

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВЕСТНИК ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

Tomsk State University Journal of Biology

Научный журнал

2020

№ 51

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

Подписной индекс в объединённом каталоге «Пресса России» 44024

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

Учредитель – Томский государственный университет

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

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

E-mail: kulizhskiy@yandex.ru

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E-mail: biotsu@rambler.ru, biotsu@mail.ru

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Издательство: Издательство ТГУ. Редактор К.Г. Шилько; редактор-переводчик М.Б. Кузьменко; оригинал-макет А.И. Лелюор; дизайн обложки Л.Д. Кривцова

Подписано в печать 25.09.2020 г. Формат 70x108^{1/16}. Усл. печ. л. 18,6. Тираж 50 экз. Заказ № 4430. Цена свободная. Дата выхода в свет 02.10.2020 г.

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

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

Founder – Tomsk State University

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

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

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

Language: Russian, English

Publications are on non-commercial basis (FREE)

Open access

Publication timeframe: 3-6 months

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

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

Contact the Journal

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

biojournaltsu@gmail.com, biotsu@mail.ru

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL BOARD [In Russian Alphabetical order]

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

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

Passed for printing 25.09.2020. Format 70x108^{1/16}. Conventional printed sheets 18.6. Circulation is 50 copies. Orders No. 4430 Open price. Date of publication 02.10.2020.

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

СОДЕРЖАНИЕ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Сидоров А.В., Зайцева Ю.В., Маракаев О.А.** Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro*6
- Словарева О.Ю., Корнев К.П.** Определение аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *Acidovorax citrulli*25

ЗООЛОГИЯ

- Маловичко Л.В., Железнова Т.К., Зубалий А.М., Швыкова А.В.** Современное состояние кольчатой горлицы *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) в Ставропольском крае46

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

- Novikov Yu.M., Shevchenko A.I.** Cryptic species of *Anopheles messeae sensu lato* (Diptera: Culicidae), their identification, features, and nomenclature69

ФИЗИОЛОГИЯ

- Михайлова А.А., Белалов В.В., Дягилева Ю.О., Павленко В.Б.** Особенности изменений тета-ритма ЭЭГ при восприятии речи у детей-сирот раннего возраста86

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

- Колупаев Ю.Е., Кокорев А.И., Шклярский М.А.** Кальцийзависимое изменение активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина105
- Мурган О.К., Казакова А.Д., Ефимова М.В.** Сравнение методов экстракции РНК из растения картофеля для проведения ПЦР в реальном времени123

ЭКОЛОГИЯ

- Гиниятуллин Р.Х., Бактыбаева З.Б.** Особенности накопления Cd и Ni лиственницей Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях техногенеза141
- Лопатина Т.С., Александрова Ю.В., Анищенко О.В., Грибовская И.В., Оськина Н.А., Зотина Т.А., Задереев Е.С.** Влияние растворов противогололёдной смеси на *Moina macroscopa* и *Allium cepa* в биотестовом эксперименте162
- Рязанцев П.А., Кабонен А.В., Родионов А.И.** Определение архитектоники корневой системы деревьев методом георадиолокации179

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Andreeva I.V., Shatalova E.I., Shternshis M.V.** Environmental and anthropogenic factors influencing key cabbage Lepidopteran pests in the southwestern Siberia205
- Зверев А.А., Щёголева Н.В., Ревушкин А.С.** Выявление экологических ареалов редких высокогорных видов рода *Ranunculus* методами фитоиндикации212
- Чигодайкина Д.С., Ревушкин А.С.** Хромосомные числа полыней (*Artemisia* L.) Центрального Казахстана223

TABLE OF CONTENTS

BIOTECHNOLOGY & MICROBIOLOGY

- Sidorov AV, Zaytseva YV, Marakaev OA.** Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* on germination, morphogenesis and growth of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro*6
- Slovareva OY, Kornev KP.** Determination of analytical specificity of PCR methods for *Acidovorax citrulli* identification25

ZOOLOGY

- Malovichko LV, Zheleznova TK, Zubalii AM, Shvykova AV.** Current status of the *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) in Stavropol region.....46

CELL BIOLOGY & GENETICS

- Novikov YuM, Shevchenko AI.** Cryptic species of *Anopheles messeae sensu lato* (Diptera: Culicidae), their identification, features, and nomenclature.....69

PHYSIOLOGY

- Mikhailova AA, Belalov VV, Dyagileva YuO, Pavlenko VB.** Patterns of the EEG theta rhythm modulations when attending to speech by orphans in early childhood.....86

PLANT PHYSIOLOGY & BIOCHEMISTRY

- Kolupaev YE, Kokorev AI, Shkliarevskiy MA.** Calcium-dependent changes in the activity of antioxidant enzymes and heat resistance of wheat seedlings under the influence of exogenous putrescine.....105
- Murgan OK, Kazakova AD, Efimova MV.** Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR.....123

ECOLOGY

- Giniyatullin RKh, Baktybaeva ZB.** Features of Cd and Ni accumulation by *Larix sukaczewii* Dyl. under technogenesis141
- Lopatina TS, Aleksandrova YV, Anishchenko OV, Gribovskaya IV, Oskina NA, Zotina TA, Zadereev ES.** The effect of deicing salt solutes on *Moina macrocopa* and *Allium cepa* in a toxicity test experiment.....162
- Ryazantsev PA, Kabonen AV, Rodionov AI.** Detection of the tree root system architecture using Ground penetrating radar179

BRIEF COMMUNICATIONS

- Andreeva IV, Shatalova EI, Shternshis MV.** Environmental and anthropogenic factors influencing key cabbage Lepidopteran pests in the southwestern Siberia.....205
- Zverev AA, Shchegoleva NV, Revushkin AS.** Determination of the ecological areas of rare high-mountain *Ranunculus* species by indicator values methods.....212
- Chigodaykina DS, Revushkin AS.** Chromosome numbers of wormwoods (*Artemisia* L.) from Central Kazakhstan223

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 577.15:579.83

doi: 10.17223/19988591/51/1

А.В. Сидоров, Ю.В. Зайцева, О.А. Маракеев

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, г. Ярославль, Россия

Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro*

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, государственное задание ЯрГУ, работа № 0856-2020-0008

Установлено, что штаммы бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и *P. brassicacearum* GRT221, ассоциированные с подземными органами пальчатокоренника мясокрасного (*Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó), тубероидной орхидеей средней полосы европейской части России, синтезируют и выделяют в культуральную жидкость индоллил-3-уксусную кислоту в концентрациях от $18,2 \pm 1,30$ до $31,1 \pm 1,94$ мг/л. Внесение культуральной жидкости ассоциативных бактерий в питательную среду для культивирования *D. incarnata in vitro* способствовало ускорению прорастания зрелых семян и повышению их всхожести, увеличению темпов развития проростков, линейных размеров формирующихся ортотропного побега и придаточных корней, накоплению сырой массы. Наиболее выраженное стимулирующее действие отмечено для штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225.

Ключевые слова: *Pseudomonas*; орхидные; протокорм; ювенильное растение; супернант; индоллил-3-уксусная кислота.

Введение

Бактерии рода *Pseudomonas* являются типичными представителями почвенных микроорганизмов в составе ассоциированных с растениями микробных сообществ [1]. Они обладают способностью синтезировать фитогормоны [2], вторичные метаболиты [3], вещества с антибактериальной и фунгицидной активностями [4]. Эти бактерии также оптимизируют условия минерального питания растений [5]. Их используют в качестве основы биологических средств регуляции роста и защиты растений, рассматривают как перспективные агенты биоконтроля [1]. Бактеризация семян и проростков сельскохозяйственных культур суспензией на основе *Pseudomonas* увеличивает прирост линейных размеров и повышает урожайность [6]. Наряду с инокуляцией растений живыми клетками бактерий в культуре *in vitro* в ка-

честве компонента питательных сред используют культуральные жидкости (КЖ) микроорганизмов [7]. В исследовании на пшенице показано, что КЖ бактерий рода *Pseudomonas* способствовали увеличению энергии прорастания и всхожести семян до 15%, а также двукратному увеличению прироста линейных размеров проростков [8]. Известно, что применение КЖ бактерий может быть эффективнее, чем использование самих клеток, отмытых от КЖ [9].

Среди бактерий, ассоциированных с орхидными (Orchidaceae), также выявлены представители рода *Pseudomonas*. Они обнаружены на поверхности и внутри надземных и подземных органов как у тропических видов [10], так и у видов умеренного климата Северного полушария [11]. Исследования по симбиотическому прорастанию семян орхидных на искусственных питательных средах ранее проводились. Первая попытка инокуляции семян орхидных бактериальными культурами предпринята Кнудсоном в 1922 г. [12]. Он показал, что бактерии *Bacillus radicola* увеличивали всхожесть семян эпифитных видов *Epidendrum* и *Laelia-Cattleya*. В 90-х годах было продемонстрировано, что *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas maltophilia* и *Bacillus cereus* в комплексе с микоризными грибами способствовали прорастанию семян *Pterostylis vittata* [13]. Последние исследования показали, что бактериализация семян *Dendrobium nobile* *Pseudomonas fluorescens* штаммами бактерий *Klebsiella oxytoca*, выделенными из растения-хозяина, способствовала их прорастанию *in vitro* [10, 14, 15]. Однако при использовании живого инокулята возникает ряд сложностей: невозможность отследить конечную концентрацию ауксинов в культуральной среде, неустойчивое равновесие в моделируемой симбиотической системе, различный состав питательных сред для бактериальных и растительных культур. С практической точки зрения решением этих проблем может стать применение биостимуляторов микробного происхождения отдельно от клеток [7]. Однако исследования по влиянию КЖ ассоциативных бактерий на рост и развитие орхидных умеренного климата Северного полушария в культуре *in vitro* до настоящего времени не проводились. Между тем эти растения имеют особенности онтогенеза, связанные с длительным прорастанием семян, формированием специфических структур (протокормов, проторизомов), продолжительной подземной жизнью проростков, вторичным покоем, зависимостью в природных условиях от микосимбионта и др. [16]. Исследования влияния КЖ ассоциативных бактерий на эффективность прорастания семян, анатомо-морфологическую структуру и физиологические особенности проростков орхидных умеренного климата Северного полушария в культуре *in vitro* могут способствовать разработке технологий культивирования редких и охраняемых видов с использованием биологически активных компонентов питательных сред.

Цель работы – оценка влияния двух культуральных жидкостей ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы генеративных особей *Dactylorhiza incarnata*, на прорастание семян, морфогенез и рост

проростков пальчатокоренника мясокрасного в культуре *in vitro* как одного из представителей орхидных средней полосы европейской части России.

Материалы и методики исследования

Dactylorhiza incarnata (L.) Soó (пальчатокоренник мясокрасный) относится к орхидным с тубероидной жизненной формой, широко распространен на территории средней полосы европейской части России [17], охраняется – включен в Европейский список краснокнижных сосудистых растений, Приложение II к конвенции CITES, а также в некоторые региональные Красные книги [18].

Бактерии рода *Pseudomonas* – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и *P. brassicacearum* GRT221 выделены из ризосферы генеративных особей *D. incarnata*, произрастающих в осоково-разнотравном сообществе на дерново-подзолистой суглинистой почве (содержание гумуса в корнеобитаемом слое 5,7%, сумма поглощенных оснований – 14 мг/экв, pH – 6,3) на территории Ярославской области. Для идентификации штаммов использовали молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Геномная ДНК выделена с помощью набора ExtractDNA (Евроген) согласно инструкциям производителя. Гены 16S рРНК амплифицированы с использованием универсальных праймеров 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1512R(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT). Режим проведения ПЦР: 95 °С – 4 мин; (95 °С – 1 мин; 55 °С – 1 мин; 72 °С – 1 мин 30 с) – 30 циклов; 72 °С – 5 мин. Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле. Фрагменты размером около 1,5 т.п.н. вырезали и очищали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген) согласно инструкциям производителя. Амплифицированные фрагменты ДНК легиrowали с ДНК вектора рAL-ТА (Евроген). Секвенирование клонированной последовательности ДНК проводили, используя универсальные М13-праймеры. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в GenBank (MN469936, MN469937). Штамм *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика под регистрационным номером В–13158.

Бактерии культивировали на среде LB в условиях постоянного перемешивания на роторном шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) при температуре 30 °С в течение 5–7 суток. КЖ ассоциативных бактерий получали путем отделения бактериальной массы центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 20 мин при 4 °С (Eppendorf 5804R, Германия). КЖ стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр «Millipore» (США) с диаметром пор 0,22 мкм. Содержание индолил-3-уксусной кислоты (IAA) в КЖ исследуемых штаммов бактерий определяли колориметрическим методом с реактивом Сальковского [10]. Культуру бактерий вносили в питательную среду

Чапека с 5 мг/л триптофана и культивировали на роторном шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) при 180 об/мин при температуре 28 °С, суспензию центрифугировали 15 мин при 7 000 об/мин. К полученной КЖ добавляли реактив Сальковского (1:1) и оставляли в темноте на 20 мин при 30 °С. Аналогично поступали в вариантах со средой Чапека и дистиллированной водой. Оптическую плотность жидкости определяли на спектрофотометре Unicо-2802S/VIS (США) при 540 нм. Концентрацию IAA устанавливали по калибровочному графику, построенному на основе разведений стандартного раствора синтетической IAA.

Изучение влияния КЖ ассоциативных бактерий на прорастание семян, морфогенез и рост проростков *D. incarnata* проводили в культуре *in vitro* с использованием модифицированной питательной среды Кнудсона с активированным углем и гуматом натрия [19]. В нее дополнительно вносили стерильные КЖ ассоциативных бактерий в количестве 10% от общего объема среды. Для сравнения использовали модифицированную питательную среду Кнудсона с IAA в концентрации 1,75 мг/л (10 мкМ), а также контроль – вариант с использованием модифицированной питательной среды Кнудсона без внесения КЖ и IAA.

