняя приживаемость сеянцев дендробиумов в промежуточном субстрате составила 72,5 ± 6,5%.

Установлено, что *D. phalaenopsis* характеризуется медленным ростом. Прирост стебля у данного вида к четырехлетнему возрасту составляет 2,25 см в год, а средняя скорость роста листа – 2,34 см в год. На шестой год наблюдается усиление роста стеблей, что связано с переходом растений в генеративный период развития. Зацветают молодые растения *D. phalaenopsis* в оранжереях СибБС на шестом году жизни.

Исследовано влияние минеральных и органических подкормок на интенсивность роста и развития молодых растений *D. phalaenopsis* и *D. nobile*. Установлено, что из трех типов подкормок оптимальным является раствор минеральных солей по прописи Мурасиге – Скуга в концентрации 1 мл маточного раствора на 1 л воды.

Разработан способ размножения четырех видов дендробиумов «живыми детками». Установлено, что с одного побега *D. phalaenopsis* и *D. nobile* можно получить до 5 деток в год, а с одного побега *D. kingianum* или *D. delicatum* – 3 детки в год. Приживаемость деток у данных видов составила в среднем 81,3%. Установлено, что растения, размноженные данным методом, зацветают на третий год жизни.

Литература

1. *Arditti J.* Factors affecting the germination of orchid seeds // Botanical Review. 1967. № 1. P. 1–97.
2. *Rao A.* Tissue culture in the orchid industry // Plant cell tissue and organ culture. N.Y. : Springer, 1977. P. 44–69.
3. *Герасимов С.О., Журавлев И.М.* Орхидеи. М. : Росагропромиздат, 1988. 208 с.
4. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
5. *Белицкий И.В.* Орхидеи. М. : Астрель, 2001. 172 с.
6. *Лапин П.И.* Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР. М. : ГБС АН СССР, 1975. 28 с.
7. *Степанюк Г.Я.* Размножение тропических и субтропических растений *in vitro* в Сибирском ботаническом саду // Проблемы интродукции растений и отдаленной гибридизации. М., 1998. С. 196–197.
8. *Черевченко Т.М., Кушнир Г.П.* Орхидеи в культуре. Киев : Наукова думка, 1986. 200 с.
9. *Knudson L.* Non symbiotic germination of orchid seeds // Botanical gazette. 1922. Vol. 73. P. 1–25.
10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.

Поступила в редакцию 12.03.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 56–72

doi: 10.17223/19988591/23/5

Galina Ya. Stepanyuk, Lyubov V. Khotskova

Siberian Botanical Garden of Tomsk State University, Tomsk, Russia

REPRODUCTIVE FEATURES OF *Dendrobium* Sw. SPECIES INTRODUCED IN THE SIBERIAN BOTANICAL GARDEN OF TOMSK STATE UNIVERSITY

The phenorythmic features of seven species of Dendrobium Sw. during cultivation in hothouses of the Siberian botanical garden of Tomsk state university were studied. The studied Dendrobium species are divided into four phenorhythmic groups on terms of flowering in garden greenhouses: blossoming during winter period, blossoming during winter and spring periods, blossoming during summer period and blossoming during autumn and winter periods. Artificial pollination of Dendrobium flowers was carried out. Biometric characteristics of fruits of the studied Dendrobium species and terms of their maturing during cultivation under conditions of greenhouses of the Siberian botanical garden of TSU were submitted.

When cultivating the species of Dendrobium in greenhouses of the Siberian botanical garden, the duration of maturing of D. phalaenopsis fruits makes 155 days, D. nobile fruits – 247 days and D. kingianum fruits – 67 days. The technique of sterilization of fruits and seed crops on artificial nutrient mediums was fulfilled. The stages of the development of Dendrobium seedlings on nutrient mediums in vitro were studied. It is established that plants are ready to disembarkation in an intermediate substratum on the average in 330 days after crops of seeds. The period of adaptation of Dendrobium seedlings in an intermediate substratum made 10–15 months, then the seedlings were replaced in constant substrata. Average survival of Dendrobium seedlings in an inter-

mediate substratum made 72.5 ± 6.5%.

It is established that D. phalaenopsis is characterized by slow growth. An increase in D. phalaenopsis shoot makes 2.25 cm a year, and the average growth rate of a leaf – 2.34 cm a year. For the sixth year intensification of growth of D. phalaenopsis shoots is observed; that is, connected with transition of plants to the generative period of development. Young plants of D. phalaenopsis blossomed in greenhouses of the Siberian botanical garden on the sixth year of their life. The influence of mineral and organic nutrition on the intensity of growth and development of young plants of D. phalaenopsis and D. nobile was investigated. It is established that optimum nutrition is solution of mineral salts on Murashige&Skoog's copy-book in concentration of 1 ml of the MS solution on 1 l of water.

A way of reproduction of four Dendrobium species by «live children» was developed. It is established that from one shoot of D. phalaenopsis and D. nobile it is possible to receive up to 5 top shoots-suckers a year, and from one shoot of D. kingianum and D. delicatum – 3 top shoots-suckers a year. Survival of «children» of these Dendrobium species averaged 81.3%. It is established that Dendrobium plants multiplied by this method and blossomed for the third year of their life in hothouses of Siberian botanical garden.

Key words: *Dendrobium; introduction; phenorythmic features; reproductive biology; in vitro propagation.*

Received March 12, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 73–82

ЗООЛОГИЯ

УДК 57.034:591.54:599.32
doi: 10.17223/19988591/23/6

М.И. Чепраков

Институт экологии растений и животных УрО РАН (г. Екатеринбург)

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ И ДРУГИХ ФАКТОРОВ НА ПОЛОВОЕ СОЗРЕВАНИЕ СЕГОЛЕТОК (НА ПРИМЕРЕ РЫЖЕЙ ПОЛЕВКИ – *Clethrionomys glareolus* Schreber)

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-01369).

Наиболее высокую долю половозрелых молодых индивидуумов наблюдали в изучаемой популяции рыжей полевки в фазе популяционного подъема при среднем уровне плотности популяции. В пределах низких значений популяционной плотности пропорция половозрелых сеголеток уменьшается от 0,8 до 0,3. Это уменьшение связано с воздействием аномальных погодных условий и / или повышенной долей красной и красно-серой полевок в сообществе на изучаемый показатель. Плотностно-зависимые механизмы популяционной саморегуляции начинают работать уже при средней плотности (20–40 ос./га) в виде сезонного ингибирования полового созревания самок-сеголеток. В полной же мере их действие проявляется, когда плотность популяции превышает 40 ос./га, в результате чего доля репродуктивно-активных сеголеток приближается к нулю.

Ключевые слова: *рыжая полевка; доля половозрелых сеголеток; фазы популяционного цикла; популяционная плотность; нарушения монотонности кривой.*

Введение

Половое созревание мелких млекопитающих, которые живут в сезонно меняющейся среде, может наступать в год их рождения либо происходить в следующий сезон размножения в существенно большем возрасте. Подавление полового созревания сеголеток при высокой плотности популяции известно для грызунов [1–3]. Считается, что интенсивность полового созревания и участия в размножении прибылых особей связана с плотностью популяции монотонно убывающей зависимостью [4, 5]. Однако имеются данные, указывающие на то, что эта связь может быть не монотонной [6, 7].

Цель исследования – изучить изменения интенсивности полового созревания сеголеток в зависимости от популяционной плотности, представленной как в форме фазовых (спад, подъем, пик) изменений, так и в виде численных величин в разные годы.

Материалы и методы исследования

Влияние популяционной плотности и других факторов на половое созревание сеголеток исследовали на особях из природной популяции рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus* Schreber). С 1999 по 2011 г. раз в сезон во второй половине июля брали выборки из этой локальной популяции. Отлов животных проводили живоловками на полуизолированном участке леса площадью около 12 га с доминированием ели, на котором обитает исследуемая популяция. Ловушки проверяли 3 раза в сутки: утром, днем и вечером. Для оценки популяционного обилия использовали показатели попадаемости на 100 ловушко-суток (л.-с.) в первые два дня отлова. Репродуктивный статус полевок определяли по состоянию генеративной системы. К половозрелым относили беременных и рожавших самок, имеющих плацентарные пятна и / или эмбрионы в матке, и самцов с массой семенника более 150 мг с развитыми придатками и выраженным сперматогенезом. В работе понятия «половозрелые» и «репродуктивно-активные» использованы как синонимы. Оценки относительной численности рыжей полевки были преобразованы в оценки плотности по методике Бернштейн с соавт. [8]. Данные по годам группировали в три категории плотности: низкую (до 20 ос./га, спад, депрессия), среднюю (20–40 ос./га, подъем) и высокую (более 40 ос./га, пик). То, что за каждым годом среднего обилия следовал год высокой плотности, позволило считать их фазами подъема (роста). Факт, что годы низкого обилия следовали за пиковыми годами либо один за другим, позволил относить их к фазе спада (депрессии). Возраст животных определяли по форме и размерам второго верхнего зуба [9]. Для анализа использовали молодых рыжих полевок только в возрасте от 1,5 мес., так как в наших выборках половозрелые особи встречаются начиная с этого возраста. Общее количество исследованных сеголеток составило 443 индивидуума. Так как среди молодых полевок самые старшие особи имели возраст 3,5 мес., а среди перезимовавших животных самые молодые были не моложе 9,5 мес., заключаем, что за период наблюдений зимнего размножения не было. Другие методические аспекты сбора материала и его обработки описаны ранее [10]. При статистической обработке данных был использован пакет программ StatSoft STATISTICA 6.0 (лог-линейный анализ, статистика χ^2, множественный регрессионный анализ с использованием биномиальной логистической модели, ковариационный анализ). Данные представлены в виде M ± m – среднее значение и его ошибка. При сравнении средних значений использовали метод Шеффе.

Результаты исследования и обсуждение

Первоначально с помощью лог-линейного анализа было выяснено, что между возрастными группами 1,5 и 2 мес. нет различий в доле половозрелых особей между полами, возрастными группами и значениями у самцов и самок в различных возрастных группах (для частной связи $\chi^2 < 1{,}9$; df = 1; $p > 0{,}17$). Поэтому при оценке влияния фактора «возраст» использовали такие возрастные классы, как 1,5–2 и 3 мес.

Для выяснения взаимодействия факторов был проведен лог-линейный анализ с факторами «фаза численности» (3 градации), «пол» (2), «возраст» (2) и «репродуктивный статус» (2). Было установлено, что доля размножающихся среди молодых особей существенно меняется в зависимости от фазы цикла (для частной связи $\chi^2 = 164{,}8$; df = 2; $p < 1 \cdot 10^{-7}$) и в различных половозрастных группах (для частной связи $\chi^2 = 5{,}1$; df = 1; $p < 0{,}03$). Доля половозрелых сеголеток увеличивается при переходе от низкой (0,340; n = 94, при годовых значениях 0,83; n = 12; 0,18, n = 28; 0,32; n = 31 и 0,30; n = 23) к средней (0,647; n = 99; при годовых значениях 0,76; n = 58; 0,69; n = 16 и 0,36; n = 25; $\chi^2 > 18{,}0$; df = 1; $p < 0{,}001$). При высокой плотности эта доля наименьшая (0,028; n = 250; $\chi^2 > 58{,}7$; df = 1; $p < 0{,}001$). Максимальную долю репродуктивно-активных сеголеток в годы подъема плотности наблюдали у рыжей полевки и других видов [6, 7, 11].

У самок половозрелых особей больше в старшей (3 мес.) возрастной группе (0,388), чем в младшей (1,5–2 мес.; 0,178; $\chi^2 = 10{,}0$; df = 1; $p < 0{,}002$), а у самцов достоверных различий между этими возрастами нет (0,174 и 0,236; $\chi^2 = 1{,}2$; df = 1; $p = 0{,}28$). Значимые различия между возрастными группами 3 и 1,5–2 мес. у сеголеток наблюдаются на подъеме (0,852 и 0,569; $\chi^2 = 6{,}9$; df = 1; $p < 0{,}01$) и пике (0,071 и 0,006; $\chi^2 = 8{,}3$; df = 1; $p < 0{,}005$) и незначимые – при низкой численности популяции (0,375 и 0,329; $\chi^2 = 0{,}2$; df = 1; $p = 0{,}68$). Уменьшение процента самок, достигающих полового созревания, в позднее рожденных когортах, рассматривают как одну из форм сезонного ингибирования этого процесса [1]. У самцов такая форма ингибирования на нашем материале не обнаружена. Существенно, что подобная форма подавления сексуального созревания не выражена при низкой численности, но проявляется при среднем и высоком уровне обилия.

В изучаемом сообществе мелких млекопитающих рыжая полевка занимает доминирующее положение. В оценках обилия она составляет в среднем 0,68±0,02. В роли субдоминанта (0,15±0,01) выступает красная полевка (*Clethrionomys rutilus* Pall.). К подчиненным (0,02–0,05) компонентам относятся малая лесная мышь (*Silvaemus uralensis* Pall.), красно-серая полевка (*Clethrionomys rufocanus* Sundevall), представители родов серых полевок (*Microtus sp.* Schrank) и землероек (*Sorex sp.* L.). Редкими (< 0,01) являются полевая мышь (*Apodemus agrarius* Pall.), лесной лемминг (*Myopus schisticolor* Lilljeborg) и домовая мышь (*Mus musculus* L.). Доли красной полевки, малой лесной мыши и землероек в сообществе значимо ($p < 0{,}01$) увеличиваются (в среднем до 0,22; 0,14 и 0,11 соответственно) в годы низкой численности рыжей полевки. Доля красно-серой полевки, напротив, значительно ($p < 0{,}03$) выше (0,04) в периоды пиков, чем в другие фазы цикла (< 0,01). Степень участия серых полевок в сообществе при разных фазах плотности изменяется незначимо (p > 0,13). Полевая мышь и лесной лемминг были пойманы в годы низкой численности, а домовая мышь – в пиковый год. Степень доминирования рыжей полевки наименьшая при низкой плотности (0,46; $\chi^2 > 6{,}70$; df = 1; p < 0,001), наибольшая – в фазе подъема (0,84) и промежуточная – при высокой плотности (0,74; $\chi^2 = 2{,}5$; df = 1; p < 0,02). Если считать, что доминантный вид на своем трофическом уровне обладает наибольшей продуктивностью и продуктивность вида возрастает по мере увеличения его доли в сообществе, то можно заключить, что наибольшая эффективность увеличения численности свойственна изучаемой популяции рыжей полевки в периоды средней плотности. Существенный вклад в это вносят половозрелые сеголетки, когда степень их участия в размножении высока.

Зависимость годовых значений пропорции половозрелых самцов и самок рыжей полевки от ее популяционной плотности позволяет рассмотреть детальные особенности ее изменений (рис. 1). Можно видеть, что в пределах фазы депрессии (низкая плотность – до 20 ос./га) происходит уменьшение доли половозрелых сеголеток. Первая из точек, на основе которых построена данная зависимость, имеет координаты: *x* – 4,6 ± 0,70; *y* – 0,83 ± 0,108. Следующие три точки имеют координаты: *x* – 12,3 ± 1,94; *y* – 0,18 ± 0,072; *x* – 14,3 ± 2,94; *y* – 0,32 ± 0,084 и *x* – 18,78 ± 4,87; *y* – 0,30 ± 0,096. Эти три точки имеют сходные оценки популяционной плотности ($\chi^2 = 1{,}9$; df = 2; p > 0,30), а также сходные оценки доли половозрелых молодых ($\chi^2 = 1{,}8$; df = 2; p > 0,40). Поэтому данные за три года были объединены в одну выборку. Для объединенной выборки среднее значение величины плотности составляет 13,8 ± 1,56 ос./га, а значение доли половозрелых молодых равно 0,27 ± 0,049. Таким образом, в пределах фазы депрессии получили две точки и провели их сравнение по изучаемым параметрам. Оценки популяционной плотности достоверно отличаются ($\chi^2 = 30{,}2$; df = 1; p < 0,001) при переходе от интервала от 0–7 ос./га к интервалу 8–19 ос./га. Доли половозрелых особей также достоверно различаются ($\chi^2 > 14{,}3$; df = 1, p < 0,001) при переходе от интервала от 0–7 ос./га к интервалу 8–19 ос./га.

В интервале 20–30 ос./га лежат две годовые точки с координатами: *x* – 26,0 ± 2,94; *y* – 0,76 ± 0,056 и *x* – 29,2 ± 5,81; *y* – 0,69 ± 0,116. Координаты этих двух точек не различаются ($\chi^2 < 0{,}33$; df = 1; p > 0,50), поэтому данные за эти два года могут быть объединены в одну выборку с координатами: *x* – 26,7 ± 2,83; *y* – 0,74 ± 0,051. При переходе от интервала 8–19 ос./га к интервалу 20–30 ос./га фазы роста (средней плотности) увеличиваются как величина популяционной плотности ($\chi^2 = 19{,}9$; df = 1; p < 0,001), так и величина доли половозрелых сеголеток ($\chi^2 > 35{,}1$; df = 1; p < 0,001). В конце фазы роста последняя начинает уменьшаться ($\chi^2 = 12{,}0$; df = 1; p < 0,001). В фазе пика при плотности больше 40 ос./га доля половозрелых прибылых приближается к нулю. Таким образом, первое нарушение монотонности кривой (изменение знака связи с минуса на плюс), отражающей зависимость пропорции молодых половозрелых полевок в популяции от ее плотности, происходит при низкой плотности популяции в интервале 8–19 ос./га. Второе изменение знака связи (с плюса на минус) наблюдаем в интервале 20–30 ос./га в фазе роста при средней плотности.

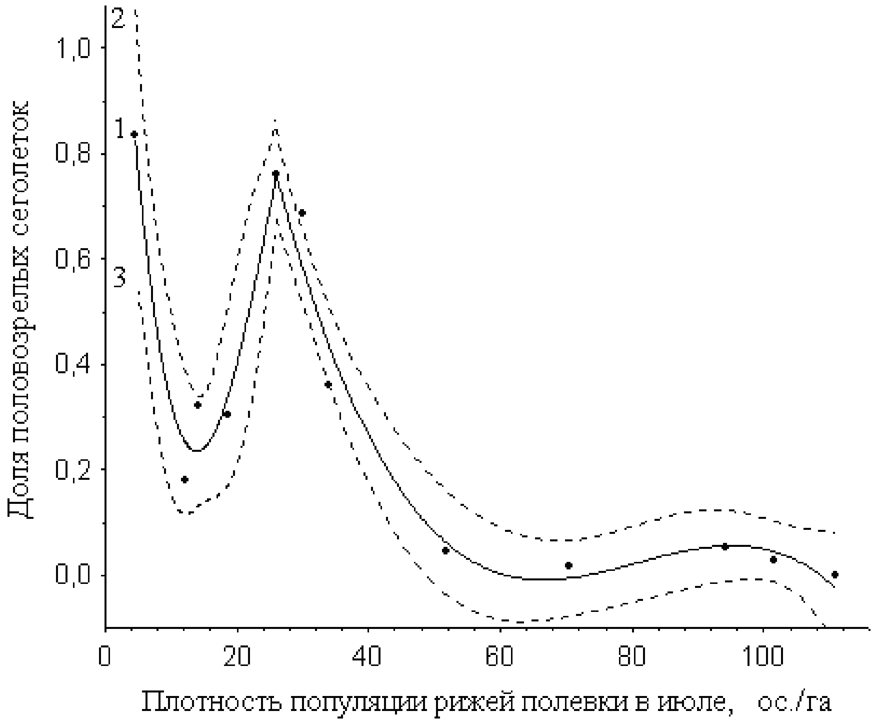


Рис. 1. Изменения доли половозрелых самцов и самок сеголеток рыжей полевки в зависимости от ее популяционной плотности в июле. *1* – линия полиноминальной регрессии третьего порядка; *2* – величина верхнего 95%-ного доверительного интервала; *3* – величина нижнего 95%-ного доверительного интервала. Точки – годовые средние значения

Известно, что высокая популяционная плотность отрицательно воздействует на пропорцию половозрелых сеголеток [12–18]. Однако этот показатель не только меняется под влиянием плотности, но и зависит от состояния кормовой базы [19, 20]. В свою очередь, на состояние кормовой базы влияют погодные условия. Так, условия сильной засухи могут полностью ингибировать половое созревание сеголеток рыжей полевки в условиях невысокой численности [21]. Считается, что плотность влияет на половое созревание молодых полевок через территориальное поведение взрослых самок и иерархическую структуру самцов [22]. Социальные взаимодействия между особями могут происходить как на внутривидовом, так и на межвидовом уровне. Известно, что такие экологические факторы, как межвидовые взаимодействия с представителями видов сходного и более высокого трофического уровня, могут влиять на пропорцию половозрелых самок-сеголеток [23–25].

С помощью множественного регрессионного анализа отдельно на двух интервалах плотности популяции (от 0 до 30 ос./га и более 30 ос./га) оценивали влияние популяционной плотности и других факторов на вероятность полового созревания сеголеток рыжих полевок. При анализе зависимости показателя от переменных использовали биномиальную логистическую модель (0 – неполовозрелые особи, 1 – половозрелые индивидуумы). В отдельные годы доля близкородственных видов (красной и красно-серой полевок) в изучаемом сообществе колебалась от 0 до 0,34. Состояние кормовой базы может изменяться под воздействием погодных условий. Так, в засушливые и жаркие либо холодные и дождливые годы может происходить ухудшение качества и уменьшение доступности кормов. При формировании погодного фактора такие годы были отделены от остальных. Результаты анализа показали, что в интервале плотности от 0 до 30 ос./га на изучаемый параметр оказывают влияние погодные условия в первой половине лета, доля в сообществе красной и красно-серой полевок, пол животных и плотность популяции рыжей полевки (таблица).

Влияние различных факторов на вероятность полового созревания сеголеток в интервале плотности популяции в июле от 0 до 30 ос./га

Фактор	Параметр уравнения регрессии	p
Константа	–0,49 ± 0,57	0,39
Погодные условия в первой половине лета	–1,15 ± 0,39	0,001
Доля в сообществе красной и красно-серой полевок	–1,20 ± 0,36	0,001
Пол полевок	0,84 ± 0,37	0,023
Плотность популяции рыжей полевки	0,06 ± 0,02	0,017

Чтобы детально рассмотреть влияние факторов на изучаемый показатель в интервале плотности от 0 до 30 ос./га и оценить возможное их взаимодействие, использовали ковариационный анализ. В качестве содержания исходных ячеек использовали годовые средние значения отдельно самцов или самок, взвешенные на величину выборок. Детальные изменения изучаемого параметра в зависимости от плотности популяции были рассмотрены выше, поэтому этот фактор использовали в качестве ковариаты. Ее влияние в комплексе высоко значимо, впрочем, как и влияние всех других факторов ($p < 0,001$). Величина объясненной изменчивости в этой модели составляет 81%. В годы, когда доля в сообществе красной и красно-серой полевок меньше 0,11, пропорция половозрелых сеголеток рыжей полевки составляет 0,64 ± 0,03 и больше, чем в остальные годы с большей долей (> 0,30) родственных видов в сообществе, в которые эта пропорция равна 0,34 ± 0,03. В засушливые и жаркие либо холодные и дождливые годы процент половозрелых особей в популяции равен 31 ± 1 и меньше, чем в годы без таких погодных аномалий (62 ± 3%). Среди самок рыжих полевок половозрелых индивидуумов больше (0,61 ± 0,04), чем среди самцов (0,46 ± 0,02).

В годы с обычными погодными условиями и с низкой долей (< 0,11) в сообществе красной и красно-серой полевок пропорция сексуально созревших рыжих полевок высока (0,78 ± 0,02). В такие же годы, но с высокой долей (> 0,30) родственных видов в сообществе (0,36 ± 0,04), либо в годы с аномальными погодными условиями (0,32 ± 0,01 и 0,30 ± 0,02, для взаимодействия факторов $p < 0{,}001$) эта пропорция низка. Следовательно, оба фактора, оказывающие отрицательное влияние на зависимую переменную, показывают сходное по величине воздействие, если не учитываются половые различия.

В годы с низкой долей близкородственных видов в сообществе (< 0,11) среди самок рыжих полевок половозрелых больше (0,76 ± 0,04), чем среди самцов (0,56 ± 0,03). А в годы с высокой (> 0,30) пропорцией в сообществе красной и красно-серой полевок у самцов и самок рыжих полевок доля половозрелых особей сходная (0,32 ± 0,01 и 0,30 ± 0,02, для взаимодействия факторов $p < 0{,}001$). Зато различия между полами сохраняются как в годы с аномальными погодными условиями (у самцов – 0,23 ± 0,01, у самок – 0,42 ± 0,01), так и в те, когда погода в первой половине лета обычная (у самцов – 0,56 ± 0,03, у самок – 0,73 ± 0,06). Следовательно, неблагоприятные погодные условия примерно в равной степени подавляют половое созревание как молодых самцов, так и молодых самок. А повышенная доля близкородственных видов в сообществе в большей мере действует на молодых самок рыжих полевок, чем на самцов. Сосуществование в сообществе с другими видами, в первую очередь близкородственными, может негативно воздействовать на половое созревание самок сеголеток рыжей полевки [23, 24, 26].

При аномальных погодных условиях эффект повышенной доли (> 0,30) близкородственных видов в сообществе не проявляется ни у самцов (0,22 ± 0,03 и 0,29 ± 0,03), ни у самок (0,45 ± 0,04 и 0,44 ± 0,03). Зато при обычной погоде в первой половине лета этот эффект хорошо выражен у самцов (0,41 ± 0,02 и 0,65 ± 0,02) и еще лучше – у самок (0,29 ± 0,02 и 0,94 ± 0,03, для тройного взаимодействия факторов $p < 0{,}001$). Следовательно, неблагоприятные погодные условия нивелируют эффект повышенной доли близкородственных видов в сообществе.

Для интервала плотности популяции более 30 ос./га множественный регрессионный анализ с использованием биномиальной логистической модели показал, что только популяционная плотность рыжей полевки оказывает значимое отрицательное влияние на независимую переменную (угловой коэффициент логит регрессии = –0,060 ± 0,016; $p < 0{,}001$). Доля в сообществе красной и красно-серой полевок (1,61 ± 0,095; $p = 0{,}09$) и пол (0,44 ± 0,59; $p = 0{,}46$) не влияют на изучаемый показатель. Константа не отличается от нуля (45 ± 59; $p = 0{,}46$). А погодные условия в первой половине лета были только благоприятными.

Заключение

Таким образом, в пределах низких и средних значений популяционной плотности в июле (от 0 до 30 ос./га) у рыжей полевки происходят нарушения монотонности кривой, отражающей зависимость доли половозрелых среди сеголеток от ее индексов обилия в июле. После высоких значений (~0,8) в интервале плотности от 0 до 7 ос./га пропорция половозрелых сеголеток уменьшается примерно до 0,3 в интервале плотности 8–19 ос./га. Это уменьшение связано с воздействием аномальных погодных условий в первой половине лета и / или повышенной долей красной и красно-серой полевок в сообществе на изучаемый показатель. Если неблагоприятные погодные условия примерно в равной степени подавляют половое созревание как самцов, так и самок сеголеток, то повышенная доля близкородственных видов в сообществе в большей мере действует на молодых самок рыжих полевок, чем на самцов. При аномальных погодных условиях эффект повышенной доли близкородственных видов в сообществе не проявляется ни у самцов, ни у самок рыжих полевок. Между интервалами популяционной плотности 8–19 и 20–30 ос./га наблюдали положительную связь индексов обилия рыжих полевок в июле с долей половозрелых молодых особей. В значительной мере это может быть связано с тем, что в те годы, когда плотность достигала значений 20–30 ос./га, погодные условия были благоприятными. Плотностно-зависимые механизмы популяционной саморегуляции начинают работать уже при средней плотности (20–40 ос./га) в виде сезонного ингибирования полового созревания самок-сеголеток. В полной же мере их действие проявляется, когда плотность популяции превышает 40 ос./га, в результате чего доля репродуктивно-активных сеголеток приближается к нулю.

Литература

1. *Bujalska G*. Regulation of female maturation in *Clethrionomys* species, with special reference to an island population of *C. glareolus* // Annales Zoologici Fennici. 1985. Vol. 22, № 3. P. 331–342.
2. *Gipps J.H.W*. Spacing behaviour and male reproductive ecology in voles of the genus *Clethrionomys* // Annales Zoologici Fennici. 1985. Vol. 22, № 3. P. 343–351.
3. *Boonstra R*. Population cycles in microtines – the senescence hypothesis //. Evolutionary Ecology. 1994. Vol. 8, № 2. P. 196–219.
4. *Окулова Н.М., Бернштейн А.Д.* Доля размножающихся среди самок-сеголеток – гибкий демографический параметр у лесных полевок // Экология популяций: структура и динамика : материалы совещ. М., 1995. С. 667–678.
5. *Tkadlec E., Zejda J*. Small rodent population fluctuations: The effects of age structure and seasonality // Evolutionary Ecology. 1998. Vol. 12, № 2. P. 191–210.
6. *Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Рогов В.Г*. Популяционная экология водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) в Западной Сибири. Сообщение I. Репродуктивная способность самок, полиморфных по окраске шерстяного покрова, на разных фазах динамики численности популяции // Сибирский экологический журнал. 1999. № 1. С. 59–68.

7. *Ozgul A., Getz L.L., Oli M.K.* Demography of fluctuating populations: temporal and phase-related changes in vital rates of *Microtus ochrogaster* // Journal of Animal Ecology. 2004. Vol. 73, № 2. P. 201–215.
8. *Бернштейн А.Д., Михайлова Т.В., Апекина Н.С.* Эффективность метода ловушко-линий для оценки численности и структуры популяции рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) // Зоологический журнал. 1995. Т. 74, вып. 7. С. 119–127.
9. *Оленев Г.В.* Определение возраста цикломорфных грызунов, функционально-онтогенетическая детерминированность, экологические аспекты // Экология. 2009. № 2. С. 102–115.
10. *Чепраков М.И.* Составляющие эффекта Читти // Экология. 2011. № 6. С. 478–480.
11. *Norrdahl K., Korpimaki E.* Changes in population structure and reproduction during a 3-yr population cycle of voles // Oikos. 2002. V. 96, № 2. P. 331–345.
12. *Myllymäki A.* Demographic mechanisms in the fluctuating populations of the field vole *Microtis agrestis* // Oikos. 1977. Vol. 29. P. 468–493.
13. *Hansson L., Henttonen H.* Regional differences in cyclicity and reproduction in *Clethrionomys* species: are they related? // Annales Zoologici Fennici. 1985. Vol. 22, № 3. P. 277–288.
14. *Bondrup-Nielsen S., Ims R.A.* Reproduction and spacing behaviour of females in peak density population of *Clethrionomys glareolus* // Holarctic Ecology. 1986. V. 9. P. 109–112.
15. *Gilbert B.S., Krebs C.J., Talarico D., Cichowski B.* Do *Clethrionomys rutilus* females suppress maturation in juvenile females? // Journal of Animal Ecology. 1986. Vol. 55. P. 543–552.
16. *Rodd F.H., Boonstra R.* Effects of adult meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, on young conspecifics in field populations // Journal of Animal Ecology. 1988. Vol. 57. P. 755–770.
17. *Gilbert B.S., Krebs C.J.* Population dynamics of *Clethrionomys* and *Peromyscus* in southwestern Yukon 1973–89 // Holarctic Ecology. 1991. Vol. 14. P. 250–259.
18. *Ostfeld R.S., Canham C.D., Pugh, S.R.* Intrinsic density dependent regulation of vole populations // Nature. 1993. Vol. 366. P. 259–261.
19. *Desy E.A., Batzli G.O., Liu J.* Effects of food and predation on behaviour of prairie voles: a field experiment // Oikos. 1990. Vol. 58. P. 159–168.
20. *Hansson L.* Demographic effects of food quality on the bank vole *Clethrionomys glareolus (*Schreber) // Ecoscience. 1995. Vol. 2. P. 41–47.
21. *Оленев Г.В.* Популяционные механизмы приспособлений к экстремальным факторам среды (на примере рыжей полевки) // Журнал общей биологии. 1981. № 4. С. 506–511.
22. *Viitala J. Hoffmeyer I.* Social organization in *Clethrionomys* compared with *Microtus* and *Apodemus:* social odours, chemistry and biological effects // Annales Zoologici Fennici. 1985. Vol. 22. P. 359–371.
23. *Lofgren O.* Niche expansion and increased maturation rate of *Clethrionomys glareolus* in the absence of competitors // Journal of Mammalogy. 1995. Vol. 76, № 4. P. 1100–1112.
24. *Prevot-Julliard A.C., Henttonen H., Yoccoz N.G., Stenseth N.C.* Delayed maturation in female bank voles, *Clethrionomys glareolus*: optimal decision or social constraint? // Journal of Animal Ecology. 1999. Vol. 68, № 4. P. 684–697.
25. *Fuelling O., Halle S.* Breeding suppression in free-ranging grey-sided voles under the influence of predator odour // Oecologia. 2004. Vol. 138, № 1. P. 151–159.
26. *Eccard J.A., Klemme I., Horne T.J., Ylonen H.* Effects of competition and season on survival and maturation of young bank vole females // Evolutionary Ecology. 2002. Vol. 16, № 2. P. 85–99.

Поступила в редакцию 12.03.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 73–82
doi: 10.17223/19988591/23/6

Mikhail I. Cheprakov

Federal State Establishment of Science Institute of Plant and Animal Ecology, of the Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

EFFECTS OF POPULATION DENSITY AND OTHER FACTORS ON MATURATION OF YOUNG OF THE YEAR (BY THE EXAMPLE OF BANK VOLE – *Clethrionomys glareolus* Schreber)

The present work is directed to study of changes of intensity of maturation of young of the year depending on population density. Since 1999 for 2011 years once in a season in second half of July took samples of local population bank vole (Clethrionomys glareolus Schreber). Reproductive status voles on a condition of reproductive system determined. The pregnant and parous females, having placental scar and/or embryos in uterus, and males with weight of the testis more than 150 mg with the advanced epididymis were ranked to sexually mature individuals. Each time after year of a middle abundance occurred year high-density, therefore years of middle population density were increase phases. For the years of a low abundance followed peak years or one behind another, this has allowed to consider theirs as phase of decline (depressions). Age of animals determined under the form and sizes of the second upper tooth. For the analysis used young bank voles only in the age from 1.5 month, as sexually mature individuals in our samples meet since this age. Total investigated of young of the year has made 443 individuals. As among young voles the grown-ups individuals had age 3.5 month and among overwintered animals youngest were not younger 9.5 month, hence for the period of supervision of winter reproduction was not.

The infringements of monotony of a curve reflecting dependence of a share sexually mature among young of the year from its indexes of abundance in July, occur within the limits of low and middle values population density of bank vole. The high values of a proportion mature young of the year, expressed at population of density are less 8 ind./ha, within the limits of area 8–19 ind./ha decrease and remain low. This is connected to influence on an investigated parameter of abnormal weather conditions in first half summer and/or of the raised share red-backed (Clethrionomys rutilus Pall.) and red-sided voles (Clethrionomys rufocanus Sundevall) in community. The adverse weather conditions approximately equally suppress puberty, both males, and females young of the year. But the increased share red-backed and red-sided voles in community in the greater measure works on young females of the bank vole, than on males. Under abnormal weather conditions the effect of the raised share closely-related of species in community is not shown. The new increase of share sexually mature individuals up to a previous level occurs at population density within the limits of 20–30 ind./ha. Substantially it is connected to favorable weather conditions in those years, when the level population density was in the indicated limits. Density-dependent mechanisms of population self-regulation begin to work already at middle population density as seasonal inhibition of puberty females young of the year. In a complete measure their action is shown, when population density exceeds 40 ind./ha, therefore a share reproductively-active young voles comes nearer to zero.

Key words: *bank vole; proportion of mature young of the year; phases of population cycle; population density; infringements of monotony of a curve.*

Received March 12, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 83–90

УДК 597.95 + 575.222.72+591.551
doi: 10.17223/19988591/23/7

В.В. Ярцев, В.Н. Куранова

Томский государственный университет (г. Томск)

О ВОЗМОЖНОСТИ ГИБРИДИЗАЦИИ ПРИМОРСКОГО, *Salamandrella tridactyla*, И СИБИРСКОГО, *S. keyserlingii*, УГЛОЗУБОВ (AMPHIBIA: CAUDATA, HYNOBIIDAE)

Работа выполнена в рамках Программы развития
Томского государственного университета (Приоритетное направление развития № 3).

Проведены опыты по гибридизации между самками сибирского и самцами приморского углозуба в лабораторных условиях. Самки сибирского углозуба отловлены в окрестностях г. Томска (Западная Сибирь), а самцы приморского углозуба – в окрестностях г. Хабаровска (Дальний Восток) в период размножения. За животными вели наблюдения в аквариумах. Самцы для привлечения самок совершали колебания хвостом и телом. Самки также могут использовать колебание хвостом для привлечения самцов. В целом половое поведение приморского и сибирского углозубов сходно. Две из трех кладок самок сибирского углозуба были оплодотворены самцами приморского углозуба. Эмбрионы развивались, а затем были получены личинки. Схожесть поведения и развитие кладок указывают на отсутствие поведенческих и гаметических барьеров. Это позволяет заключить, что гибридизация между видами возможна.

Ключевые слова: *приморский углозуб; сибирский углозуб; Salamandrella tridactyla; Salamandrella keyserlingii; Hynobiidae; гибридизация; половое поведение.*

Введение

Род Сибирские углозубы *Salamandrella* Dybowski, 1870 принадлежит к обширному семейству хвостатых земноводных – Углозубые, Hynobiidae (Amphibia, Caudata) [1]. Род *Salamandrella* долгое время считали монотипическим с одним видом – сибирский углозуб *S. keyserlingii* Dybowski, 1870 [1–3]. Однако на основе данных по изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК описан новый вид с юга Дальнего Востока [4]. Позже его самостоятельность подтвердили ряд других исследований, основанных на анализе как данного маркера, так и других – аллозимы, фрагменты яДНК [5–8]. Вопрос номенклатуры данного вида остаётся открытым, в работе использовано название «приморский углозуб» – *Salamandrella tridactyla* Nikolsky, 1905 [9–10].

В настоящее время сведения о репродуктивной изоляции между *S. keyserlingii* и *S. tridactyla* отсутствуют. Специальные исследования юга Российского Дальнего Востока показали, что приморский и сибирский углозубы распространены парапатрично [6]. Однако на территории Хабаровского края и Еврейской автономной области выявлены зоны контакта ареалов, где предполагается возможность естественной гибридизации между видами [6, 11]. На этот феномен косвенно указывают единичные встречи (по маркерам мтДНК) сибирского углозуба на территории распространения *S. tridactyla* на юге Хабаровского края, и наоборот – в Еврейской Автономной области [6]. В последнем случае среди множества кладок сибирского углозуба несколько принадлежали *S. tridactyla*.

Подтверждение гипотезы о возможности гибридизации сибирского и приморского углозубов возможно, с одной стороны, с помощью методов анализа яДНК [6], с другой – в опытах по лабораторной гибридизации, которые позволяют также оценить наличие пре- и постзиготических механизмов репродуктивной изоляции. Последний подход широко применяется для решения ряда аналогичных задач в области систематики, в том числе и хвостатых земноводных [12–13].

Цель данной работы – проверить возможность гибридизации сибирского и приморского углозубов.

Материалы и методики исследования

В опытах по гибридизации использованы самки *S. keyserlingii* и самцы *S. tridactyla,* собранные во время нерестовых миграций и в водоёмах в период размножения. Самки сибирского углозуба (n = 3) отловлены 03–06.05.2012 г. в окрестностях г. Томска, самцы приморского углозуба (n = 24) – 30.04.2012 г. в лужах на минполосе в окрестностях г. Хабаровска (предгорья хребта Хехцир). После отлова и до ссаживаний всех животных содержали в пластиковых контейнерах в холодильнике при температурах +2 ÷ +5°C. Транспортировку самцов *S. tridactyla* из Хабаровска в Томск осуществляли в контейнерах с влажным мхом и льдом приблизительно в течение суток.

В период с 15.05. по 22.06.2012 г. осуществлено три ссаживания в аквариумах (50 × 30 × 30 см). В качестве субстрата для «токования» самцов и прикрепления кладок самками в воду помещали ветки берёзы, грунт отсутствовал. Использовали естественное освещение, искусственную подсветку применяли только в период наблюдений длительностью 15–120 мин, которые сопровождали фото- и видеосъёмкой. Воду в аквариумах аэрировали круглосуточно. Средняя температура воды составила 14,2°C (10,5–18,5), воздуха в помещении – 14,7°C (10,0–14,0). В один аквариум помещали трёх самцов приморского и одну самку сибирского углозуба. Если в течение суток у самцов не наблюдалось половой активности, их вылавливали и подсаживали к самке других. Икру и личинок содержали в кристаллизаторах. Наблюдения продолжали до гибели личинок 22.06.2012 г.

Результаты исследования и обсуждение

Половое поведение в условиях межвидового контакта. В ходе «токования» самцы приморского углозуба располагались в 3–7 см от поверхности воды на веточке, удерживаясь на ней при помощи передних и задних конечностей и периодически перемещаясь вдоль ветки (рис. 1, *А*). В таком положении они раскачивали свисающим дугообразно изогнутым хвостом, частота в среднем составляла 10 колебаний в минуту (n = 2).

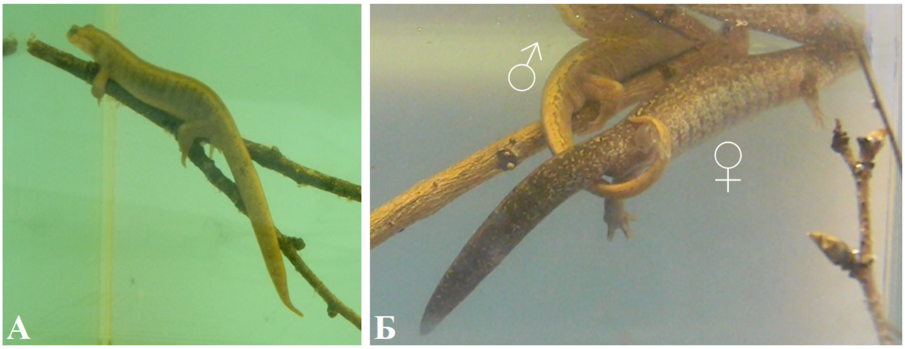


Рис. 1. Элементы полового поведения самцов приморского, *Salamandrella tridactyla*, и самок сибирского, *S. keyserlingii*, углозубов в условиях межвидового ссаживания: *А* – «токующий» самец приморского углозуба (25.05.2012 г.); *Б* – захват хвостом самки сибирского углозуба самцом приморского (особи находятся у поверхности воды, передняя часть тела самца находится над водой) (27.05.2012 г.). Фото Г.С. Платоновой

Иногда самцы параллельно с колебаниями хвостом совершали резкие сократительные движения всем телом. Причём при слабом возбуждении они либо отсутствовали, либо затрагивали заднюю часть тела самца. 17.05.2012 г. наблюдали поведение самцов при сильном возбуждении: все они отслеживали перемещение самки, поворачивая морду в её сторону, резкими движениями полностью разворачивались и плыли к ней, иногда касаясь мордой области клоаки. При этом самцы как бы нюхали воду, что, возможно, связано с реакцией на запах самки. Наиболее активный самец после контакта с самкой быстро взбирался по ветке, размахивал хвостом и совершал резкие сокращения телом, периодически осматриваясь вокруг и переползая вдоль ветки на новое место. Его сокращения телом вызывали резкие колебания ветки. В это же время удалось наблюдать агрессивное поведение самцов. К самцу, находящемуся на ветке, подплыл другой и расположился на соседней ветке в трех сантиметрах от него. Через 5 мин приплывший самец, закрепившись задними конечностями на субстрате и направившись к другому самцу, начал кусать его. В ответ тот пытался укусить за передние конечности, вытянувшись к нему. «Токовавший» самец уплыл на дно, после того как был укушен за задние конечности. Оставшийся самец располагался на ветке, свесив хвост вниз. Агрессивный контакт длился около пяти секунд.

20.05.2012 г. наблюдали, что самка, находясь на ветке, тоже совершала колебательные движения хвостом: передняя треть тела располагалась над поверхностью воды, огибая ветку сбоку, а задняя часть была закреплена к субстрату только одной задней конечностью, хвост и вторая задняя конечность свободно свисали в воде. Самка размахивала хвостом с частотой 16 колебаний в минуту. Приблизительно через 15 мин к ней подплыл самец, который закрепился на месте, где до этого находилась самка. Он обхватил ветку передними и задними конечностями, прополз вверх вдоль неё и остановился в положении, когда передняя часть его тела находилась над водой. Самка была в этот момент рядом в воде. Когда она медленно плыла у поверхности, самец удержал её в области задних конечностей, загнув хвост (рис. 1, *Б*). Через 30 с он расслабил хвост, самка в течение 6 мин еще плавала, касаясь самца, после – опустилась на дно аквариума.

Гибридные кладки и их развитие. В ходе двух ссаживаний получены гибридные кладки через 3 и 4 дня с начала наблюдений – 18.05. и 19.05.2012 г. соответственно. В третьем случае ссаживание в течение 20 дней не завершилось икрометанием. Обе кладки были выметаны в ночное время суток и прикреплены на глубине около 2 см от поверхности воды к ветке березы и к шлангу для подачи воздуха. Икряные шнуры начали закручиваться на следующие сутки со свободных концов и затем приобрели спирально-закрученную форму (рис. 2, *А*). В кладках было по 206 и 216 икринок.

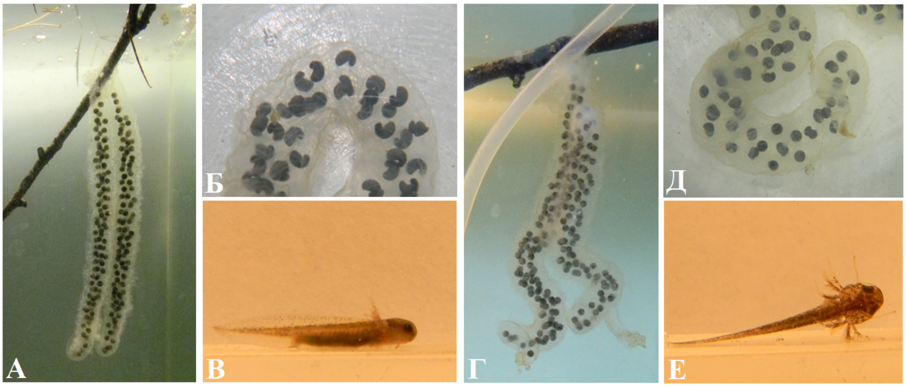


Рис. 2. Гибридные кладки, полученные от скрещивания самок сибирского, *Salamandrella keyserlingii*, и самцов приморского, *S. tridactyla*, углозубов в лабораторных условиях, и их развитие: *А, Г* – гибридные кладки в первые сутки после икрометания (18.05. и 19.05.2012 г.); *Б, Д* – фрагменты икряных шнуров с развивающимися эмбрионами (24.05.2012 г.); *В, Е* – гибридные личинки (7.06. и 11.06.2012 г.). Фото В.В. Ярцева

В дальнейшем икра развивалась (рис. 2, *Б*), и к 5.06.2012 г. произошёл массовый выклев личинок (рис. 2, *В*). К этому моменту в каждой кладке осталось 51 и 53% икринок, среди которых были неоплодотворённые яйцеклетки и погибшие эмбрионы. Гибридные личинки прошли развитие до 36–37-й стадии [14], после чего произошла их массовая гибель. Анализ показал, что основные причины гибели эмбрионов и личинок связаны, главным образом, с условиями содержания, а не с нарушениями эмбрионального развития.

Полученные результаты подтверждают точку зрения о схожести полового поведения приморского и сибирского углозубов [10, 15]. Наблюдаемые нами элементы брачного поведения самцов *S. tridactyla* отмечали ранее у *S. keyserlingii*: размахивание хвостом для привлечения самок [16–19], сокращения тела [20], использование хвоста для захвата самки [17–19, 21]. Наличие драк между самцами также характерно для обоих видов [19, 22, наши данные]. На отмеченную нами форму поведения для самки сибирского углозуба, при котором она размахивала хвостом для привлечения самца, указывали ранее другие авторы [22–25]. Однако позже эти описания стали считать ошибочными и относить к брачному поведению самца [17, 19, 26]. В некоторых случаях, действительно, описания относились к самцам и не вызывают сомнений, как, например, в одной из работ О.В. Григорьева [23]. Однако в описанном нами случае правильность определения пола не вызывает сомнения, поскольку самка имела широкое брюшко, так как была с икрой. Колебательные движения хвостом отмечали в лабораторных условиях также для самок чёрного углозуба, *Hynobius nigrescens*: самка крепко обхватывала ветку передними и задними конечностями и размахивала хвостом, при этом на такое поведение положительно реагировали только самцы [27].

Лабораторная гибридизация, нашедшая широкое применение для решения ряда вопросов систематики настоящих саламандр, в частности тритонов рода *Triturus*, в настоящее время практически не используется для аналогичных целей среди гинобиид. Нам известны лишь работы японского герпетолога Т. Кавамура [28–29], в которых приводятся результаты экспериментов по лабораторной гибридизации между видами рода *Hynobius* с использованием искусственного осеменения. Опыт по гибридизации углозубов рода *Salamandrella* проведён нами впервые. Развитие гибридных кладок, полученных в ходе ссаживаний, указывает на отсутствие гаметических барьеров между видами. Аналогичные результаты получены при искусственном осеменении видов рода *Hynobius* [28–29].

Все это позволяет заключить, что гибридизация между видами вполне возможна. Наблюдения за поведением указывают на отсутствие этологических, а развитие кладок – гаметических барьеров между видами. В дальнейшем необходима оценка жизнеспособности и фертильности гибридов, которая позволит проверить наличие постзиготических изоляционных механизмов. Исследование с помощью анализа маркеров яДНК образцов из зоны контакта ареалов позволит выявить возможность естественной гибридизации.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории экологии животных Института водных и экологических проблем ДВО РАН (г. Хабаровск) Э.В. Аднагулову за помощь в организации и активное участие в полевых работах, студентке Биологического института Томского государственного университета Г.С. Платоновой за помощь в проведении лабораторных наблюдений.

Литература

1. *Боркин Л.Я.* Систематика // Сибирский углозуб: зоогеография, систематика, морфология. М. : Наука, 1994. С. 54–80.
2. *Кузьмин С.Л.* Земноводные бывшего СССР. М. : Тов-во науч. изд. КМК, 1999. 298 с.
3. *Кузьмин С.Л., Семёнов Д.В.* Конспект фауны земноводных и пресмыкающихся России. М. : Тов-во науч. изд. КМК, 2006. 139 с.
4. *Берман Д.И., Деренко М.В., Малярчук Б.А. и др.* Внутривидовая генетическая дифференциация сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Caudata) и криптический вид *S. schrenckii* с юго-востока России // Зоологический журнал. 2005. Т. 84, № 11. С. 1374–1388.
5. *Matsui M., Tominaga A., Liu W. et al.* Phylogenetic relationships of two *Salamandrella* species as revealed by mitochondrial DNA and allozyme variation (Amphibia: Caudata: Hynobiidae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2008. Vol. 48. P. 84–93.
6. *Берман Д.И., Деренко М.В., Малярчук Б.А. и др.* Ареал и генетический полиморфизм углозуба Шренка (*Salamandrella schrenckii*, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) // Зоологический журнал. 2009. Т. 88, № 5. С. 530–545.
7. *Малярчук Б.А., Деренко М.В., Берман Д.И. и др.* Генетическая структура популяций углозуба Шренка (*Salamandrella schrenckii*) по данным об изменчивости гена цитохрома b митохондриальной ДНК // Молекулярная биология. 2009. Т. 43, № 1. С. 53–61.
8. *Поярков Н.А.* Филогенетические связи и систематика хвостатых амфибий семейства углозубов (Amphibia:Caudata, Hynobiidae) : автореф. дис. … канд. биол. наук. МГУ, 2010. 25 с.
9. *Кузьмин С.Л.* О номенклатуре сибирских углозубов, *Salamandrella* Dybowski, 1870 (Caudata: Hynobiidae) // Известия Самарского научного центра РАН. 2008. Т. 10 (24), № 2. С. 447–452.
10. *Кузьмин С.Л.* Земноводные бывшего СССР. М. : Тов-во науч. изд. КМК, 2012. 370 с.
11. *Поярков Н.А., Кузьмин С.Л.* Филогеография сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*) по данным последовательностей митохондриальной ДНК // Генетика. 2008. Т. 44, № 8. С. 1089–1100.
12. *Писанец Е.М.* Основные направления в исследовании р. *Bufo* // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. Киев, 1989. С. 46–72.
13. *Литвинчук С.Н., Боркин, Л.Я.* Эволюция, систематика и распространение гребенчатых тритонов (*Triturus cristatus* complex) на территории России и сопредельных стран. СПб. : Европейский Дом, 2009. 592 с.
14. *Сытина Л.А., Медведева И.М., Година Л.Б.* Развитие сибирского углозуба. М. : Наука, 1987. 87 с.

15. *Ярцев В.В., Аднагулов Э.В.* Некоторые особенности поведения самцов приморского углозуба *Salamandrella tridactyla* (Amphibia, Caudata, Hynobiidae) // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2012. № 3 (19). С. 92–99.
16. *Григорьев О.В.* Групповое поведение сибирского углозуба в брачный период // Групповое поведение животных. М. : Наука, 1976. С. 81–82.
17. *Григорьев О.В.* О способе откладки икры у сибирского углозуба // Вопросы герпетологии. Л. : Наука, 1977. С. 72–73.
18. *Григорьев О.В.* Брачные игры сибирского углозуба // Природа. 1981. № 3. С. 104–105.
19. *Басарукин А.М., Боркин Л.Я.* Распространение, экология и морфологическая изменчивость сибирского углозуба, *Hynobius keyserlingii*, на острове Сахалин // Экология и фаунистика амфибий и рептилий СССР и сопредельных стран. Л. : Зоолог. ин-т АН СССР, 1984. С. 12–54.
20. *Берман Д.И., Бойко Е.А., Михайлова Е.И.* Брачное поведение сибирского углозуба // Прикладная этология. М., 1983. Т. 3. С. 167–171.
21. *Nakabayashi S., Ueda T., Sato T.* Breeding environment and behavoir of Siberian salamander, *Salamandrella keyserlingii*, at the Kushiro Marshland, Hokkaido, Japan // Kushiro shitatsu hakobutsukan tekiho. 1986. № 299. P. 3–11.
22. *Коротков Ю.М.* К экологии когтистого тритона (*Onychodactylus fischeri*) и сибирского углозуба (*Hynobius keyserlingi*) в Приморском крае // Зоологический журнал. 1977. Т. 56, вып. 8. С. 1258–1260.
23. *Григорьев О.В.* Брачный «танец» сибирского углозуба // Природа. 1971. № 4. С. 82–83.
24. *Басарукин А.М.* О размножении сибирского углозуба на юге Сахалина // Девятая конференция молодых ученых и специалистов Сахалинского комплексного НИИ : тезисы докладов. Южно-Сахалинск : СахКНИИ ДВНЦ АН СССР, 1975. С. 38.
25. *Банников А.Г., Даревский И.С., Ищенко В.Г. и др.* Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М. : Просвещение, 1977. 415 с.
26. *Кузьмин С.Л., Ищенко В.Г., Марголис С.Э., Година Л.Б.* Поведение и ритм активности // Сибирский углозуб: Экология, поведение, охрана. М. : Наука, 1995. С. 124–140.
27. *Usuda H.* Waving behavior and its effect on the reproductive behavior of *Hynobius nigrescens* // Japanese Journal of Herpetology. 1995. Vol. 16, № 1. P. 19–24.
28. *Kawamura T.* Interspecific hybrids between *Hynobius nigrescens* ♀ and *Hynobius tokyoensis* ♂ // Journal of the Faculty of Science Hokkaido University. Series VI. Zoology. 1957. Vol. 13 (1–4). P. 248–252.
29. *Kawamura T.* Studies on hybridization in amphibians. V. Physiological isolation among four *Hynobius* species // Journal of Science Hiroshima University. 1953. Series B. Div. 1, 14. P. 73–116.

Поступила в редакцию 15.06.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 83–90

doi: 10.17223/19988591/23/7

Vadim V. Yartsev, Valentina N. Kuranova

Tomsk State University, Tomsk, Russia

ON THE POSSIBILITY OF HYBRIDIZATION BETWEEN THE *Salamandrella tridactyla* AND THE *S. keyserlingii* (AMPHIBIA: CAUDATA, HYNOBIIDAE)

Genus Siberian Salamanders Salamandrella Dybowski, 1870 includes two species which are considered cryptic: S. keyserlingii Dybowski, 1870 and Salamandrella tri-

dactyla Nikolsky, 1905. The data on reproductive isolation between species are absent. We have conducted experiments of the hybridization between females of S. keyserlingii (n = 3) and males of S. tridactyla (n = 24) in the laboratory. Females of S. keyserlingii were captured in the vicinities of Tomsk (Western Siberia), and males of S. tridactyla – in the vicinities of Khabarovsk (Far East) during the breeding season. The animals were observed in aquariums. Males performed tail and body vibrations to attract females. Females may also swing their tails to attract males. In general, the reproductive behavior of the S. tridactyla and the S. keyserlingii is similar. Two of three clutches of females of S. keyserlingii were fertilized by males of S. tridactyla. Embryos developed, and then larvae appeared. The similarity of behavior and the development of hybrid embryos indicate the absence of behavioral and gametal barriers between species. The results show the possibility of hybridization between species. Further studies of evaluation of the viability of embryos, larvae and postmetamorphic stages, as well as hybrids' fertility are necessary.

Key words: *Siberian Salamanders; Salamandrella tridactyla; Salamandrella keyserlingii; Hynobiidae; hybridization; reproductive behavior.*

Received June 15, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 91–99

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.89
doi: 10.17223/19988591/23/8

И.И. Брусенцов[1], И.В. Брусенцова[1], А.В. Катохин[1], В.В. Беспрозванных[2], Н.Н. Семенченко[3], А.Э. Сазонов[4], В.А. Мордвинов[1]

[1] Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск)
[2] Биолого-почвенный институт ДВО РАН (г. Владивосток)
[3] Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, Хабаровский филиал (г. Хабаровск)
[4] Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск)

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ КИТАЙСКОГО ПЕЧЕНОЧНОГО СОСАЛЬЩИКА (*Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875) НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 16.522.12.2006) и проекта № 19 Интеграция СО РАН.

Clonorchis sinensis относится к эпидемиологически значимым трематодам, так как способен паразитировать у человека, вызывая хроническое заболевание – клонорхоз. В России данный вид встречается только в бассейне р. Амур. В работе впервые исследуется генетическое разнообразие C. sinensis в российской части его ареала с использованием стандартного маркерного фрагмента ДНК – внутреннего транскрибируемого спейсера 1. Были проанализированы 52 особи из пяти отдаленных географических точек, расположенных в Хабаровском и Приморском краях. Полиморфизм маркерного фрагмента исследовался путем анализа данных секвенирования ДНК. Расчет стандартных статистических индексов показал низкое генетическое разнообразие C. sinensis на исследуемой территории. Значение индекса Fst свидетельствует о низкой степени дифференциации изученных популяций. Анализ распределения попарных нуклеотидных различий предполагает недавнее изменение численности вида. Выдвинуто предположение об относительно позднем заселении клонорхом Приморья в результате человеческих миграций.

Ключевые слова: *популяционная генетика; филогеография; трематоды; Clonorchis sinensis; Opisthorchiidae.*

Введение

Китайский печеночный сосальщик – паразитическая трематода из семейства Opisthorchiidae. Основной ареал вида приходится на страны Восточной и Юго-восточной Азии, в первую очередь Китай [1]. На территории

России паразит распространен только в бассейне р. Амур на Дальнем Востоке [2]. *C. sinensis*, как и его близкородственные виды *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) и *O. viverrini* (Poirier, 1886), паразитируя в желчных протоках окончательных хозяев – рыбоядных млекопитающих, включая человека [2], вызывает заболевание клонорхоз. В ряде случаев оно сопровождается тяжелыми осложнениями, в том числе холангиокарциномой. По данным Международного агентства по изучению рака (IARC) *C. sinensis* отнесен к канцерогенным факторам первой группы [3].

Первые оценки внутривидового генетического разнообразия *C. sinensis* были сделаны на основе результатов анализа нуклеотидного полиморфизма в ряде ядерных и митохондриальных маркеров у 3–4 особей из разных мест ареала [4, 5]. Кроме того, ранее для *ITS1* было выявлено два уровня внутривидовой вариабельности [6]. Однако, несмотря на большое эпидемиологическое значение этого паразитического вида, исследования его популяционной структуры до сих пор не проводились.

Популяционно-генетические исследования паразитических видов позволяют оценить степень их генетического разнообразия и имеют огромное значение в понимании процессов, проходящих в их популяциях в прошлом и в настоящее время. Понимание факторов, определяющих популяционно-генетическую структуру у трематод со сложным жизненным циклом, может иметь решающее значение для мероприятий, направленных на санитарно-эпидемиологический контроль трематодозов.

В настоящее время для популяционно-генетических исследований широко используются маркерные фрагменты ДНК (митохондриальные гены, *ITS1* и *ITS2*, микросателлитные последовательности), имеющие достаточную вариабельность, чтобы оценить генетическое разнообразие в природных популяциях и реконструировать филогеографию видов. *ITS1* является некодирующим участком в кластере рибосомальных генов и эволюционирует гораздо быстрее, чем последовательности собственно рибосомальных РНК, а также ядерных белок-кодирующих генов [7]. В результате высокой вариабельности *ITS1* часто используется для решения филогенетических и популяционных задач, в том числе и у трематод [8].

Цель работы – изучить генетическое разнообразие *C. sinensis* на российской части его ареала.

Материалы и методики исследования

Метацеркарии *C. sinensis* были собраны из мышечной ткани карповых рыб (Cyprinidae): гольяна озёрного (*Phoxinus percnurus*, Pallas, 1814), горчака обыкновенного (*Rhodeus sericeus*, Rhodeus sericeus, Pallas, 1776), желтощёка (*Elopichthys bambusa*, Richardson, 1845) и амурского чебачка (*Pseudorasbora parva*, Temminck и Schlegel, 1846), отловленных в трех географических точках: в Анученском (р. Арсеньевка) и Дальнереченском (р. Б. Уссурка) районах Приморского края и в г. Хабаровске (о. Б. Уссурийский, р. Амур) (рис. 1).