Посевы зрелых семян культивировали *in vitro* в течение 2 месяцев в темноте и 16 месяцев в климатической камере КС-200 (СКТБ, Россия) при интенсивности освещения 2000 лк и 16/8 фотопериоде. Для поддержания влажности питательной среды флаконы закрывали парафинизированной пленкой. Количество проросших семян определяли на 3-, 6-, 12- и 18-й месяцы культивирования. О прорастании судили по количеству образовавшихся протокормов. Полную всхожесть семян определяли по количеству проростков через 18 месяцев после посева. При описании морфогенеза *D. incarnata* в культуре *in vitro* выделяли протосому (на стадиях протокорма и проторизома) и ювенильное растение. Под протосомой понимали своеобразную форму постсеменного развития орхидных, представляющую собой метамерное или неметамерное тело, развивающееся из апикального полюса зародыша, состоящее из протокорма (1-я стадия развития протосомы) и проторизома (2-я стадия развития протосомы) с закладкой на его верхушке почки с зачатками первых листьев. Ювенильным растением называли комплексную структуру, состоящую из протосомы и первого одноосного побега с корнями и листьями [20]. Морфофизиологические параметры (линейные размеры протосом, побегов и придаточных корней, сырую массу проростков) определяли на 3-, 6-, 12- и 18-й месяцы культивирования. В каждом варианте проанализировано не менее 20 экземпляров. Повторность опыта трехкратная.

Статистическая обработка результатов проведена по стандартным методикам [21]. Данные в таблицах приведены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой ($M \pm m_M$). Оценка различий выборочных средних проведена при значении доверительной вероятности 0,95.

Результаты исследования и обсуждение

Содержание ИУК в КЖ исследуемых штаммов. Ауксины – один из важнейших компонентов культуральной среды, необходимый для размножения растений в культуре *in vitro*. Индолил-3-уксусная кислота (IAA) – наиболее характерный ауксин, продуцируемый многими бактериями [1, 22]. Экзогенная IAA контролирует широкий спектр процессов роста и развития растений: низкие концентрации стимулируют первичное удлинение корней, высокие – образование боковых корней, уменьшают длину первичных корней и увеличивают образование корневых волосков [22, 23]. Известно, что бактерии, связанные с орхидными, способны продуцировать ауксины [2, 10, 24]. В наших предыдущих исследованиях впервые показано, что бактерии, ассоциированные с растениями рода *Dactylorhiza*, также способны продуцировать ауксины [25]. Нами проведен скрининг бактерий, ассоциированных с *D. incarnata*, по их способности синтезировать IAA. Наиболее активные штаммы-продуценты этого фитогормона были отобраны для дальнейших исследований. Сравнительный анализ последовательности генов 16S рРНК показал, что филогенетически эти штаммы относятся к роду *Pseudomonas*. При этом штамм *Pseudomonas* sp. GRP225 ближе всего к виду *Pseudomonas chlororaphis*, подвид *aurantiaca* (99,93%), штамм *Pseudomonas* sp. GRT221 – к виду *Pseudomonas brassicacearum* (99,73%). Максимальное количество IAA в КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 составило $18,2 \pm 1,30$ мг/л, для *P. brassicacearum* GRT221 – $31,1 \pm 1,94$ мг/л. Ризобактерии в основном синтезируют IAA из триптофана, который в различных концентрациях присутствует в корневых экссудатах [22]. В наших исследованиях добавление триптофана значительно увеличивало количество синтезируемого ауксина. Наивысший уровень продукции IAA получен при культивировании штаммов в среде Чапека, дополненной 5 мг/л триптофана при pH 7 и инкубировании на роторном шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) (200 об/мин) при 30 °C в течение 5 дней.

Прорастание семян. На прорастание зрелых семян орхидных оказывают влияние приемы их предпосевной обработки, составы питательных сред, режимы проращивания и др. [20]. Скрининг биостимуляторов микробного происхождения, способствующих семенному размножению *D. incarnata* в культуре *in vitro*, может оказаться полезным для выяснения факторов, влияющих на рост и развитие орхидных на ранних стадиях онтогенеза.

В нашей работе показано, что к третьему месяцу прорастание зрелых семян *D. incarnata* связано с набуханием зародыша и формированием многочисленных ризоидов (рис. 1, а). При этом на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 прорастание семян достигает максимума (21%) и превышает значение в контроле в 5 раз, в опыте с IAA – в 1,8 раза (рис. 2).

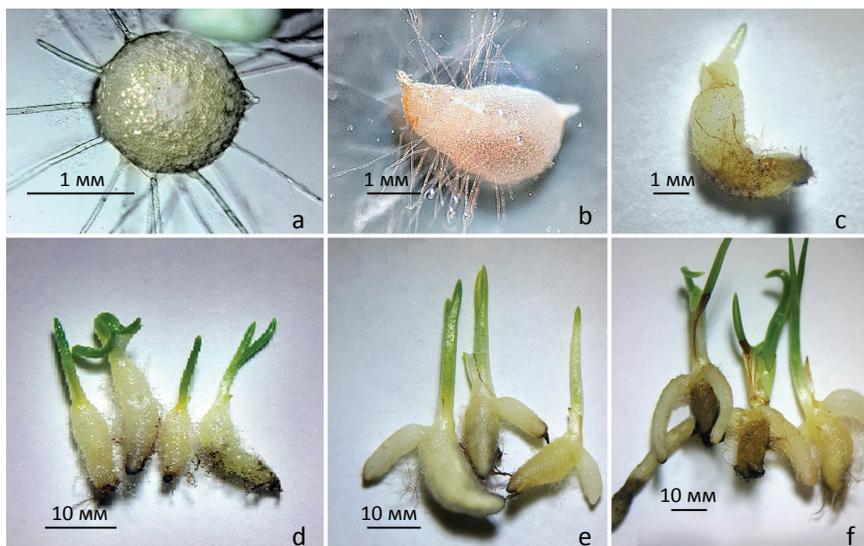


Рис. 1. Прорастание и формирование проростков *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro*: *a* – протококорм (3-й месяц); *b* – протококорм (6-й месяц); *c* – проторизом (6-й месяц); *d* – протосомы с ортоотропным побегом (12-й месяц); *e* – протосомы с придаточными корнями (18-й месяц); *f* – ювенильные растения (18-й месяц).

Автор фото А.В. Сидоров

[Fig. 1. Germination and seedling formation of *Dactylorhiza incarnata* *in vitro*: *a* - Protocorm (3rd month); *b* - Protocorm (6th month); *c* - Protorizom (6th month); *d* - Protosoms with orthotropic shoot (12th month); *e* - Seedlings with additional roots (18th month); *f* - Juvenile plants (18th month). Photo by Andrey Sidorov]

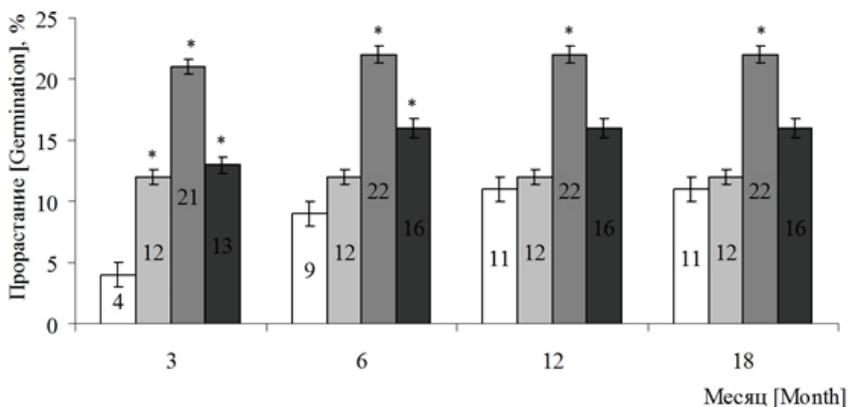


Рис. 2. Прорастание семян *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro* (%)

[Fig. 2 Germination of *Dactylorhiza incarnata* seeds *in vitro* (%):

□ – контроль (Control); ◻ – IAA; ◻ – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225;
 ◼ – *P. brassicacearum* GRT221.

Примечание. *Статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

[Note. Differences are statistically significant ($p \leq 0,05$) compared to the control]

Ранее указывалась способность *D. incarnata* (до 15% зрелых семян) к прорастанию на безгормональных питательных средах в культуре *in vitro* [26]. В случае с использованием среды с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 этот показатель оказывается выше, что может свидетельствовать о ее стимулирующем действии.

Аналогичная картина отмечена также для КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221, наиболее выраженная с 6-го месяца (см. рис. 2). При этом эффективность ее стимулирующего влияния на 27% ниже, чем у КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. КЖ двух штаммов в большей степени способствуют прорастанию семян *D. incarnata* в культуре *in vitro* по сравнению с контролем и вариантом с IAA. Известно, что внесение экзогенной IAA в питательную среду может способствовать увеличению всхожести семян тубероидных видов орхидных умеренных широт, характеризующихся трудным прорастанием в культуре *in vitro* [27]. По-видимому, IAA, содержащаяся в КЖ штаммов ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, оказывает сходное влияние. В нашей работе максимальный стимулирующий эффект воздействия на семена *D. incarnata* во всех вариантах опыта с КЖ проявляется к 6-му месяцу.

Таким образом, выявлено стимулирующее влияние КЖ штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225К и *P. brassicacearum* GRT221 на прорастание зрелых семян *D. incarnata* в культуре *in vitro*. При этом действие первой на 27% эффективнее по сравнению со второй и выражается в увеличении количества проросших семян по отношению к контролю в 5 раз и к варианту с IAA в 1,8 раза.

Морфогенез проростков. Начальные этапы роста и развития *D. incarnata* связаны с образованием из метаморфизированного апикального полюса зародыша протосомы, представленной на ранней стадии протокормом. Это утолщенное биполярное образование, способное к дальнейшему формированию структур проростка – ризоидов и проторизомов [20]. В исследованных вариантах опыта у протокормов *D. incarnata* в базальной части отмечались многочисленные ризоиды однорядного типа (см. рис. 1, *b*). На средах с IAA и КЖ штаммов ассоциативных бактерий протокормы к 3-му месяцу культивирования имели более вытянутую форму по сравнению с контролем, которая тяготеет к округлой. Известно, что форма протокормов орхидных определяется генетически, зависит от условий культивирования, активности метаболических процессов в их клетках и др. [28]. Способность ауксинов к полярному транспорту, созданию градиентов фитогормонов позволяет им по-разному изменять скорость деления и роста клеток в зависимости от органа и его положения в пространстве [29].

К 6-му месяцу большая часть посевов во всех вариантах опыта представлена проторизомами – образованиями с видоизмененными стеблями, развивающимися из апикальной зоны протокорма (см. рис. 1, *c*). Доля проторизомов к этому времени возрастает в следующем ряду: контроль – КЖ

штамма *P. brassicacearum* GRT221 – IAA – КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 (рис. 3).

Увеличение этого показателя свидетельствует о более быстрых темпах развития проростков. Дальнейшее развитие *D. incarnata* сопровождается ростом апекса и формированием ортотропного побега (см. рис. 1, *d*). К 12-му месяцу культивирования доля проростков с ортотропным побегом, в том числе имеющих уже придаточные корни, в вариантах опыта с КЖ исследуемых штаммов составляет 95–99%, в контроле – 70% (см. рис. 3). Придаточные корни к этому времени становятся хорошо различимы у проростков во всех вариантах опыта (см. рис. 1, *e*). При этом наибольшая доля (80%) развитых проростков на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. Минимальное количество (39%) проростков с корнями отмечено в контроле (см. рис. 3). К 15-му месяцу культивирования у проростков на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и IAA формируется второй придаточный корень, в то время как в контроле и варианте с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 проростки имеют один придаточный корень. Необходимо отметить, что некоторые придаточные корни проростков на средах с КЖ исследуемых штаммов бактерий и IAA разрастаются, что, вероятно, связано с приобретением ими запасующей функции. Эти особенности не проявляются в контрольном варианте.

К 15–16-му месяцам культивирования у *D. incarnata* отмечается образование первого настоящего листа (см. рис. 1, *f*), что свидетельствует о переходе в состояние ювенильных растений. Первые растения с шиловидно-линейным листом формируются на средах с исследуемыми КЖ на 1,5–2 месяца раньше, чем в контроле и варианте с IAA. К 18-му месяцу доля проростков с первым настоящим листом на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 максимальна и в 1,8–2 раза превышает этот показатель в вариантах с IAA и КЖ *P. brassicacearum* GRT221 (см. рис. 3). Менее развиты проростки в контроле, у которых к этому времени настоящие листья отсутствуют.

Таким образом, у проростков *D. incarnata* на питательных средах с КЖ отмечены более высокие темпы развития. Это проявляется в более раннем и активном формировании проторизомов, ортотропного побега, первого и второго придаточных корней. У проростков на средах с КЖ выявлено формирование запасующих корней, отсутствующих в контроле. Влияние КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 сопоставимо с действием IAA. На среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 к 18-му месяцу культивирования формируется наибольшее число проростков с фотосинтезирующим листом – ювенильных растений.

Рост проростков. Накопление сырой массы *D. incarnata* в культуре *in vitro* является интегральным параметром, отражающим наряду с водным статусом проростков содержание образующихся в них пластических соединений в процессе роста.