Рис. 1. Места сбора образцов *C. sinensis*. Вверху для каждого района показано количество проанализированных образцов

Из 26 образцов ДНК была выделена стандартным фенол-хлороформным методом [9]. Для ПЦР и секвенирования использовались следующие праймеры: прямой 5′-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA и обратный 5′-ACACGAGCCGAGTGATCC с температурой отжига 59°C. ПЦР проводилась в общем объеме 20 мкл (250 мкМ dNTP, 25 мкМ dUTP, праймеры по 200 нМ каждого, 0,1 ед. урацил-ДНК-гликозилазы (Fermentas), 1,5 мМ $MgCl_2$, 1,5 ед.

TrueStart Hot Start Taq DNA polymerase (Fermentas) и соответствующий ей ПЦР буфер) при следующих условиях: 37°C – 5 мин, 94°C – 2 мин, 10 циклов: 94°C – 10 с, 69°C, декремент –1°C за цикл – 20 с, 72°C – 40 с, 20 циклов: 94°C – 10 с, 59°C – 20 с, 72°C – 40 с, финальная элонгация при 72°C – 5 мин. Секвенирование проводилось по методу Сэнгера с использованием BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA). Продукты реакции Сэнгера были проанализированы на приборе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Последовательности депонированы в Genbank (KC987514-539). Последовательность наиболее представленного гаплотипа находится в Genbank под номером KC987514.

Кроме полученных нами данных, мы также использовали 26 последовательностей фрагмента *ITS1 C. sinensis*, депонированных в Genbank с номером JQ048576-601 из Спасского (с. Кронштадтка) и Уссурийского (с. Кондратеновка) районов (см. рис. 1) [6]. Таким образом, для анализа была подготовлена выборка из 52 последовательностей; использовался фрагмент позиций 153–607 (JQ048601). Суммарно было охвачено 5 географических точек (см. рис. 1).

Расчет стандартных статистик генетического разнообразия и оценка демографической динамики вида были проведены с помощью программы DnaSP 4.5 [10]. Медианная сеть гаплотипов была построена методом median joining в программе Network 4.6 [11]. Степень дифференциации популяций рассчитана в программе Arlequin 3.5 [12].

Результаты исследования и обсуждение

Анализ нуклеотидного полиморфизма во фрагменте *ITS1* выявил низкое генетическое разнообразие у *C. sinensis* в Приморье. Анализируемый фрагмент был представлен двумя формами: 92,3% последовательностей имели 450 п.о., а 7,7% – 455 п.о. Различие последовательностей по длине объясняется разным количеством повторов (GCCTG). Было найдено всего 6 гаплотипов. Доля полиморфных позиций (S) составила 1,8% (8 пар оснований, из которых 5 приходится на инсерцию / делецию (И/Д)). Индекс генного (гаплотипического) разнообразия (Hd) – $0,21 \pm 0,05$, нуклеотидного (π) – $0,0006 \pm 0,0002$.

Далее мы провели оценку различий между 5 популяциями, использованными в анализе. Согласно S. Wright, полученное значение индекса *Fst* (0,045; $p = 0,059$) свидетельствует о низкой степени их дифференциации [13].

При построении сети гаплотипов было выявлено значительное преобладание одного (мажорного) гаплотипа, доля которого составила 88,5%. Из оставшихся 5 гаплотипов 3 были синглетными, т.е. встретились только у одной особи (рис. 2). Максимальное расстояние между гаплотипами составило 3 нуклеотидные замены и одну И/Д 5 оснований, т.е. оно является относительно большим для такой слабоструктурированной сети.

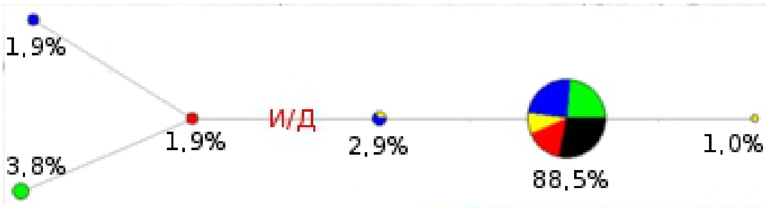


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов *C. sinensis*.
Указаны частоты гаплотипов в выборке, размер узла сети пропорционален частоте гаплотипа. Цветовая кодировка обозначает места сбора образцов и соответствует таковой на рис. 1

Таким образом, мы показали, что исследованная территории клонорха характеризуют:

1) низкое генетическое разнообразие;

2) низкие различия между популяциями;

3) бедная гаплотипическая сеть с преобладанием одного гаплотипа.

Наблюдаемую нами картину можно объяснить экспансией вида после переселения небольшой группы на новые территории («эффект основателя», когда происходят снижение разнообразия и случайное смещение частот гаплотипов) или после прохождения видом «узкого бутылочного горлышка» на занимаемой им ранее территории. Формирование подобной структуры под действием отбора (преобладание одного гаплотипа вследствие его приспособительного преимущества) можно исключить, поскольку *ITS1* считается селективно нейтральным участком ДНК.

Многие виды палеоарктической зоны претерпели снижение численности в результате геоклиматических событий плейстоцена с последующей экспансией из небольшой предковой группы, сохранившейся в убежищах (рефугиумах) [14]. В нашей работе, посвященной *O. felineus*, было показано крайне низкое разнообразие вида на огромной территории и высказано предположение о восстановлении этого вида из популяции с низкой численностью и бедным генофондом [15]. Напротив, у другого близкородственного вида *O. viverrini*, ареал которого ограничен бассейном р. Меконг в тропических широтах, было показано высокое генетическое разнообразие и наличие разветвленной сети гаплотипов [16]. К сожалению, фактически нет работ, исследующих генетическое разнообразие клонорха на территории его обширного ареала, приходящегося как на умеренную, так и на субтропическую климатические зоны.

Для подтверждения гипотезы об экспансии вида мы провели оценку динамики численности *C. sinensis* на российской части ареала с помощью анализа распределения попарных нуклеотидных различий. Было получено унимодальное L-образное распределение замен (рис. 3), что позволяет предположить недавнее изменение численности вида на российской части его ареала. Этот анализ также позволяет оценить параметр τ ($\tau = 2ut$; t – время, рассчитанное в поколениях; u – скорость накопления мутаций в последовательности за поколение). Для шистосом (Schistosomatidae, Trematoda) было показано, что скорость накопления мутаций составляет 0,8% за миллион лет [17]. Используя данные С.А. Беэра о том, что смена поколений у близкородственного вида *O. felineus* происходит за один год, мы приняли такую же оценку для *C. sinensis* [18] и рассчитали, что изменение численности *C. sinensis* на изучаемой территории началось порядка 4,5 тыс. лет назад.

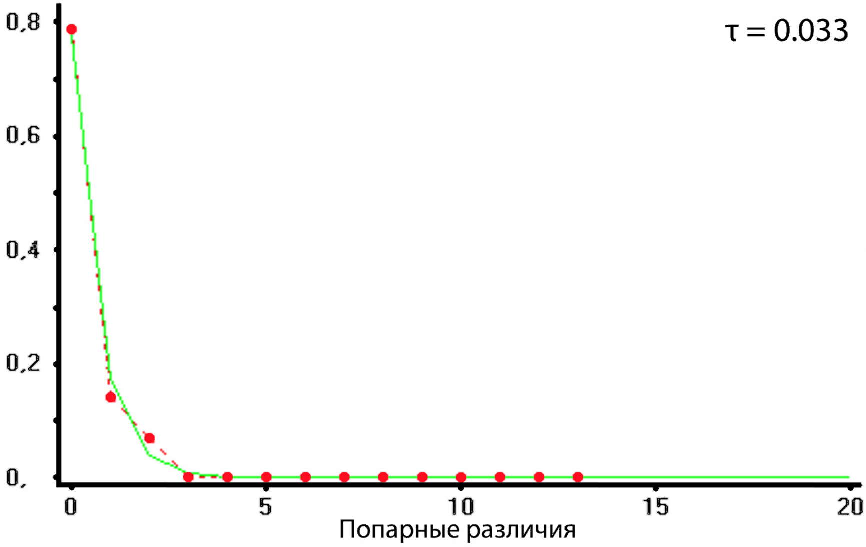


Рис. 3. Распределение попарных нуклеотидных различий.
Зеленая сплошная линия – значения, ожидаемые для модели растущей популяции, красная пунктирная – полученные нами значения

Во время плейстоценовых похолоданий климат на изучаемой территории был значительно холоднее современного. Несмотря на отсутствие ледового щита, повсеместно встречались участки вечной мерзлоты, и долины были заболочены [19]. Таким образом, условия были непригодны для существования *C. sinensis*. Поскольку основной современный ареал *C. sinensis* расположен на территории Китая, то логично предположить, что заселение изучаемой территории произошло именно оттуда по завершению ледникового периода. Однако на пути естественной миграции из Восточной Азии на Дальний Восток России присутствует географический барьер – Малый Хинган и Маньчжуро-Корейские горы, являющиеся серьезным препятствием для диких животных [20, 21]. Поскольку данные археологических раскопок свидетельствуют о появлении активных миграций человеческих племен на территории Маньчжурии начиная с 6,5 тыс. лет назад, можно предположить, что основную роль в заселении Приморья клонорхом мог сыграть человек [22].

Заключение

Таким образом, показано низкое генетическое разнообразие *C. sinensis* на изучаемой территории. Филогеографический анализ вида позволил предположить, что подобная картина могла сформироваться вследствие недавнего проникновения вида на Дальний Восток России, имевшего место приблизительно 4,5 тыс. лет назад и предположительно связанного с миграциями человека.

Литература

1. *Посохов П.С.* Клонорхоз в Приамурье. Хабаровск : Изд-во Дальневосточ. гос. мед. ун-та, 2004. 187 с.
2. *Беспрозванных В.В., Ермоленко А.В., Румянцева Е.Е. и др.* Нозоареалы клонорхоза в Приморском крае // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2012. № 2. С. 7–14.
3. *Bouvard V., Baan R., Straif K. et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents // The lancet oncology. 2009. Vol. 10, № 4. P. 321–322.
4. *Lee S., Huh S.* Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korean and Chinese isolates of Clonorchis sinensis // The Korean journal of parasitology. 2004. Vol. 42, № 3. P. 145–148.
5. *Park G-M.* Genetic comparison of liver flukes, Clonorchis sinensis and Opisthorchis viverrini, based on rDNA and mtDNA gene sequences // Parasitology research. 2007. Vol. 100, № 2. P. 351–357.
6. *Tatonova Y., Chelomina G., Besprosvannykh V.* Genetic diversity of nuclear ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence in Clonorchis sinensis Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchidae) from the Russian Far East // Parasitology international. 2012. Vol. 61, № 4. P. 664–674.
7. *Hwang U.W., Kim W.* General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics // The Korean journal of parasitology. 1999 Vol. 37. P. 215–228.
8. *Nolan M., Cribb T.* The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species // Advances in parasitology. 2005. Vol. 60, № 2. P. 101–163.
9. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2344 p.
10. *Rozas J., Sánchez-DelBarrio J., Messeguer X., Rozas R.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // Bioinformatics (Oxford, England). 2003. Vol. 19, № 18. P. 2496–2497.
11. *Bandelt H., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular biology and evolution. 1999. Vol. 16, № 1. P. 37–48.
12. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary bioinformatics online. 2005. Vol. 1. P. 47–50.
13. *Wright S.* Evolution and Genetics of Population. Chicago : University of Chicago Press, 1978. 590 p.
14. *Hewitt G.* Post-glacial re-colonization of European biota // Biological Journal of the Linnean Society. 1999. Vol. 68, № 1–2. P. 87–112.
15. *Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V. et al.* Low Genetic Diversity in Wide-Spread Eurasian Liver Fluke Opisthorchis felineus Suggests Special Demographic History of This Trematode Species // PloS one. 2013. Vol 8(4). e62453.

16. *Thaenkham U., Nuamtanong S., Sa-nguankiat S. et al.* Monophyly of Opisthorchis viverrini populations in the lower Mekong Basin, using mitochondrial DNA nad1 gene as the marker // Parasitology international. 2010. Vol. 59. P. 242–247.
17. *Despres L., Imbert-Establet D., Combes C., Bonhomme F.* Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes: Trematoda) // Molecular phylogenetics and evolution. 1992. Vol. 1, № 4. P. 295–304.
18. *Беэр С.А.* Биология возбудителя описторхоза. М. : Тов-во науч. изд. КМК, 2005. 336 с.
19. *Белянин П.* Растительность междуречья рек Уссури и Сунгач в позднем плейстоцене (Приморский край). Актуальные проблемы палеогеографии и стратиграфии плейстоцена. М. : Географ. факультет МГУ, 2010. С. 14.
20. *Driscoll C., Yamaguchi N., Bar-Gal G. et al.* Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct caspian tiger and its relationship to the amur tiger // PloS one. 2009. Vol. 4, № 1. P. e4125.
21. *Shi Y., Cui Z., Li J.* Reassessment of Quaternary glaciation problems in East China. Earth Sciences 2 / ed. by G. Tu // Advances in Science of China: Earth Sciences. 1987. P. 45–54.
22. *Вострецов Ю.* Приморские охотники-собиратели и земледельцы бассейна Японского моря: адаптация и взаимодействие в среднем и позднем голоцене (6500–1800 лет назад) : автореф. дис. ... д-ра ист. наук. СПб., 2010. 64 с.

Поступила в редакцию 15.06.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 91–99

doi: 10.17223/19988591/23/8

Ilja I. Brusentsov[1], Irina V. Brusentsova[1], Alexey V. Katokhin[1], Vladimir V. Besprozvannykh[2], Nadezhda N. Semenchenko[3], Alexey E. Sazovov[4], Viatcheslav A. Mordvinov[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Institute of Biology and Soil Science of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia
[3] Pacific Research Fisheries Centre, Khabarovsk, Russia
[4] Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

POPULATION GENETIC ANALYSIS AND PHYLOGEOGRAPHY OF CHINESE LIVER FLUKE (*Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875) FROM THE RUSSIA

This work was partially supported by the Ministry of education and science of Russia project № 16.522.12.2006 and the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (interdisciplinary integration project № 19 and 52).

In the present work, genetic diversity and phylogeography of the Far Eastern population of the liver fluke Clonorchis sinensis has been studied using nuclear rDNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. C. sinensis is a causative factor of serious pathologies in humans. It is widely distributed in East Asia, but in Russia it is only found in the Far East. 26 metacercarian samples were collected at three distant localities in Khabarovsk and Primorsky Krai and were subjected to ITS1 sequencing. We also used 26 ITS1 sequences of C. sinensis from Primorsky Krai (two localities), which were previously deposited in GenBank. Statistical analysis was performed using the program DnaSP 4.5 and Arlequin 3.5. The median haplotype network was *constructed by median joining using Network 4.6. Standard statistics showed low genetic diversity in the studied population: S, the number of polymorphic positions was 1.8%; Hd, haplotype diversity, was 0.21 ±0.05; and π, nucleotide diversity, was 0.0006 ± 0.0002. The obtained value of Fst was 0.045, which is indicative of low genetic differentiation.*

To establish the genealogical relationships between the haplotypes, we constructed a statistical parsimony network. It was found out that one major haplotype was identified in 88.5% of the sampled individuals. Of other five haplotypes, three were unique (singlets). The maximum distance between haplotypes was 3 SNP and one indel (5 substitutions). To estimate the population dynamics of C. sinensis in Russian part of the area, the analysis of pairwise nucleotide differences distribution was conducted. Unimodal mismatch distribution suggests a recent change in population size. Therefore, we believe that our data are consistent with a "founder effect" hypothesis, when a small number of migrants that were not genetically representative of the ancestral population have colonized a new area. To estimate the expected time of the species expansion, we used substitution rate (0.8%/MY) previously established for Schistosoma species (Schistosomatidae, Trematoda). Based on these data, C. sinensis expansion began approximately sooner than 4.5 kBP. We conclude that the outspread of the studied species to the Russian Far East territory could be due to the Holocene migration of the final hosts including humans.

Key words: *population genetics; phylogeography; Trematoda; Clonorchis sinensis; Opisthorchiidae.*

Received June 15, 2013

УДК 578.5
doi: 10.17223/19988591/23/9

В.А. Терновой[1], В.А. Святченко[1], М.В. Тарасова[1,2], Н.Н. Киселев[1], Е.В. Чуб[1], Т.П. Микрюкова[1], Е.В. Протопопова[1], В.Б. Локтев[1,2], П.М. Чумаков[2,3], С.В. Нетесов[1,2]

[1] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирская область)
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (г. Новосибирск)
[3] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (г. Москва)

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОВИРУСОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН БЕЛКА АПОПТИНА

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (ГК №14.512.11.0003 с ГНЦ ВБ «Вектор» по теме: «Разработка прототипов онколитических препаратов на основе рекомбинантных аденовирусов, избирательно инфицирующих и лизирующих опухолевые клетки человека»).

Осуществлен дизайн последовательностей гена белка апоптина, промоторов hTERT, CMV и конструирование несущих их рекомбинантных плазмид. С использованием методологии гомологичной рекомбинации и котрансфекции клеток получены два рекомбинантных аденовируса AdΔE1a-hT-Apo и AdΔE1a-CM-Apo с инсерциями гена белка апоптина под контролем hTERT- и CMV-промоторов и дефектных по репликации в эукариотических клетках. Третий рекомбинантный аденовирус AdhTE1a-CM-Apo содержит инсерцию гена апоптина и ген E1A под контролем hTERT-промотора и делецию гена E1B-55K, что должно обеспечивать ему высокий уровень селективной литической активности в отношении раковых клеток. Полученные аденовирусные векторы могут служить основой для создания перспективных онколитических препаратов, обладающих высокой специфичностью благодаря контролю вирусной репликации hTERT-промотором, а также высокой онколитической активности, обусловленной наличием гена белка апоптина, вызывающего p53- и bcl-2-независимый апоптоз опухолевых клеток.

Ключевые слова: *аденовирус; рекомбинанты; апоптин; онколитические вирусы; hTERT-промотор; апоптоз.*

Введение

Несмотря на успехи, достигнутые в терапии злокачественных новообразований с применением классических методов лечения, таких как хирургия, радио- и химиотерапия, прогресс их применения в настоящее время представляется достигшим своего предела. В связи с этим актуальной задачей является разработка новых методов противоопухолевой терапии. Одним из таких перспективных и бурно развивающихся направлений является применение онколитических аденовирусов. Данное семейство вирусов зарекомендовало себя в качестве эффективных и безопасных противоопухолевых агентов, обладающих рядом преимуществ по сравнению с другими семействами вирусов. Задачи, стоящие перед исследователями, конструирующими эффективные онколитические вирусы, заключаются, во-первых, в повышении их специфичности с целью избежать поражение нормальных клеток организма, во-вторых – в усилении их литических свойств для полного уничтожения всех раковых клеток в организме.

Один из наиболее эффективных путей по усилению специфичности онколитических аденовирусов является использование опухолеспецифических промоторов, один из которых, промотор обратной транскриптазы полимеразы (hTERT), показал себя как эффективный инструмент для контроля аденовирусной репликации [1, 2]. Для усилении онколитического потенциала аденовирусов в геном последних вводят различные трансгены, продукты которых могут усиливать литическую активность вирусов, участвовать в индукции противоопухолевого иммунного ответа или выполнять какие-либо другие функции, приводящие к более эффективному уничтожению опухолевых клеток. Одним из перспективных онколитических трансгенов является ген апоптоз-индуцирующего белка апоптина (продукт генома вируса анемии цыплят), индуцирующего p53- и bcl-2-независимый апоптоз клеток. Было показано, что экспрессия гена апоптина в клетках сопровождается индукцией апоптоза исключительно опухолевых клеток [3, 4], что позволяет встраивать данный ген под контроль более сильных, нежели опухолевоспецифичные, промоторов, например цитомегаловирусного (PCMV).

Цель исследования – конструирование перспективных онколитических рекомбинатных аденовирусов со встроенным геном белка апоптина, отличающихся по используемым промоторам, контролирующим его экспрессию (hTERT и PCVM), а также по способности вирусов к репликации (репликативно-дефектных и компетентных по репликации, контролирующейся hTERT-промотором).

Материалы и методики исследования

Клетки и вирусы. В работе были использованы культуры клеток HEK293 (клетки почки эмбриона человека, трансформированные генами E1A и E1B аденовируса человека 5-го серотипа), HEp2 (эпителиальная карцинома гортани человека), аденовирус человека 5-го серотипа (Ad5), полученный из Государственной коллекции вирусных штаммов при Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Конструирование рекомбинантных аденовирусов. Последовательность коровой части промотора hTERT длиной 236 п.н. синтезировали методом элонгации праймеров в ПЦР согласно Li X. et al. [2]. Для синтеза были рассчитаны, химически синтезированы и использованы следующие праймеры:

F1 GGCCAGGCCGGGCTCCCA
R1 CGCGGGGGTGGCCGGGGC
F2 GGCCAGGCCGGGCTCCCAGTGGATTCGCGGGCACAGACGCCCAGGACCGCGCTCCCCACGT
R2 GAAGGGGCAGGACGGGTGCCCGGGTCCCCAGTCCCTCCGCCACGTGGGGAGCGCGGTCC
F3 CACCCGTCCTGCCCCTTCACCTTCCAGCTCCGCCTCCTCCGCGCGGACCCCGCCCCGTCC CGACCCCTCCCG
R3 GGAAAGGAAGGGGAGGGGCTGGGAGGGCCCGGAGGGGGCTGGGCCGGGGACCCGGGAGGG GTCGGGACG
F4 CCAGCCCCTCCCCTTCCTTTCCGCGGCCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCAGGCA GCGCTGC
R5 CGCGGGGGTGGCCGGGGCCAGGGCTTCCCACGTGCGCAGCAGGACGCAGCGCTGCCTGAA ACTCGC

Синтез гена белка апоптина с последовательностью репортерного пептида осуществляли методом элонгации праймеров в ПЦР. С этой целью по прототипной последовательности гена белка VP3 (апоптин) вируса анемии цыплят (GenBank P54094) были рассчитаны, химически синтезированы и использованы следующие праймеры:

F1B ACCTTAGGAAAATTTGGCCAACAATCCGGAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTC-CACCCGGACCATCAACGGTG
R1A GAGGGGTTTCCAACGGCCGTGAACTTGTTGGTGGCCTGAACACCGTTGATGGTCC-GGGTGGAGT
F2A CAAGTTCACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTATCGCT
R2A TCGCGCAGCCACACAGCGATAGAGTGATTGTAATTCCAGCGATAATCCGGATCTCTCT
F3A TCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCGCGCTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGA-CAATTCAGAA
R3A GGGTTGATCGGTCCTCAAGTCCGGCACATTCTTGAAACCAGTGCTTTCTGAATTGTC-CGCAGTTGCAGA
F4A CTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAG-TACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAA
R4A-End TTACAGTCTTATACACCTTCTTGCGGTTCGGGGTCGGCTGGGAGTAGTGGTAAT-CAAGCTTTCTTTTAGCTCGCTTACCCTG
R4A-add ATTTTCCTAAGGTTGTTATGGTAGCTCTCAGTCTTATACACCTTCTTGCGGT

Для получения фрагмента аденовирусного генома с 459 по 2178 п.н., несущего последовательности генов E1A и E1B-19K, использовали следующие праймеры:

F1-hTERT-E1a-Ad5 GCCCCGGCCACCCCCGCGATGAGACATATTATCTGCCACGGA
R1-E1b-19K-Ad5 AGTTCTGGATACAGTTCAGCCACCT

Фрагмент ДНК 601 п.н., содержащий промотор CMV, получали с использованием плазмиды pcDNA4 методом ПЦР с помощью праймеров:

```
Fpcmv GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
Rpcmv CCTAGTTAGCCAAGAGAGCTCTGC
```

Для клонирования в аденовирусный геном использовали наборы ViraPover Adenoviral Gateway Expression Kit и TOPO TA Cloning, «Invitrogen» (США). Генные кассеты, содержащие последовательности гена белка апоптина под контролем промотора hTERT, гена белка апоптина под контролем промотора CMV и гена E1A под контролем промотора hTERT + ген белка апоптина встраивали в промежуточную плазмиду pCR2.1. В результате были получены плазмиды pCR2.1-hT-Apo, pCR2.1-CM-Apo и pCR2.1-hTE1a-CM-Apo соответственно. На следующем этапе, с использованием LR Clonase™ II и клеток *E. coli* T1, проводили рекомбинацию вышеуказанных промежуточных плазмид с векторной плазмидой, несущей последовательности аденовирусного генома pAd/CMV/V5-DEST™. Рекомбинантные клоны *E. coli* T1, содержащие плазмиды, несущие вставки гена апоптина, отбирали на основании ПЦР-анализа с использованием праймеров:

```
T7 promoter/priming site TAATACGACTCACTATAGGG
V5(C-term) reverse priming site ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT
```

Правильность сборки полученных конструкций подтверждали секвенированием на генетическом анализаторе ABI3130*xl*.

Для проведения трансфекции эукаритических клеток плазмидные ДНК были наработаны в препаративных количествах и очищены от эндотоксинов с использованием набора реагентов «EndoFree Plasmid Maxi Kit», «QIAGEN» (США). После подтверждения наличия и правильности целевых инсерций в векторных плазмидных ДНК секвенированием проводили трансфекцию клеток HEK293. Использовали реагент для трансфекции Lipofectamine™ LTX и реагент Plus «Invitrogen» (США). Трансфекцию проводили в шестилуночных культуральных планшетах смесью соответствующей векторной плазмидной ДНК (pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo, pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-CM-Apo или pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo) гидролизованной эдонуклеазой рестрикции PacI в присутствии реагентов для трансфекции (2,5 мкг плазмидной ДНК + липофектамин, 10 мкл + реагент Plus, 3,5мкл) в соответствии с рекомендациями производителя в 1 мл среды Opti-MEM (Invitrogen, USA). После 6 ч инкубации клеток с трансфекционной смесью при 37°C в лунки добавляли еще 2 мл среды Opti-MEM и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 4–8 сут до развития вирусиндуцированного цитопатического действия (ЦПД). Освобожденный из клеток трехкратным замораживанием – оттаиванием вирус клонировали методом бляшек на культуре клеток HEK293, после чего проводили наработку вирусного потомства отдельных клонов. Рекомбинантный генотип полученных аденовирусов подтверждали ПЦР-анализом и частичным секвенированием вирусных геномных ДНК. Для подтверждения наличия инсерции трансгена рассчитывали две пары праймеров: одна пара лежит во фланкирующих место встройки последовательностях аденовирусного генома, вторая включает праймер, лежащий внутри трансгена, и праймер на геномной последовательности, тем самым осуществляя привязку встройки к определенному району вирусного генома. Расчет структур праймеров выполняли в среде ПО «Vector NTI v.9.1» производства «Madison Inc.» (США), специфичность полученных последовательностей оценивали, используя программу «BLAST», интегрированную в систему базы данных «GenBank». Обработку и анализ нуклеотидных последовательностей проводили в среде ПО «Vector NTI v.9.1» производства «Madison Inc.» (США) и ПО секвенатора «ABI 3130xl» (США).

Результаты исследования и обсуждение

В ходе данной работы предполагалось сконструировать три варианта аденовирусных векторов, несущих встройки гена белка апоптина. Первые две конструкции обеспечивают создание репликативно-дефектных аденовирусов, в геноме которых делетирован ген E1A, абсолютно необходимый для репликации вируса. В первом случае ген белка апоптина был встроен под контроль промотора обратной транскриптазы теломеразы (hTERT), а во втором – под контроль промотора цитомегаловируса. Третья конструкция представляет собой репликативно-компетентный вектор, в котором отсутствует область, кодирующая белок E1B-55K, а активация E1A возможна только в присутствии теломеразы, в связи с чем репликация данного аденовируса ограничивается опухолевыми клетками [2, 5]. На рис. 1 представлены схемы генома сконструированных аденовирусных векторов.

Для создания конструкций, представленных на рис. 1, были синтезированы целевые последовательности, осуществлен их дизайн и сконструированы генные кассеты, обеспечивающие интеграцию трансгенов в аденовирусный геном. Синтез трансгенов осуществляли по опубликованным последовательностям промотора hTERT [2] и гена белка апоптина (GenBank P54094). Последовательность коровой части промотора hTERT длиной 236 п.н. синтезировали методом элонгации праймеров в ПЦР. Амплифицированная последовательность промотора hTERT была секвенирована и полностью соответствовала литературным данным по нуклеотидной последовательности промотора hTERT. Синтез гена белка апоптина с последовательностью репортерного пептида осуществляли методом элонгации праймеров в ПЦР. Фрагмент ДНК длиной 601 п.н., содержащий промотор CMV, получали с использованием плазмиды pcDNA4 методом ПЦР.

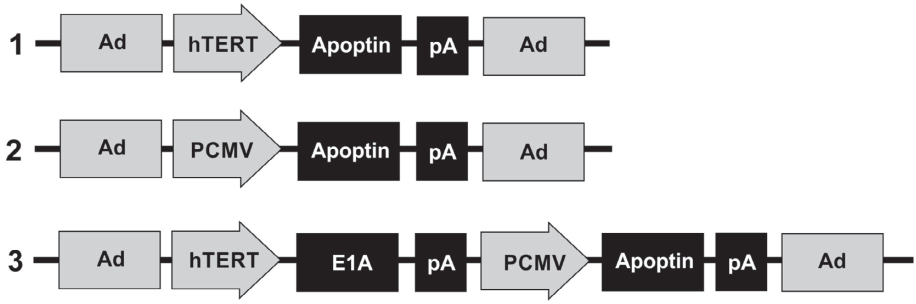


Рис. 1. Схема геномной организации сконструированных рекомбинантных аденовирусов: *1* – дефектный по репликации аденовирус с делетированными генами E1A и E1B с инсерцией гена апоптина под контролем hTERT-промотора; *2* – дефектный по репликации аденовирус с делетированными генами E1A и E1B с инсерцией гена апоптина под контролем CMV-промотора; *3* – компетентный по репликации аденовирус с геном E1A под контролем hTERT-промотора (несущий делецию гена E1B-55K) с инсерцией гена апоптина по контролем CMV-промотора. pA – сигнал полиаденилирования

С целью последующего конструирования компетентного по репликации рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего трансген и несущего делецию гена E1B-55K, методом ПЦР с использованием геномной ДНК аденовируса 5-го серотипа в качестве матрицы амплифицировали фрагмент аденовирусного генома с 459 по 2178 п.н., включающий последовательность генов E1A и E1B-19K.