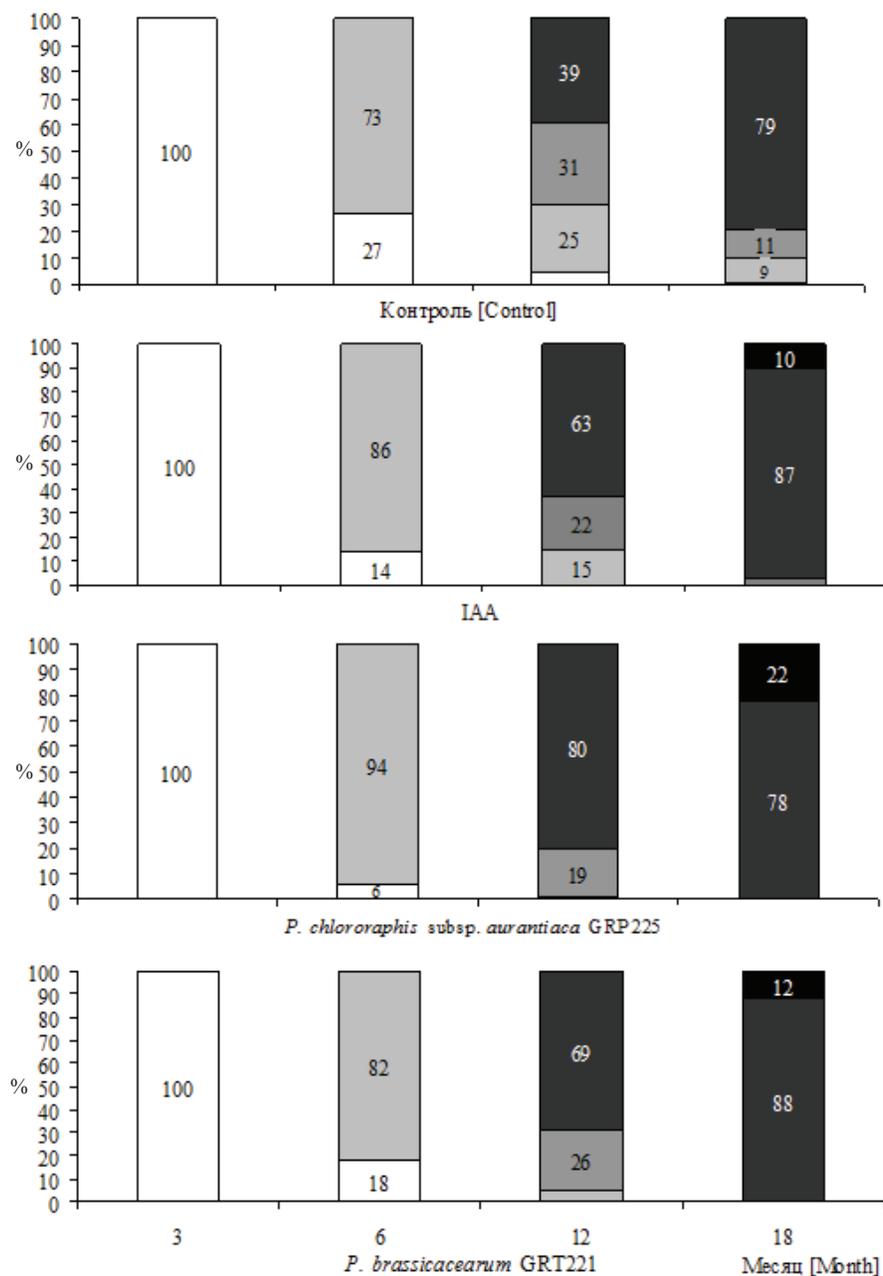


Рис. 3. Влияние КЖ ассоциативных бактерий на морфогенез *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro* (%): □ – протокормы; □ – проторизомы; □ – проростки с ортотропным побегом; ■ – проростки с придаточными корнями; ■ – ювенильные растения

[Fig. 3. Effect of supernatant of associative bacteria on the morphogenesis of *Dactylorhiza incarnata* *in vitro* (%): □ - Protocorms; □ - Protorizoms; □ - Seedlings with orthotropic shoot; ■ - Seedlings with additional roots; ■ - Juvenile plants]

на накопление массы увеличивается в следующем ряду: контроль – IAA – КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 – КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 (табл. 1).

Таблица 1 [Table 1]

Влияние КЖ ассоциативных бактерий на темпы прироста сырой массы *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro*
[Effect of supernatant of associative bacteria on the growth rate of *Dactylorhiza incarnata* wet weight *in vitro*], %

Вариант [Sample]	Месяц [Month]			
	3-й	6-й	12-й	18-й
Контроль [Control]	100	289	1 117	1 644
IAA	100	310	1 519	2 048
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> GRP225	100	350	1 717	2 458
<i>P. brassicacearum</i> GRT221	100	314	1 648	2 386

Масса проростков, формирующихся к 18-му месяцу, составляет на среде с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 – 50,1±3,11 мг и на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 – 59,0±3,91 мг. При этом она на 14–27% выше, чем в варианте с IAA, и на 40–50% превышает аналогичный показатель в контроле. Проростки *D. incarnata* на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 отличаются высокими значениями сырой массы и наибольшими темпами ее прироста в культуре *in vitro*.

Что касается линейных размеров, то первые три месяца культивирования протосомы *D. incarnata* статистически значимо ($p \leq 0,05$) различались только длиной. Она превышает показатель в контроле на 40% у проростков на среде с КЖ исследуемых штаммов бактерий и на 18% у проростков на среде с IAA (табл. 2).

Таблица 2 [Table 2]

Влияние КЖ ассоциативных бактерий на линейные размеры *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro*
[Effect of supernatant of associative *Pseudomonas* bacteria on *Dactylorhiza incarnata* linear parameters *in vitro*] (mm) ($M \pm m_{\text{н}}$)

Параметр [Parameter]	Контроль [Control]	IAA	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> GRP225	<i>P. brassicacearum</i> GRT221
3-й месяц [Third month]				
Длина, мм [Length, mm]	1,0±0,08	1,4±0,12*	1,7±0,12*	1,7±0,11*
Ширина, мм [Width, mm]	1,0±0,09	0,9±0,08	1,1±0,10	0,8±0,08
6-й месяц [Sixth month]				
Длина, мм [Length, mm]	3,1±0,16	3,4±0,19	3,7±0,19*	3,4±0,17
Ширина, мм [Width, mm]	2,1±0,13	2,3±0,13	2,9±0,16*	2,4±0,14

Окончание табл. 2 [Table 2 (end)]

Параметр [Parameter]	Контроль [Control]	IAA	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> GRP225	<i>P. brassicacearum</i> GRT221
Длина побега, мм [Shoot length, mm]	1,1±0,11	1,1±0,12	2,3±0,14*	1,6±0,13*
12-й месяц [Twelfth month]				
Длина, мм [Length, mm]	9,4±0,82	14,3±1,41*	14,1±1,34*	16,2±1,15*
Ширина, мм [Width, mm]	6,3±0,11	9,1±0,12*	12±0,11*	9,3±0,14*
Длина побега, мм [Shoot length, mm]	29,1±1,93	35,8±2,18*	48,2±2,65*	36,1±2,42*
Длина придаточных корней, мм [The length of adventitious roots, mm]	3,0±0,15	11,8±1,09*	12,1±1,03*	13,2±1,18*
18-й месяц [Eighteenth month]				
Длина, мм [Length, mm]	9,4±1,26	15,4±1,50*	14,6±1,69*	16,8±1,18*
Ширина, мм [Width, mm]	7,2±1,34	9,2±1,17	9,3±1,08	11,2±1,25*
Длина побега, мм [Shoot length, mm]	41,4±3,24	42,9±3,33	63,5±5,16*	44,3±3,15
Длина придаточных корней, мм [The length of adventitious roots, mm]	11,1±0,61	34,8±1,79*	36,2±1,32*	32,0±1,72*

* Статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.[* Differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) compared to the control].

К 6-му месяцу культивирования у проторизомов появляются различия по ширине, которая в варианте с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 оказывается больше на 28%, чем в контроле. Линейные размеры проторизомов не различаются на средах с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 и с IAA, одновременно имея несколько большие значения по сравнению с контрольным вариантом. Длина формирующегося в это время ортотропного побега у проростков на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 оказывается максимальной и более чем в 2 раза превышает аналогичные показатели у проростков в контроле и варианте с IAA (см. табл. 2).

Наиболее существенные различия линейных размеров проторизомов в исследуемых вариантах опыта отмечаются к 12-му месяцу (см. табл. 2). На среде с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 их длина на 42%, а ширина на 32% больше по сравнению с контролем. Проторизомы на средах с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и IAA не различаются по длине, однако их ширина на 24% больше в варианте с КЖ. К этому времени длина ортотропного побега у проростков существенно увеличивается и оказывается на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 на 40% выше, чем в контроле. При этом длина ортотропного побега у проростков на средах с IAA и КЖ *P. brassicacearum* GRT221 статистически значимо ($p \leq 0,05$) не различается. Придаточные корни у проростков формируются к

12-му месяцу, и их длина на среде с КЖ исследуемых штаммов бактерий и IAA в 4 раза выше по сравнению с контролем.

При дальнейшем культивировании (к 18-му месяцу) линейные размеры проторизомов в исследованных вариантах опыта меняются незначительно при активизации процессов органогенеза, связанных с активным формированием ортотропных побегов и придаточных корней. Так, у проростков на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 длина ортотропного побега оказывается максимальной и превышает более чем на 30% значения в других вариантах опыта (см. табл. 2). Темпы прироста и абсолютные значения длины придаточных корней во всех опытных вариантах являются довольно сходными, превышая контрольные значения в 3 раза.

Таким образом, ризосферные микроорганизмы и соединения, которые они выделяют, представляют собой ценные биостимуляторы и имеют существенное значение в регуляции жизнедеятельности растений [1]. Использование ассоциативных бактерий и / или их экзометаболитов может быть эффективной стратегией для управления ростом и развитием растений в культуре *in vitro*. Нами впервые показано положительное влияние двух КЖ ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы растения-хозяина, на прорастание семян, морфогенез и рост *D. incarnata* в культуре *in vitro*. Прорастание семян в этом случае происходило в отсутствие каких-либо экзогенных растительных гормонов или стимуляторов роста, которые обычно добавляют в среду. Можно предположить, что стимулирующее влияние КЖ бактерий рода *Pseudomonas* связано с присутствием в их составе ауксинов. Как известно, экзогенная обработка ауксинами вызывает целый ряд изменений показателей роста. Они участвуют в стимуляции образования придаточных корней, формировании разных типов их симметрии и проводящих систем [22, 23]. По-видимому, добавление в питательную среду КЖ ассоциативных штаммов бактерий, содержащих IAA, приводит к выявленному в работе разрастанию придаточных корней проростков *D. incarnata* и приобретению ими запасающей функции. При этом содержание IAA в КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 сопоставимо с концентрацией синтетической IAA в контроле. Используемые концентрации IAA соответствуют таковым в работах по семенному размножению *in vitro* других видов орхидных [30, 31]. Однако КЖ оказывала более выраженный эффект на рост и развитие *D. incarnata* в условиях *in vitro*. Выявленные эффекты могут быть связаны с наличием в КЖ бактерий и иных физиологически активных соединений, например сидерофоров, ацилгомосеринлактонов и др. [1, 3, 4, 32].

Данное исследование расширяет наши знания о взаимодействии орхидных и микроорганизмов, предоставляет новые возможности применения бактериальных биостимуляторов в системах культивирования, размножения и сохранения редких видов. IAA микробного происхождения обладает высоким потенциалом для стимуляции роста и развития растений в культуре *in vitro*, ее

использование более рентабельно по сравнению с синтетическими гормонами.

Заключение

Таким образом, впервые проведено изучение влияния двух КЖ ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы генеративных особей *D. incarnata*, на прорастание семян, морфогенез и рост пальчатокоренника мясокрасного в культуре *in vitro*. Использование КЖ ассоциативных бактерий – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и *P. brassicacearum* GRT221, выделенных из ризосферы *D. incarnata*, в качестве дополнительных биологически активных компонентов модифицированной питательной среды Кнудсона можно считать эффективным для ускорения прорастания зрелых семян и повышения их всхожести, увеличения темпов развития проростков, линейных размеров формирующихся ортотропного побега и придаточных корней, накопления сырой массы. Наиболее выраженное стимулирующее действие отмечено для КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225, что открывает перспективы его применения в технологии культивирования *in vitro* редких и охраняемых видов орхидных средней полосы европейской части России для их сохранения и воспроизводства.

Литература

1. Backer R., Rokem J.S., Hlangumaran G. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture // *Front Plant Sci.* 2018. Vol. 9. P. 1473. doi: [10.3389/fpls.2018.01473](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473)
2. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots // *Microbiology.* 2005. Vol. 74, № 1. PP. 46–53. doi: [10.1007/s11021-005-0027-6](https://doi.org/10.1007/s11021-005-0027-6)
3. Bhattacharya A. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation // *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.).* 2010. Vol. 39, № 2. PP. 147–155. doi: [10.4038/cjsbs.v39i2.3001](https://doi.org/10.4038/cjsbs.v39i2.3001)
4. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Исследование содержания биологически активных веществ в культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* при хранении // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.* 2012. Т. 8, № 3. С. 26–30.
5. Simons M., Bij A.J.I., Brand L.A.W., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria // *МРМІ.* 1996. № 9. PP. 600–607. doi: [10.1094/mpmi-9-0600](https://doi.org/10.1094/mpmi-9-0600)
6. Сидоренко О.Д. Действие ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // *Агрохимия.* 2001. № 8. С. 56–62.
7. Ali B., Hasnain S. Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture // *Letters in Applied Microbiology.* 2007. Vol. 45. PP. 128–133. doi: [10.1111/j.1472-765X.2007.02158.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02158.x)
8. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Действие культуральной жидкости бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на развитие семян пшеницы и фитопатогенных грибов // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.* 2012. Вып. 3. С. 198–206.

9. Саламатова Ю.А., Минаева О.М., Акимова Е.Е. Эффективность хранения ряда бактериальных препаратов в жидкой форме // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2010. № 1 (9). С. 20–28.
10. Tsavkelova E.A., Cherdynitseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I. Bacteria, associated orchid roots and microbial production of auxin // Microbiol. Res. 2007. Vol. 162. PP. 69–76. doi: [10.1016/j.micres.2006.07.014](https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.014)
11. Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Маракаев О.А., Холмогоров С.В., Осипов Г.А. Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами орхидных средней полосы России // Проблемы агрохимии и экологии. 2010. № 4. С. 30–36.
12. Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds // Bot Gazette. 1922. Vol. 73. PP. 1–25.
13. Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparam K. *et al.* Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria // Plant Soil. 1994. Vol. 159. PP. 291–295. doi: [10.1007/BF00009292](https://doi.org/10.1007/BF00009292)
14. Teixeira J.A., Tsavkelova E.A., Zeng S., Tzi Bun Ng., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J., Rao M.V. Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development // Planta. 2015. Vol. 242, № 1. PP. 1–22. doi: [10.1007/s00425-015-2301-9](https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9)
15. Pavlova A.S., Leontieva M.R., Smirnova T.A., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. J // Appl Microbiol. 2017. Vol. 123, № 1. PP. 217–232. doi: [10.1111/jam.13481](https://doi.org/10.1111/jam.13481)
16. Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). М. : Товарищество научных изданий КМК, 2014. 437 с.
17. Вахрамеева М.Г. Род Пальчатокоренник // Биологическая флора Московской области. М., 2000. Вып. 14. С. 55–86.
18. Маракаев О.А. Семейство Орхидные – Orchidaceae // В: Красная книга Ярославской области / под ред. М.А. Нянковского. Ярославль : Академия 76, 2015. С. 114–138.
19. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. Киев : Наукова думка, 1986. 197 с.
20. Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. М. : Геос, 2012. 352 с.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. М. : Высшая школа, 1990. 352 с.
22. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development // Annu Rev Plant Biol. 2010. Vol. 61. PP. 49–64. doi: [10.1146/annurev-arplant-042809-112308](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308)
23. Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati P.K. Auxin: a master regulator in plant root development // Plant Cell Rep. 2013. Vol. 32, № 6. PP. 741–757. doi: [10.1007/s00299-013-1430-5](https://doi.org/10.1007/s00299-013-1430-5)
24. Faria D.C., Dias A.C., Melo I.S., de Carvalho Costa F.E. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth // World J Microbiol Biotechnol. 2013. Vol. 29, № 2. PP. 217–221. doi: [10.1007/s11274-012-1173-4](https://doi.org/10.1007/s11274-012-1173-4)
25. Шеховцова Н.В., Маракаев О.А., Первушина К.А., Холмогоров С.В., Цапляева К.Г. Образование ауксинов эндофитными бактериями подземных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 12(131). С. 366–368.
26. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Прорастание семян и развитие проростков *in vitro* у некоторых орхидных умеренной зоны // Экология и интродукция растений на Урале. Свердловск: УрО АН СССР, 1991. С. 39–43.
27. Андронова Е.В., Батыгина Т.Б., Васильева Е.В. Протоко́рм // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / под ред. Т.Б. Батыгиной, СПб., 2000. С. 324–329.