На следующем этапе полученные фрагменты кДНК гена белка апоптина (444 п.н.), CMV-промотора (601 п.н.), промотора hTERT (236 п.н.) и генов E1A и E1B-19K аденовируса 5-го серотипа (1719 п.н.) методом ПЦР-лигирования собирали в генные кассеты и клонировали в промежуточную плазмиду pCR2.1TOPO. В результате были получены плазмиды pCR2.1-hT--Apo, pCR2.1-CM-Apo и pCR2.1-AdhTE1a-CM-Apo. Сконструированные генные кассеты методом 5′- и 3′-концевого удлинения праймеров в ПЦР фланкировали последовательностями attB1 и attB2 и клонировали в векторную плазмиду pAd/CMV/V5-DEST, несущую аденовирусный геном, методом гомологичной рекомбинации к клетках *E. coli* T1. Рекомбинантные клоны *E. coli* T1, содержащие рекомбинантные плазмиды, отбирали на основании ПЦР и рестрикционного анализа. Были получены векторные плазмиды, несущие аденовирусный геном, и встроенные генные кассеты: pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo, pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-CM-Apo и pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo. Наличие и правильность целевых инсерций в векторных плазмидных подтверждены секвенированием, после чего проводили трансфекцию клеток HEK293. Для контроля эффективности трансфекции использовали аденовирусную ДНК в комплексе с терминальным белком, выделенную из рекомбинантного варианта аденовируса

Adel2, делеционного по гену E1B-55K [6, 7]. Типичное для клеток HEK293 аденовирусное ЦПД было выявлено на 4-е сут для контрольной аденовирусной ДНК Adel2, на 6-е и 8-е сут для векторных плазмидных ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo и pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo соответственно. Появление вирусиндуцированного ЦПД в монослое клеток HEK293, трансфецированных векторной ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-CM-Apo, выявлено при выполнении пересева («слепого» пассажа) трансфецированных клеток. На рис. 2 приведены фотографии трансфецированных плазмидными и аденовирусной ДНК клеток HEK293 с типичными проявлениями аденовирусного ЦПД.

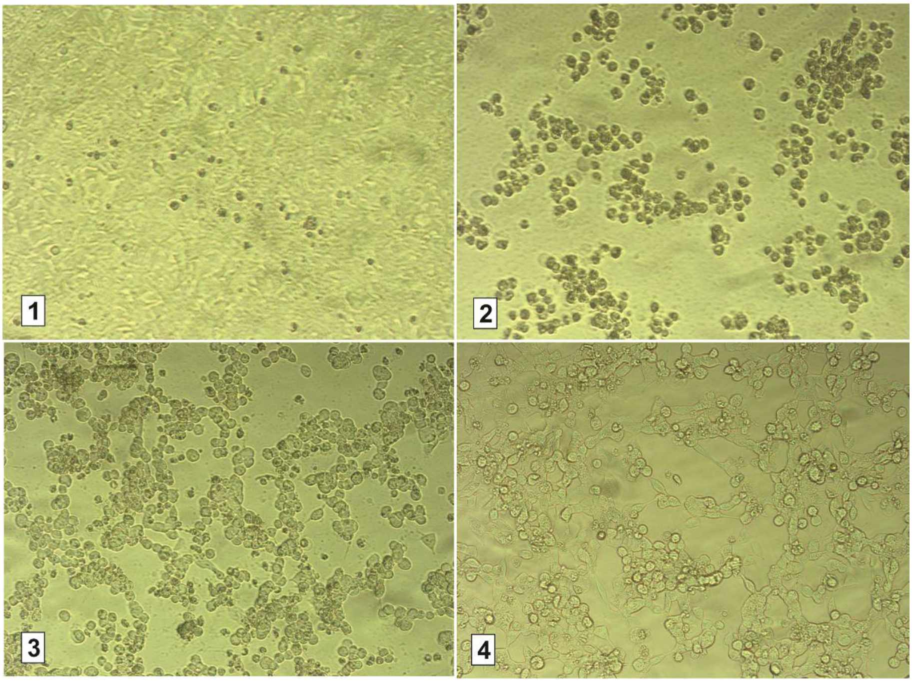


Рис. 2. Вирусиндуцированное ЦПД клеток HEK293, трансфецированных векторными плазмидными и аденовирусной Adel2 ДНК: *1* – контрольный монослой клеток HEK293; *2* – клетки HEK293, трансфецированные ДНК рекомбинантного аденовируса Adel2; *3* – клетки HEK293, трансфецированные векторной плазмидной ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo; *4* – клетки HEK293, трансфецированные векторной плазмидной ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo

Полученные рекомбинантные аденовирусы были клонированы методом бляшек. Инфекционную активность рекомбинантных аденовирусов определяли титрованием на клетках HEK293. Для определения фенотипа (репликационно-компетентный или дефектный) проводили параллельное титрование сконструированных рекомбинантных аденовирусов на культуре клеток HEp2 (не комплементирующая дефект аденовирусного гена E1A перевиваемая линия эпителиальных клеток гортани человека, чувствительная к аденовирусной инфекции). В качестве контрольного рекомбинантного аденовируса использовали делеционный по гену E1B-55K аденовирус Adel2. Результаты приведены в таблице, инфекционный титр рекомбинантных аденовирусов выражали через ТЦПД$_{50}$/мл (50%-ная тканевая цитопатическая доза) [8]. Как видно из табл. 1, рекомбинатные аденовирусы AdΔE1a-hT-Apo и AdΔE1a-CM-Apo инфицируют с высокой активностью комплементарные клетки HEK293 и в то же время не способны к эффективной репликации в культуре клеток HEp2, что свидетельствует о репликационно-дефектном фенотипе этих двух рекомбинантов. Рекомбинатный аденовирус AdhTE1a-CM-Apo способен эффективно инфицировать как клетки HEK293, так и HEp2 (с активностью, близкой к таковой рекомбинанта Adel2) и соответственно является компетентным по репликации аденовирусом. Способность AdhTE1a-CM-Apo инфицировать клетки HEp2 обусловлена, по-видимому, тем, что данная клеточная культура является перевиваемой (иммортализованной) и характеризуется повышенным уровнем теломеразной активности.

Инфекционная активность сконструированных рекомбинатных аденовирусов

Аденовирус	Инфекционный титр для клеточной культуры, ТЦПД$_{50}$/мл	
	HEK293	HEp2
AdΔE1a-hT-Apo	10^{10}	$<10^{3}$
AdΔE1a-CM-Apo	2×10^{10}	$<10^{3}$
AdhTE1a-CM-Apo	10^{10}	5×10^{7}
Adel2	5×10^{10}	5×10^{8}

На основании полученных результатов можно утверждать, что удалось получить два рекомбинантных дефектных по репликации аденовируса с инсерциями гена белка апоптина под контролем hTERT- и CMV-промоторов соответственно и компетентный по репликации делеционный по гену E1B-55K аденовирус с инсерцией гена апоптина и геном E1A под контролем hTERT-промотора.

Верификацию правильности внесенных генетических модификаций в геномах сконструированных аденовирусных вариантов проводили секвенированием геномных ДНК. ДНК для анализа выделяли из очищенных в градиенте хлористого цезия препаратов рекомбинатных аденовирусов. После проведения ПЦР с праймерами к фланкирующим встроенные генные кассеты районам векторной ДНК pAd/CMV/V5-DEST и выделенными из сконструированных рекомбинантных аденовирусов геномных ДНК в качестве матриц образцы продуктов амплификации очищали и секвенировали по прямой и обратной цепи ДНК. Все нуклеотидные последовательности были определены дважды в независимых экспериментах.

Их анализ показал, что в ДНК рекомбинантов AdΔE1a-hT-Apo и AdΔE1a-CM-Apo в районе встройки генных кассет полностью делетирован ген E1 (E1A, E1B-19K и E1B-55K, позиции 459–3 512 п.н. аденовирусного генома). В геномной ДНК AdhTE1a-CM-Apo восстановлена последовательность гена E1A, помещенная под контроль hTERT промотора и E1B-19K (протяженностью 1720 п.н.) и делетирован ген E1B-55K (1330 п.н.). Тот факт, что вариант AdhTE1a-CM-Apo способен инфицировать не комплементирующие дефект по гену E1 клетки HEp2, свидетельствует о функциональности восстановленного за счет встройки генной кассеты гена E1A. Кроме того, у всех сконструированных рекомбинантных аденовирусов делетирован необязательный для вирусной репликации ген E3.

Заключение

В результате проведенной работы сконструированы три варианта рекомбинантных аденовирусов 5-го серотипа, несущих встройку гена белка апоптина под контролем промоторов CMV и hTERT; два рекомбинанта являются репликативно-дефектными в связи с делецией гена E1A, необходимого для вирусной репликации, третий – компетентным по репликации аденовирусом. Правильность полученных конструкций верифицировали секвенированием. Полученные аденовирусные векторы могут служить основой для создания перспективных онколитических препаратов, обладающих высокой специфичностью благодаря контролю вирусной репликации hTERT-промотором, а также высокой онколитической активностью благодаря экспрессии терапевтического трансгена – гена белка апоптина, вызывающего p53- и bcl-2-независимый апоптоз опухолевых клеток. В дальнейшем онколитическая активность сконструированных рекомбинантных аденовирусов будет исследована *in vitro* и *in vivo*.

Литература

1. *Dong C.K., Masutomi K., Hahn W.C.* Telomerase: regulation, function and transformation // Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2005. Vol. 54. P. 85–93.
2. *Li X., Liu Y., Wen Z. et al.* Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin in vitro and in vivo // Molecular cancer. 2010. Vol. 9. P. 10.
3. *Bullenkamp J., Cole D., Malik F. et al.* Human Gyrovirus Apoptin shows a similar subcellular distribution pattern and apoptosis induction as the chicken anaemia virus derived VP3/Apoptin // Cell death & disease. 2012. Vol. 3. P. e296.
4. *Wu Y., Zhang X., Wang X. et al.* Apoptin enhances the oncolytic properties of Newcastle disease virus // Intervirology. 2012. Vol. 55. P. 276–286.
5. *O'Shea C.C., Johnson L., Bagus B. et al.* Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity // Cancer cell. 2004. Vol. 6. P. 611–623.

6. *Качко А.В. Святченко В.А., Терновой В.А. и др.* Варианты аденовируса типа 5 с делециями в ранних генах: способность к селективной репликации в р53-дефектных опухолевых клетках человека // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. С. 868–875.
7. *Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А. и др.* Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата «канцеролизин» // Вопросы вирусологии. 2006. № 6. С. 39–42.
8. *Chanas A.C., Johnson B.K., Simpson D.I.* Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method // Journal of General Virology. 1976. Vol. 32. P. 295–300.

Поступила в редакцию 05.07.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 100–110

doi: 10.17223/19988591/23/9

Vladimir A. Ternovoy[1], Viktor A. Svyatchenko[1], Margarita V. Tarasova[1,2], Nikolay N. Кiselev[1], Elena V. Chub[1], Tamara P. Mikryukova[1], Elena V. Protopopova[1], Valeryi B. Loktev[1], Petr M. Chumakov[2,3], Sergey V. Netesov[1,2]

[1] State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk area, Russia
[2] Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia
[3] Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

THE CONSTRUCTION OF RECOMBINANT ADENOVIRUSES EXPRESSING APOPTIN

This work was partially supported by FSP (SC № 14.512.11.0003).

The use of oncolytic viruses is one of the promising areas of malignant diseases modern treatment methods. In numerous studies of the adenoviruses strains oncolytic properties, their efficacy and safety in the treatment of various cancers were shown. The vast majority of the studies were carried out with the use of adenovirus serotype 5. To improve these anticancer agents means to increase their specificity for cancer cells and their lytic activity. To this end, adenovirus serotype 5 recombinant variants were constructed expressing apoptin (VP3 protein of chicken anemia virus) and causing p53 and bcl-2 independent apoptosis, increasing the lytic properties of viruses. Furthermore, to increase the specificity of adenovirus replication towards tumor cells, telomerase reverse transcriptase promoter (hTERT) was used. According to the data indicating that the apoptin expression in the cells is accompanied by induction of apoptosis in tumor cells only, the adenoviruses variants were constructed in which apoptin expression is regulated by cytomegalovirus promoter (CMV), which is stronger than hTERT. As a result, the design of apoptin gene sequences, CMV and hTERT promoters and the construction of recombinant plasmids bearing them, which are necessary for constructing recombinant adenoviruses, was created. Using the methodology of homologous recombination and co-transfection of cells, two replications of defective recombinant adenovirus AdΔE1a-hT-Apo and AdΔE1a-CM-Apo with insertions of apoptin gene under the control of the hTERT-and CMV-promoter, respectively, were obtained. In these recombinants, E1A and E1B genes, necessary for viral replication, are deleted, which makes such agents safer. The third constructed recombinant represents replication competent adenovirus AdhTE1a-CM-Apo with deletion of E1B-55K protein gene and insertion of *apoptin gene and E1A gene under the control of the hTERT-promoter. The use of the tumor-specific promoter in this recombinant strain allows the virus to replicate only in the cells with an active telomerase. Furthermore, the specificity of this adenoviral variant to tumor cells is enhanced by deletion of the gene coding E1B-55K protein, limiting its replication in normal cells, which are not able to complement the function of this protein. The sequencing of recombinant adenoviruses genomic DNA demonstrated the presence of engineered gene cassettes in their genomes, the validity of the introduced transgenes and regulatory sequences and their compliance with the chosen design scheme. The obtained adenovirus vectors can serve as a basis for creating perspective oncolytic agents with high specificity due to the control of viral replication by hTERT promoter and high lytic activity due to the presence of the apoptin gene as a transgene causing p53 and bcl-2-independent apoptosis in tumor cells.*

Key words: *adenovirus; recombinants; apoptin; oncolytic viruses; hTERT promoter; apoptosis.*

Received July 5, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 111–119

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.132
doi: 10.17223/19988591/23/10

С.А. Войцековская[1, 2], Э.Р. Юмагулова[3], Е.Н. Сурнина[4], Т.П. Астафурова[4]

[1]Томский государственный педагогический университет (г. Томск)
[2] Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета (г. Томск)
[3]Нижневартовский государственный гуманитарный университет (г. Нижневартовск)
[4]Томский государственный университет (г. Томск)

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Pinus sylvestris* L.) БОЛОТНЫХ И ЛЕСНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Работа выполнена по Госзаданию Министерства образования и науки РФ (№ РК 01201261252) и при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-90877 мол_рф_нр).

Показаны особенности фотосинтетического аппарата, активности некоторых ферментов анаэробного дыхательного метаболизма, содержания аскорбиновой кислоты и каталазной активности в двухлетней хвое сосны обыкновенной (Pinus sylvestris L.) естественных экосистем верхового и низинного болота и соснового леса в различных районах Томской области. Результаты исследований показали, что в сформированном фотосинтетическом аппарате при близких условиях произрастания (биоценозы соснового леса) количество хлорофиллов a, b и каротиноидов, а также их соотношения достоверно не отличались. Содержание зеленых, желтых пигментов, а также активность фермента каталазы достоверно ниже у растений болотных экосистем. Повышенные активность алкогольдегидрогеназы и функционирование окислительного пентозофосфатного пути дыхания отмечена в хвое сосны обыкновенной, произрастающей на болоте. Выявлены определенные связи между изменениями в содержании аскорбата и каротиноидов. В хвое болотных популяций растений сосны сохранялось высокое содержание аскорбата при снижении уровня каротиноидов.

Ключевые слова: *болотные экосистемы; Pinus sylvestris; фотосинтетические пигменты; ферменты анаэробного дыхательного метаболизма; антиоксидантная система; каталаза; аскорбат.*

Введение

Под влиянием глобальных климатических факторов и локальных воздействий на экосистемы происходят ухудшение общего экологического состояния биосферы, нарушение естественного круговорота и баланса углерода, смена растительности. В связи с этим большое значение приобретают исследования по проблеме адаптации растительных организмов к изменению окружающей среды [1].

Болотные экосистемы выполняют комплекс важных экологических функций в биосфере [2–4]. Главным компонентом болот являются растения-продуценты. Они играют большую роль в круговороте углерода в биосфере. Фотосинтез и дыхание растений – два взаимосвязанных и взаимодополняющих процесса, в ходе которых происходит превращение неорганического углерода атмосферы в органическую форму, обеспечение организмов энергией, метаболитами для всех процессов жизнедеятельности, депонирование углерода в виде разнообразных органических соединений в общей биомассе растений и в конечном счете в торфе и выделение CO_2 и O_2 в атмосферу. Среди разнообразных экологических факторов, оказывающих воздействие на растения болотных экосистем, ведущим в условиях обильного застойного увлажнения является недостаток кислорода. В условиях дефицита кислорода метаболические способы адаптации растений касаются прежде всего процесса дыхания, что объясняется спецификой воздействия. Компенсаторные перестройки дыхательного метаболизма в значительной степени отражают использование эволюционно сформированных систем гликолиза, переходящего в спиртовое брожение, и окислительного пентозофосфатного пути, поставляющих АТФ, промежуточные вещества для биосинтезов и биологические восстановители. Чувствительным показателем физиологического состояния растений, отражающим интенсивность фотосинтеза и адаптивные перестройки метаболизма, является содержание фотосинтетических пигментов [5–7].

В адаптации растений к неблагоприятным воздействиям важная роль также принадлежит функционированию эффективных антиоксидантных систем, способных обеспечить защиту от активных форм кислорода, накапливающихся при разных формах стресса [8]. Антиоксидантные системы состоят из низкомолекулярных соединений (аскорбиновая кислота, каротиноиды, глутатион, токоферол, флавоноиды) и ферментов (пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза и др.) [9]. В условиях стресса растения способны к индукции активности антиоксидантной системы, в результате чего они приобретают устойчивость к действующему фактору.

Известно, что растения, устойчивые к недостатку кислорода, обладают более высоким содержанием аскорбата, токоферола, активностью защитных ферментов [5]. В процессе переноса электронов, накапливающихся в дыхательной цепи клетки в условиях дефицита кислорода, на молекулярный кислород образуются его активные формы (супероксид-ион, перекись водорода), которые атакуют липиды мембран, денатурируют белки и нуклеиновые кислоты, существенно повреждая растительные клетки [10].

Цель работы – сравнительное исследование ряда показателей, характеризующих основные жизненно важные физиологические функции: фотосинтез, дыхание и особенности антиоксидантной системы у сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. (семейство Pinaceae) из болотных и лесных естественных экосистем в различных районах Томской области.

Материалы и методики исследования

Исследованные объекты произрастали в естественных биоценозах соснового леса в окрестностях сел Победа 1, Большое Протопопово 2 и Тимирязево 3; опытные участки были расположены на территории болотных экосистем низинного типа – Таган (1, 2, 3) – и верхового типа – Полынянка. Характеристика этих болотных экосистем проведена ранее [11]. Исследования проводились на двухлетней развитой хвое. Количество хлорофиллов *a* и *b*, а также сумму каротиноидов определяли в этиловом спирте на спектрофотометре UV-1650 pc UV-spectrophotometer (Shimadzu) при длинах волн 665, 649 и 440,5 нм [12]. Для определения активности ферментов производили гомогенизацию растительных тканей при пониженной температуре в среде следующего состава: трис-HCl буфер (50 мМ, pH 7,8), аскорбат натрия (5 мМ), цистеин (3 мМ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (1 мМ) и ДТТ (5 мМ) [13]. Гомогенат центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин при 4°C. Активность ферментов измеряли в супернатанте спектрофотометрически (UV-1650 pc UV-spectrophotometer, Shimadzu). Ферментативную активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) определяли в окислительно-восстановительных превращениях $НАД^+$ или НАДН в реакционных средах, содержащих трис-HCl буфер (50 мМ, pH 9,5), НАДН (2 мкМ); ацетальдегид (50 мкМ) или НАД (15 мМ) и этанол (50 мМ). Функционирование фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) исследовали в реакционной смеси, содержащей трис-HCl буфер (30 мМ, pH 7,4), глюкозо-6-фосфат Na соль (0,12 мМ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,25 М) и НАДФ (11 мМ) [14]. Содержание белка определяли по методике Бредфорда [15]. Полученные данные выражали в единицах ферментативной активности на 1 мг белка. Определение активности каталазы проводили по методу Баха и Опарина; содержание свободной и связанной аскорбиновой кислоты исследовали, используя 2,6-дихлорфенолиндофенол [16].

Обработку результатов проводили статистически с помощью компьютерных программ Excel и StatSoft STATISTICA 6.0. В табл. 1–4 приведены средние арифметические и ошибки среднеарифметической величины. Разницу между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в сформированном фотосинтетическом аппарате при близких условиях произрастания (биоценозы соснового леса) количество хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов, а также их соотношение в двухлетней хвое сосны обыкновенной достоверно не отличались (табл. 1). Среднее содержание пигментов на контрольных участках имело следующие значения: хлорофилла *a* – 1 068 мкг/г сырой массы; хлорофилла *b* – 373 мкг/г сырой массы и каротиноидов – 292 мкг/г сырой массы (рис. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика содержания фотосинтетических пигментов в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем соснового леса и болотных экосистем, мкг/г сырой массы

Экосистема	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Сумма (*a* + *b*)	Сумма каротиноидов	*a*/*b*	(*a* + *b*) / Каротиноиды
Сосновый лес *1*	1035 ± 43	368 ± 19	1403 ± 62	284 ± 12	2,9	4,9 ± 0,02
Сосновый лес *2*	1101 ± 17	377 ± 15	1478 ± 23	299 ± 6	2,9	4,9 ± 0,07
Болото низинное *1*	961 ± 23*	316 ± 5*	1278 ± 28*	211 ± 5*	3,0	6,1 ± 0,003*
Болото низинное *2*	938 ± 17*	312 ± 14*	1250 ± 30*	203 ± 2*	3,0	6,2 ± 0,12*
Болото низинное *3*	732 ± 34*	253 ± 8*	985 ± 41*	148 ± 7*	2,9	6,7 ± 0,05*
Болото верховое	332 ± 13*	116 ± 1*	448 ± 14*	95 ± 4*	2,9	4,7 ± 0,11

Примечание. Здесь и далее в таблицах между разными экосистемами все различия статистически значимы ($p \leq 0,05$).

Исследование пигментного фонда хвои сосны обыкновенной показало, что в условиях болотных экосистем содержание зеленых и желтых пигментов достоверно ниже, чем у растений всех исследованных биоценозов соснового леса (табл. 1, рис. 1). Больше всего эта разница была выражена для растений болотной экосистемы верхового типа, что, по-видимому, обусловлено своеобразным сочетанием эдафических и климатических факторов, характерных для сфагновых болот. Различия в содержании пигментов значительны. Соотношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* в разных вариантах не изменялось, а отношение суммы хлорофилла *a* хлорофиллу *b* к каротиноидам в условиях низинного болота возрастало (см. табл. 1), что свидетельствует о происходящих адаптивных перестройках.

О переходе гликолиза в брожение свидетельствовало резкое повышение активности алкогольдегидрогеназы – основного тестового фермента для гипоксического воздействия любого типа, который катализирует заключительную реакцию спиртового брожения. В хвое сосны, произрастающей на верховом болоте, активность НАДН-алкогольдегидрогеназы была значительно выше, чем в образцах соснового леса соснового биоценоза (табл. 2). Одновременно отмечено увеличение активности НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы, что указывало на возможность вторичной переработки этанола растениями, испытывающими анаэробиоз [5].

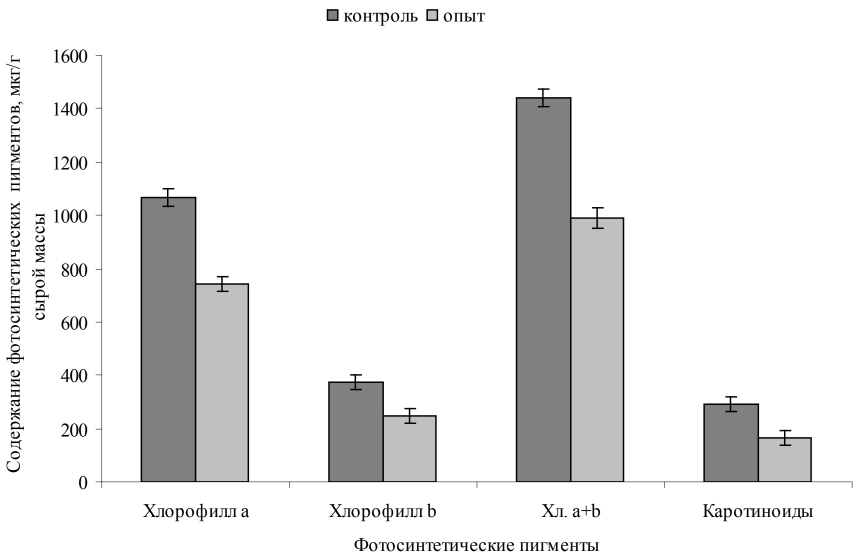


Рис. 1. Содержание фотосинтетических пигментов в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем соснового леса и болотных экосистем, мкг/г сырой массы

Таблица 2

Активность некоторых ферментов анаэробного дыхательного метаболизма в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. разных экосистем

Фермент	Активность, мЕ/мг белка	
	Сосновый лес 1	Болото верховое
НАДН-алкогольдегидрогеназа	60,6 ± 3,58	229,6 ± 19,21
НАД-алкогольдегидрогеназа	3,7 ± 0,28	59,6 ± 2,24
НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	1,44 ± 0,07	9,88 ± 0,01

Вместе с усилением гликолиза в хвое сосны, произрастающей на верховом болоте, активировалась работа окислительного пентозофосфатного пути дыхания, о чем свидетельствует высокая активность его стартового энзима НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (табл. 2). Подтверждается представление о том, что в условиях кислородной недостаточности процессы гликолиза и апотомического распада углеводов осуществляются параллельно в силу их тесной взаимосвязи [5].

Изучение активности фермента каталазы в двухлетней хвое сосны обыкновенной болотных экосистем низинного и верхового типа показало достоверное уменьшение данного параметра, по сравнению с сосной обыкновенной экосистемы соснового леса *3*. Так, каталазная активность в хвое сосны, произрастающей в условиях низинного болота *1*, была в 2 раза ниже, а в условиях верхового болота – в 4 раза ниже соответствующих показателей хвои сосны лесной экосистемы (табл. 3).

Таблица 3

Активность каталазы в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем соснового леса и болотных экосистем, мг/г сырой массы перекиси водорода, разложенной ферментом

Экосистема	Активность каталазы
Сосновый лес *3*	45,33 ± 2,4
Болото низинное *1*	24,00 ± 1,21*
Болото верховое	11,33 ± 0, 52*

Каталаза – фермент, эффективно работающий при высокой концентрации пероксида водорода, может ликвидировать его избыточные количества. Активность каталазы в растениях связана в основном с митохондриями, цитоплазмой и пероксисомами [9]. Антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные соединения могут быть гидрофильными и гидрофобными. Аскорбиновая кислота находится в водной фазе клетки, хлоропластах, митохондриях и других структурах, также в межмембранном пространстве клеточных органелл. Как восстанавливающий агент аскорбиновая кислота способна напрямую реагировать с супероксидным, гидроксильным и токоферольным радикалами [5]. Согласно полученным данным, в хвое сосны, произрастающей в условиях верхового болота, обнаружено более высокое содержание аскорбиновой кислоты, по сравнению с хвоей сосны в экосистеме соснового леса *2* и соснового леса *3*, что, вероятно, свидетельствует о защитной роли аскорбата (табл. 4).

Таблица 4

Содержание аскорбиновой кислоты в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем соснового леса и болотной экосистемы, мг %

Экосистема	Содержание аскорбата
Сосновый лес *3*	374,0 ± 0,91
Сосновый лес *2*	444,6 ± 0,82
Болото верховое	506,0 ± 0,90*

Отмечены определенные связи между изменениями в содержании аскорбата и каротиноидов. В хвое болотных растений сохранялось высоким содержание аскорбата, но интенсивно снижался уровень каротиноидов. Известно, что аскорбат выполняет защитную функцию уже на первых этапах образования активных форм кислорода в гидрофильной среде, тогда как каротиноиды защищают мембранно-связанные компоненты в гидрофобной среде. Каротиноиды как липофильные антиокислители способны дезактивировать многие активные формы кислорода, особенно синглетный кислород. Не менее важными в защите клеточных структур являются реакции взаимодействия каротиноидов с органическими радикалами жирных кислот, обрывающие цепь свободнорадикального окисления, защищая мембраны клетки от деструкции.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что в двухлетней хвое сосны обыкновенной в условиях дефицита кислорода для корневой системы изменяется уровень фотосинтетических пигментов и обнаруживаются особенности дыхательного метаболизма. В условиях соснового леса содержание фотосинтетических пигментов значительно выше, чем в болотных экосистемах, среди которых пониженное содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов выявлено на верховом болоте, по сравнению с низинным. В хвое сосны болотных экосистем активируются процессы анаэробного дыхательного обмена, которые обеспечивают стратегию выживания растений. Разнонаправленные изменения содержания антиоксидантов в хвое сосны болотных и лесных экосистем свидетельствуют об особенностях реакции ассимиляционного аппарата растений на длительное затопление. Участие веществ, обладающих антиокислительными свойствами, – каталазы, аскорбиновой кислоты, каротиноидов, – создает мощный антиоксидантный пул обменных процессов в надземных органах, необходимых для выживания растений в условиях дефицита кислорода для корневой системы.

Благодарим доктора сельскохозяйственных наук, профессора Л.И. Инишеву, руководителя проблемной лаборатории агроэкологии ТГПУ, за научную консультацию и предоставленную возможность для проведения эксперимента.

Литература

1. *Иванова Н.А., Юмагулова Э.Р.* Эколого-физиологические механизмы адаптации и типы стратегии сосудистых растений верховых болот. Ханты-Мансийск : Печатное дело, 2010. 165 с.
2. *Лапшина Е.Д.* Флора болот юго-востока Западной Сибири. Томск, 2003. 296 с.
3. *Chapin F.S., Bret-Harte M.S., Hobble S.E., Zhong H.* Plant functional types as predictors of transient responses of arctic vegetation to global change // Journal of Vegetation Science. 1996. Vol. 7, № 3. P. 347–358.
4. *Woodward F.I., Cramer W.* Plant functional types and climatik changes: Introduction // Journal of Vegetation Science. 1996. Vol. 7. P. 306–308.
5. *Чиркова Т.В.* Физиологические основы устойчивости растений. Л. : Изд-во СПб. ун-та, 2002. 240 с.
6. *Зотикова А.П., Бендер О.Г.* Структура и функция ассимиляционного аппарата кедра сибирского в горах Центрального Алтая // Journal of Siberian Federal University. Biology. 2009. № 2 (1). С. 80–89.
7. *Романова Л.И.* Метаболическая реакция сеянцев лиственницы сибирской на затопление корней // Лесоведение. 2004. № 1. С. 31–37.
8. *Радюкина Н.Л, Иванов Ю.В., Карташов А.В.* и др. Изучение индуцибельных и конститутивных механизмов устойчивости к солевому стрессу у гравилата городского // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 5. С. 692–698.
9. *Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н.* Природные антиоксиданты (экологический аспект). Калининград : Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. 111 с.

10. *Вартапетян Б.Б.* Учение об анаэробном стрессе растений – новое направление в экологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений. 2. Дальнейшее развитие проблемы // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 6. С. 805–836.
11. *Головченко А.В., Инишева Л.И., Губина А.В., Голубина А.Б.* Характеристика биохимических процессов в эвтрофных и мезотрофных болотах Сибири // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2009. Вып. 11(89). С. 207–212.
12. *Шлык А.А.* Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений / под ред. О.А. Павлиновой. М. : Наука, 1971. С. 154–170.
13. *Юзбеков А.К.* Спектрофотометрические способы определения активности ключевых ферментов фотосинтетического метаболизма у C_3 и C_4-растений: методическое пособие. Киев : Ин-т физиологии растений и генетики АН УССР, 1990. 32 с.
14. *Астафурова Т.П., Войцековская С.А., Верхотурова Г.С.* Исследование путей адаптации растений к гипобарической гипоксии // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2007. № 1. С. 67–74.
15. *Bradford R.M.M.* A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
16. *Лещук Р.И., Вайшля О.Б., Войцековская С.А.* Практикум по биохимии. Томск : Изд-во ТГУ, 2002. 192 с.