28. Иванников Р.В. Обусловленность морфогенеза первичного протокорма орхидных // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2008. Вып. 9. С. 76–85.
29. Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // *The Plant Cell*. 2015. Vol. 27, № 1. PP. 44–63. doi: [10.1105/tpc.114.133595](https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595)
30. Nongdam P., Tikendra L. Establishment of an efficient *in vitro* regeneration protocol for rapid and mass propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. using seed culture // *Scientific World Journal*. 2014. Vol. 2014. PP. 1–8. doi: [10.1155/2014/740150](https://doi.org/10.1155/2014/740150)
31. Deb C.R., Temjensangba I. *In vitro* propagation of threatened terrestrial orchid, *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture // *Indian J. Exp Biol*. 2006. Vol. 44, № 9. PP. 762–766.
32. Зайцева Ю.В., Сидоров А.В., Маракаев О.А., Хмель И.А. Растительно-микробные взаимодействия с участием Quorum Sensing регуляции // *Микробиология*. 2019. № 88 (5). С. 519–531. doi: [10.1134/S0026261719040131](https://doi.org/10.1134/S0026261719040131)

Поступила в редакцию 04.06.2020 г.; повторно 06.08.2020 г.;
принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Сидоров Андрей Владимирович – ассистент кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14).

E-mail: sidan43@yandex.ru

Зайцева Юлия Владимировна – канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9522-010X>

E-mail: zjv9@mail.ru

Маракаев Олег Анатольевич – канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14).

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-7685-3275>

E-mail: marakaev@uniyar.ac.ru

Для цитирования: Сидоров А.В., Зайцева Ю.В., Маракаев О.А. Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro* // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 6–24. doi: [10.17223/19988591/51/1](https://doi.org/10.17223/19988591/51/1)

For citation: Sidorov AV, Zaytseva YV, Marakaev OA. Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* on germination, morphogenesis and growth of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro*. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:6-24. doi: [10.17223/19988591/51/1](https://doi.org/10.17223/19988591/51/1) In Russian, English Summary

Andrey V. Sidorov, Yulia V. Zaytseva, Oleg A. Marakaev

P.G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russian Federation

**Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas*
on germination, morphogenesis and growth
of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro***

No studies on the influence of supernatant of associative bacteria on the growth and development of orchid temperate climate of the northern hemisphere *in vitro* have been conducted to date. However, it is necessary to develop technologies for the cultivation

of rare and protected species *in vitro* using biologically active components of culture media. The aim of this research was to assess the effect of two supernatants of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* from the rhizosphere of generative individuals of *Dactylorhiza incarnata* on seed germination, morphogenesis and seedling growth of this species *in vitro*, a representative of orchids in the middle part of the European part of Russia.

We isolated bacteria of the genus *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 and *P. brassicacearum* GRT221) from the rhizosphere of generative individuals of *D. incarnata*, growing in a sedge-herb community in the middle zone of the European part of Russia (Yaroslavl region). Molecular genetic analysis of the nucleotide sequences of 16S rRNA genes was used to identify the strains. Bacteria were grown on LB medium with constant stirring for 5-7 days at 30 °C. Supernatant was obtained by separation of the bacterial mass by centrifugation (5000 rpm, 20 min, at 4 °C). The content of IAA in supernatant was determined by the Salkovsky method [Tsavkelova EA et al, 2007]. For supernatant strain *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225, this parameter was 18.2±1.30 mg/l, for *P. brassicacearum* GRT221 it was 31.1±1.94 mg/l. We carried out the study according to the following scheme: 1) a modified Knudson nutrient medium (control); 2) the same with IAA 1.75 mg/l (10 µM); 3) the same with supernatant *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 (10% of volume); 4) the same with supernatant *P. brassicacearum* GRT221 (10% of the volume). Crops of seeds were cultivated for 2 months in the dark and 16 months in the light (2000 lux, 16 h). Seed germination was judged by the amount of proto-feeds formed. The number of germinated seeds was determined at the 3rd, 6th, 12th and 18th months of cultivation by the number of formed protocorms. Full germination of seeds was determined by the number of seedlings 18 months after sowing. We distinguished a protosome and a juvenile plant when describing morphogenesis [Kolomeytseva GL et al, 2012]. The morphophysiological parameters of the seedlings (linear dimensions of protosomes, shoots and adventitious roots, the wet weight of seedlings) were determined at the 3rd, 6th, 12th and 18th months of cultivation.

We revealed a stimulating effect of supernatant of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 and *P. brassicacearum* GRT221 for the germination of mature seeds of *D. incarnata in vitro* (See Fig. 2). Moreover, the effect of the first supernatant is 27% more effective compared to the second supernatant and is expressed in an increase in the number of sprouted seeds in relation to the control 5 times and in the test with IAA 1.8 times. *D. incarnata* seedlings on nutrient media with a supernatant are characterized by accelerated rates of development (See Fig. 3). This is confirmed by the early and active formation of protorizomes, orthotropic shoots and accessory roots. The effect of the supernatant of the strain *P. brassicacearum* GRT221 coincides with the action of IAA. On a medium with supernatant *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225, more seedlings with photosynthetic leaf - juvenile plants are formed by the 18th month (See Fig. 1f). The growth parameters of *D. incarnata* seedlings on nutrient media with a supernatant are high (See Table 1 and 2). For linear sizes of protorizomes, this was noted from the 3rd month and amounts to 20-30% compared with the control. Orthotropic shoot growth is most pronounced in seedlings on a medium with supernatant *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. Its length is 30% more than the corresponding values in other tests. On the same medium, seedlings have the maximum wet weight.

Thus, the use of supernatant of associative bacteria is effective for accelerating the germination of mature seeds, increasing their germination, the rate of development of seedlings, the size of the orthotropic shoot and adventitious roots, as well as the accumulation of fresh mass. The maximum stimulating effect is shown for the supernatant of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. This opens up prospects for

its use *in vitro* cultivation of rare and protected orchid species of the middle zone of the European part of Russia for their conservation and reproduction.

The paper contains 3 Figures, 2 Tables and 32 References.

Key words: *Pseudomonas*; Orchidaceae; protocorm; juvenile plant; supernatant; indole-3-acetic acid.

Funding: This work was partially supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (Project No 0856-2020-0008).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front Plant Sci.* 2018;9:1473. doi: [10.3389/fpls.2018.01473](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473)
2. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology.* 2005;74(1):46-53. doi: [10.1007/s11021-005-0027-6](https://doi.org/10.1007/s11021-005-0027-6)
3. Bhattacharya A. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.)*. 2010;39(2):147-155. doi: [10.4038/cjsbs.v39i2.3001](https://doi.org/10.4038/cjsbs.v39i2.3001)
4. Burova YA, Ibragimova SA, Revin VV. Study of content of biologically active substances in the culture medium bacterium *Pseudomonas aureofaciens* under storage. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology.* 2012;8(3):26-30. In Russian
5. Simons M, Bij AI, Brand LW, Wijffelman CA, Lugtenberg BJ. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *MPMI.* 1996;9:600-607. doi: [10.1094/mpmi-9-0600](https://doi.org/10.1094/mpmi-9-0600)
6. Sidorenko OD. Deystvie rizosfernykh psevdomonad na urozhaynost' sel'skokhozyaystvennykh kul'tur [The effect of rhizospheric pseudomonads on crop yields]. *Agrokhimiya = Agrochemistry.* 2001;8:56-62. In Russian
7. Ali B, Hasnain S. Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture. *Letters in Applied Microbiology.* 2007;45:128-133. doi: [10.1111/j.1472-765X.2007.02158.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02158.x)
8. Burova YA, Ibragimova SA, Revin VV. Deystvie kul'tural'noy zhidkosti bakteriy *Pseudomonas aureofaciens* na razvitie semyan pshenitsy i fitopatogennykh gribov [The study of the culture fluid of bacteria *Pseudomonas aureofaciens* on the development seeds of wheat and phytopathogens]. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki = Izvestiya Tula State University. Natural sciences.* 2012;3:198-206. In Russian
9. Salamatova YA, Minaeva OM, Akimova EE. Effectiveness of storing some bacterial preparations in liquid form. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2010;1(9):20-28. In Russian, English Summary
10. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. Bacteria, associated orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* 2007;162:69-76. doi: [10.1016/j.micres.2006.07.014](https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.014)
11. Shekhovtsova NV, Pervushina KA, Marakaev OA, Kholmogorov SV, Osipov GA. Mikroorganizmy, assotsiirovannye s podzemnymi organami orkhidnykh sredney polosy Rossii [Microorganisms associated with underground organs of Central Russia ORCHIDACEAE]. *Problemy Agrohimii i Ekologii.* 2010;4:30-36. In Russian
12. Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gazette.* 1922;73:1-25.
13. Wilkinson KG, Dixon KW, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil.* 1994;159:291-295. doi: [10.1007/BF00009292](https://doi.org/10.1007/BF00009292)

14. Teixeira JA, Tsavkelova EA, Zeng S, Tzi Bun Ng, Parthibhan S, Dobránszki J, Cardoso J, Rao MV. Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*. 2015;242(1):1-22. doi: [10.1007/s00425-015-2301-9](https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9)
15. Pavlova AS, Leontieva MR, Smirnova TA, Kolomeitseva GL, Netrusov AI, Tsavkelova EA. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. *J. Appl Microbiol*. 2017;123(1):217-232. doi: [10.1111/jam.13481](https://doi.org/10.1111/jam.13481)
16. Vakhrameeva MG, Varlygina TI, Tatarenko IV. Orkhidnye Rossii (biologiya, ekologiya i okhrana) [Orchids of Russia: Biology, ecology and protection]. Moscow: KMK Scientific Press LTD; 2014. 437 p. In Russian
17. Vakhrameeva MG. *Dactylorhiza*. In: *Biologicheskaya flora Moskovskoy oblasti* [Biological flora of Moscow region]. Pavlov VN, editor. Moscow: "Grif i Ko" Publ.; 2000. Iss. 14. pp. 55-68. In Russian
18. Marakaev OA. Orchidaceae. In: *Krasnaya kniga Yaroslavskoy oblasti* [The Red Data Book of the Yaroslavl region]. Nyankovskiy MA, editor. Yaroslavl: Akademiya 76 Publ.; 2015. pp. 114-138. In Russian. Available at: <http://oopt.aari.ru/ref/1722> (access 25.05.2020)
19. Cherevchenko TM, Kushnir GP. Orkhidei v kul'ture [Orchids in culture]. Kiev: Naukova dumka Publ.; 1986. 197 p. In Russian
20. Kolomeytseva GL, Antipina VA, Shirokov AI, Khomutovskiy MI, Babosha AV, Ryabchenko AS. Semena orkhidey: razvitie, struktura, prorastanie [Orchid seeds: Development, structure, germination]. Moscow: Geos Publ.; 2012. 352 p. In Russian
21. Lakin GF. Biometriya [Biometry]. Moscow: Vysshaya shkola Publ.; 1990. 352 p. In Russian
22. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61:49-64. doi: [10.1146/annurev-arplant-042809-112308](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308)
23. Saini S, Sharma I, Kaur N, Pati PK. Auxin: A master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep*. 2013;32(6):741-757. doi: [10.1007/s00299-013-1430-5](https://doi.org/10.1007/s00299-013-1430-5)
24. Faria DC, Dias AC, Melo IS, de Carvalho Costa FE. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29(2):217-221. doi: [10.1007/s11274-012-1173-4](https://doi.org/10.1007/s11274-012-1173-4)
25. Shekhovtsova NV, Marakaev OA, Pervushina KA, Kholmogorov SV, Tsaplyaeva KG. Auxine production by endophytic bacteria from underground organs of *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae). *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta*. 2011;12(131):366-368. In Russian, English Summary
26. Kulikov PV, Filippov EG. Prorastanie semyan i razvitie prorostkov *in vitro* u nekotorykh orkhidnykh umerennoy zony [Seed germination and *in vitro* seedling development in some orchid temperate zones]. *Ekologiya i introduktsiya rasteniy na Urale* [Ecology and introduction of plants in the Urals]. Sverdlovsk: UrO AN SSSR Publ.; 1991. pp. 9-43. In Russian
27. Andronova EV, Batygina TB, Vasil'eva EV. Protokorm. In: *Embriologiya tsvetkovykh rasteniy. Terminologiya i kontseptsii* [Embryology of Flowering Plants: Terminology and Concepts]. Batygina TB, editor. Saint Petersburg: Mir & Sem'ya Publ.; 2000; Vol. 3. pp. 324-329. In Russian
28. Ivannikov RV. Obuslovlennost' morfogeneza pervichnogo protokorma orkhidnykh [Conditionality of a morphogenesis of orchids primary protocorm]. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Biologiya i ekologiya = Herald of Tver State University. Series: Biology and Ecology*. 2008;9:76-85. In Russian
29. Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ. The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*. 2015;27(1):44-63. doi: [10.1105/tpc.114.133595](https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595)

30. Nongdam P, Tikendra L. Establishment of an efficient *in vitro* regeneration protocol for rapid and mass propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. using seed culture. *Scientific World Journal*. 2014;2014:1-8. doi: [10.1155/2014/740150](https://doi.org/10.1155/2014/740150)
31. Deb CR, Temjensangba I. *In vitro* propagation of threatened terrestrial orchid, *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture. *Indian J Exp Biol*. 2006;44(9):762-766.
32. Zaytseva YuV, Sidorov AV, Marakaev OA, Khmel' IA. Plant-Microbial interactions involving quorum sensing regulation. *Mikrobiology*. 2019;88(5):519-531. doi: [10.1134/S0026261719040131](https://doi.org/10.1134/S0026261719040131)

*Received 04 June 2020; Revised 06 August 2020;
Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020*

Author info:

Sidorov Andrey V, Assistant, Department of Botany and Microbiology, Faculty of Biology and Ecology, P.G. Demidov Yaroslavl State University, 14 Sovetskaya Str., Yaroslavl 150003, Russian Federation.