Поступила в редакцию 16.04.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 111–119

doi: 10.17223/19988591/23/10

Svetlana A. Voizekhovskaya[1, 2], Elvira R. Umagulova[3], Elena N. Surnina[4], Tatyana P. Astafurova[4]

[1] *Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia*
[2] *Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia*
[3] *Nizhnevartovsk State University for the Humanities, Nizhnevartovsk, Russia*
[4] *Tomsk State University, Tomsk, Russia*

STUDY OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF PINE NEEDLES OF SCOTS PINE (*Pinus sylvestris* L.) BOG AND FOREST POPULATIONS

Under the impact of global climatic factors and local influence on ecosystems there is a deterioration of common ecological conditions of the biosphere, disturbance of natural circulation and carbon balance and vegetation changing. In connection with this, investigations of adaptation of plant's organisms to environmental changes acquire a great significance. Mire ecosystems perform a complex of important ecological functions in the biosphere. The main components of mire are plants producing biomass, which plays a big role in carbon circulation in the biosphere. Among different ecological factors influencing mire plants, a leading factor under the conditions of abundant congested moistening is oxygen deficiency. Under the conditions of oxygen deficiency, metabolic modes of adaptation of plants are connected, first of all, with process of respiration, which is explained by the specificity of influence. Recompense rearrangements of respiration metabolism reflect, considerably, the use of evolutionary formed glycolysis systems, which transforms into alcohol fermentation, and a pentaphosphate *way leading to an increased ATF production, intermediate substances for biological synthesis and biological rehabilitation. A sensitive index of plant physiological condition, which reflects intensity of photosynthesis and adaptive reconstruction of metabolism, is the quantity of photosynthetic pigments. .*

The aim of this work is connected with a comparable investigation of a series of indexes, which characterize major vitally important physiological functions: photosynthesis, respiration and peculiarities of anti-oxygenating system of Scot's pine Pinus sylvestris L. (fam. Pinaceae) in natural ecosystems of mire and pine forest in Tomsk and Bakchar districts of Tomsk oblast. The studied objects grew in natural pine forest biocenosis near villages Pobeda, Bolshoe Protopopovo and Timiryazevo (control): experimental sites were located on the territory of mire ecosystems of eutrophic type – Tagan and oligotrophic type – Polynyanka. Two- year old pine needles were used for investigation.

The performed investigations showed that Scot's pine, growing in different ecological conditions, differs by the level of photosynthetic pigments and by peculiarities of respiration exchange. Under the conditions of pine forest the content of photosynthetic pigments is considerably higher, compared with mire ecosystems. Among mire pines there is a lower content of chlorophyll "a" and "b" and carotenoids on oligotrophic bog, compared with euthrophic mire. In pine needles, processes of anaerobic transpiration exchange activate, which promotes a strategy of survival of plants. Different changes of the content of anti-oxidants in pine needles under the conditions of mire and forest ecosystems show specific peculiarities of pine reaction to long-time inundation of the assimilation mechanism of plants. Participation of substances with anti-oxidant features (catalase, ascorbic acid and carotenoids) creates a strong anti-oxidant pool of substances in above-ground organs of plants; supports correlative connections between the root system and photosynthetic organs, which are necessary for survival of plants under the conditions of oxygen deficiency for the root system.

Key words: *peat ecosystems; pine; photosynthetic pigments; enzymes of anaerobic respiratory metabolism; antioxidant system; catalase; ascorbate.*

Received April 16, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 120–126

УДК 581.142
doi: 10.17223/19988591/23/11

А.А. Ермошин, М.Н. Цибизова, И.С. Киселёва

Институт естественных наук Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург)

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ И АЛЮМИНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ *Trifolium repens* L.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашения № 14.B37.21.2078 и 14.A18.21.0203), а также молодых ученых УрФУ в рамках реализации программы развития УрФУ.

Проведено изучение влияния высоких доз ионов меди и алюминия на развитие проростков клевера ползучего. Определены всхожесть семян, линейные размеры корешка и гипокотиля, содержание фотосинтетических пигментов. В качестве стрессоров в работе использовали растворы сульфата меди и сульфата алюминия в концентрации 50, 100, 200 и 1000 мкМ по металлу. Было показано, что более чувствительным к поллютантам является рост корешка, менее чувствительным – рост гипокотиля. Ионы меди были более токсичны для проростков клевера, чем ионы алюминия. Ионы меди в концентрации 100–200 мкМ вызывали двукратное уменьшение всех изученных показателей, в то время как алюминий в дозе 200 и 1 000 мкМ снижал их не более чем на треть. Также были использованы концентрации 10 и 5 000 мкМ. Первая из них не оказала существенного влияния на развитие проростков, вторая оказалась летальной.

Ключевые слова: *Trifolium repens L.; ионы алюминия; медь; рост растений; стресс.*

Введение

Ухудшение экологической обстановки, вызванное антропогенной нагрузкой, негативно сказывается на жизнедеятельности организмов, в том числе растений. Сильным токсическим действием обладают ионы тяжелых металлов, в частности меди. Исследование действия ионов меди на живые организмы представляет интерес в связи с тем, что этот элемент – весьма распространенный антропогенный поллютант, так как металлическая медь является одним из самых востребованных конструкционных металлов. Вместе с тем медь – важный микроэлемент, ионы которого участвуют в переносе электронов в ЭТЦ митохондрий и хлоропластов, синтезе пигментов и активации многих ферментов.

Для большинства высших растений граница толерантности к ионам меди в растворе составляет 10^{-6} моль/л. При действии избытка меди снижается уровень биосинтеза хлорофилла, изменяется белковый состав хлоропластов, ингибируется транспорт электронов по фотосинтетической цепи [1]. Опыты с хрустальной травкой выявили прямую зависимость между разными концентрациями ионов меди в среде и скоростью ингибирования процессов накопления биомассы и появления некротических образований на листьях [2].

Алюминий в высоких концентрациях также является токсичным элементом для растений. Он – один из самых распространенных элементов в земной коре. В связи со своей легкостью, высокой тепло- и электропроводностью широко применяется в качестве конструкционного материала.

Несмотря на то что алюминий не относится к тяжелым металлам, его ионы достаточно токсичны для растений, особенно на кислых почвах. Токсичность ионов алюминия во многом связана с его антагонизмом по отношению к кальцию и магнию [3]. Это обусловливает интерес к созданию форм растений, устойчивых к нему, и изучению механизмов его токсичности и детоксикации.

Действие металлов-токсикантов удобно изучать на видах, растущих в местах, подвергающихся их воздействию. Клевер ползучий является одним из широко распространенных видов травянистых растений со смешанной экологической стратегией с выраженной склонностью к рудеральности. Он имеет широкий ареал, произрастает в различных экологических условиях, применятся человеком в качестве кормового и медоносного растения. Используется, как и все бобовые, в качестве седератного удобрения, может быть перспективным в качестве газонного растения и для целей фиторемедиации и рекультивации нарушенных земель [4].

Цель работы – изучение влияния ионов меди и алюминия на процессы прорастания и развития проростков клевера ползучего.

Материалы и методики исследования

Семена клевера проращивали в пластиковых чашках Петри на двух слоях фильтровальной бумаги, на которые наносили 10 мл дистиллированной воды (контроль), или раствор $CuSO_4$, или $Al_2(SO_4)_3$ в концентрации 10, 50, 100, 200, 1 000 и 5 000 мкМ по металлу. В каждую чашку помещали по 100 семян. Чашки выдерживали при температуре 26°С и фотопериоде 16/8 ч. На 3-и сут определяли всхожесть семян, на 5-е – линейные размеры растений. Из пятидневных проростков экстрагировали фотосинтетические пигменты. Для определения содержания пигментов по 30 проростков помещали в пробирку Эппендорфа, добавляли 1 мл 96%-ного этанола, выдерживали в темноте в течение суток при комнатной температуре, после чего экстракт сливали, растительный материал промывали этанолом дважды до обесцвечивания проростков. Этанольные экстракты объединяли, оптическую плотность раствора оценивали при 440, 649 и 665 нм на спектрофотометре Apel UV-303 (Япония). Содержание пигментов определяли по формулам для этанольных экстрактов [5].

Опыт повторяли трижды, для определения пигментов в каждом опыте брали три биологические повторности. За биологическую повторность принимали усредненную пробу из 30 проростков. Для определения линейных размеров проростков выборка составляла 50 растений в каждом из экспериментов.

Статистическую обработку данных проводили в приложениях MS Excel 2003 и StatSoft STATISTICA for Windows 6.0. Статистическую значимость отличий в содержании пигментов определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни ($p<0,05$). Для оценки всхожести использовали угловое преобразование Фишера, линейных размеров – критерий Стьюдента после проверки выборки на нормальность распределения. Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой.

Результаты исследования и обсуждение

В качестве токсикантов использовали растворы сульфата меди и сульфата алюминия в концентрации 10, 50, 100, 200, 1 000 и 5 000 мкМ по металлу. Концентрация 10 мкМ не оказывала заметного влияния на изучаемые ростовые показатели, а 5 000 мкМ была летальной для проростков. Поэтому на рисунках данные представлены только для концентраций в диапазоне от 50 до 1 000 мкМ.

Была определена всхожесть семян при действии ионов меди и алюминия (рис. 1). Этот показатель интегрально характеризует жизнеспособность растений. В отношении всхожести семян ионы меди оказались более токсичны, чем ионы алюминия. Низкая концентрация ионов меди (50 мкМ) не оказывала влияния на всхожесть семян. Ионы меди в концентрации 100 мкМ вызывали 50%-ное ингибирование всхожести семян. Линейной зависимости между дозой токсиканта и всхожестью семян для концентраций ионов 100 и 200 мкМ не показано: повышение дозы токсиканта в 2 раза вызывает уменьшение всхожести на одну треть. Максимальная из использованных концентраций сульфата меди (1000 мкМ) понижает всхожесть семян до 12%.

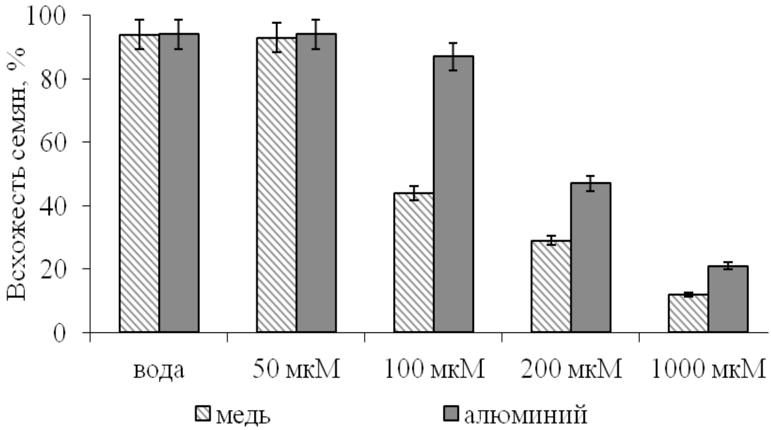


Рис. 1. Всхожесть семян клевера лугового при действии ионов меди и алюминия

Ионы алюминия оказывали существенно меньшее влияние на всхожесть семян: в концентрации 200 мкМ они вызывали 50%-ное ингибирование. Максимальная концентрация ионов алюминия (1 000 мкМ) приводила к снижению всхожести примерно до 25% от всхожести в контроле. Концентрации 50 и 100 мкМ не оказывали влияния на всхожесть семян.

Были определены показатели линейных размеров проростков. Изменение длины корешка при обработке растений ионами тяжелых металлов были выражены сильнее, чем длины гипокотиля (рис. 2). При концентрации 50 мкМ Cu^{2+} наблюдали достоверное уменьшение длины корешка. С ростом концентрации происходило практически линейное уменьшение его длины. Ионы меди в концентрации 200 мкМ вызывали 50%-ное ингибирование роста корешка; при содержании меди в среде 1 000 мкМ корешок достигал четверти своей длины. Изменение длины гипокотиля было значительно менее чувствительно к действию тяжелых металлов – только при содержании меди в среде 200 мкМ происходило незначительное уменьшение длины гипокотиля. Влияние самой высокой из использованных концентраций выражалось в подавлении его роста на 50%.

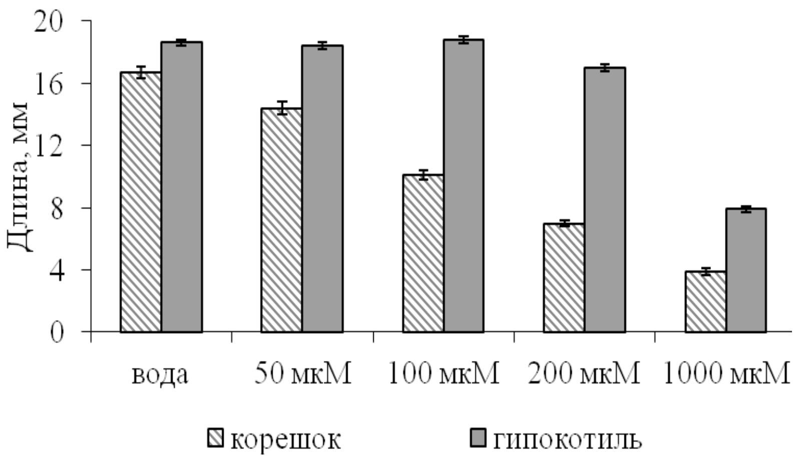


Рис. 2. Влияние ионов меди на длину корешка и гипокотиля клевера ползучего

Алюминий не относится к тяжелым металлам, поэтому мы предположили, что он будет менее токсичен для растений, чем медь. Рис. 3 демонстрирует, что самая высокая из использованных нами концентраций (1 000 мкМ) вызывала достоверное уменьшение роста органов проростков клевера. Длина гипокотиля при этом уменьшалась на треть, а размеры корешка составляли около 50% от контроля.

Известно, что при действии избытка металлов происходит угнетение интенсивности фотосинтеза [6, 7]. В значительной степени это связано с деградацией фотосинтетических пигментов. Изменение содержания суммы хлорофиллов было использовано как маркер стресса (рис. 4). Достоверное снижение содержания суммы хлорофиллов вызывала обработка проростков раствором 100 мкМ ионов меди. 200 мкМ $CuSO_4$ вызывал уменьшение их содержания в два раза, а 1 000 мкМ раствор – в три раза по сравнению с контролем. Алюминий оказался менее токсичен, чем медь, и в отношении деградации хлорофиллов. Концентрация 200 мкМ сульфата алюминия не вызывала деградации пигментов, 1 000 мкМ раствор вызывал снижение содержания пигментов на треть.

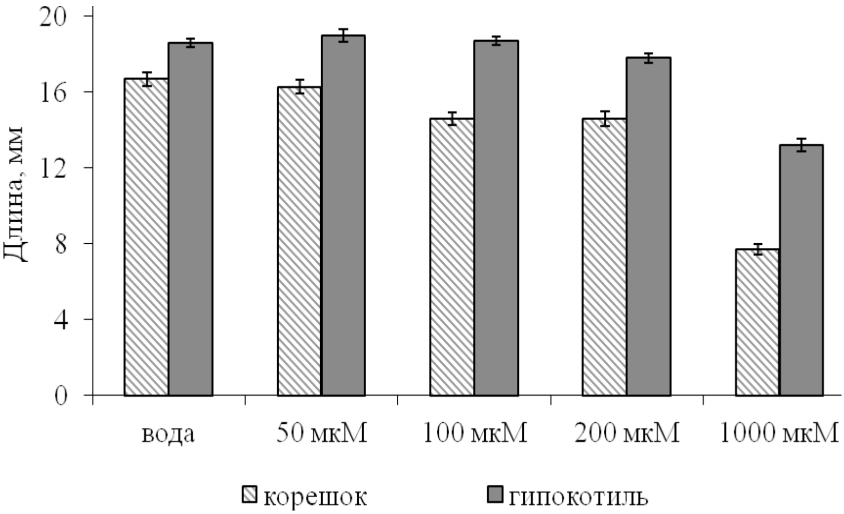


Рис. 3. Влияние ионов алюминия на длину корешка и гипокотиля клевера ползучего

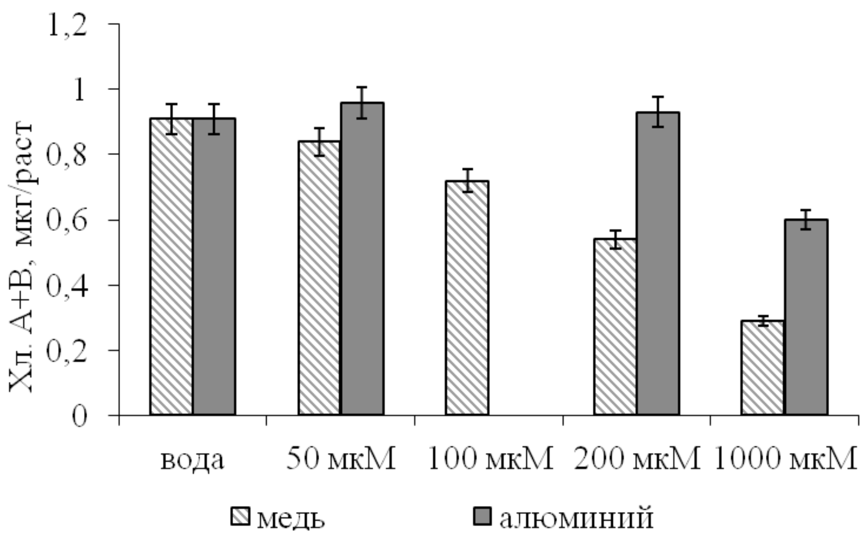


Рис. 4. Содержание суммы хлорофиллов в проростках клевера ползучего
при действии ионов алюминия и меди

Заключение

Определен интервал чувствительности проростков клевера ползучего к действию ионов меди и алюминия. Концентрация 10 мкМ не оказывала существенного влияния на ростовые и физиологические особенности растений, тогда как концентрация 5 000 мкМ оказалась летальной. Воздействие 50 мкМ $CuSO_4$ угнетающе действовало на развитие растений, 200 мкМ вызывало двукратное снижение содержания хлорофиллов в проростках и уменьшение длины корешка, подавляло рост гипокотиля и более чем в два раза уменьшало всхожесть семян.

Таким образом, содержание в среде 200 мкМ меди оказывало сильное, но не летальное токсичное воздействие на растения клевера. Ионы алюминия, в сравнении с медью, оказались менее токсичными для проростков клевера. Самая высокая из использованных концентраций (1 000 мкМ) не вызывала столь заметных изменений, как 100–200 мкМ ионов меди. Результаты исследования могут быть полезны для дальнейшей селекции этой культуры на устойчивость к металлам.

Литература

1. *Полынов В.А.* Действие низких концентраций меди на фотоингибирование фотосистемы II у *Chlorella vulgaris* // Физиология растений. 1993. № 5. С. 754–757.
2. *Холодова В.П., Волков К.С., Кузнецов Вл.В*. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации // Физиология растений. 2005. № 6. С. 848–858.
3. *Kinraide T.B., Parker D.R., Zobel R.W*. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer // Journal of Experimental Botany. 2005. № 417. P. 1853–1865.
4. *Бояркин Д.В., Губанов Л.Н., Федоровский Д.Н.* Обезвреживание осадков городских сточных вод с использованием бобовых культур // Вода и экология: проблемы и решения. 2003. № 4. С. 55–58.
5. *Практикум* по физиологии растений / под ред. В.Б. Иванова. М. : Академия, 2001. 144 с.
6. *Караваев В.А., Баулин А.М., Гордиенко Т.В.* Изменения фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // Физиология растений. 2001. № 1. С. 47–54.
7. *Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А*. Содержание фотосинтетических пигментов, рост и размер клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* при загрязнении среды медью // Физиология растений. 2006. № 3. С. 343–347.

Поступила в редакцию 16.04.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 120–126

doi: 10.17223/19988591/23/11

Alexander A. Ermoshin, Marianna N. Tsybizova, Irina S. Kiselyova

Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

THE INFLUENCE OF COPPER AND ALUMINUM ON THE DEVELOPMENT OF *Trifolium repens* L. SEEDLINGS

The study was supported by the Ministry of education and science of the Russian Federation, projects 14.A18.21.0203, 14.B37.21.2078 and Program for development of Ural Federal University, financial support for young scientists

Environmental degradation caused by anthropogenic impact affects the living activity of organisms, including plants. Especially a lot of stresses are caused by heavy metal ions, p.e. copper. Investigation of the effects of copper ions on living organisms is important because this element is a very common pollutant, as metallic copper is one of the most wide-spread constructing materials. However, copper is an important trace element involved in the transfer of electrons in the ETC in mitochondria and chloroplasts, pigment synthesis and activation of many enzymes. The excess of copper in the environment lowers the level of chlorophyll biosynthesis, changes the protein composition of the chloroplast and inhibits photosynthetic electron transport. Aluminum at high concentrations is also a toxic element for plants. It is one of the most abundant elements in the lithosphere. Due to its light weight, high thermal and electrical conductivity, it is widely used as a structural material. Despite the fact that aluminum is not a heavy metal, it is quite toxic to plants, especially in acidic soils. Aluminum toxicity is significantly caused by its antagonism to calcium and magnesium. All these facts cause the interest to creating forms of plants tolerable to these ions and to the study of the mechanisms of their toxicity and detoxification. The aim of our study was to investigate the influence of copper and aluminum ions on germination and seedling growth in white clover.

Seed germination, root and hypocotyls sizes as well as the content of photosynthetic pigments were studied under the influence of copper sulphate and aluminum sulphate solutions at 50, 100, 200 and 1 000 µM on metal. Seeds were germinated in Petri dishes on filter paper moistened with test solutions. The germination of seeds was tested on the third day after sowing, on the fifth day the linear size of seedlings and concentration of photosynthetic pigment were determined after ethanol extraction spectrophotometrically. It was shown that the most sensitive indicator of copper and aluminum stress is the root growth compared to hypocotyl growth. Copper ions were significantly more toxic to clover sprouts than aluminum ones. 50 µM copper sulfate caused a depression in the development of plants, and aluminum ions at the same concentration had no effect on plant development. 100–200 µM $CuSO_4$ *caused a two-fold reduction in all the studied parameters while the* $Al_2(SO_4)_3$ *at 200 and 1 000 µM reduced them to no more than one third. Maximum concentration of aluminum ions (1 mM) had less effect on plant development than copper ions at concentration of 100 and 200 µM. The obtained data could be used for clover breeding to get more heavy-metal resistant forms.*

Key words: *Trifolium repens L; aluminum ions; copper; plant growth; stress.*

Received April 16, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 127–136

УДК 575:581.144.2:581.133.8:582.683.2
doi: 10.17223/19988591/23/12

С.Г. Хаблак

Луганский национальный аграрный университет (г. Луганск, Украина)

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ПО ГЕНАМ ВОСПРИЯТИЯ И ПЕРЕДАЧИ СВЕТОВОГО СИГНАЛА НА СТРОЕНИЕ КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.

Представлены результаты исследований, отражающие особенности строения корневых волосков у растений мутантных линий rhd3-1, rhd4-1, rhd6-1, shv3-1, bst1-1, phyA, phyB, cpc-1, gl-2, rhl1-1, rhl2-1, rhl3-1, ttg-1, wer-1, cow1-1 с нарушенной передачей светового сигнала. Установлено, что мутации генов восприятия и передачи светового сигнала вызывают изменение морфологии волосков эпиблемы корня. У растений всех анализируемых мутантных линий корни значительно отличаются от исходной расы Col-0 по ряду признаков: форме корневых волосков, их длине, числу и степени разветвления. Длина и количество волосков эпиблемы у растений данных мутантных линий колеблется в широких пределах. Диаметр корневых волосков у растений исследуемых мутантных линий изменяется в меньшей степени, чем их длина и количество. Показано, что свет наряду с регулированием многих процессов роста и развития растений контролирует параметры образования корневых волосков.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.; корневой волосок; свет; ген; мутация; мутантная линия.*

Введение

Важным фактором окружающей среды, регулирующим у растений *A. thaliana* большинство процессов роста и развития, является свет. Он участвует в прорастании семян, удлинении гипокотиля проростков, раскрывании апикальной петельки, развитии семядолей, дифференцировании эпидермиса и устьиц, ориентации в клетке хлоропластов, синтезе антоциана и хлорофилла, а также контролирует рост и развитие корней [1]. В то же время роль света в процессе формирования на корнях корневых волосков у растений до конца еще не определена. Вполне очевидно, что необходимо проведение специальных исследований для выяснения действия света на образование волосков эпиблемы у растений.

К настоящему времени молекулярно-генетические и физиологические исследования мутантных растений у *A. thaliana* позволили изолировать и секвенировать ряд генов, участвующих в восприятии и передаче светового сигнала. К ним относятся гены *RHD3*, *RHD4*, *RHD6*, *SHV3*, *BST1*, *PHYA*, *PHYB*, *CPC1*, *GL2*, *RHL1*, *RHL2*, *RHL3*, *TTG1*, *WER1* и *COW1* (табл. 1).

Восприятие светового информационного сигнала у растений осуществляется с помощью молекул-рецепторов – фоторецепторов [2]. Растения имеют несколько групп фоторецепторов, различающихся по структуре и спектральным свойствам: фоторецепторы синего света и ближнего ультрафиолета (фототропины и криптохромы), фоторецепторы красного света (фитохромы) и др. [3]. Несмотря на интерес к передаче светового сигнала в растениях, процессы от восприятия света фоторецептором до конечного физиологического ответа мало исследованы.

Таблица 1

Общая характеристика генов

Локус	Продукт гена	Ссылка на литературный источник
PHYTOCHROME A (PHYA)	Фоторецептор (фитохром) PHYA	Robson et al., 2010
PHYTOCHROME B (PHYB)	Фоторецептор (фитохром) PHYB	Shen et al., 2009
ROOT HAIR DEFECTIVE3 (RHD3)	α-субъединица гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (G-белки)	Chen et al., 2011
SHAVEN3 (SHV3)	Фермент киназа	Hayashi et al., 2008
BRISTLED1 (BST1)	Минорный фосфолипид внутреннего слоя мембран	Thole et al., 2008
ROOT HAIR DEFECTIVE4 (RHD4)	Минорный фосфолипид внутреннего слоя мембран	Thole et al., 2008
CANOFWORMS1 (COW1)	Минорный фосфолипид внутреннего слоя мембран	Thole et al., 2008
GLABRA 2 (GL2)	Транскрипционный фактор GL2	Ohashi et al., 2003
TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)	Транскрипционный фактор TTG1	Tominaga et al., 2007
WEREWOLF (WER)	Транскрипционный фактор WER1	Tominaga et al., 2007
CAPRICE (CPC)	Транскрипционный фактор CPC	Tominaga et al., 2007
ROOT HAIR DEFECTIVE6 (RHD6)	Транскрипционный фактор RHD6	Heim et al., 2003
ROOTHAIRLESS1 (RHL1)	ДНК-топоизомераза типа II	Kirik et al., 2007
ROOTHAIRLESS2 (RHL2)	ДНК-топоизомераза типа II	Kirik et al., 2007
ROOTHAIRLESS3 (RHL3)	ДНК-топоизомераза типа II	Kirik et al., 2007

Наиболее изученными являются фоторецепторы красного и дальнего красного света – фитохромы, сложный белок, простетической группой которого служит разомкнутый тетрапиррол. Он обнаружен практически во всем царстве растений [4]. У *A. thaliana* имеются пять фитохромов: PHYA, PHYB, PHYC, PHYD и PHYE, представляющих собой цитозольные белки, включающие в себя N-концевой сенсорный светочувствительный домен, содержащий тетрапиррольный хромофор, и расположенные в С-концевой части молекулы два PAS-домена и гистидинкиназный домен [5]. Гены *PHYA* и *PHYB* кодируют фитохромы PHYA и PHYB, которые являются мажорными фоторецепторами красного/дальнего красного света. PhyA воспринимает свет низкой интенсивности, PhyB – высокой [6].

У растений и животных в путь передачи светового сигнала от рецепторов на внутриклеточные эффекторные системы вовлечены небольшие ГТФ-связывающие белки. Эти белки являются объектом интенсивного изучения в связи с их участием во многих важных генетических и физиологических процессах [7]. Ген *RHD3* кодирует одну из α-субъединиц ГТФ-связывающих белков, являющихся универсальными посредниками при передаче световых сигналов от рецепторов к эффекторным белкам, вызывающим конечный клеточный ответ [8].

В клетках позвоночных животных, человека и растений интегральную роль в передаче сигналов в геном выполняют также каскады протеинкиназ [9]. Ген *SHV3* кодирует киназу (фосфотрансферазу) – фермент, катализирующий перенос фосфатной группы от молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) на различные субстраты [10].

Гены *BST1*, *RHD4* и *COW1* кодируют минорные фосфолипиды внутреннего слоя мембран эукариотических клеток, принадлежащие к ферментам класса гидролаз. Продукты этих генов являются важными компонентами внутриклеточных сигнальных путей [11].

В последнее время в растениях определены практически все типы транскрипционных факторов, которые функционируют у животных и дрожжей. У арабидопсиса установлены более 1 800 белков-регуляторов транскрипции, которые обычно классифицируют по строению ДНК-связывающих доменов [12].

Гены *WER1*, *CPC1* и *TTG1* кодируют белки-регуляторы, принадлежащие к самому многочисленному типу транскрипционных факторов (ТФ) растений MYB-белкам [13]. Это семейство ТФ включает около 200 белков, контролирующих такие процессы, как развитие корня, образование листа, формирование трихом, клеточный цикл, циркадные ритмы, передачу светового сигнала [14]. Ген *WER1* в основном экспрессируется в поверхностных клетках эпидермиса корня. В отличие от генов *TTG1* и *GL2*, ген *WER1* не влияет на развитие трихом, оболочку семян и их антоциановую окраску [15].

Ген *GL2* контролирует транскрипционный фактор, содержащий ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность из 60 аминокислотных остатков, которую называют гомеодоменом [16]. У арабидопсиса выявлено около 90 белков этого типа. К ним относятся, в частности, HOMEBOX-2, ATHB-8, ATHB-13, BEL1 (BELL1), KNAT1, LD (LUMINIDEPEN – DEN), PHB (PHABULOSA), PHV (PHAVOLU – TA), STM (SHOOT MERISTEMLESS) [17].

Ген *RHD6* контролирует фактор транскрипции с основным доменом типа спираль – петля – спираль. ДНК-связывающий участок гена состоит из 9–11 положительно заряженных аминокислот, что обеспечивает распознавание специфической нуклеотидной последовательности, называемой E-боксом, в то время как HLH-домен обеспечивает возможность для гомо- и гетеродимеризации белка и взаимодействие с ДНК [18]. В это семейство ТФ входят около 140 белков, включая такие белки арабидопсиса, как GL3 (GLABRA3), SPT (SPATULA) и TT8 (TRANSPARENT TESTA8). Белки bHLH участвуют в регуляции развития корней, трихом и плодолистиков, в передаче светового сигнала, а также в формировании устьиц [19].