E-mail: sidan43@yandex.ru

Zaytseva Yulia V, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Botany and Microbiology, Faculty of Biology and Ecology, P.G. Demidov Yaroslavl State University, 14 Sovetskaya Str., Yaroslavl 150003, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9522-010X>

E-mail: zjv9@mail.ru

Marakaev Oleg A, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Botany and Microbiology, Faculty of Biology and Ecology, P.G. Demidov Yaroslavl State University, 14 Sovetskaya Str., Yaroslavl 150003, Russian Federation.

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-7685-3275>

E-mail: marakaev@uniyar.ac.ru

УДК 579.64:632.3.01/08
doi: 10.17223/19988591/51/2

О.Ю. Словарева^{1,2}, К.П. Корнев²

¹ Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия

² Всероссийский центр карантина растений, рп. Быково, Россия

Определение аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *Acidovorax citrulli*

Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) – значимый объект в области карантина растений. Исследование посвящено определению аналитической специфичности (АС) молекулярно-генетических методов идентификации фитопатогена. ДНК 5 штаммов *A. citrulli*, а также 53 бактерий, не относящихся к *A. citrulli*, и ДНК из 106 образцов микробиоты тыквенных культур тестировали с помощью ПЦР-методов *Acit 1 F/R*, *Acit 1-probe*, «*Acidovorax citrulli-PB*» «Синтол», *Acidovorax citrulli-Rt* «АгроДиагностика», *AC158F/AC158R*, *SEQ ID 3/4*, *PL1/PL2* и *G12AcFwd/G12AcRev*. Для каждого метода оценивали АС, исходя из определения таких ее критериев, как инклюзивность (отсутствие ложноотрицательных результатов) и эксклюзивность (отсутствие ложноположительных результатов), выраженных в процентах. Метод оценивали как специфичный при значениях каждого из показателей 99% и более. Установлено, что ПЦР-*PB Acit 1 F/R*, *Acit 1-probe*, набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур «*Acidovorax citrulli-PB*» «Синтол», комплект реагентов для диагностики бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* в формате *Rt* «АгроДиагностика» и ПЦР с праймерами *AC158F/AC158R* не являются специфичными в связи с низким значением эксклюзивности. При этом ПЦР с праймерами *SEQ ID 3/4*, *PL1/PL2* и *G12AcFwd/G12AcRev* – высокоспецифичные методы и могут применяться исследователями для идентификации *A. citrulli*. Все апробированные методы показали отсутствие ложноотрицательных результатов, что позволяет использовать их для выявления образцов, свободных от *A. citrulli*.

Ключевые слова: ПЦР; карантин растений; диагностика фитопатогенов.

Введение

Acidovorax citrulli (Schaad et al.) – это фитопатогенная бактерия – возбудителем бактериальной пятнистости тыквенных культур. Первые сообщения о фитопатогене появились в 1965 г., когда R.E. Webb & R.W. Goth [1] описали возбудителя, выделенного из рассады арбузов. Идентификацию и классификацию бактерии как *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* провел американский ученый N.W. Schaad в 1978 г. [2]. В 1992 г., основы-

ваясь на экспериментах по гибридизации ДНК, Willems et al. предложили перенести несколько видов фитопатогенных *Pseudomonas* в род *Acidovorax*. Таким образом, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* реклассифицировали как *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [3].

Бактерия патогенна в отношении следующих растений: семейство Cucurbitaceae: *Citrullus lanatus*, *Citrullus lanatus* var. *citroides*, *Cucumis melo*, *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, *Cucumis sativus*, *Cucumis anguria*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita pepo* subsp. *ovifera*, *Cucurbita pepo* var. *giromontia*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*; семейство Piperaceae: *Piper betle* [4, 5].

Вскоре после обнаружения бактерия проникла из США на территории стран Азии, Европы и Океании. Причину распространения связывают с международной торговлей семенами [2, 6]. В последние годы все больше отмечается повышение агрессивности фитопатогенных бактерий в отношении растений-хозяев [7–10], и *A. citrulli*, в зависимости от условий окружающей среды, может уничтожать от 5 до 100% урожая тыквенных культур [11].

Ввиду того, что *A. citrulli* может наносить существенный вред производству тыквенных культур, проникновение и распространение данного фитопатогена контролируется странами Европейской и средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР). Также *A. citrulli* пристально изучается учеными по всему миру. Однако, несмотря на предпринимаемые меры контроля, найден свежий отчет о выявлении данной бактерии в европейских странах [12]. Таким образом, не теряет свою актуальность потребность в разработке комплекса мер по контролю распространения возбудителей болезней растений [13], и, в частности, *A. citrulli*; центральным звеном такого комплекса является своевременная диагностика [14].

При выявлении возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур целесообразно руководствоваться наличием или отсутствием симптомов, так как болезнь может протекать в скрытой форме. Следует отметить, что зачастую инфекция не препятствует образованию семян, на которых симптомы заражения не проявляются [2, 14]. Поэтому основной этап обнаружения фитопатогена проходит в рамках лабораторной диагностики.

Согласно существующим нормативным документам, регламентирующим процедуру диагностики *A. citrulli* в Российской Федерации – Международный стандарт РМ7/127(1) [15] и МР 67-2015 ВНИИКР, идентификация патогена проводится в лаборатории с использованием методов на основе ПЦР, и именно результаты применения данных методов являются определяющими. В связи с этим к используемым методам предъявляют строгие требования по оценке их применимости. Такой критерий, как аналитическая специфичность (АС), показывающий способность теста достоверно отличать целевой организм от нецелевых, является неотъемлемой составляющей определения применимости диагностического метода, что отражено в Международном стандарте РМ 7/76 (5) об использовании диагностических протоколов [16]. Оценка АС молекулярно-генетических методов идентификации бактерий,

согласно Международному стандарту РМ 7/98 (3), базируется на двух параметрах – инклюзивность (inclusivity) и эксклюзивность (exclusivity). Инклюзивность показывает способность метода идентифицировать штаммы целевой бактерии, представляющие все генетическое разнообразие, различное географическое происхождение и растения-хозяева. Эксклюзивность показывает способность метода отличать нецелевые бактерии, особенно те, которые могут находиться в ДНК-матрице образцов микробиоты растений-хозяев целевого микроорганизма [17].

Цель работы – оценка аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *A. citrulli*.

Материалы и методики исследования

Определение АС проводили со штаммами *A. citrulli*, бактериальными штаммами, не относящимися к виду *A. citrulli*, и образцами ДНК, выделенной из различных сортов и видов растений семейства Cucurbitaceae.

В данном исследовании оценивали АС методов ПЦР, видоспецифичных для *A. citrulli*. Ввиду того, что мишенями для ПЦР являлись различные участки генома *A. citrulli*, данную бактерию следует считать целевой. Способность метода ПЦР идентифицировать все штаммы целевой бактерии (отношение числа положительных результатов к общему числу проведенных тестов, выраженное в процентах) характеризует инклюзивность метода ПЦР [17].

Генетическое разнообразие *A. citrulli* в рамках исследования представлено изолятами, выделенными из растений *Citrullus lanatus* в США, Испании и Китая и позднее заложенными в Испанской коллекции фитопатогенов Института сельскохозяйственных исследований (IVIA), г. Валенсия, под номерами 51, 2609 и 3000 соответственно, а также штаммами DLS 1035 и DLS 1456 из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (далее – DSMZ).

Бактерии, не относящиеся к виду *A. citrulli*, участки генома которых не представляли собой мишень для ПЦР, считали нецелевыми согласно Международному стандарту РМ 7/98 (3). Отношение числа отрицательных результатов к общему числу проведенных ПЦР-тестов, выраженное в процентах, полученное при тестировании нецелевых бактерий, характеризует эксклюзивность метода ПЦР. При этом чем большее количество нецелевых бактерий протестировано и чем больше их видовое разнообразие, тем выше достоверность определения эксклюзивности [17]. Для оценки АС использовали 19 штаммов, полученных из зарубежных коллекций, а также 28 бактериальных изолятов, выделенных в лаборатории бактериологии Всероссийского центра карантина растений (ВНИИКР) в различные периоды времени из различных видов растений и заложенных в коллекцию бактериологических культур ВНИИКР.

Таблица 1 [Table 1]

Используемые бактериальные изоляты
[Used bacterial isolates]

Бактерия [Bacterium]	№ штамма ВНИИКР [№ of strain of VNIICKR]	Дата вы- деления [Isolation date]	Растение [Plant]
<i>Arthrobacter castelli</i>	0073	30.04.2013	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	0341	16.01.2019	<i>Citrullus lanatus</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	0342	16.01.2019	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>
<i>Bacillus</i> sp.	0320	08.10.2018	<i>Citrullus lanatus</i>
<i>Burkholderia</i> sp.	0287	06.05.2016	<i>Musa</i>
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0049	28.02.2013	<i>Brassica oleracea</i>
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0239	26.02.2015	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0047	08.07.2015	<i>Crataegus oxyacantha</i>
<i>Erwinia billingiae</i>	0044	30.11.2018	<i>Malus domestica</i>
<i>Erwinia piriflorinigrans</i>	0109	12.12.2013	<i>Pyrus communis</i>
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	0078	29.11.2013	<i>Prunus persica</i>
<i>Microbacterium</i> <i>phyllosphaerae</i>	0340	16.01.2019	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>
<i>Microbacterium</i> sp.	0300	17.03.2017	<i>Zea mays</i>
<i>Ochrobactrum anthropic</i>	0048	08.07.2015	<i>Pyrus communis</i>
<i>Ochrobactrum</i> sp.	0043	30.01.2013	<i>Pyrus communis</i>
<i>Pantoea</i> sp.	0409	17.10.2018	<i>Glycine max</i>
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	0120	15.07.2015	<i>Zea mays</i> var. <i>rugose</i>
<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	0370	07.03.2018	<i>Glycine max</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	0033	18.02.2013	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0222	17.10.2014	<i>Prunus avium</i>
<i>Rahnella aquantilis</i>	0181	03.10.2014	<i>Rosa</i>
<i>Ralstonia</i> <i>pseudosolanacearum</i>	0030	28.11.2017	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0339	11.01.2019	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>
<i>Xanthomonas</i> <i>arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	0149	06.10.2014	<i>Prunus domestica</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0226	20.10.2014	<i>Brassica oleracea</i>
<i>Xanthomonas hortorum</i>	0170	30.09.2013	<i>Pelargonium</i>
<i>Xylella fastidiosa</i>	0306	05.10.2017	<i>Olea europaea</i>
<i>Xylophilus ampelinus</i>	0050	18.02.2013	<i>Vitis vinifera</i>

Примечание: ВНИИКР – Всероссийский центр карантина растений.
[Note: VNIICKR - All-Russian Plant Quarantine Center].

Использовали следующие штаммы из зарубежных коллекций: *Acidovorax cattleya* NBC 430 (DSMZ), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 2137 (Национальная коллекция фитопатогенных бактерий (Великобритания), далее – NCPPB), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

CFBP 3418 (Коллекция связанных с растениями бактерий (Франция), далее – CFBP), *Dickeya solani* DSMZ 28711, *Erwinia amylovora* CFBP 1430, CFBP 3025, NCPPB 683T, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2315, *Rathayibacter tritici* CFBP 1385, *Pantoea agglomerans* DSM 1619 (DSMZ), *Pectobacterium atrosepticum* DSM 18077 (DSMZ), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* DSM 30168 (DSMZ), *Pseudomonas congelans* ICMP 9032 (Международная коллекция микроорганизмов растений Новой Зеландии и Тихого океана ICMP), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* CFBP 2214, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* CFBP 1390, *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* CFBP 6369, *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* NCPPB 1946, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* NCPPB 3002, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* CFBP 2286. Также использовали бактериальные изоляты из коллекции ВНИИКР (табл. 1).

Для оценки АС, руководствуясь Международным стандартом РМ 7/98 (3), использовали максимально доступное количество бактерий, отличающихся видовой принадлежностью, географическим происхождением и периодом изоляции, выделенных не только из тыквенных культур, но и из других растений.

Выявление и идентификацию *A. citrulli* проводят, в основном, в образцах тыквенных культур. Чем большее количество потенциальных растений-хозяев протестировано, тем выше достоверность оценки АС [17]. В связи с этим для исследования отбирали максимально доступное количество различных образцов тыквенных культур, свободных от *A. citrulli*; всего использовали 106 образцов, 30 из которых – вегетативные части растений, а 76 – семенной материал (табл. 2).

Процесс подготовки аналитических проб из растений заключался в следующем: от каждого образца растений отбирали 5–7 фрагментов стеблей и листьев и измельчали с помощью скальпеля. Навеску массой 2,5–3,0 г от полученной пробы помещали в пластмассовые емкости объемом 120 мл. Для взвешивания проб использовали весы лабораторные электронные АН-4200СЕ «Vibra» (Япония). К каждой пробе добавляли 20 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) [18]. Емкости с пробами встряхивали на ротационном шейкере Unimax 2010 «Heidolph» (Германия) при режиме 200 оборотов в минуту (об/мин) в течение 45 минут. Затем жидкость из емкостей переливали в центрифужные пробирки объемом 50 мл, пропуская через бумажные фильтры «Синяя лента» с размером пор 3–5 микрон. Пробирки центрифугировали в течение 15 минут при режиме 10000 g, 4 °С, используя высокоскоростную центрифугу Allegra X-30R «Beckman Coulter» (Дания). Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS.

Аналитические пробы семян подготавливали следующим образом: от каждого образца семян отбирали навеску массой 10 г, помещали в пластмассовую емкость и добавляли к каждой навеске 20 мл PBS. Емкости с пробами встряхивали на ротационном шейкере при режиме 90 об/мин в течение 24 часов. Затем жидкость из емкостей переливали в центрифужные пробир-

ки и центрифугировали в течение 10 минут при режиме 1200 g, 4 °С. Супернатант аккуратно переливали в чистые пробирки и повторно центрифугировали в течение 15 минут при режиме 10000 g, 4 °С. Затем супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS.

ДНК из полученных аналитических проб выделяли с помощью набора «Проба-ГС» («АгроДиагностика», Россия).

Постановку ПЦР для каждого исследуемого образца ДНК, выделенной из аналитических проб тыквенных культур, а также из коллекционных штаммов бактерий и бактериальных изолятов, осуществляли в 3-кратной повторности по каждому из следующих методов:

1. ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) Acit 1 F/R, Acit 1-probe (Woudt et al, 2009) [15], где мишенью является участок IS1002, расположенный в последовательности генома штамма AAC00-1 *A. citrull*. Последовательности праймеров и зонда: Acit 1-F IS1002: 5'-GAG TCT CAC GAG GTT GTT-3', Acit 1-R IS1002: 5'-GAC CCT ACG AAA GCT CAG-3', Acit 1-probe IS1002: 5'-6FAM-TGC AGC CCT TCA TTG ACG G-BHQ1-3'. Праймеры и зонд произведены ООО «Евроген» (Россия). Кроме олигонуклеотидов, ПЦР-смесь содержала готовый ПЦР-буфер 5X Mas^{CE}TaqMIX-2025 («Диалат», Россия) и готовую смесь для проведения внутреннего положительного контроля (ВПК) («Синтол», Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовали амплификатор детектирующий ДТпрайм производства фирмы ООО «ДНК-Технология» (Россия).

2. Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол» (Россия) (далее – *Acidovorax citrulli*-РВ «Синтол»). ПЦР проводили согласно инструкции производителя, используя амплификатор детектирующий ДТпрайм «ДНК-Технология» (Россия).

3. Комплект реагентов для диагностики бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* в формате Rt «АгроДиагностика» (Россия) (далее – *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика»). ПЦР проводили согласно инструкции производителя, используя амплификатор детектирующий ДТпрайм «ДНК-Технология» (Россия).

4. Классическая ПЦР с праймерами AC158F/AC158R (Cho et al., 2015) [19], где целевой последовательностью является YD-repeat protein. Размер ПЦР-продукта 158 н.п. Последовательности праймеров: AC158 F: 5'-СТТ GGT GCT CCA TGC TCGA-3', AC158 R: 5'-GGC TTG GTT GCG AAT TCA CT-3'.

5. Классическая ПЦР с праймерами SEQ ID 3/4 (Schaad et al., 2000) [15], где мишенью служит участок рДНК внутреннего спейсерного региона. Размер продукта амплификации 450 н.п. Последовательности праймеров: SEQ ID NO3: 5'-GGA AGA ATT CGG TGC TAC CC-3', SEQ ID NO4: 5'-TCG TCA TTA CTG AAT TTC AAC A-3'.

6. Классическая ПЦР с праймерами PL1/PL2 (Zhong et al., 2015) [20], мишень – Aave_2768, ген pilL в последовательности генома штамма AAC00-1

A. citrull. Размер продукта амплификации 332 н.п. Последовательности праймеров: PL1 5'-GTC CGA GCG TAC GTT GAG-3', PL2 5'-ACG GCA CCT GAC CCG TTG-3'.

7. Классическая ПЦР с праймерами G12AcFwd/G12AcRev (Zivanovic & Walcott, 2017) [21], мишень – Aave_2166, предполагаемый ген эффектора секреции 3-го типа. Размер продукта амплификации 291 н.п. Последовательности праймеров: G12AcFwd: 5'-CCGAAGAGATAACACTGCATC-3', G12AcRev: 5'-ACG TAC TGC CGA TTT TTG C-3'.

Для приготовления всех смесей классических ПЦР использовали буфер 5X Mas^{DD}TaqMIX-2025 («Диалат», Россия). Праймеры произведены ООО «Евроген» (Россия). ПЦР проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Для детекции использовали метод электрофореза в 1,5% агарозном геле, результаты анализировали с помощью гельдокументирующей системы «BioRad» (США).

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) для каждого метода ПЦР использовали ДНК *A. citrulli* в концентрации 10⁶ генетических копий в 1 мл. Концентрацию определяли с помощью прибора для измерения концентрации нуклеиновых кислот NanoDrop-2000 («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) использовали воду.

Результат теста ПЦР-РВ (Acit 1 F/R, Acit 1-probe, *Acidovorax citrulli*-РВ «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика») считали отрицательным, если накопление флуоресценции по каналу детекции специфичной реакции с ДНК образца и ОКО отсутствовало, а с ДНК ПКО показывало характерную экспоненциальную кривую; при этом накопление флуоресценции по каналу детекции ВПК показывало характерную экспоненциальную кривую в реакциях со всеми образцами ДНК. Результат теста ПЦР-РВ считали положительным, если накопление флуоресценции по каналу детекции специфичной реакции с ДНК образца и ПКО показывало характерную экспоненциальную кривую, а в ОКО реакция отсутствовала.

Результат классической ПЦР (AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2, G12AcFwd/G12AcRev) считали отрицательным, если продукт амплификации с ДНК образца и ОКО отсутствовал, а с ДНК ПКО амплификация привела к образованию характерного для метода продукта реакции (158 н.п. для AC158F/AC158R, 450 н.п. для SEQ ID 3/4, 332 н.п. для PL1/PL2 и 254 н.п. для G12AcFwd/G12AcRev). Результат классической ПЦР считали положительным, если амплификация с ДНК образца привела к образованию характерного для метода продукта реакции, а с ОКО продукт реакции отсутствовал.

Значение инклюзивности для каждого метода ПЦР определяли как отношение достоверных положительных результатов к общему числу проведенных реакций, выраженное в процентах (при тестировании образцов ДНК *A. citrulli*).

Значение эксклюзивности определяли как отношение достоверных отрицательных результатов к общему числу проведенных реакций, выраженное в процентах (при тестировании образцов ДНК бактерий, не относящихся к виду *A. citrulli*, а также при тестировании образцов ДНК из аналитических проб, свободных от *A. citrulli*).

Оценку аналитической специфичности присваивали каждому из методов, исходя из анализа параметров инклюзивности и эксклюзивности. Заключение о специфичности метода делали при значениях показателей инклюзивности и эксклюзивности 99% или выше.

Изоляцию бактерий проводили из аналитических проб тыквенных культур, показавших хотя бы один положительный результат при тестировании любым из приведенных выше методов ПЦР (см. табл. 2). Высеивали по 100 мкл 100- и 1000-кратного разведений аналитических проб методом Дригальского [22] на чашки Петри с питательной средой Кинга Б [23]. Чашки Петри после посева плотно оборачивали герметизирующей пленкой Parafilm («Nuova Aptaca», Италия) и инкубировали в течение 72 часов при температуре 27 °С, используя инкубатор MIR-254 («Panasonic (Sanyo)», Япония).

Отдельные бактериальные колонии различных морфотипов всех выросших колоний пересеивали на новые чашки Петри со средой Кинга Б, используя стерильную микробиологическую петлю. Чашки Петри, обернутые пленкой Parafilm, инкубировали при температуре 27 °С в течение 72 ч. Затем от каждого изолята с помощью бактериологической петли отбирали отдельные колонии и помещали в микропробирки с 200 мкл PBS. Таким образом, получали бактериальные суспензии, из которых выделяли ДНК при помощи автоматизированной станции Freedom Evo («Tecan», Швейцария) и наборов «М-СорбТуб-Автомат-48» («Синтол», Россия). Полученные образцы ДНК тестировали методом ПЦР-PB Acit 1 F/R, Acit 1-probe. Образцы ДНК, выделенной из бактериальных изолятов, положительных в результате тестирования методом ПЦР-PB Acit 1 F/R, Acit 1-probe, идентифицировали методом секвенирования. Для этого с ДНК бактериальных изолятов проводили ПЦР с праймерами 8UA/519B для участка 16S рПНК, размер продукта амплификации 500 н.п. Последовательности праймеров: 8UA: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 519B: 5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3' производства фирмы ООО «Евроген» (Россия). Для приготовления реакционной смеси использовали на один образец: 14 мкл деионизированной воды, 5 мкл мастер-микса 5X Mas^{DP}TaqMIX-2025 производства фирмы ЗАО «Диалат» (Россия), по 2 мкл каждого праймера в концентрации 10 пкм. Затем в микропробирку вносили 2 мкл ДНК-матрицы образца. Программа амплификации: начальная денатурация 96 °С – 10 минут, затем 35 циклов 95 °С – 15 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; финальная элонгация 72 °С – 10 минут. Для амплификации использовали T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). ПЦР-продукты анализировали методом определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) по Сэнгеру [24], используя секвенатор AB-3500 («Applied Biosystems», США, Япония).

Таблица 2 [Table 2]

**Результаты тестирования образцов ДНК
из семян тыквенных культур методами ПЦР
[PCR results with DNA from plant material of cucurbit crops]**

Культура [Crop]	Сорт / гибрид [Variety/ hybrid]	1	2	3	4	5	6	7
<i>Citrullus lanatus</i>	Кримстар F1 [Krimstar F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Кримсон Рекорд F1 [Krimson Rekord F1]	-	-	-	-	-	-	-
	АУ Продюсер F1 [AU Prodyuser F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Огонёк [Ogonek]	-	-	-	-	-	-	-
	Сахарный Малыш [Sugar Baby]	+	+	-	-	-	-	-
	Кримсон Свит [Crimson Sweet]	-	-	-	-	-	-	-
	Сибирские огни [Sibirskiye ogni]	+	+	+	-	-	-	-
<i>Cucumis melo</i>	Холодок [Kholodok]	-	-	-	-	-	-	-
	Золотистая [Zolotistaya]	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>giromontia</i>	Колхозница [Kolkhoznitsa]	-	-	-	-	-	-	-
	Искандер F1 [Iskander F1]	+	+	+	+	-	-	-
	Куанд [Kuand]	-	-	-	-	-	-	-
	Цукеша [Tsukeshya]	+	+	+	-	-	-	-
	Якорь [Yakor]	-	-	-	-	-	-	-
	Ролик [Rolik]	-	-	-	-	-	-	-
	Белоплодный [Beloplodnyy]	-	-	-	-	-	-	-
	Аэронавт [Aeronavt]	+	+	+	-	-	-	-
	Белогор F1 [Belogor F1]	+	+	+	+	-	-	-
	Изумруд [Izumrud]	-	-	-	-	-	-	-
	Анна [Anna]	-	-	-	-	-	-	-
	Кавили F1 [Kavili F1]	+	+	-	-	-	-	-
	Камили F1 [Kamili F1]	+	+	+	+	-	-	-
Скворушка [Skvorushka]	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>ovifera</i>	Бетси F1 [Betsy F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Квета Мс [Kveta Ms]	-	-	-	-	-	-	-
	Зонтик [Zontik]	+	+	+	-	-	-	-
	НЛО оранжевый [NLO Oranzhevyiy]	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cucumis sativus</i>	Санни Делайт F1 [Sunny Delight F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Белые 13 [Belye 13]	-	-	-	-	-	-	-
	Форсаж F1 [Forsazh F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Ласточка F1 [Lastochka F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Вязниковский 37 [Vyaznikovskiy 37]	-	-	-	-	-	-	-
	Практик F1 [Praktik F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Голубчик F1 [Golubchik F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Феникс [Feniks]	-	-	-	-	-	-	-
	Феникс Плюс [Feniks Plyus]	-	-	-	-	-	-	-
	Дружок F1 [Druzhok F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Засолочный [Zasolochnyy]	-	-	-	-	-	-	-
	Конкурент [Konkurent]	-	-	-	-	-	-	-
	Родничок F1 [Rodnichok F1]	-	-	+	-	-	-	-
	Журавлёнок F1 [Zhuravlenok F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Дальневосточный 27 [Dal'nevostochnyy 27]	-	-	-	-	-	-	-
	Амур 1801 F1 [Amur 1801 F1]	-	-	-	-	-	-	-
Артист F1 [Artist F1]	-	-	-	-	-	-	-	
Астерикс F1 [Asteriks F1]	-	-	-	-	-	-	-	
Верные друзья F1 [Vernye druz'ya F1]	+	+	-	-	-	-	-	
Весёлая семейка F1 [Veselaya semeyka F1]	+	+	-	-	-	-	-	
Дачный посол F1 [Dachnyy posol F1]	+	+	+	-	-	-	-	

Окончание табл. 2 [Table 2 (end)]

Культура [Crop]	Сорт / гибрид [Variety/ hybrid]	1	2	3	4	5	6	7
<i>Cucumis sativus</i>	Зозуля F1 [Zozulya F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Капитошка F1 [Kapitoshka F1]	+	+	+	-	-	-	-
	Конни F1 [Konni F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Крестьянка F1 [Krest'yanka F1]	+	+	+	-	-	-	-
	Любимец хозяйки F1 [Lyubimets khozyayki F1]	+	+	-	-	-	-	-
	Мальши-карандаши F1 [Malyshi-karandashi F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Мальчик с пальчик F1 [Mal'chik s pal'chik F1]	+	+	+	+	-	-	-
	Маша F1 [Masha F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Мульти-пульти F1 [Mul'ti-pul'ti F1]	+	+	-	-	-	-	-
	Пальчик [Pal'chik]	-	-	-	-	-	-	-
	Первачок F1 [Pervachok F1]	+	+	-	-	-	-	-
	Реванш F1 [Revansh F1]	-	-	-	-	-	-	-
	Нежинский [Nezhinskiy]	-	-	-	-	-	-	-
	Спринтер F1 [Sprinter F1]	+	+	-	-	-	-	-
	Тополёк F1 [Topolek F1]	+	+	+	-	-	-	-
Шустрец-молодец F1 [Shustrets-molodets F1]	-	-	-	-	-	-	-	
Экспресс F1 [Ekspress F1]	+	+	+	-	-	-	-	
<i>Cucurbita moschata</i>	Витаминная [Vitaminnyaya]	-	-	-	-	-	-	-
	Мраморная [Mramornaya]	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cucurbita maxima</i>	Стофунтовая [Stofuntovaya]	-	-	-	-	-	-	-
	Зимняя Сладкая [Zimnyaya Sladkaya]	-	-	-	-	-	-	-
	Амазонка [Amazonka]	+	+	+	-	-	-	-
	Большой Макс [Bol'shoj Maks]	+	+	+	-	-	-	-
	Землячка [Zemlyachka]	+	+	-	-	-	-	-
	Марсельеза [Marsel'ezha]	+	+	-	-	-	-	-
	Улыбка [Ulybka]	-	-	-	-	-	-	-
Россиянка [Rossiyanka]	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Cucurbita pepo</i>	Грибовская кустовая 189 [Gribovskaya Kustovaya 189]	-	-	-	-	-	-	-

Примечание [Note]: 1 – Acit 1 F/R, Acit 1-probe; 2 – «*Acidovorax citrulli*-PB» “Sintol”; 3 – *Acidovorax citrulli*-Rt “AgroDiagnostika”; 4 – AC158F/AC158R; 5 – SEQ ID 3/4; 6 – PL1/PL2; 7 – G12AcFwd/G12AcRev; «+» положительный результат ПЦР [positive PCR result]; «-» отрицательный результат ПЦР [negative PCR result].

Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями геномов бактерий, размещенных в базе данных Национального центра биотехнологической информации NCBI.

Результаты исследования и обсуждение

Процесс диагностики фитопатогенов представляет собой совокупность последовательно применяемых методов, финальным этапом каждого из которых является интерпретация полученных данных. В случае получения положительных результатов применяемых тестов важное значение имеет установление точной причины этих результатов.

Тестирование 5 штаммов *A. citrulli* методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагности-

ка», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev позволило получить положительные результаты по каждому из данных методов в трех повторностях. Таким образом, изучаемые методы ПЦР позволяют идентифицировать штаммы *A. citrulli* различного происхождения в случае содержания их в образце в концентрации, достаточной для детекции. Полученные данные совпадают с результатами исследований разработчиков методов [15, 19–21].

В результате тестирования образцов ДНК, выделенных из вегетативных частей тыквенных культур, положительный результат в трех повторностях получен только для образца кабачка сорта Якорь при использовании метода «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол». В связи с тем, что одним из условий данного опыта являлось отсутствие *A. citrulli* в образцах тыквенных культур, аналитическую пробу кабачка Якорь использовали для изоляции бактерий с целью установления причины получения положительного результата тестирования методом «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол». Тестирование образцов ДНК, выделенных из семян, показало положительные результаты с различными образцами тыквенных культур (см. табл. 2).

Такие образцы, как сорт арбуза Сибирские огни, кабачок Искандер F1, Цукеша, Аэронавт и др., показали положительные результаты на всех трех тестах ПЦР-PB – Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика». Однако образец арбуза Сахарный Малыш, кабачок Кавили F1 и Скворушка, патиссон Зонтик и др. показали положительные результаты только при тестировании методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe и «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», а образец огурца Родничок F1 оказался положительным только при тестировании методом *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика». Тестирование образцов ДНК из семян показало также наличие положительных результатов при детекции продуктов ПЦР AC158F/AC158R в агарозном геле (табл. 3, рис. 1). Продукты реакции с ДНК образцов семян кабачка Искандер F1, Белогор F1 и Камили F1, а также огурца Мальчик с пальчик, состояли из 158 н.п., что соответствует ПКО (см. рис. 1). Без дополнительных исследований установить причину получения положительных результатов невозможно, поэтому аналитические пробы семян, положительных в результате тестирования любым из изучаемых методов ПЦР, использовали для изоляции бактерий. Всего для изоляции использовали 27 аналитических проб семян.

Проведение изоляции бактерий из образца вегетативных частей кабачка сорта Якорь, а также из 27 образцов семян позволило выделить бактериальные культуры, колонии которых морфологически различались. Определить связь различий с тем, что выделенные бактерии относились к разным видам или являлись разными формами одного вида, не представлялось возможным только лишь на основании морфологических характеристик. Поэтому колонии всех полученных морфотипов отбирали для тестирования методом ПЦР-PB Acit 1 F/R, Acit 1-probe для обнаружения тех изолятов, которые спо-

способны приводить к получению положительных результатов данного ПЦР-теста. Среди 89 отобранных и протестированных изолятов только 14 показали положительные результаты при тестировании методом ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe, поэтому ДНК только этих 14 образцов использовали для проведения ПЦР 8UA/519В. Продукты ПЦР 8UA/519В использовали для секвенирования и последующей идентификации путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями геномов бактерий, размещенных в NCBI. Для 10 из 14 полученных нуклеотидных последовательностей не обнаружено совпадений в NCBI. Для 4 из 14 нуклеотидных последовательностей совпадения в NCBI обнаружены, и изоляты, ДНК которых использовали для ПЦР 8UA/519В и последующего секвенирования, идентифицированы как *Microbacterium phyllosphaerae*, *Arthrobacter* sp. (2 изолята) и *Sphingomonas paucimobilis*. Данные изоляты показали положительную реакцию при тестировании методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол» и *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика». При тестировании методом AC158F/AC158R данные изоляты также оказались положительными (см. рис. 1). Кроме того, изолят, идентифицированный как *Microbacterium phyllosphaerae*, показал положительную реакцию при тестировании методами SEQ ID 3/4 и PL1/PL2 (см. рис. 2).

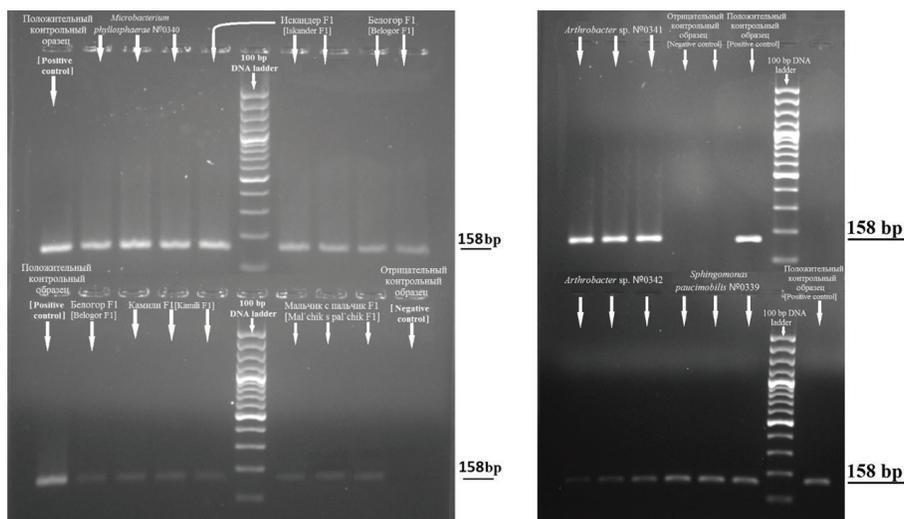


Рис. 1. Детекция продуктов ПЦР AC158F/AC158R с ДНК из семян тыквенных культур и бактериальными изолятами

[Fig. 1. Detection of PCR products of AC158F/AC158R with DNA from cucurbit seeds and bacterial isolates]

Изолят, идентифицированный как *Microbacterium phyllosphaerae*, депонировали в коллекции бактериологических культур ВНИИКР под номером 0340. Два изолята, идентифицированные как *Arthrobacter* sp., депонировали

в коллекции под номерами 0341 и 0342, *Sphingomonas paucimobilis* – № 0339. Таким образом, выделены и идентифицированы бактерии, потенциально являющиеся источниками ложноположительных результатов ПЦР-тестов Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4 и PL1/PL2. Данные, полученные путем тестирования штаммов 0339–0342, учтены при оценке АС.

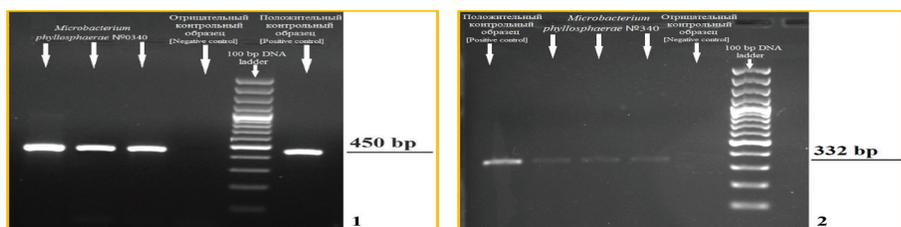


Рис. 2. Детекция продуктов ПЦР SEQ ID 3/4 (1) и ПЦР PL1/PL2 (2) с ДНК *Microbacterium phyllosphaerae*
[Fig. 2. Detection of PCR products of SEQ ID 3/4 (1) and PL1/PL2 (2) with *Microbacterium phyllosphaerae* DNA]

В рамках данного исследования тестирование других бактерий, не относящихся к виду *A. citrulli*, методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4 и PL1/PL2, показало отрицательные результаты. Метод G12AcFwd/G12AcRev показал положительные реакции только при тестировании штаммов *A. citrulli*, ложноположительные реакции отсутствовали.

Результаты тестирования штаммов *A. citrulli* методами ПЦР Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev использовали для определения значения инклюзивности (см. табл. 3). Все указанные методы ПЦР показали положительную реакцию с каждым из 5 тестируемых штаммов *A. citrulli*. Полученные данные позволяют сделать вывод об инклюзивности указанных методов ПЦР на уровне 100% и возможности их применения для идентификации *A. citrulli* ввиду отсутствия ложноотрицательных результатов.

Результаты тестирования бактериальных штаммов, не относящихся к виду *A. citrulli*, и образцов ДНК, выделенной из различных сортов и видов растений семейства Cucurbitaceae, использовали для определения значения эксклюзивности (табл. 4).

Установлено, что значение эксклюзивности методов Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика» и AC158F/AC158R ниже 99%, установленных в качестве критерия для признания метода специфичным; следовательно, указанные методы нельзя считать специфичными, несмотря на 100% инклюзивность. В то же время методы SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev являются спе-

цифичными (значение эксклюзивности более 99%, значение инклюзивности 100%).

Таблица 3 [Table 3]

Значения параметров оценки аналитической специфичности методов ПЦР
[The values of the parameters for assessing the analytical specificity of PCR methods]

Параметр оценки аналитической специфичности [Analytical specificity assessment parameter]	Метод ПЦР [PCR method]						
	1	2	3	4	5	6	7
Число достоверных положительных результатов при тестировании штаммов <i>Acidovorax citrulli</i> / Общее число протестированных штаммов <i>Acidovorax citrulli</i> , шт. [The number of true-positive results with <i>Acidovorax citrulli</i> strains / Total number of tested <i>Acidovorax citrulli</i> strains, pcs.]	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Инклюзивность [Inclusivity], %	100	100	100	100	100	100	100
Число достоверных отрицательных результатов при тестировании образцов, не содержащих ДНК <i>Acidovorax citrulli</i> / Общее число образцов, шт. [The number of true-negative results when testing samples that did not contain <i>Acidovorax citrulli</i> DNA / Total number of tested samples, pcs.]	124/153	122/153	133/153	145/153	152/153	152/153	153/153
Эксклюзивность [Exclusivity], %	81,0	79,7	86,9	94,8	99,3	99,3	100

Примечание [Note]: 1 – Acit 1 F/R, Acit 1-probe; 2 – «*Acidovorax citrulli*-PB» «Sintol»; 3 – *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика»; 4 – AC158F/AC158R; 5 – SEQ ID 3/4; 6 – PL1/PL2; 7 – G12AcFwd/G12AcRev.

Полученные результаты оценки АС позволяют сделать вывод о том, что ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика» и ПЦР AC158F/AC158R могут использоваться в диагностике *A. citrulli* только в качестве отборочных методов. На основании положительных результатов тестирования образцов указанными методами нельзя делать заключение о наличии возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур в образце. В то же время ПЦР SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev могут быть применены в качестве подтверждающих методов диагностики *A. citrulli*.

Таким образом, в результате исследования проведена оценка аналитической специфичности существующих молекулярно-генетических методов идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.).

Заключение

В результате тестирования 5 штаммов *A. citrulli*, а также 47 бактериальных штаммов, не относящихся к виду *A. citrulli*, и 106 образцов ДНК, выделенной из различных сортов и видов растений семейства Cucurbitaceae, оценена аналитическая специфичность следующих молекулярно-генетических методов диагностики возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур: Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev. Установлено, что Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика» и AC158F/AC158R могут использоваться в диагностике *A. citrulli* только в качестве отборочных методов ввиду низкой аналитической специфичности. На основании положительных результатов тестирования образцов указанными методами нельзя делать заключение о наличии возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур в образце. ПЦР SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev могут быть применены в качестве подтверждающих методов диагностики *A. citrulli*.

Подобная полномасштабная оценка аналитической специфичности диагностических методов ПЦР для *A. citrulli* проведена впервые. Полученные данные позволят более достоверно проводить выявление и идентификацию *A. citrulli* в рамках работы испытательных лабораторий.