Практически любой процесс, связанный с передачей или реализацией наследственной информации, приводит к появлению положительной и отрицательной сверхспирализации ДНК, образованию «закрученных» молекул – катенанов и узлов. Все эти топологические проблемы, появляющиеся в процессах репликации, транскрипции и рекомбинации, успешно решаются особыми ферментами – ДНК-топоизомеразами. Все ДНК-топоизомеразы разделяют на два типа: I и II [20]. Гены *RHL1*, *RHL2* и *RHL3* кодируют ДНК-топоизомеразы типа II, являющиеся ключевыми ферментами, которые изменяют и регулируют топологическое состояние ДНК [21]. ДНК-топоизомеразы II необходимы для разрешения сложных топологических проблем, возникающих при изменении структуры хроматина в процессах репликации ДНК, транскрипции генов и сегрегации хромосом в митозе и мейозе. Они принимают участие практически во всех жизненно важных процессах клетки и обнаружены у всех про- и эукариот, а также некоторых вирусов [22].

Цель исследования – изучение влияния мутантных аллелей *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1*, *cow1-1* генов *RHD3*, *RHD4*, *RHD6*, *SHV3*, *BST1*, *PHYA*, *PHYB*, *CPC1*, *GL2*, *RHL1*, *RHL2*, *RHL3*, *TTG1*, *WER1*, *COW1* на строение корневых волосков *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследований послужили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia (Col-0) и мутантных линий *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1*, *cow1-1*. Семена мутантных линий были получены из Ноттингемского центра *Arabidopsis* (Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), UK).

Растения выращивали в асептической пробирочной культуре на агаризованной питательной среде Кнопа, обогащенной микроэлементами [23]. Питательную смесь разливали в химические пробирки размером 14×120 мм и закрывали плотными ватными пробками.

Семена к посеву готовили путем яровизации в течение 5 сут при температуре 4–6°С и последующего односуточного проращивания при комнатной температуре. Пробирки для предохранения от нагревания и попадания света на корни растений обертывали двумя слоями бумаги. Растения культивировали при температуре 18–20°С, освещенность круглосуточная в пределах 4 000–7 000 Лк.

При проведении наблюдений за растениями руководствовались общепринятыми методиками вегетационных и сравнительно-морфологических исследований [24]. Учет количества корневых волосков и их длину в корневых системах у растений экотипа Col-0 и исследуемых мутантных линий проводили в фазе второй пары настоящих листьев под микроскопом типа МБС-9 («Модуль Плюс», Украина). Объем выборки у расы Col-0 и мутантных линий, нарушающих сигнализацию светового сигнала, составлял по 30 растений. Математическую обработку результатов проводили по методам, описанным Б.А. Доспеховым [24] и Г.Ф. Лакиным [25].

Результаты исследования и обсуждение

У *Arabidopsis thaliana* кончик корня снаружи покрыт однослойной эпиблемой (кожицей). Поверх кожицы корня из клеток эпиблемы вырастают корневые волоски трубчатой формы. Они являются настоящими выростами внешних стенок поверхностных клеток корня, которые не ограничиваются от них перегородками. Корневые волоски поглощают из почвы воду с растворенными в ней минеральными веществами.

Волоски эпиблемы появляются в поглощающей зоне в виде небольших выростов клеток кожицы корня. В процессе формирования волоска эпиблемы внешняя стенка клетки трихобласта выпячивается и образовывает его кончик. По мере его роста растяжением происходит удлинение корневого волоска. Длина полностью закончившего рост выроста поверхностной клетки корня достигает 997,8 мкм.

У растений мутантных линий *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1*, *cow1-1* корни в значительной степени отличались от исходной расы Col-0 по ряду признаков: форме волосков эпиблемы, их длине, числу и степени разветвления. Длина выростов клеток кожицы корня у растений данных мутантных линий колебалась в большом интервале (от 42,4 до 1 497,7 мкм) (табл. 2).

Короткие волоски эпиблемы были характерны для растений линии *shv3-1*. Крупные корневые волоски имели растения мутантных линий *rhd6-1*, *cpc-1*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *rhd3-1*, *rhd4-1*, *bst1-1* и *cow1-1*. Самые длинные волоски эпиблемы наблюдались у мутантных линий *phyA* и *phyB*. Растения трех линий (*gl-2*, *ttg-1* и *wer-1*) имели величину выростов поверхностных клеток корня на уровне дикого типа Col-0. Наибольшей длиной корневых волосков характеризовалась линия *phyA*, а наименьшей – линия *shv3-1*.

Количество волосков эпиблемы у растений исследуемых мутантных линий также варьировало в широких пределах (от 1,1 до 100,3 шт./мм^2). У мутантных линий *gl-2*, *ttg-1*, *wer-1*, *phyA* и *phyB* на 1 мм^2 зоны всасывания приходилось большее число корневых волосков, чем у контроля (Col-0). Исключение составляли линии *rhd6-1*, *cpc-1*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *shv3-1*, *rhd3-1*, *bst1-1* и *cow1-1*, у которых количество выростов клеток кожицы корня на 1 мм^2 поглощающей зоны было меньше по сравнению с диким типом Col-0. Максимальное число волосков эпиблемы на 1 мм^2 зоны всасывания было характерно для мутантной линии *wer-1*, тогда как минимальное – для мутантной линии *cpc-1*.

Таблица 2

Средние значения биометрических параметров (длина, толщина и количество) корневых волосков у экотипа Col-0 и растений мутантных линий, нарушающих их формирование, в фазу второй пары настоящих листьев (на 10-й день после прорастания семян)

Название линии	Корневые волоски			
	Длина, мкм	Диаметр в основании, мкм	Диаметр в средней части, мкм	Количество, шт/мм^2
WT (Col-0)	997,8	21,3	9,8	51,4
rhd6-1	432,9	17,3	9,1	1,6
cpc-1	641,0	18,8	8,4	1,1
rhl1-1	559,6	19,6	8,8	1,8
rhl2-1	632,9	20,9	9,5	1,3
rhl3-1	499,2	17,2	7,8	1,1
shv3-1	42,4	21,7	10,2	41,1
rhd3-1	628,4	10,4	9,6	34,1
rhd4-1	747,3	21,8	6,4	40,8
bst1-1	600,6	21,7	10,0	36,6
cow1-1	738,4	22,5	15,8	34,4
gl-2	1000,3	21,8	9,9	80,4
ttg-1	1000,3	21,2	9,5	84,8
wer-1	1000,7	21,3	9,8	100,3
phyA	1497,7	21,5	9,8	91,5
phyB	1491,2	21,7	9,7	84,1
$НСР_{05}$, мкм	81,2	4,2	2,1	2,5

Диаметр корневых волосков у растений изучаемых мутантных линий изменялся в меньшей степени по сравнению с их длиной и количеством. Исследования показали, что только у трех линий (*rhd3-1*, *rhd4-1* и *cow1-1*) было обнаружено изменение параметров поперечника волосков эпиблемы по сравнению с исходной расой Col-0.

Важно отметить, что мутантные линии *rhd3-1* и *rhd4-1* отличались от дикого типа Col-0 и формой выростов клеток кожицы корня. У растений линии *rhd3-1* на корнях образовывались волнистые волоски эпиблемы, а у растений линии *rhd4-1* – выпуклые с перетяжками вдоль длины корневые волоски. Кроме того, обращает на себя внимание то, что для мутантных линий *bst1-1* и *cow1-1* были характерны разветвленные волоски эпиблемы.

Таким образом, полученные результаты указывают на существование различий у мутантных линий *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1* и *cow1-1* по длине, количеству, форме и степени ветвления корневых волосков. Это позволило разделить данные мутации по характеру влияния на строение волосков эпиблемы на две группы: мутации, подавляющие образование выростов клеток кожицы корня, и мутации, вызывающие формирование корневых волосков.

К первой группе можно отнести мутации, подавляющие развитие волосков эпиблемы. В этих случаях мутантные растения характеризовались уменьшенным по отношению к экотипу Col-O количеством и длиной выростов клеток кожицы корня. Такими мутациями являлись *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *cpc-1*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1* и *cow1-1*.

Мутации *rhd3-1*, *rhd4-1*, *bst1-1* и *cow1-1* в генах *RHD3*, *RHD4*, *BST1* и *COW1* вызывали у растений нарушения компонентов внутриклеточных сигнальных путей; мутации *cpc-1* и *rhd6-1* соответствующих генов – в белках-регуляторах транскрипции, ответственных за экспрессию генов, контролирующих образование из клеток поверхностной ткани корня корневых волосков, тогда как мутации *rhl1-1*, *rhl2-1* и *rhl3-1* генов *RHL1*, *RHL2* и *RHL3* – в ДНК-топоизомеразах, регулирующих топологическое состояние ДНК. Это вызывало в корневой системе снижение формирования волосков эпиблемы.

Во вторую группу входили мутации, которые вызывали образование выростов клеток кожицы корня. К ним относились мутанты *Arabidopsis gl-2*, *ttg-1*, *wer-1*, *phyA* и *phyB*. В таких случаях у растений под влиянием мутации развивались большие, по сравнению с исходной расой Col-O, число или длина корневых волосков.

Мутации *phyA* и *phyB* вызывали у растений нарушения в фоторецепторах, воспринимающих и передающих световой сигнал к транскрипционным факторам, а мутации *gl-2*, *ttg-1* и *wer-1* в генах *GL2*, *TTG1* и *WER1* – в белках-регуляторах транскрипции, блокирующих транскрипцию генов, участвующих в процессе формирования корневых волосков. В результате в корневой системе повышалось образование волосков эпиблемы.

При изучении строения корневых волосков у растений мутантных линий, характеризующихся нарушением световых сигнальных путей, нами был сделан вывод о том, что свет наравне с регулированием многих процессов роста и развития растений контролирует параметры образования волосков эпиблемы. Эти результаты вполне согласуются с имеющимися литературными данными о том, что свет является внешним фактором, регулирующим рост и развитие корня [1–6]. В нормальных условиях прямое действие света на корни не проявляется, однако их формирование ослабевает при снижении освещенности надземных, фотосинтетически активных частей как однолетних полевых культур, так и многолетних травостоев [26].

Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

У мутантных линий *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1* и *cow1-1* корневые системы значительно отличались от исходной расы Col-O по количеству корневых волосков и их длине.

Мутации *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1*, *cow1-1* генов *RHD3*, *RHD4*, *RHD6*, *SHV3*, *BST1*, *PHYA*, *PHYB*, *CPC1*, *GL2*, *RHL1*, *RHL2*, *RHL3*, *TTG1*, *WER1*, *COW1* по-разному отражались на количестве и длине волосков эпиблемы. Мутации *gl-2*, *ttg-1*, *wer-1*, *phyA* и *phyB* обусловливали стимуляцию образования выростов клеток кожицы корня, а мутации *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *cpc-1*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1* и *cow1-1* подавляли формирование корневых волосков.

Свет наравне с регулированием многих процессов роста и развития растений контролирует параметры образования волосков эпиблемы.

Литература

1. *Shin D.H., Cho M.H, Kim T.L.* A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285(42). P. 32151–32159.
2. *Toledo-Ortiz G., Kiryu Y., Kobayashi J., Oka Y.* Subcellular sites of the signal transduction and degradation of phytochrome A // Plant Cell. Physiol. 2010. Vol. 51(10). P. 1648–1660.
3. *Qin Y., Guo M., Li X.* Stress responsive gene *CIPK14* is involved in phytochrome A-mediated far-red light inhibition of greening in *Arabidopsis* // Sci China Life Sci. 2010. Vol. 53(11). P. 1307–1314.
4. *Robson F., Okamoto H., Patrick E.* Jasmonate and phytochrome A signaling in *Arabidopsis* wound and shade responses are integrated through JAZ1 stability // Plant Cell. 2010. Vol. 22(4). P. 1143–1160.
5. *Shen Y., Zhou Z., Feng S. et al.* Phytochrome A mediates rapid red light-induced phosphorylation of *Arabidopsis* FAR-RED *ELONGATED HYPOCOTYL1* in a low fluence response // Plant Cell. 2009. Vol. 21, № 2. P. 494–506.
6. *Saijo Y., Zhu D., Li J. et al. Arabidopsis* COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling // Mol Cell. 2008. Vol. 31, № 4. P. 607–613.
7. *Wei Q., Zhou W., Hu G. et al.* Heterotrimeric G-protein is involved in phytochrome A-mediated cell death of *Arabidopsis* hypocotyls // Cell Res. 2008. Vol. 18, № 2. P. 949–960.
8. *Chen J., Stefano G., Brandizzi F., Zheng H. Arabidopsis RHD3* mediates the generation of the tubular ER network and is required for Golgi distribution and motility in plant cells // J. Cell. Sci. 2011. Vol. 124(13). P. 2241–2252.
9. *Шемарова И.В.* Роль протеинкиназных каскадов в передаче стрессовых сигналов в клетках низших эукариот // Цитология. 2006. Т. 48, № 2. С. 95–113.
10. *Hayashi S., Ishii T., Matsunaga T. et al.* The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins *SHV3* and its homologs play important roles in cell wall organization // Plant Cell. Physiol. 2008. Vol. 49, № 1. P. 1522–1535.

11. *Thole J.M., Vermeer J.E., Zhang Y.* Root hair defective 4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. 2008. Vol. 20(2). P. 381–395.
12. *Медведев С.С., Шарова Е.И.* Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор) // Journal of Siberian Federal University Biology. 2010. Vol. 2, № 3. P. 109–129.
13. *Tominaga R., Iwata M., Okada K., Wada T.* Functional analysis of the epidermal-specific MYB genes *CAPRICE* and *WEREWOLF* in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2007. Vol. 19, № 1. P. 2264–2277.
14. *Kang Y.H., Kirik V., Hulskamp M. et al.* The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis // Plant Cell. 2009. Vol. 21, № 1. P. 1080–1094.
15. *Seo E., Yu E., Ryu K.H. et al. WEREWOLF*, a regulator of root hair pattern formation, controls flowering time through the regulation of FT mRNA stability // Plant Physiol. 2011. Vol. 156, № 2. P. 1867–1877.
16. *Ohashi Y., Oka A., Rodrigues-Pousada R.* Modulation of phospholipid signaling by *GLABRA2* in root-hair pattern formation // Science. 2003. Vol. 300(5624). P. 1427–1430.
17. *Ariel F.D., Manavella P.A., Carlos A. et al.* The true story of the HD-Zip family // Trends in Plant Science. 2007. Vol. 12, № 1. P. 419–426.
18. *Heim M.A., Jakoby M., Werber M. et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein str ucture and functional diversity // Molecular Biology and Evolution. 2003. Vol. 20, № 1. P. 735–747.
19. *Serna L.* bHLH protein know when to make a stoma // Trends in Plant Science. 2007. Vol. 12, № 3. P. 483–485.
20. *Shaw P., Dolan L.* Chromatin and *Arabidopsis* root development // Semin. Cell. Dev. Biol. 2008. Vol. 19, № 1. P. 580–585.
21. *Kirik V., Schrader A., Uhrig J.F., Hulskamp M.* MIDGET unravels functions of the *Arabidopsis* topoisomerase VI complex in DNA endoreduplication, chromatin condensation, and transcriptional silencing // Plant Cell. 2007. Vol. 19(10). P. 3100–3110.
22. *Sugimoto-Shirasu K., Roberts G.R. RHL1* is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. Vol. 102(51). P. 18736–41.
23. *Рубин Б.А., Чернавина И.А., Потапов Н.Г.* Большой практикум по физиологии растений. М. : Высш. шк., 1978. 408 с.
24. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. М. : Агропромиздат, 1985. 351 с.
25. *Лакин Г.Ф.* Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.
26. *Saijo Y., Zhu D., Li J., Rubio V. et al. Arabidopsis* COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling // Mol. Cell. 2008. Vol. 31, № 4. P. 607–613.

Поступила в редакцию 11.05.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 127–136

doi: 10.17223/19988591/23/12

Sergey G. Hablak

Lugansk National Agrarian University, Lugansk, Ukraine

THE EFFECT OF MUTATIONS IN GENES PERCEPTION AND TRANSMISSION FLARE ON STRUCTURE OF ROOT HAIRS OF *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.

An important environmental factor that regulates most of the processes of the growth and development of the plants A. thaliana is light. At the same time, the role of light during the formation of roots in the root hairs of plants are still not fully determined. To date, molecular genetic and physiological studies of mutant plants of A. thaliana allowed isolation and sequencing of a number of genes involved in the perception and transmission of the light signal. These include genes RHD3, RHD4, RHD6, SHV3, BST1, PHYA, PHYB, SRS1, GL2, RHL1, RHL2, RHL3, TTG1, WER1 and COW1 The aim of this work was to study the effect of mutant alleles rhd3-1, rhd4-1, rhd6 -1, shv3-1, bst1-1 phyA, phyB, cpc-1, gl-2, rhl1-1, rhl2-1, rhl3-1, ttg-1, wer-1, cow1-1 gene RHD3, RHD4 , RHD6, SHV3, BST1, PHYA, PHYB, SRS1, GL2, RHL1, RHL2, RHL3, TTG1, WER1, COW1 on the structure of root hairs. Plants were grown in aseptic test-tube culture on agar medium Knop, rich in trace elements. When conducting observations of the plants, conventional techniques of vegetation and comparative morphological studies were taken into consideration. The studies found that mutations in the genes of the perception and transmission of the light signal caused changing the morphology of the roots of the hair epiblemy. In plants of all the analyzed mutant lines, roots are very different from the original race Col-0 according to a number of different features: the form of root hairs, their length, the number and degree of branching. The length and number of hairs in plant epiblemy of these mutant strains vary widely. The diameter of the root hairs of plants of the studied mutant lines change less than their length and quantity. Three lines (rhd3-1, rhd4-1 and cow1-1) revealed a change in the parameters of the diameter of the hair epiblemy. Mutant lines rhd3-1 and rhd4-1 differ from wild-type Col-0 cells form root skin outgrowths. The plants of line rhd3-1 form wavy hair epiblemy on the roots, and the plants of line rhd4-1 – bulging with constrictions along the length of root hairs. Mutant strains bst1-1 and cow1-1 are characterized by branched hairs epiblemy. It is shown that the light controls the parameters of the formation of root hairs together with the regulation of many processes of plant growth and development.

Key words: *Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.; root hairs; light; gene; mutation; mutant line.*

Received May 11, 2013

Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 3 (23). С. 137–151

ЭКОЛОГИЯ

УДК 574.45
doi: 10.17223/19988591/23/13

Е.А. Головацкая, Л.Г. Никонова (Абзалимова)

Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН (г. Томск)

РАЗЛОЖЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ В ТОРФЯНЫХ ПОЧВАХ ОЛИГОТРОФНЫХ БОЛОТ

Приведены экспериментальные данные по разложению растений-торфообразователей в торфяных почвах олиготрофного типа. Дана количественная оценка скорости разложения основных видов-торфообразователей, выноса углерода, азота и зольных элементов из растительных остатков в процессе разложения. Выявлено, что наиболее интенсивные процессы разложения протекают на начальном этапе разложения, затем скорость разложения снижается. Наиболее устойчивы к разложению сфагновые мхи, за исключением Sph. angustifolium. Наименее устойчивы – травянистые растения Menyanthes trifoliata, Rubus chamaemorus. Кустарнички характеризуются средней скоростью разложения. Динамика выноса углерода из растительных остатков растений-торфообразователей повторяет динамику потери массы органического вещества при деструкции. В процессе разложения растительных остатков в течение первого года наблюдается иммобилизация азота во многих видах исследуемых растений. Показано, что количество запасаемого в процессе фотосинтеза углерода значительно превышает потери углерода при разложении растительных остатков как для отдельных видов растений, так и для фитоценоза в целом.

Ключевые слова: *болотные фитоценозы; растения-торфообразователи; скорость деструкции; потери углерода; продукция.*

Введение

Изучение процессов трансформации органического вещества приобретает большое значение в связи с изменением климата и возрастанием уровня антропогенного воздействия на природные экосистемы. Знание количественных характеристик круговорота элементов в болотных экосистемах необходимо для изучения механизмов их устойчивости и продуктивности, обоснования прогноза эволюции болот в связи с изменением экологической обстановки. В болотных экосистемах происходит постоянный обмен минеральными элементами между растениями и торфяной почвой. Темпы разложения растительных остатков и высвобождения из них элементов питания зависят от индивидуальных особенностей химического состава растений и условий, в которых эти процессы протекают. Болотные экосистемы характеризуются более низкими, по сравнению с продуктивностью, скоростями трансформации органического вещества растений, за счет чего и происходит постоянное накопление органического вещества в виде торфа [1].

Цель работы – оценка скорости торфонакопления и количества углерода, запасаемого в виде торфа в результате разложения растительных остатков на олиготрофных болотах южно-таежной подзоны Западной Сибири.

Материалы и методики исследования

Исследования проводились на территории восточной части Обь-Иртышского междуречья, в пределах восточной окраины Васюганского плато – ключевой участок (КУ) «Бакчарский» (Бакчарский район Томской области). Среднегодовая температура воздуха 0,51°С, годовая сумма осадков 515 мм (по данным метеостанции «Бакчар»). А также на территории Обь-Томского междуречья – ключевой участок «Томский» (Томский район Томской области). По данным метеостанции «Томск» среднегодовая температура воздуха 1,2°С, годовая сумма осадков 604 мм. Расстояние между ключевыми участками составляет 180 км. Бакчарское болото КУ «Бакчарский» находится в нативном состоянии, т.е. не подвержено антропогенному воздействию. Болото Кирсановское на территории КУ «Томский» также не испытывает прямого антропогенного воздействия, однако находится в зоне действия Томского водозабора [2]. Характеристика растительного покрова, мощность торфяной залежи и среднемноголетние уровни болотных вод (УБВ) исследуемых фитоценозов представлены в табл. 1, подробное описание исследуемых сообществ приведено в [3]. Измерение УБВ проводилось непосредственно в каждом исследуемом фитоценозе в соответствии с [4]. Скорость разложения растительных остатков определялась для 3 видов сфагновых мхов, 5 видов кустарничков, 5 видов трав. Для определения интенсивности деструкции растительных остатков применялся метод закладки растительности в торф [5]. В августе–сентябре 2008 г. на болоте были собраны растения, характерные для сосново-кустарничково-сфагновых фитоценозов и осоково-сфагновой топи (всего 13 видов, табл. 2). У вечнозеленых кустарничков для эксперимента брали прошлогодние листья, у трав – ветошь, у сфагновых мхов использовали очес. Исследуемые растения разделяются на 3 группы по видовому и химическому составу (табл. 2). Растительный материал был высушен в лабораторных условиях и развешен в нейлоновые мешочки (масса навески 3–6 г), которые закладывали в торфяную залежь на глубину 10 см от поверхности в конце вегетационного периода (сентябрь 2008 г.). Повторность опыта – 3-кратная. Образцы извлекались в сентябре 2009, 2010 гг. (через 1 и 2 года). Растительные образцы были заложены в торфяные залежи исследуемых болотных экосистем: сосново-кустарничково-сфагновых фитоценозов – высокого и низкого ряма (ВР и НР) и осоково-сфагновой топи (ОТ) Бакчарского болота; ряме и осоковой топи Кирсановского болота (КР и КТ) (табл. 2). Верхние горизонты торфяных залежей Бакчарского болота сложены сфагновыми торфами с низкой степенью разложения (0–10%) – магелланикум-, фускум- и ангустифолиум-торфом на высоком, низком ряме и осоково-сфагновой топи соответственно. Торф верхних горизонтов Кирсановского болота представлен на ряме ангустифолиум-торфом (степень разложения 15–20%), на осоковой топи – осоково-сфагновым торфом (степень разложения 20%).

Таблица 1

Растительный покров исследуемых болотных фитоценозов

Деревья	Кустарнички	Травы	Мхи
Бакчарское болото			
Сосново-кустарничково-сфагновый фитоценоз – высокий рям (ВР) Мощность торфяной залежи 100 см, (УБВ (см) средний: –19, макс.: +3, мин.: –44)			
Pinus silvestris L. Pinus sibirica Mayr. *Betula pubescens Ehrh.* (90%)	*Ledum palustre L.* *Chamaedaphne calyculata (L.) Moench* *Vaccinium vitis-idea L.* *Vaccinium oxycoccus L.* (90%)	*Carex globularis L.* *Eriophorum vaginatum L.* *Rubus chamaemorus L.* (15%)	*Sphagnum angustifolium (Russ. Ex Russ.) C. Jens* (96%)
Сосново-кустарничково-сфагновый фитоценоз – низкий рям (НР) Мощность торфяной залежи 200 см, (УБВ (см) средний: – 5, макс.: +0,5, мин.: –13)			
P. silvestris f. Litwinowii (30%)	*L. palustre* *C. calyculata* *Andromeda polifolia L.* *Vaccinium uliginosum L.* (65%)	*E. vaginatum* *R. chamaemorus* *Drosera rotundifolia L.* (5%)	*Sphagnum fuscum (Schmp.) Klinggr.* *S. angustifolium* *Sphagnum magellanicum Brid.* (95%)
Открытая осоково-сфагновая топь (ОТ) Мощность торфяной залежи 300 см, (УБВ (см) средний: –5, макс.: +0,2, мин.: –10)			
–	*V. oxycoccus* *C. calyculata* *A. polifolia* (20%)	*E. vaginatum* *Carex rostrata Stokes.* *Carex limosa L.* *Scheuchzeria palustris L.* (50%)	*S. fuscum* *S. angustifolium* *S. magellanicum* (100%)
Кирсановское болото			
Сосново-кустарничково-сфагновый фитоценоз – рям (КР) Мощность торфяной залежи 310 см, (УБВ (см) средний: –39, макс.: –38, мин.: –40)			
P. silvestris (90%)	*L. palustre* *C. calyculata* *V. vitis-idea* *V. oxycoccus* (90%)	*E. vaginatum* *R. chamaemorus* (15%)	*S. fuscum* *S. angustifolium* *S. magellanicum* (96%)
Осоковая топь (КТ) Мощность торфяной залежи 110 см, (УБВ (см) средний: –8, макс.: –5, мин.: –11)			
–	*A. polifolia* (30%)	*E. vaginatum* *C. rostrata* *C. limosa* *S. palustris* *Menyanthes trifoliate* (50%)	*Sphagnum fallax Klinggr.* (30%)

В исходных образцах и после эксперимента по разложению определяли убыль массы растительного вещества весовым методом, а также изменение зольности, содержания углерода и азота по общепринятым методикам [6, 7]. Скорость разложения рассчитывалась как процент потери массы через 12 и 24 месяцев по следующей формуле:

$$\text{Скорость разложения (\%)} = ((W_0 – W_1) / W_0) \times 100,$$

где W_0 – вес исходного образца; W_1 – вес образца через 1 и 2 года.

В каждом образце до и после разложения определяли содержание углерода, азота, зольность и рассчитывали потери углерода, азота и зольных элементов как процент от исходного содержания:

$$\text{Потери элемента (\%)} = ((X_0W_0 – X_1W_1)/X_0W_0) \times 100,$$

где X_0 – исходное содержание элемента, мг/г; X_1 – содержание элемента через 1 и 2 года.

Таблица 2

Виды исследуемых растений-торфообразователей, место закладки эксперимента, исходный химический состав растительных образцов

Вид растения	Место закладки	*C*, %	*N*, %	*C*/*N*	*A*, %
Сфагновые мхи					
S. angustifolium	ВР, КР	39,75	1,04	38	2,25
S. magellanicum	ОТ, КР	40,60	0,58	70	2,95
S. fuscum	НР, КР	39,33	0,46	86	1,09
Кустарнички					
A. polifolia	НР, КТ	49,47	1,15	43	2,62
L. palustre	НР, КР	50,33	1,27	40	2,61
V. vitis-idea	ВР, КР	49,06	1,04	47	2,40
C. calyculata	НР, КР	50,33	1,38	37	2,53
V. oxycoccus	ОТ	47,37	1,04	46	3,25
Травы					
M. trifoliata	ОТ, КТ	43,14	2,30	19	6,51
R. chamaemorus	НР, КР	41,87	1,38	30	4,01
C. rostrata	ОТ, КТ	41,87	1,15	36	3,63
E. vaginatum	ОТ, КТ	45,25	1,04	44	2,29
S. palustris	ОТ, КТ	43,98	1,15	38	4,32

Примечание. C – содержание углерода; *N* – содержание азота; *C*/*N* – отношение углерода к азоту; *A* – зольность.

Результаты исследования и обсуждение

В среднем сфагновые мхи (рис. 1) характеризуются низкой скоростью разложения (за исключением *S. angustifolium* в торфяной залежи ряма Кирсановского болота – 60%), потери массы за два года составляют от 6 (*S. fuscum*, Бакчарское болото) до 32% (*S. angustifolium*, Бакчарское болото). Для всех исследуемых видов сфагновых мхов характерно менее интенсивное разложение в более влажных и прохладных условиях Бакчарского болота. Для всех исследуемых видов максимальная скорость разложения наблюдалась в первый год эксперимента, кроме *S. fuscum* на Кирсановском болоте, для которого максимальная интенсивность разложения достигается во второй год эксперимента.

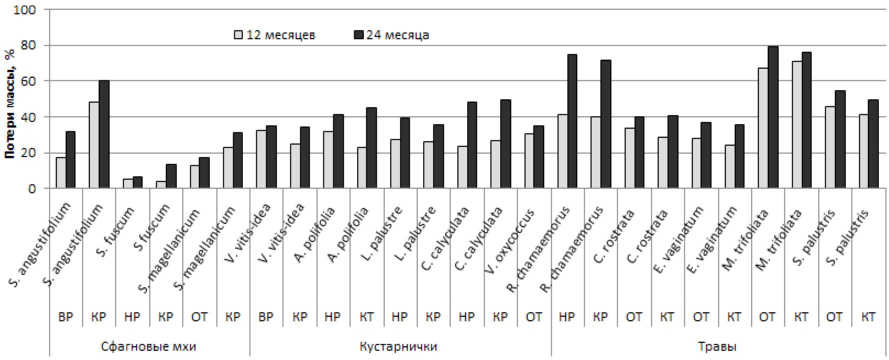


Рис. 1. Потери массы при разложении растений-торфообразователей

Средняя скорость разложения листьев кустарничков – 43% за два года. Одни и те же виды кустарничков в разных условиях имеют близкие величины скорости разложения и сходную динамику в течение двух лет (рис. 1). Максимальные потери массы были получены для листьев *C. calyculata* (48 и 49% на Бакчарском и Кирсановском болотах соответственно), минимальные – для *V. vitis-idea* (35 и 34% на Бакчарском и Кирсановском болотах соответственно). Различия по месту закладки образцов (Бакчарское или Кирсановское болото) слабо выражены, но на первом этапе разложение интенсивнее идет в условиях более влажного Бакчарского болота.

Потери массы трав при разложении характеризуются сходной динамикой для одинаковых видов, при этом более интенсивно теряется органическое вещество в условиях Бакчарского болота по сравнению с Кирсановским. Максимальные потери за два года получены для *M. trifoliata* (76–79%) и *R. chamaemorus* (71–74%), минимальные – для *E. vaginatum* (35–36%) (см. рис. 1).

В исследуемых образцах определялись потери углерода, азота, зольных элементов (табл. 3). Потери углерода в сфагновых мхах составляют от 3% от исходного содержания (*S. fuscum*, Бакчарское болото) до 27% (*S. magellanicum* Кирсановского болота и *S. angustifolium* Бакчарского болота). Для *S. angustifolium* на Кирсановском болоте получены максимальные потери углерода (56%).

Потери углерода при разложении исследуемых кустарничков в течение одного года составляют в среднем 27%, изменяясь от 35% (*A. polifolia* на НР Бакчарского болота) до 22% (*C. calyculata* на Бакчарском болоте) (табл. 3). Почти для всех кустарничков характерны быстрые потери углерода в течение первых 12 месяцев и снижение потерь почти до нуля к концу второго года. Для *C. calyculata* на обоих участках характерны равномерные потери углерода в течение двух лет. Для *A. polifolia* на Кирсановском болоте характерно резкое увеличение потерь углерода к концу второго года.

Таблица 3

Изменение содержания элементов при разложении растительных остатков растений-торфообразователей, % от исходного содержания

Группа	Вид	Фитоценоз	Углерод		Азот		Зольность	
			1 год	2 года	1 год	2 года	1 год	2 года
Сфагновые мхи	*S. angustifolium*	ВР	79	72	53	44	86	87
		КР	47	44	65	44	49	48
	S. fuscum	НР	97	97	187	69	114	79
		КР	97	95	163	85	135	145
	S. magellanicum	ОТ	90	87	84	129	88	–
		КР	77	73	103	53	45	–
Кустарнички	*V. vitis-idea*	ВР	71	70	80	69	45	45
		КР	72	69	137	19	90	104
	A. polifolia	НР	65	63	106	51	49	50
		КТ	76	58	113	59	60	40
	L. palustre	НР	75	67	115	54	45	13
		КР	70	67	123	103	56	55
	C. calyculata	НР	78	55	148	59	153	20
		КР	73	51	95	90	73	54
	V. oxycoccus	ОТ	72	71	83	105	31	62
Травы	*R. chamaemorus*	НР	60	30	114	49	62	27
		КР	58	32	117	53	35	23
	C. rostrata	ОТ	70	68	52	47	59	55
		КТ	76	67	84	69	87	45
	E. vaginatum	ОТ	71	63	77	55	60	80
		КТ	73	69	97	69	92	77
	M. trifoliata	ОТ	35	25	97	26	15	13
		КТ	29	28	57	39	27	12
	S. palustris	ОТ	57	53	53	44	18	13
		КТ	60	59	75	49	38	15

Примечание. ВР, НР, ОТ – высокий рям, низкий рям, осоково-сфагновая топь Бакчарского болота; КР, КТ – рям и осоково-сфагновая топь Кирсановского болота.

Максимальная скорость выноса углерода из растительных остатков травянистых растений характерна в течение первого года для всех видов. Средние потери углерода в травянистых растениях составляют 43% через год и 53% через два года.

В процессе разложения растительных остатков может происходить как минерализация азота, так и его иммобилизация (накопление). Согласно данным Л.С. Козловской с соавт. [5], по мере разложения сфагновых мхов повышается содержание азота мхов с 0,5 до 1,9; в дальнейшем в растениях, подвергающихся значительной минерализации, содержание азота начинает убывать, а в случае гумусообразования количество азота остается высоким. В нашем исследовании содержание азота увеличилось в образцах *S. fuscum* и *S. magellanicum* (табл. 3). Максимальное увеличение содержания азота относительно исходного содержания составило 187% для *S. fuscum* на Бакчарском болоте.

При разложении листьев кустарничков почти во всех видах наблюдается иммобилизация азота к концу первого года разложения, за исключением *V. vitis-idea* на высоком ряме, *V. oxycoccus* на открытой топи и *C. calyculata* на ряме Кирсановского болота (табл. 3). Максимальное накопление азота происходит в образцах *C. calyculata* на Бакчарском болоте. К концу второго года происходит вынос азота, который в среднем для листьев кустарничков составляет 39% от исходного содержания азота. Наибольшие потери азота при разложении получены для листьев *V. vitis-idea* на Кирсановском болоте (82%).

При разложении травянистых растений иммобилизация азота наблюдается только у *R. chamaemorus* в течение 12 месяцев (см. табл. 3). У остальных видов выявлено снижение содержания азота, однако возможно временное увеличение его содержания на разных этапах разложения, но не превышающее исходное количество азота. Согласно литературным данным [8], существует определенный минимум азота, при котором идет интенсивное разложение органического вещества растений, – 1,5–1,7%, при более низком содержании азота скорость деструкции растительных остатков снижается. Содержание азота в исследуемых травянистых растениях 1,04–2,3%. Самое низкое содержание азота у *E. vaginatum* (1,04%), и, соответственно, самая низкая среди исследуемых травянистых растений скорость разложения.

Изменение соотношения C/N в растительных остатках в результате разложения свидетельствует о неравнозначных потерях углерода и азота. При увеличении отношения C/N относительные потери азота выше, чем потери углерода. Кроме того, при значительной иммобилизации азота также может снижаться значение соотношения C/N (рис. 2). К концу второго года эксперимента практически во всех сфагновых мхах наблюдается значительное увеличение отношения C/N, по сравнению с исходными образцами, за исключением *S. magellanicum* на Бакчарском болоте, где наблюдалась значительная иммобилизация азота, и *S. angustifolium* на Кирсановском болоте, где, по сравнению с остальными сфагновыми мхами, наблюдается интенсивный вынос углерода.

Динамика изменения отношения C/N в листьях кустарничков представлена на рис. 2. Травянистые растения характеризуются самым низким отношением C/N, по сравнению с кустарничками и сфагновыми мхами. В образцах *C. rostrata, E. vaginatum* и *S. palustris* увеличение соотношения C/N свидетельствует о более слабом разложении, по сравнению с остальными исследуемыми растениями, где происходит снижение отношения (рис. 2).

Оценка изменения содержания зольных элементов в сфагновых мхах при разложении показала, что на начальном этапе разложения происходит снижение зольности (за исключением *S. fuscum*); максимальным снижением содержания зольных элементов характеризуется *S. magellanicum* на Кирсановском болоте, за первый год потери зольных элементов составили более 50% от исходного содержания (см. табл. 3).

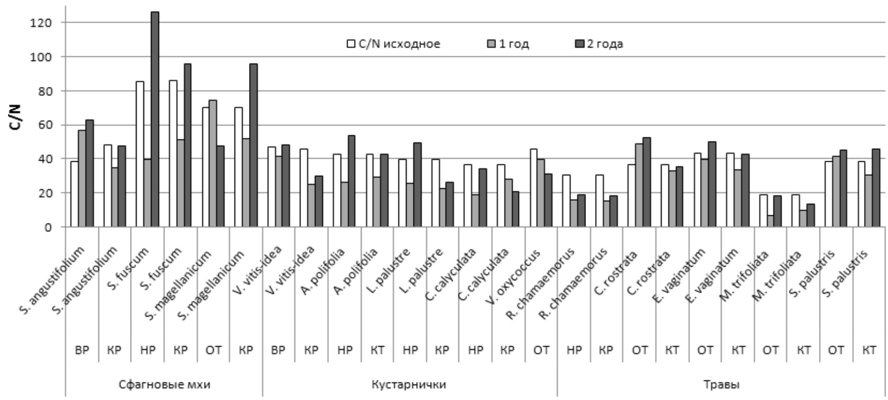


Рис. 2. Изменение отношения C/N при разложении растительных остатков растений-торфообразователей

К концу второго года эксперимента содержание зольных элементов начинает снижаться, в среднем потери зольных элементов составляют для сфагновых мхов около 30%, за исключением *S. fuscum* на Кирсановском болоте, для которого содержание зольных элементов по-прежнему выше (в 1,5 раза), чем в исходном состоянии. При этом все максимальные значения зольности растительных остатков не превышают зольности торфа, в котором находятся разлагающиеся образцы (табл. 4). Увеличение зольности в процессе разложения растительных остатков показано Н.Н. Бамбаловым с соавт. [9]. Согласно данным [5], в растительных остатках при разложении происходят снижение содержания калия и фосфора и увеличение содержания кальция и магния. На накопление кальция в опаде и затем в подстилке также указывали Д.Ф. Соколов и Е.Ф. Иваницкая [10], Н.И. Базилевич и А.А. Титлянова [11] и др.

В первый год происходит снижение содержания зольных элементов в растительных остатках кустарничков в среднем на 40% (см. табл. 3). Максимальным снижением зольности характеризуется *V. oxycoccus* на открытой топи Бакчарского болота, минимальным – *V. vitis-idea* на ряме Кирсановского болота. Следует отметить увеличение зольности (в 1,5 раза) в образцах *C. calyculata* на Бакчарском болоте. К концу второго года эксперимента содержание зольных элементов снизилось во всех образцах, за исключением *V. vitis-idea* на Кирсановском болоте. Максимальное снижение зольности наблюдается в листьях кустарничков, разлагающихся в более влажных и холодных условиях Бакчарского болота.

Таблица 4

Максимальная зольность при разложении сфагновых мхов на Бакчарском болоте и зольность торфа в слое 0–20 см

Растение	Зольность, %		
	Высокий рям *S. angustifolium*	Низкий рям *S. fuscum*	Открытая топь *S. magellanicum*
Торф	5,8	4,5	4,0
Мох	2,9	2,9	3,0

По содержанию зольных элементов травянистые растения являются самыми высокозольными из исследуемых. Потери зольных элементов относительно исходного содержания также самые высокие среди исследуемых видов (в среднем 35% за два года) (табл. 3). Максимальные потери зольных элементов получены для *M. trifoliata* и *S. palustris* (12,5 и 14% соответственно).

Кроме поверхностного опада трав, кустарничков и мхов, разложению подвергаются также и отмершие подземные органы растений – корни. Данные по скорости деструкции корней болотных растений малочисленны [5, 12]. Однако известно, что корневой опад гораздо медленнее подвергается разложению по сравнению с зелеными частями сосудистых растений [12]. Считается, что в корнях содержатся органические соединения, препятствующие их разложению, кроме того, сама кора корней, содержащая дубильные вещества и смолы, также способствует замедлению процессов деструкции [5].

Для определения скорости деструкции корней нами были заложены корни *C. rostrata, M. trifoliata* в торфяную залежь топи Кирсановского болота и *C. calyculata* (тонкие диаметром менее 2 мм и толстые диметром 2–5 мм) в торфяную залежь ряма Кирсановского болота. Результаты исследования показали, что наиболее быстро разлагаются корни *M. trifoliata* – потери массы составили за первый год 71% от исходного, корни *C. rostrata* разлагаются в три раза медленнее – потери органического вещества составили 21%. Наиболее медленно разлагаются толстые корни *C. calyculata* – 13%, тонкие корни *C. calyculata* разлагаются немного быстрее – 20%. Полученные данные в целом соответвуют приведенным в литературе [5, 12].

Процессы деструкции органического вещества растений являются неотъемлемой частью биологического круговорота. Чистая первичная продукция (NPP) и опад исследуемых растений рассмотрены в [3]. Накопление торфа происходит за счет более низкой скорости разложения растительных остатков, по сравнению с продукцией и отмиранием растений. Поскольку оценить скорость отмирания сфагновых мхов весьма затруднительно из-за особенностей роста сфагновых мхов, то мы принимали годичный опад мхов равным 70% от продукции [13]. Нами был выполнен расчет потерь растительного вещества сфагновых мхов в процессе разложения, происходившего в каждой исследуемой экосистеме, который показал, что скорость разложения сфагновых мхов значительно ниже скорости ежегодного накопления биомассы мхов и поступления мохового опада. Для Бакчарского болота ежегодные потери органического вещества при разложении растительных остатков сфагновых мхов составляют от 3 г/м^2 в год для *S. magellanicum* на осоковой топи до 18 г/м^2 в год для *S. angustifolium* на высоком ряме. На ряме Кирсановского болота ежегодные потери органического вещества мхов в среднем равны 21 г/м^2 в год, изменяясь от 3 до 41 г/м^2 в год в зависимости от вида мха (табл. 5). Превышение ежегодной продукции сфагновых мхов над их разложением составляет от 3 до 25 раз. Минимальная разница между продукцией и деструкцией получена для *S. angustifolium*, максимальная – для *S. magellanicum*. Из ежегодного опада мха разложению подвергается лишь 3–18% на Бакчарском болоте и от 4 до 48% – на Кирсановском. К концу второго года эксперимента потери органического вещества сфагновых мхов возрастают и составляют в среднем для Бакчарского болота 13%, для Кирсановского – 24% от ежегодной продукции. В результате происходит постоянное накопление слаборазложившегося сфагнового торфа.

Таблица 5

Продукция, опад и потери органического вещества при разложении растительных остатков исследуемых растений-торфообразователей

Группа растений	Фитоценоз	NPP, г/м^2 в год	Опад, г/м^2 в год	Разложение, г/м^2	
				1 год	2 года
Сфагновые мхи	ВР	151	106	18	34
	НР	168	118	5	7
	ОТ	152	106	3	18
	КР	122	85	21	30
Кустарнички	ВР	174	136	45	61
	НР	166	106	35	75
	ОТ	35	34	10	12
	КР	217	100	34	95
	КТ	0	0	0	0
Травы	ВР	10	8	3	8
	НР	6	6	3	5
	ОТ	91	97	38	48
	КР	4	4	1	3
	КТ	107	106	43	74
Корни	ВР	318	223	42	–
	НР	280	196	37	–
	ОТ	275	193	39	–
	КР	494	346	66	–
	КТ	685	479	101	–

Расчет потерь растительного вещества трав и кустарничков показал, что скорость разложения и трав, и кустарничков, так же, как у сфагновых мхов, значительно ниже скорости накопления их биомассы в течение вегетационного периода (табл. 5). Потери трав составляют в зависимости от вида фитоценоза от 1–2 г/м^2 в год на рямовых участках до 38–43 г/м^2 в год – на топяных. Ежегодные потери при деструкции растительных остатков трав на исследуемых фитоценозах Бакчарского болота в среднем в 2 раза ниже по сравнению с продукцией трав. На ряме и топи Кирсановского болота – в 6 и 2 раза соответственно. Из ежегодного опада трав деструкции в течение первого года подвергается в среднем 46% на Бакчарском болоте и 40% – на Кирсановском. Через два года от ежегодного опада остается только 4 и 25% на высоком и низком ряме Бакчарского болота, 45% – на осоково-сфагновой топи. На Кирсановском болоте при разложении ежегодного опада через два года остается 20 и 30% на ряме и топи соответственно.

При разложении кустарничков потери органического вещества составляют на рямах 34–35 г/м^2 в год, на осоково-сфагновой топи Бакчарского болота – 10 г/м^2 в год. Соотношение между продукцией и деструкцией кустарничков в среднем для исследуемых болотных фитоценозов составляет от 3 до 5 на Бакчарском болоте и 6,5 – на ряме Кирсановского болота. Из ежегодного опада листьев кустарничков в течение одного года разлагается в среднем 34% опада кустарничков. К концу второго года эксперимента из ежегодного опада разлагается на Кирсановском болоте 96%, на Бакчарском – 45, 70 и 37% на высоком, низком ряме и открытой топи соответственно.

Наиболее трудно оценить соотношение процессов продукции, отмирания и деструкции корней болотных экосистем. При оценке продуктивности болотных экосистем зачастую не проводятся исследования продуктивности корневых систем, в основном приводятся данные по запасам корней и динамике запасов живых корней, на основании которых рассчитывается продукция. Сведения об опаде корней болотных растений и их деструкции практически отсутствуют. Деятельный слой торфяной залежи густо пронизан корнями сосудистых растений, насыщенность корней в корнеобитаемом слое значительно выше по сравнению с минеральными почвами [5]. Согласно данным [14, 15], ежегодное поступление корневого опада составляет около 70–80% от продукции корней. При расчете опада корневых систем на исследуемых болотных фитоценозах мы принимали количество опада равным 70% от продукции корней. Так как скорость деструкции корней трав и кустарничков имеет разную величину, то для каждого фитоценоза рассчитывали количество опада корней трав и кустарничков пропорционально их вкладу в продукцию. Для рямовых участков доля корней кустарничков составляла в среднем 98% от общей продукции корней, для топяных участков изменялась от 0 (топь Кирсановского болота) до 25% (осоково-сфагновая топь Бакчарского болота). Соответственно оставшаяся часть BNP (belowground production – подземная продукция) и корневого опада обеспечивается корнями травянистой растительности. При разложении корней сосудистых растений потери массы составляют для болотных фитоценозов Бакчарского болота 37–47 г/м^{2}год, для Кирсановского – 79–101 г/м^{2}год (см. табл. 5). Соотношение между продукцией и деструкцией корней в среднем для исследуемых болотных фитоценозов равно от 7 до 8.

Также были оценены соотношение процессов накопления биомассы растений и потери органического вещества для исследуемых фитоценозов в целом (рис. 3). Для этого на основании данных по проективному покрытию травяного, кустарничкового и мохового ярусов были рассчитаны продукция для каждого исследуемого фитоценоза и потери органического вещества при деструкции растительных остатков. Потери органического вещества рассчитывались по следующей формуле:

$$Д_ф = \Sigma(Д_{кi} *П_{кi})+\Sigma(Д_{тi} *П_{тi}) +\Sigma(Д_{мi}*П_{мi}),$$

где $Д_ф$ – потери органического вещества для фитоценоза; $Д_{кi}$, $Д_{тi}$, $Д_{мi}$ – потери органического вещества кустарничков, трав и мхов *i*-го вида; $П_{кi}$, $П_{тi}$, $П_{мi}$ – проективное покрытие кустарничков, трав и мхов *i*-го вида в фитоценозе.

Результаты проведенных оценок продукционного и деструкционного процессов на исследуемых болотных фитоценозах олиготрофного типа показали, что в течение вегетационного периода на рямовых участках олиготрофных болот углерода накапливается в 1,1–2 раза больше, чем ежегодно отмирает, и в 4–7 раз больше, чем его теряется при разложении растительных остатков, что свидетельствует о постоянном стоке углерода из атмосферы и накоплении его как в виде растительности, так и в виде торфа.

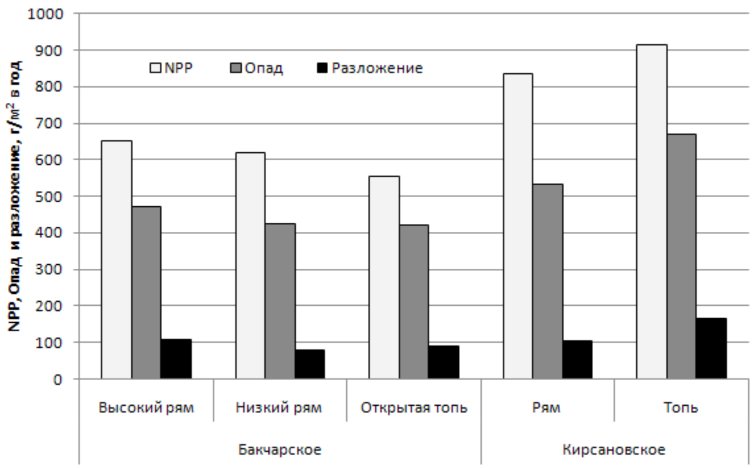


Рис. 3. Продукция (NPP), опад и потери органического вещества при разложении в исследуемых болотных фитоценозах

Заключение

В результате проведенных исследований выявлено, что наиболее интенсивные процессы деструкции протекают на начальном этапе разложения, затем их скорость снижается. Наиболее устойчивы к разложению сфагновые мхи, за исключением *S. angustifolium*. Наименее устойчивы – травянистые растения: *M. trifoliata*, *R. chamaemorus*. Кустарнички характеризуются средней скоростью разложения. Таким образом, основным торфообразователем в настоящее время на исследуемых олиготрофных болотах являются сфагновые мхи, о чем также свидетельствует ботанический состав торфяной залежи.

Динамика выноса углерода из растительных остатков растений-торфообразователей повторяет динамику потери массы органического вещества при деструкции. Вынос углерода при разложении растений-торфообразователей в течение года в зависимости от вида растения составляет от 3 (*S. fuscum*) до 72% (*M. trifoliata*) и в среднем для олиготрофных фитоценозов составляет 33%.

В процессе разложения растительных остатков в течение первого года, как правило, наблюдается иммобилизация азота во многих видах исследуемых растений (*S. fuscum*, *S. magellanicum*, *V. vitis-idea*, *A. polifolia*, *L. palustre*, *C. calyculata, V. oxycoccus, R. chamaemorus*). Максимальное накопление азота характерно для *S. fuscum* (187% от исходного количества).

Сравнение данных по чистой первичной продукции исследуемых фитоценозов и скорости деструкции показало, что количество запасаемого в процессе фотосинтеза углерода значительно превышает потери углерода при разложении растительных остатков как для отдельных видов растений (в 2–25 раз в зависимости от вида растений), так и для фитоценоза в целом (в 4–7 раз в зависимости от фитоценоза).

Литература

1. *Косых Н.П., Миронычева-Токарева Н.П., Паршина Е.К.* Фитомасса, продукция и разложение растительных остатков в олиготрофных болотах средней тайги Западной Сибири // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2009. Вып. 3(81). С. 63–69.
2. *Дюкарев А.Г., Пологова Н.Н.* Трансформация природной среды в зоне действия Томского водозабора // ENVIROMIS. Труды межд. конф. Томск : ИОА, 2002. С. 244–251.
3. *Головацкая Е.А.* Биологическая продуктивность олиготрофных и эвтрофных болот южно-таежной подзоны Западной Сибири // Журнал Сибирского федерального университета. Сер. Биол. 2009. Т. 2, № 1. С. 38–53.
4. *Наставления* гидрометеорологическим станциям и постам. Л. : Гидрометеоиздат, 1989. Вып. 8. 201 с.
5. *Козловская Л.С., Медведева В.М., Пьявченко Н.И.* Динамика органического вещества в процессе торфообразования. Л. : Наука, 1978. 176 с.
6. *Агрохимические* методы исследования почв. М. : Наука, 1975. 656 с.
7. *Пономарева В.В., Плотникова Т.А.* Методические указания по определению содержания состава гумуса в почвах (минеральных и торфяных). Л. : Наука, 1975. 105 с.
8. *Аристовская Т.В.* Микробиология подзолистых почв. М. ; Л. : Наука, 1965. 186 с.
9. *Бамбалов Н.Н., Хоружик А.В., Лукошко Е.С., Стригуцкий В.П.* Превращение отмерших растений в болотных биогеоценозах // Эксперимент и математическое моделирование в изучении биогеоценозов лесов и болот. М. : Наука, 1990. С. 53–63.

10. *Соколов Д.Ф., Иваницкая Е.Ф.* Влияние продуктов распада растительных остатков на лесорастительные свойства почв сосняков. М. : Наука, 1971. 159 с.
11. *Базилевич Н.И., Титлянова А.А.* Биотический круговорот на пяти континентах: азот и зольные элементы в природных наземных экосистемах / отв. ред. А.А. Тишков. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2008. 381 с.
12. *Паршина Е.К.* Деструкция растительного вещества в болотных экосистемах таежной и лесотундровой зон Западной Сибири : автореф. дис. … канд. биол. наук. Томск, 2009. 23 с.
13. *Пьявченко Н.И.* О продуктивности болот Западной Сибири // Растительные ресурсы. 1967. Т. 67, № 3, 4. С. 523–532.
14. *Persson H.* Root dynamics in a young Scots pine stand in Central Sweden // Oikos. 1978. Vol. 30. P. 508–519.
15. *Persson H., Stadenberg I.* Fine root dynamics in a Norway spruce forest (*Picea abies* (L.) Karst) in eastern Sweden // Plant Soil. 2010. № 330. P. 329–344.

Поступила в редакцию 05.07.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 137–151

doi: 10.17223/19988591/23/13

Evgeniya A. Golovatskaya, Liliya G. Nikonova (Abzalimova)

Institute of Monitoring of Climatic and Ecological System of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

DECOMPOSITION OF PLANT RESIDUES IN PEAT SOILS OF OLIGOTROPHIC PEATLANDS

The study of the transformation of organic matter is of great importance at present time, due to climate change and the increasing level of human impact on natural ecosystems. In peatlands there is a constant exchange of minerals between plants and peat soils. The rate of decomposition of plant residues and release of these nutrients depend on individual characteristics of the chemical composition of plants and the environment in which these processes occur. Peatlands have a lower, compared with the net primary production, speed of transformation of organic matter of plants, due to which there is a constant accumulation of organic matter in the form of peat. To estimate the rate of peat accumulation and the amount of carbon stored in the form of peat from decomposition of crop residues, we carried out an investigation of the destruction of peat-forming plants (13 species), growing on oligotrophic peatlands of the southern taiga subzone of Western Siberia.

The studies revealed that the most intense transformation processes are at an early stage of decomposition, and then the degradation rate decreases. The most resistant to decomposition are sphagnum mosses, except Sph. angustifolium. The least resistant – herbaceous plants: Menyanthes trifoliata, Rubus chamaemorus. Shrubs are characterized by an average rate of decomposition. Thus, the main peat-forming plants, at present, in the studied oligotrophic bogs are sphagnum moss, as also evidenced by botanical composition of peat deposits. The dynamics of the removal of carbon from residues peat-forming plants have the same trends as the weight loss during organic matter destruction. Removal of carbon during decomposition of peat-forming plants during the year depending on the type of plant is from 3% (Sphagnum fuscum) to 72% (Menyanthes trifoliata), and the average for phytocenosis is 33%.

In the process of decomposition of plant residues in the first year, as a rule, there is immobilization of nitrogen in many of the studied plants (S. fuscum, S. magellanicum, Vaccinium vitis-idea, Andromeda polifolia, Ledum palustre, Chamaedaphne calyculata, Vaccinium oxycoccus, Rubus chamaemorus). The maximum accumulation of nitrogen is characteristic for S. fuscum (187% of the initial quantity). A comparison of net primary production of the studied plant communities and the rate of destruction showed that the amount of carbon stored in the process of photosynthesis is much higher than the loss of carbon during decomposition of plant residues both for certain species of plants (2–25 times depending on the plant species) and for phytocenosis overall (4–7 times depending on phytocenosis).

Key words: *peatlands; peat-forming plants; rate of decomposition; removal of carbon; production.*

Received July 5, 2013

УДК 581.5
doi: 10.17223/19988591/23/14

О.Н. Папина[1], Р.О. Собчак[1], Т.П. Астафурова[2]

[1]*Горно-Алтайский государственный университет (г. Горно-Алтайск)*
[2]*Томский государственный университет (г. Томск)*

ВЛИЯНИЕ УРБАНИЗИРОВАННОЙ СРЕДЫ НА ПОКРОВНЫЕ ТКАНИ И СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ В ХВОЕ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА PINACEAE LINDL.

Исследование проведено при финансовой поддержке ФЦП
«Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»
на 2009–2013 годы (соглашение № 14.В37.21.2004).

Показаны изменения в водном режиме (содержание связанной воды, концентрация клеточного сока) и покровных тканях четырех видов хвойных семейства Pinaceae Lindl. в загрязненных районах г. Горно-Алтайска (Республика Алтай). Выявлены деструкция элементов покровных тканей хвои, изменение соотношения свободной и связанной воды в сторону увеличения содержания наиболее упорядоченных форм, что, в свою очередь, приводит к уменьшению водоотдачи при действии неблагоприятных факторов среды. Концентрация клеточного сока изменяется в зависимости от сезона и степени загрязнения. Все отмеченные изменения тесно связаны с устойчивостью растений к загрязнению. Наиболее устойчивыми к загазованности воздуха в условиях г. Горно-Алтайска являются сосна сибирская (Pinus sibirica) и сосна обыкновенная (P. sylvestris), а наименее устойчивыми – ель сибирская (Picea obovata) и пихта сибирская (Abies sibirica).

Ключевые слова: *водный режим; связанная вода; концентрация клеточного сока; покровные ткани; загрязнение.*

Введение

В настоящее время многими исследованиями выявлены изменения в анатомической структуре листа, возникающие от воздействия полютантов [1, 2], которые могут приводить к подавлению важнейших физиологических процессов и снижению жизнеспособности растений. Содержание воды в значительной степени зависит от состояния покровных тканей, что особенно важно для растений, произрастающих в загрязненных техногенными эмиссиями зонах.

Одним из основных показателей жизнеспособности растений является степень оводненности их тканей. Содержание воды в растениях зависит от их видовых особенностей, возраста, условий водообеспеченности, минерального питания, а также от других факторов и претерпевает сезонные и суточные изменения. Л.А. Захарова выявила, что в условиях аэрогенного загрязнения проявляется различие оводненности листьев у видов рода *Salix*:

у аборигенов, характеризующихся высокой экологической пластичностью, этот показатель возрастает, в то время как у интродуцентов с низкой экологической пластичностью – уменьшается [3]. В вопросе взаимодействия водного режима и газоустойчивости растений существуют неоднозначные мнения. Одни считают засухоустойчивые растения более газоустойчивыми [4]. По мнению других авторов, устойчивыми к действию кислых газов являются растения с повышенной оводненностью и преобладанием связанной воды [5]. Ю.З. Кулагин отмечал, что реакция на задымление у разных видов неодинакова [6]. У некоторых из них содержание отдельных форм воды, по сравнению с контролем, изменяется незначительно. Эти виды проявляют газоустойчивость. У других видов содержание связанной воды снижается значительно, что приводит к затруднению синтеза гидрофильных биоколлоидов и снижению газоустойчивости. Растения с более упорядоченной структурой внутриклеточной воды оказываются более устойчивыми к атмосферным токсикантам [7]. Уменьшение содержания воды в листьях под действием кислых газов, например SO_2, связано с нарушением механизмов регуляции интенсивности транспирации (устьичной и кутикулярной) в результате «паралича устьиц» [8] и разрушения воскового слоя наружного покрова листовых пластинок [4]. Г.М. Илькун считает, что нарушение структуры клеток и тканей листа, а также коллоидно-химических свойств цитоплазмы под действием вредных газов отражается на водном режиме не только ассимилирующих органов, но и всего растения [9]. Содержание разных форм воды и концентрация клеточного сока используются как интегральные показатели эколого-физиологических особенностей водного режима, а также для выявления механизмов адаптации растений к условиям среды [10, 11].

Цель работы – выявить изменения в содержании разных форм воды, концентрации клеточного сока, сопряженные с повреждениями покровных тканей в хвое некоторых видов Pinaceae Lindl. в загрязненных районах г. Горно-Алтайска.

Материалы и методики исследования

Район исследований – г. Горно-Алтайск, расположенный в северной части Республики Алтай. Отсутствие крупных промышленных предприятий, положение в сравнительно чистом природном комплексе, небольшая численность населения должны были обеспечить экологически чистую обстановку данной территории. Однако по условиям рассеивания вредных примесей в атмосфере территория г. Горно-Алтайска входит в неблагоприятную зону, так как город расположен в долине, окруженной со всех сторон горами, и проблема загрязнения воздушного бассейна республиканского центра до настоящего времени остается наиболее острой в зимний период.

Характерной климатической особенностью долины р. Майма, в которой расположен г. Горно-Алтайск, является образование воздушных инверсий;

холодный воздух спускается с гор и подтекает под теплый. Выбрасываемые загрязняющие вещества оказываются сосредоточенными в приземном слое воздуха. Преобладающая скорость ветра в городе составляет 2 м/с. При таких условиях уноса и рассеивания выбросов практически не происходит. Это способствует накоплению загрязняющих веществ в приземной атмосфере и, как следствие, в почвенном покрове городской территории [12].

Основным фактором ухудшения качества атмосферного воздуха в г. Горно-Алтайске является значительный рост числа автотранспортных средств, что приводит к нарастающему загрязнению улиц. Другими значимыми источниками поступления загрязняющих веществ служат отопительные печи частного сектора, многочисленные мелкие и крупные котельные. Исходя из анализа экологической обстановки г. Горно-Алтайска, наиболее распространенными загрязнителями воздуха являются твердые взвеси разной дисперсности (пыль, зола, сажа, дым), оксид углерода, сернистый ангидрид, оксиды азота, летучие углеводороды.

В качестве объектов исследования были выбраны 4 вида семейства *Pinaceae* Lindl.: сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), сосна сибирская (*Pinus sibirica* L.), ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.), пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb.). Исследования были проведены в сезонной динамике (осень, зима, весна).

Контрольные пробные площади (контроль) находились в условно чистой зоне (район агробиостанции ГАГУ). Опытные площади расположены в сильнозагрязненных районах г. Горно-Алтайска в близких к контрольным природно-климатических условиях. Хвоя сосны обыкновенной взята с деревьев, произрастающих в районе ост. «Мебельная фабрика» (опыт 1), сосны сибирской – в районе Автовокзала (опыт 2), ели сибирской – в районе Родника (опыт 3), пихты сибирской – в районе ЖБИ (опыт 4).

На каждой пробной площади были выбраны визуально неповрежденные деревья (5 шт.), находящиеся в одинаковых условиях освещения и увлажнения. Возраст древесных пород составлял 40–55 лет. Анатомические показатели двухлетней хвои изучали по общепринятым методикам [13]. Состояние оводнённости хвои (свободная и связанная вода, концентрация клеточного сока) определяли в динамике в разные сезоны года (осень, зима, весна) в условиях сильного загрязнения города рефрактометрическим методом [14]. Сбор побегов со всех исследуемых площадей осуществлялся в течение одного дня из средней части кроны южной экспозиции. Повторность для анатомических исследований – 20-кратная, для показателей разных форм воды – 3-кратная. Полученные данные были обработаны с использованием пакета электронных таблиц Microsoft Excel.

Результаты исследования и обсуждение

Покровные ткани первыми принимают негативные воздействия, поскольку непосредственно контактируют с окружающей средой. Для детального изучения анатомических параметров нами были выбраны структурные элементы (кутикула, эпидерма, гиподерма). Их функция связана преимущественно с защитой внутренних тканей и наиболее уязвимых клеток к действию токсикантов (устьица, клетки мезофилла под устьицами). Кроме того, повреждения этих структурных элементов могут влиять на содержание воды в листьях.

Результаты структурных изменений покровных тканей хвои в загрязненных районах г. Горно-Алтайска представлены на рис. 1 и в таблице. Так, показатели толщины кутикулы при действии токсических веществ могут снижаться (сосна сибирская, пихта), оставаться на уровне контрольных (сосна обыкновенная) или увеличиваться (ель). Так, кутикула тоньше у пихты на 1,12 мкм, остальные показатели мало отличаются от контрольных.

Показатели структурных элементов покровных тканей в зависимости от воздействия воздушных поллютантов

Объект исследования	Вариант опыта	Толщина, мкм		
		кутикулы	эпидермы	гиподермы
Сосна обыкновенная	Контроль	5,05±0,18 / 16,7	12,85±0,52 / 18,3	12,14±0,57 / 21,1
	Опыт 1	5,1±0,64 / 40	12,95±0,57 / 13,9	8,87±0,52* / 18,8
Сосна сибирская	Контроль	6,48±0,29 / 20	10,1±0,28 / 12,6	12,24±0,3 / 11
	Опыт 2	5,1±0,21* / 13,3	11,32±0,53 / 14,9	6,94±0,33* / 15,2
Ель сибирская	Контроль	3,54±0,1 / 13,5	9,67±0,29 / 13,8	4,41±0,17 / 17
	Опыт 3	5,05±0,21* / 18,5	10,17±0,35 / 15,6	5,29±0,23 / 19,5
Пихта сибирская	Контроль	6,42±0,2 / 14,6	7,9±0,39 / 22,5	Нет гиподермы
	Опыт 4	5,3±0,26* / 22,1	7,04±0,36 * / 23	Нет гиподермы

Примечание. В числителе среднее ± ошибка средней, в знаменателе – коэффициент вариации, %. * Отличия от контрольного варианта ($p < 0,05$).

У ели толщина кутикулы увеличивается в городских условиях в 1,43 раза. У обоих видов рода сосна наблюдается большее варьирование структурных параметров. Следует отметить, что усилившийся показатель толщины кутикулы у ели в городских условиях на самом деле мало обеспечивает защиту от токсикантов. Хотя кутикула здесь и более толстая, она становится часто волнистой, извилистой, рассеченной и даже прерывистой, что еще более облегчает проникновение токсических веществ во внутренние ткани хвои. Как известно, представляя собой защитный покров, кутикула, вместе с тем, довольно легко проницаема для ряда различных веществ, в том числе для газов и воды. Поражение листьев и хвои атмосферными загрязнителями обусловлено в большей степени кутикулярной проницаемостью, чем численностью открытых устьиц [15]. Пыль нарушает температурный и водный режимы растений, поглощение световой энергии и газообмен [9].

По нашим наблюдениям, гиподерма в условиях города часто бывает более тонкой и составляет 73–96% по сравнению с контролем. В сильно загрязненных районах гиподерма в углах (ребрах) хвои некоторых видов (ель, сосна) может быть толще, иногда двухрядной. На возрастающую роль гиподермы в условиях загрязнения указывают исследования В.М. Тарбаевой и В.М. Ладановой. В данной работе авторы также отмечают образование двухрядной гиподермы при воздействии фитотоксикантов [16].

На поперечных срезах хвои исследованных видов хорошо просматривается характер повреждений хвои от атмосферных выбросов (рис. 1). У всех исследованных видов наблюдается деструкция кутикулы, эпидермы и гиподермы. Хвоя густо покрыта крупнодисперсными веществами (пыль, зола, сажа), которые забивают устьица и проникают в мезофилл прежде всего через устьица и разрыхленный слой кутикулы, а также между клетками эпидермы и гиподермы. У пораженных устьиц меняются очертания, часто разрушаются стенки замыкающих клеток, что приводит к нарушениям в механизме движения устьиц, а также к интоксикации мезофилла. При загрязнении атмосферы уменьшается число устьиц. Наши данные согласуются с результатами исследований других ученых. Е.А. Клепикова и др. отмечают, что реакция эпидермы листьев на накопление тяжелых металлов выражена в снижении количества устьиц у *Betula verrucosa* и *Plantago major* [17]. На количество устьиц в листе также влияют два фактора: концентрация CO_2 в воздухе и количество влаги в почве [18].

В загрязненных районах в зимний период в устьичных щелях часто отсутствуют восковые пробки. Можно полагать, что жироподобные вещества (воск и кутин) разрушаются загрязнителями от котельных и автотранспорта, так как *а*-пирен и диоксин разрушают липиды.

Известно, что оводненность тканей значительно изменяется в течение года. Нами проведено изучение содержания свободной, связанной воды и концентрации клеточного сока в хвое ели сибирской, сосны сибирской, сосны обыкновенной, пихты сибирской в загрязненных районах г. Горно-Алтайска в сезонной динамике (осень, зима, весна). В результате было выявлено, что осенью у всех исследованных видов в опытных вариантах, по сравнению с контролем, происходит увеличение количества связанной воды (рис. 2). Можно полагать, что эта адаптация позволяет растениям подготовиться к перенесению низких температур в зимних условиях. Зимой, как в чистой, так и в загрязненной зоне, у всех исследованных видов, кроме ели, отмечено максимальное содержание связанной воды. Весной растения выходят из состояния зимнего покоя, поэтому содержание связанной воды в хвое уменьшается (от 1 до 2,5 раза, по сравнению с зимой).

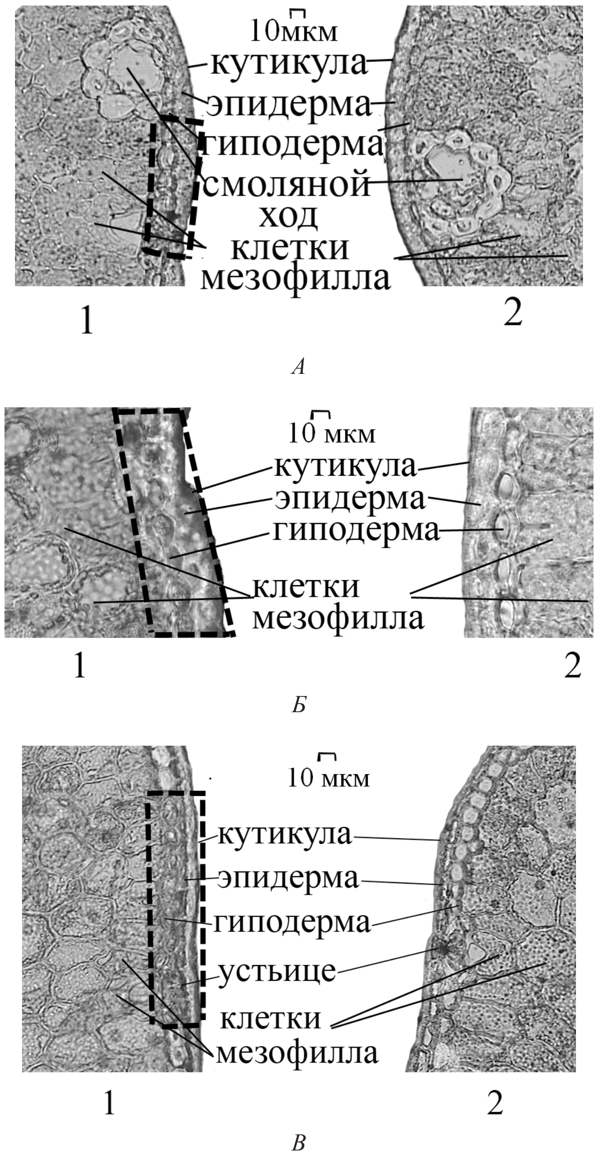


Рис. 1. Деструктивные изменения на поперечных срезах хвои
в загрязненных районах г. Горно-Алтайска (*1*), контроль (*2*):
А – сосны обыкновенной; *Б* – сосны сибирской; *В* – ели сибирской.
Места наибольших деструктивных изменений

Однако у ели максимум связанной воды в обеих зонах наблюдается весной, а у пихты – только в условиях загрязнения, что приводит к уменьшению свободной воды, особенно необходимой в весенний период активизации физиологических процессов.

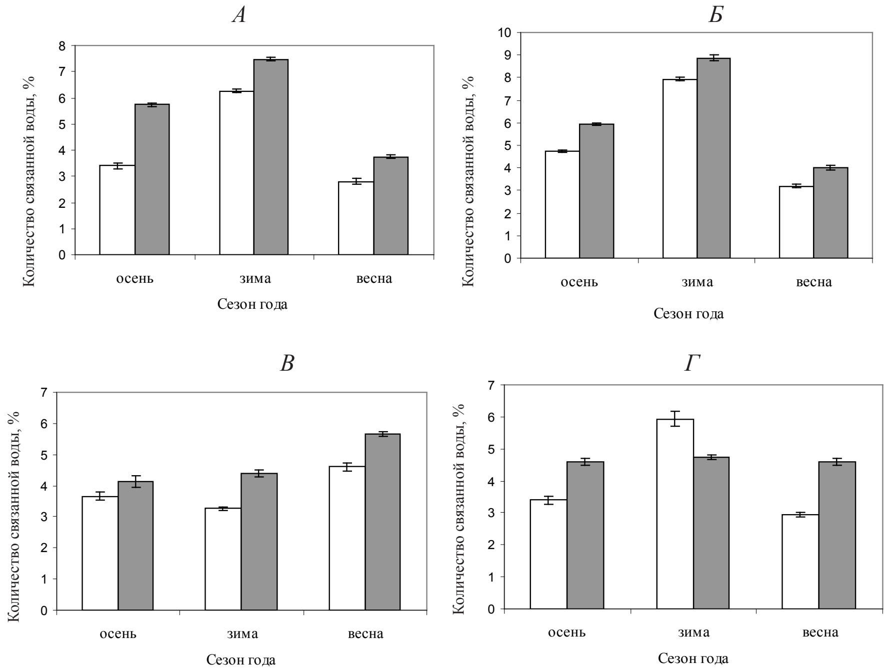


Рис. 2. Сезонная динамика содержания связанной воды в хвое сосны обыкновенной (*А*), сосны сибирской (*Б*), ели сибирской (*В*), пихты сибирской (*Г*) в загрязненных условиях г. Горно-Алтайска (опыт) и в чистой зоне (контроль)

Концентрация клеточного сока также является показателем устойчивости растений к внешним неблагоприятным условиям, в том числе к загрязнению. В результате наших исследований выяснилось, что более контрастные изменения данного показателя отмечаются между сезонами, чем в зависимости от загрязнения. В осенний и весенний периоды концентрация клеточного сока выше в хвое опытных экземпляров, по сравнению с контролем. В зимний период концентрация клеточного сока у городских растений значительно ниже. Это обусловлено тем, что в городе в зимний период гораздо теплее, чем в естественных условиях, и деревья раньше выходят из состояния зимнего покоя. Вследствие этого активизируются обменные процессы: дыхание становится более интенсивным, запас углеводов быстро расходуется, в итоге растение ослабевает. Побеги в кроне деревьев, подвергающихся задымлению, резко повышают оводнённость. Причина – более интенсивное нагревание солнечными лучами покрытых частицами сажи побегов и более раннее стаивание снега (загрязненный частицами сажи снег быстрее тает), в результате чего быстрее происходит преждевременная активация побегов, сопровождающаяся, в частности, быстрым возрастанием оводнённости как почек, так и стеблей, а следовательно и хвои. Это может отрицательно отразиться на состоянии деревьев, так как спровоцированный загрязненным воздухом период может стать причиной вымерзания побегов в кроне при весенних заморозках. Поэтому городские насаждения более уязвимы, по сравнению с загородными.

Заключение

Таким образом, в городской среде выявлены повреждения и деструкции структурных элементов покровных тканей хвои, изменения соотношения свободной и связанной воды в сторону увеличения содержания наиболее упорядоченных форм, что, в свою очередь, приводит к уменьшению водоотдачи и способствует сохранению выровненного водного баланса растений при действии неблагоприятных факторов среды. Уменьшение свободной воды весной у ели и пихты приводит к замедлению физиологических процессов. Концентрация клеточного сока изменяется сильнее в зависимости от сезона, чем от степени загрязнения. В условиях городской среды г. Горно-Алтайска больше нарушений в анатомической структуре хвои и водном балансе выявлено у неустойчивых видов – ели сибирской и пихты сибирской, чем у наиболее устойчивых – сосны сибирской и сосны обыкновенной.

Литература

1. *Ашуров А.А., Эргашева Г.М., Саидов М.* Анатомические особенности строения листа при техногенном загрязнении // Известия Академии наук Таджикской республики отделения биологических и медицинских наук. 2001. № 5. С. 95–105.
2. *Теребова Е.Н., Галибина Н.А.* Функциональная активность клеточной стенки хвои сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения (Мончегорский медно-никелевый комбинат) // Флора и фауна северных городов : сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. Мурманск, 24–26 апреля 2008 г. Мурманск : Мурманский гос. пед. ун-т, 2008. С. 159–175.
3. *Захарова Л.А.* Устойчивость видов рода *Salix* L. к аэрогенному загрязнению атмосферы : автореф. дис… канд. биол. наук. Новосибирск, 2005. 16 с.
4. *Сергейчик С.А.* Растения и экология. Минск : Ураджай, 1997. 224 с.
5. *Сарбаева Е.В.* Биоэкологические особенности туи западной *(Thuja occidentalis* L.) в условиях городской среды : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Н. Новгород, 2005. 22 с.
6. *Кулагин Ю.З.* Индустриальная дендроэкология и прогнозирование. М. : Наука, 1985. 118 с.
7. *Кондратюк Е.Н., Тарабарин В.П., Бакланов В.И. и др.* Промышленная ботаника / под ред. Е.Н. Кондратюка. Киев : Наукова Думка, 1980. 260 с.
8. *Барахтенова Л.А., Кузнецова А.А.* Ассимиляция двуокиси серы растениями. Физиология фотосинтеза. Новосибирск : Изд-во НГПУ, 1998. 203 с.
9. *Илькун Г.М.* Загрязненность атмосферы и растения. Киев : Наукова думка, 1978. 247 с.
10. *Половникова М.Г.* Эколого-физиологические особенности горных растений на разных этапах онтогенеза в условиях городской среды : автореф. дис. … канд. биол. наук. Нижний Новгород, 2007. 24 с.
11. *Воскресенская О.Л.* Экологические аспекты функциональной поливариантности онтогенеза растений : автореф. дис. … д-ра биол. наук. Казань, 2009. 50 с.

12. *Шарабура Г.Д., Модина Т.Д.* Природа загрязнения атмосферы в районе г. Горно-Алтайска // Материалы научно-практической конференции «Социально-экономические проблемы развития города Горно-Алтайска до 2000 года» 23–24 апреля 1998 г. Горно-Алтайск, 1998. С. 41–42.
13. *Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др.* Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М. : Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
14. *Методы* биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. Л. : Колос, 1972. 456 с.
15. *Кравкина И.М.* Влияние атмосферных загрязнителей на структуру листа // Ботанический журнал. 1991. Т. 76, № 1. С. 3–9.
16. *Тарбаева В.М., Ладанова Н.В*. Влияние аэротехногенного загрязнения на репродуктивную и вегетативную сферу хвойных. Сыктывкар : Коми науч. центр УрО РАН, 1994. 32 с.
17. *Клепикова Е.А., Безель В.С., Таршис Г.И.* Реакция эпидермального комплекса *Betula verrucosa* и *Plantago maior* на токсическое загрязнение среды // Сибирский экологический журнал. 2002. № 1. С. 67–71.
18. *Schoettle A.W., Rochelle S.G.* Morphological variation of *Pinus flexilis* (Pinaceae) a range of elevations // American Journal of Botany, 2000. Vol. 87, № 12. P. 1797–1806.

Поступила в редакцию 15.03.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 152–161

doi: 10.17223/19988591/23/14

Olga N. Papina[1], Raisa O. Sobchak[1], Tatyana P. Astaphurova[2]

[1] Gorno-Altaisk State University, Gorno-Altaisk, Russia
[2] Tomsk State University, Tomsk, Russia

THE INFLUENCE OF URBAN SURROUNDING ON THE INTEGUMENT AND THE WATER CONTENT IN THE NEEDLES OF THE SPECIES OF THE FAMILY PINACEAE LINDL.

Changes of the water regime (the quantities of free and bound water and the concentration of the cellular fluid) and those of the integument of four species of conifers of the family Pinaceae Lindl. (Archangel fir – Pinus sylvestris L., Siberian cedar – Pinus sibirica L., Siberian spruce – Picea obovata Ledeb., Siberian fir – Abies sibirica Ledeb) in the polluted areas of the town of Gorno-Altaisk (Republic Altai) were shown. Partial decomposition of the elements of the integument of the needles was found. Thus, toxic substances may affect the thickness of the cuticle, either making it decrease (as is the case with Siberian cedar and the fir), or increase (the spruce), or it remains as thick as that of the control set (Archangel fir). The cuticle of the fir is thinner by 1.12 μm, the other parameters differing very little from those of the control set. The cuticle of the fir increases under urban conditions 1.43 times. Both types of the pine demonstrate a greater variety of the structure parameters. It is worth noting that the thickening of the cuticle of the fir does not increase the protection from the toxins of the urban surrounding. Though the cuticle becomes thicker, it often becomes undulate, flexuous, parted, and even broken interrupted, which makes it easier for toxic agents to penetrate into the inner tissues of the needle. As it is known, the cuticle, while being a protective layer, is still quite penetrable for some substances, including gases and water.

Changes of free and bound water ratios are found, i.e. those towards the increase of the proportions of more ordered forms, which, in its turn, results in the decrease in the runout under the influence of adverse factors of the surrounding. The concentration of the cellular fluid varies, depending on the season and the levels of pollution.

All those changes are closely related to the resistant qualities of plants. The most resistant to the gas pollution of Gorno-Altaisk are the Siberian cedar (Pinus sibirica) and the Archangel fir (P. sylvestris), while the Siberian spruce (Picea obovata) and the Siberian fir (Abies sibirica) turn out to be the least resistant species.

Key words: *water mode; the free water; the bound water; the concentration of the cellular fluid; the integument; pollute the environment.*

Received March 15, 2013

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Акимова Елена Евгеньевна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры экологической и сельскохозяйственной биотехнологии Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск); старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии Сибирского научно-исследовательского института сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии (г. Томск). E-mail: biotech@sibmail.com

Астафурова Татьяна Петровна – доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой агрономии Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: agronomia@sibmail.com

Басаргин Дементий Дмитриевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории дендрологии Горнотаежной станции им. В.Л. Комарова ДВО РАН (с. Горнотаежное, Уссурийский район, Приморский край). E-mail: gtsuss@mail.ru

Беспрозванных Владимир Владимирович – доктор биологических наук, зав. лабораторией паразитологии Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток). E-mail: besproz@ibss.dvo.ru

Брусенцов Илья Иванович – инженер лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). E-mail: brusentsovi@gmail.com

Брусенцова Ирина Витальевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). E-mail: brusiii@ngs.ru

Войцековская Светлана Анатольевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии растений и биохимии биолого-химического факультета Томского государственного педагогического университета; зав. учебно-научной лабораторией растениеводства НИИ биологии и биофизики Националного исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: euvit@bk.ru

Воробьёва Анна Николаевна – кандидат биологических наук, доцент; зам. директора по науке Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН (г. Благовещенск, Амурская область). E-mail: sparrowaj@mail.ru

Головацкая Евгения Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физики климатических систем Института мониторинга климатических и экологических систем СО РАН (г. Томск). E-mail: golovatskaya@imces.ru

Евженко Константин Сергеевич – кандидат биологических наук, старший преподаватель факультета педагогики и психологии Омского государственного педагогического университета (г. Омск). E-mail: Nikonianec@yandex.ru

Ермошин Александр Анатольевич – ассистент кафедры физиологии и биохимии растений института естественных наук Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург). E-mail: ermosh@e1.ru

Ефремов Андрей Николаевич – кандидат биологических наук, начальник группы камеральной обработки отдела экологических изысканий Проектного института реконструкции и строительства объектов нефти и газа (г. Омск). E-mail: aefremov@pirs.omsknet.ru

Катохин Алексей Вадимович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). E-mail: katokhin@bionet.nsc.ru

Киселев Николай Николаевич – старший научный сотрудник лаборатории вирусологии флавивирусов отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: kiselev@vecto.nsc.ru

Киселёва Ирина Сергеевна – кандидат биологических наук, доцент, зав. кафедрой физиологии и биохимии растений института естественных наук Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург). E-mail: Irina.Kiselyova@usu.ru

Куранова Валентина Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии позвоночных и экологии Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: kuranova49@mail.ru

Локтев Валерий Борисович – доктор биологических наук, профессор, зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: valeryloktev@gmail.com

Микрюкова Тамара Петровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: mikryukova_tp@vector.nsc.ru

Минаева Оксана Модестовна – кандидат биологических наук, доцент кафедр экологической и сельскохозяйственной биотехнологии и цитологии и генетики Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: mom05@mail.ru

Мордвинов Вячеслав Алексеевич – доктор биологических наук, зам. директора по научной работе Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). E-mail: mordvin@bionet.nsc.ru

Нетесов Сергей Викторович – чл.-кор. РАН, профессор, доктор биологических наук, зав. лабораторией бионанотехнологий Новосибирского национального исследовательского государственного университета (г. Новосибирск). E-mail: nauka@nsu.ru

Никонова (Абзалимова) Лилия Гарифуловна – аспирант Института мониторинга климатических и экологических систем СО РАН (г. Томск). E-mail: lili112358@mail.ru

Оконешникова Матрена Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии почв и аласных экосистем Института биологических проблем криолитозоны СО РАН (г. Якутск). E-mail: mvok@yandex.ru

Папина Ольга Николаевна – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры ботаники и фитофизиологии Горно-Алтайского государственного университета (г. Горно-Алтайск, Республика Алтай). E-mail: degt1@mail.ru

Протопопова Елена Викторовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: protopopova_ev@vector.nsc.ru

Сазонов Алексей Эдуардович – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск). E-mail: sazonov_al@mail.ru

Свириденко Борис Федорович – профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник НИИ природопользования и экологии Севера Сургутского государственного университета Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (г. Сургут, Тюменская область). E-mail: bosviri@mail.ru

Свириденко Татьяна Викторовна – младший научный сотрудник НИИ природопользования и экологии Севера Сургутского государственного университета Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (г. Сургут, Тюменская область). E-mail: tatyanasv29@yandex.ru

Семенченко Надежда Николаевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории пресноводных биоресурсов Хабаровского филиала Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра (г. Хабаровск). E-mail: n.semenchenko@mail.ru

Святченко Виктор Александрович – кандидат биологических наук, зав. лабораторией вирусологии флавивирусов отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: svyat@vector.nsc.ru

Собчак Раиса Олеговна – кандидат биологических наук, доцент, профессор кафедры ботаники и фитофизиологии Горно-Алтайского государственного университета (г. Горно-Алтайск, Республика Алтай). E-mail: sobchak@mail.ru

Степанюк Галина Яковлевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией семеноведения и биотехнологии Сибирского ботанического сада Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: sbg_biotech@sibmail.com

Сурнина Елена Николаевна – старший лаборант кафедры агрономии Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: yelena1978@sibmail.com

Тарасова Маргарита Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий Новосибирского национального исследовательского государственного университета (г. Новосибирск); младший научный сотрудник лаборатории вирусологии флавивирусов отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: tarasovamv@gmail.com

Терновой Владимир Александрович – кандидат биологических наук, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: tern@vector.nsc.ru

Токарь Ольга Егоровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии, географии и методики их преподавания биолого-географического факультета Ишимского государственного педагогического института им. П.П. Ершова (г. Ишим, Тюменская область). E-mail: tokarishim@yandex.ru

Хаблак Сергей Григорьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры почвоведения и агрохимии Луганского национального аграрного университета (г. Луганск, Украина). E-mail: serhab_211981@rambler.ru

Хоцкова Любовь Витальевна – младший научный сотрудник Сибирского ботанического сада Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: sbg_biotech@sibmail.com

Цибизова Марианна Николаевна – магистрант кафедры физиологии и биохимии растений Института естественных наук Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург). E-mail: devilcat_613@mail.ru

Чепраков Михаил Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института экологии растений и животных УроРАН (г. Екатеринбург). E-mail: cheprakov@ipae.uran.ru

Чуб Елена Владимировна – научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии особо-опасных инфекций отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.). E-mail: chub@vector.nsc.ru

Чумаков Петр Михайлович – профессор, доктор биологических наук, зав. лабораторией пролиферации клеток Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (г. Москва). E-mail: chumakov@yahoo.com

Юмагулова Эльвира Рамилевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии естественно-географического факультета Нижневартовского государственного гуманитарного университета (г. Нижневартовск). E-mail: elvirau2009@yandex.ru

Ярцев Вадим Вадимович – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биоиндикации и экологического мониторинга Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета; аспирант кафедры зоологии позвоночных и экологии Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск). E-mail: vadim_yartsev@mail.ru

Научный журнал **«Вестник Томского государственного университета. Биология»** был выделен в самостоятельное периодическое издание из общенаучного журнала «Вестник Томского государственного университета» в 2007 г.

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. Кроме того, публикуются описания принципиально новых методов исследования, обзорные статьи по отдельным проблемам, рецензии и хроника.

Все статьи, поступающие в редакцию журнала, подлежат обязательному рецензированию. В настоящее время публикации в журнале осуществляются на некоммерческой основе. Полнотекстовые версии вышедших номеров размещены на сайте журнала: ***http://vestnik.tsu.ru/biology***.

Основные требования к представляемым статьям: новизна и обоснованность фактического материала, ясность, сжатость изложения, воспроизводимость экспериментальных данных, правильное оформление рукописи.

Научный журнал «Вестник Томского государственного университета. Биология» является реферируемым, рецензируемым, включен в **«Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук».**

Журнал 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.), ему присвоен международный стандартный номер сериального издания (ISSN 1998-8591).

«Вестник Томского государственного университета. Биология» выходит ежеквартально и распространяется по подписке, его подписной индекс 44024 в объединенном каталоге «Пресса России».

Адрес редакции: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, ГОУ ВПО «Томский государственный университет», Биологический Институт.

Председатель редакции журнала – д-р биол. наук, профессор С.П. Кулижский
Тел. раб. 8–(382–2)–529–853
Факс (382–2)–529–853
E-mail: ***decan@bio.tsu.ru***

Ответственный секретарь редакции журнала – канд. биол. наук Е.Е. Акимова
Факс (382–2)–529–853
E-mail: ***vestnictsubiology@sibmail.com***

The scientific journal **"Tomsk State University Journal of Biology"** publishes the results of the completed original researches (theoretic and experimental articles) in different areas of contemporary biology which have not been published before in this or any other edition. Besides it includes descriptions of conceptually new methods of research, round-up articles on particular topics, reviews and chronicle.

The decision on publication is taken by the scientific editorial board after reviewing, considering its correspondence to the subject area of the journal, topicality of the problem, scientific and practical novelty and value, professionalism of work execution including statistical treatment of data research materials and quality of material preparation and presentation.

The main requirements to the articles are novelty and validity of factual material, clarification and brevity of the summary, reproducibility of experimental data and appropriate presentation of the manuscript (to know more about the requirements to the rules of material presentation, please, see "Presentation rules"). **The medium term of publication is 1–2 years after receiving a paper variant of the package of documents.**

The scientific journal "Tomsk State University Journal of Biology" is read and reviewed and is included on "The list of the leading reviewed scientific journals and editions where the main scientific results of candidate's or doctoral thesis are to be published" (Decision of the State Commission for Academic Degrees and Titles as of February 19, 2010, № 6/6 – http://vak.ed.gov.ru/ru/news/allnews /index.php?id4=2571). The journal is registered in Russian Federal Service for Supervision in the Sphere of Mass Communication, Communications and the Protection of Cultural Heritage (certification of registration: PI № FS 77-29499 as of September 27, 2007). It is given an international standard serial edition number (ISSN 1998-8591).

All articles received by the editorial board are to be reviewed. Publications in the journal are free (on non-commercial basis).

"Tomsk State University Journal of Biology" is issued quarterly and is **distributed by subscription only**; its subscription index can be found in the unified catalogue "The Press of Russia". Full-text versions of the issued editions are available at "Archives".

Address: Tomsk State University, Biological Institute, 36 Lenina St., Tomsk, 634050, Russia.

Chairman – Sergey P. Kulizhskiy, Doctor of Biology, Professor
Phone 8–(382–2)–529–853
Fax (382–2)–529–853
E-mail: ***decan@bio.tsu.ru***

Executive secretary – Elena E. Akimova, Candidate of Biology
Fax (382–2)–529–853
E-mail: ***vestnictsubiology@sibmail.com***

Научный журнал

ВЕСТНИК
Томского государственного университета
БИОЛОГИЯ
2013. № 3 (23)

Редактор К.В. Полькина
Корректор Н.А. Афанасьева
Оригинал-макет А.И. Лелоюр
Дизайн обложки Я. Якобсона
(проект «Пресс-интеграл»,
факультет журналистики ТГУ)

Подписано в печать 23.09.2013 г. Формат 70х108 $^{1}/_{16}$.
Усл. печ. л. 19,6. Тираж 500 экз. Заказ № .

Отпечатано на оборудовании
Учебно-производственной типографии
Томского государственного университета
634000, г. Томск, пр. Ленина, 66