Литература

1. Webb R.E., Goth R.W. A seed-borne bacterium isolated from watermelon // Plant Disease Reporters. 1965. PP. 818–821.
2. Schaad N.W., Sowell G.Jr., Goth R.W., Colwell R.R., Webb R.E. *Pseudomonas pseudoalcalignes* subsp. *citrulli* // International Journal of Systematic Bacteriology. 1978. Vol. 28 (1). PP. 117–125.
3. Burdman S., Walcott R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry // Mol Plant Pathol. 2012. Vol. 13 (8). PP. 805–815. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00810
4. Deng W.L., Huang T.C., Tsai Y.C. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan // Plant Dis. 2010. Vol. 94 (8). P. 1065. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1065A
5. Walcott R.R., Feng J., Gitaitis R.D. Chapter 26: Detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seeds // Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, second edition / Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.W., editors. 2016. PP. 179–187. doi: 10.1094/9780890545416.026
6. Yang R., Santos Garcia D., Pérez Montaña F., da Silva G.M., Zhao M., Jiménez Guerrero I., Rosenberg T., Chen G., Plaschkes I., Morin S., Walcott R., Burdman S. Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10, № 1400. PP. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2019.01400
7. Cai L., Chen J., Liu Z., Wang H., Yang H., Ding W. Magnesium oxide nanoparticles: Effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum* // Front. Microbiol. 2018. Vol. 9, № 790. PP. 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2018.00790

8. Masum M.M.I., Siddiqi M.M., Ali K.A., Zhang Y., Abdallah Y., Ibrahim E., Qiu W., Yan C., Li B. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using phyllanthus emblica fruit extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2 of rice bacterial brown stripe // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10, № 820. PP. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2019.00820
9. Zarco-Tejada P.J., Camino C., Beck P.S.A, Calderon R., Hornero A., Hernández-Clemente R., Kattenborn T., Montes-Borrego M., Susca L., Morelli M., Gonzalez-Dugo V., North P.R.J., Landa B.B., Boscia D., Saponari M., Navas-Cortes J.A. Previsual symptoms of *Xylella fastidiosa* infection revealed in spectral plant-trait alterations // Nature Plants. 2018. Vol. 4 (7). PP. 432–439. doi: 10.1038/s41477-018-0189-7
10. Горобей И.М., Осипова Г.М. Проблема бактериозов растений и подходы к ее решению // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2017. № 47 (4). С. 94–102.
11. Islam M.R., Hossain M.R., Kim H.T., Jesse D.M.I., Abu Yusuf M., Jong H.J., Park J.I., Nou I.S. Development of molecular markers for detection of *Acidovorax citrulli* strains causing bacterial fruit blotch disease in melon // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20 (11), № 2715. PP. 1–16. doi: 10.3390/ijms20112715
12. Cuntly A., Audusseau C., Paillard S., Olivier V. First report of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, on melon (*Cucumis melo*) in Guadeloupe (France) // Plant Disease. 2018. Vol. 103, № 5. P. 1017. doi: 10.1094/PDIS-10-18-1825-PDN
13. Kruse A., Fleites L.A., Heck M. Lessons from one fastidious bacterium to another: What can we learn about *Liberibacter* species from *Xylella fastidiosa* // Insects. 2019. Vol. 10 (9), № 300. PP. 1–23. doi: 10.3390/insects10090300
14. Boykin L.M., Sseruwagi P., Alicai T., Ateka E., Mohammed I.U., Stanton J.L., Kayuki C., Mark D., Fute T., Erasto J., Bachwenkizi H., Muga B., Mumo N., Mwangi J., Abidrabo P., Okao-Okuja G., Omuut G., Akol J., Apio H.B., Osingada F., Kehoe M.A., Eccles D., Savill A., Lamb S., Kinene T., Rawle C.B., Muralidhar A., Mayall K., Tairo F., Ndunguru J. Tree lab: Portable genomics for early detection of plant viruses and pests in Sub-Saharan Africa // Genes. 2019. Vol. 10 (9), № 632. PP. 1–13. doi: 10.3390/genes10090632
15. PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli* // EPPO Bulletin. 2016. № 46 (3). PP. 444–462. doi: 10.1111/epp.12330
16. PM 7/76 (5) Use of EPPO diagnostic standards // EPPO Bulletin. 2018. № 48 (3). PP. 373–377. doi: 10.1111/epp.12506
17. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity // EPPO Bulletin. 2018. № 48 (3). PP. 387–404. doi: 10.1111/epp.12508
18. Giovanardi D., Sutton S.A., Stefani E., Walcott R.R. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays // Seed Science and Technology. 2018. Vol. 46, № 1. PP. 93–106. doi: 10.15258/sst.2018.46.1.09
19. Cho M.S., Park D.H., Ahn T., Park S.P. Rapid and specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using SYBR Green-based real-time PCR amplification of the YD-repeat protein gene // J. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 25 (9). PP. 1401–1409. doi: 10.4014/jmb.1502.02029
20. Zhong J., Lin Z.Y., Ma Y.M., Gao B.D., Liu H.Q., Zhao T.C., Schaad N.W. Rapid discrimination between groups I and II of *Acidovorax citrulli* using a primer pair specific to a pilL gene // Journal of Phytopathology. 2015. PP. 1–5. doi: 10.1111/jph.12435
21. Zivanovic M., Walcott R.R. Further characterization of genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* strains // Phytopathology. 2017. Vol. 107 (1). PP. 29–35. doi: 10.1094/PHYTO-06-16-0245-R
22. Лавренчук Л.С., Ермошин А.А. Микробиология : Практикум / под ред. Е.В. Березиной. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2019. 107 с.

23. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescing // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1954. № 44. PP. 301–307.
24. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 94. PP. 444–448.

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.; повторно 29.04.2020 г., 11.08.2020 г.; принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Словарева Ольга Юрьевна – аспирант кафедры генетики, селекции и семеноводства, факультет агрономии и биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева (Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49); м.н.с. лаборатории бактериологии, Испытательный лабораторный центр, Всероссийский центр карантина растений (Россия, 140150, рп. Быково, ул. Пограничная, 32).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6022-5955>

E-mail: slovaeva.olga@gmail.com

Корнев Константин Павлович – канд. биол. наук, зам. директора, Всероссийский центр карантина растений (Россия, 140150, рп. Быково, ул. Пограничная, 32).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3490-1857>

E-mail: konstantin.kornev@gmail.com

Для цитирования: Словарева О.Ю., Корнев К.П. Определение аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *Acidovorax citrulli* // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С.25–45. doi: 10.17223/19988591/51/2

For citation: Slovaeva O.Y., Kornev K.P. Determination of analytical specificity of PCR methods for *Acidovorax citrulli* identification. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:25-45. doi: 10.17223/19988591/51/2 In Russian, English Summary

Olga Y. Slovaeva^{1,2}, Konstantin P. Kornev²

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

² Federal State Organization “All-Russian Plant Quarantine Center”, Bykovo, Moscow region, Russian Federation

Determination of analytical specificity of PCR methods for *Acidovorax citrulli* identification

Acidovorax citrulli (Schaad et al.), the causative agent of bacterial fruit blotch of cucurbits is a significant object in plant quarantine. The main stage in the detection of the phytopathogen in the framework of laboratory diagnostics is using molecular-genetic methods, like PCR, and it is the results of the application of these methods that are decisive. In this regard, the used PCR-methods impose strict requirements for assessing their applicability. Applicability criteria such as analytical specificity, showing the ability of a test to reliably distinguish a target organism from a non-target organism, is an integral component of the assessment applicability of a diagnostic method. Analytical specificity is evaluated based on the values of parameters such as inclusivity and exclusivity. Inclusivity shows the ability of the method to identify strains of the target bacterium, representing all genetic diversity, different geographical origin and host plants. Exclusivity shows the ability of the method to distinguish non-target bacteria, especially those that can be in the DNA of host plants. This study was conducted to determine the analytical specificity of the PCR-methods for identification of *A. citrulli*.

We determined analytical specificity with 5 *A. citrulli* strains, 19 bacterial strains of other species from international collections, 28 other bacterial isolates (See Table 1) and 106 DNA samples isolated from various varieties and species of Cucurbitaceae plants. 30 samples were plant debris, and 76 were seed samples (See Table 2). The process of preparing analytical samples consisted in the extraction of microbiota from samples into phosphate-saline buffer and subsequent concentration using high-speed centrifuge. Then DNA was extracted from the samples. PCR for each sample was performed in triplicate for each of the following tests: qPCR Acit 1 F/R and Acit 1-probe according to Woudt et al [2009], commercial kits for qPCR by “Syntol” and “AgroDiagnostika” (Russia), PCR with primers AC158F/AC158R according to Cho et al. [2015], PCR SEQ ID 3/4 according to Schaad et al. [2000], PCR PL1/PL2 according to Zhong et al., 2015 and PCR G12AcFwd/G12AcRev according to Zivanovic & Walcott [2017]. The value of inclusivity for each PCR test was determined as the ratio of reliable positive results of the target to the total number of reactions, expressed as a percentage. The value of exclusivity was determined as the ratio of reliable negative results to the total number of reactions of non-target, expressed as a percentage. An assessment of analytical specificity was assigned to each of the test based on an analysis of the inclusivity and exclusivity parameters. The conclusion about the specificity of the tests was made with the values of inclusivity and exclusivity of 99% or higher. Isolation of bacteria was carried out from analytical samples of cucurbit crops that showed at least one positive result when tested by any of the above PCR methods (See Table 3). DNA from single colonies was used for PCR with primers 8UA/519B. For identification, we used the Sanger method for determining the nucleotide sequence, which were, then, compared with the sequences of bacterial genomes in the NCBI database.

The process of diagnosing phytopathogens is a combination of sequentially applied methods and tests, the final stage of each of which is the interpretation of the data. In the case of obtaining positive results of the applied tests, it is important to establish the exact cause of these results. During the study, PCR tests showed positive results with samples known to be free of the *A. citrulli* DNA. Agarose gel amplicon detection also revealed the presence of reaction products characteristic of *A. citrulli* (See Fig. 1). Also, isolated 89 bacterial cultures whose colonies were morphologically different. These isolates were selected for testing by the Acit 1 F/R, Acit 1-probe in order to detect those isolates that can lead to positive results. 14 isolates showed positive results. These isolates were used for PCR 8UA/519B. For 4 of the 14 nucleotide sequences, matches in the NCBI were detected, and isolates identified as *Microbacterium phyllosphaerae*, *Arthrobacter* sp. (2 isolates) and *Sphingomonas paucimobilis*. These isolates showed a positive reaction when tested using Acit 1 F/R, Acit 1-probe, “*Acidovorax citrulli*-RV” “Syntol” and *Acidovorax citrulli*-Rt “AgroDiagnostika”. When tested using the AC158F/AC158R method, these isolates were also positive (See Fig. 1). In addition, the isolate identified as *Microbacterium phyllosphaerae* showed a positive reaction when tested by methods of SEQ ID 3/4 and PL1/PL2 (See Fig. 2). Thus, bacteria that are potentially sources of false-positive PCR tests were isolated and identified. Testing of other bacteria not belonging to the species *A. citrulli* showed negative results. The results of testing strains *A. citrulli* by Acit 1 F/R, Acit 1-probe, “*Acidovorax citrulli*-RV” “Syntol”, *Acidovorax citrulli*-Rt “AgroDiagnostika”, AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 and G12AcFwd/G12AcRev were used to determine the value of inclusivity (See Table 4). PCR methods showed a positive reaction with each of the 5 tested *A. citrulli* strains (100% inclusivity). Test results of bacterial strains not belonging to the species *A. citrulli* and DNA samples isolated from different varieties and species of Cucurbitaceae were used to determine the value of exclusivity (See Table 3). We found that the exclusivity values of the Acit 1 F/R, Acit 1-probe,

“*Acidovorax citrulli*-RV” “Synthol”, *Acidovorax citrulli*-Rt “AgroDiagnostika” and AC158F/AC158R methods are below 99%, established as a criterion for recognizing the method as specific; therefore, these methods cannot be considered specific, despite 100% inclusivity. At the same time, the methods SEQ ID 3/4, PL1/PL2 and G12AcFwd/G12AcRev are specific (the value of exclusivity is more than 99%, the value of inclusivity is 100%). The results of the analytical specificity assessment allow us to conclude that Acit 1 F/R, Acit 1-probe, “*Acidovorax citrulli*-RV” “Synthol”, *Acidovorax citrulli*-Rt “AgroDiagnostika”, AC158F/AC158R can be used in diagnosing *A. citrulli* only as screening methods. Based on the positive results of testing the samples with the indicated methods, it is impossible to draw a conclusion about the presence of the pathogen in the sample. At the same time, PCR SEQ ID 3/4, PL1/PL2 and G12AcFwd/G12AcRev can be used as confirmatory diagnostic methods for *A. citrulli*. Thus, as a result of the study, we evaluated the analytical specificity of existing molecular-genetic methods for identifying *A. citrulli*. Such a full-scale assessment of the analytical specificity of diagnostic PCR methods for *A. citrulli* was carried out for the first time. The obtained data will allow testing laboratories to more reliably identify *A. citrulli*.

The paper contains 2 Figures, 3 Tables and 24 References.

Key words: PCR; plant quarantine; diagnostics of phytopathogens.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Webb RE, Goth RW. A seed-borne bacterium isolated from watermelon. *Plant Disease Reporters*. 1965;818-821.
2. Schaad NW, Sowell GJr, Goth RW, Colwell RR, Webb RE. *Pseudomonas pseudoalcalignes* subsp. *citrulli*. *Int J of Systematic Bacteriology*. 1978;28(1):117-125.
3. Burdman S, Walcott R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(8):805-815. doi: [10.1111/j.1364-3703.2012.00810](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00810)
4. Deng WL, Huang TC, Tsai YC. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan. *Plant Dis*. 2010;94(8):1065. doi: [10.1094/PDIS-94-8-1065A](https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1065A)
5. Walcott RR, Feng J, Gitaitis RD. Chapter 26: Detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seeds. In: *Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, second edition*. Fatmi M, Walcott RR, Schaad NW, editors. 2016;179-187. doi: [10.1094/9780890545416.026](https://doi.org/10.1094/9780890545416.026)
6. Yang R, Garcia DS, Pérez Montaña F, Mateus da Silva G, Zhao M, Jiménez Guerrero I, Rosenberg T, Chen G, Plaschkes I, Morin S, Walcott R, Burdman S. Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species. *Front. Microbiol*. 2019;10(1400):1-17. doi: [10.3389/fmicb.2019.01400](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01400)
7. Cai L, Chen J, Liu Z, Wang H, Yang H, Ding W. Magnesium oxide nanoparticles: Effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum*. *Front. Microbiol*. 2018;9(790):1-19. doi: [10.3389/fmicb.2018.00790](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00790)
8. Masum MMI, Siddiq MM, Ali KA, Zhang Y, Abdallah Y, Ibrahim E, Qiu W, Yan C, Li B. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using phyllanthus emblica fruit extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2 of rice bacterial brown stripe. *Front. Microbiol*. 2019;10(820)1-18. doi: [10.3389/fmicb.2019.00820](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00820)
9. Zarco-Tejada PJ, Camino C, Beck PSA, Calderon R, Hornero A, Hernández-Clemente R, Kattenborn T, Montes-Borrego M, Susca L, Morelli M, Gonzalez-Dugo V, North PRJ, Landa BB, Boscia D, Saponari M, Navas-Cortes JA. Previsual symptoms of *Xylella*

- fastidiosa* infection revealed in spectral plant-trait alterations. *Nature Plants*. 2018. 4(7):432-439. doi: [10.1038/s41477-018-0189-7](https://doi.org/10.1038/s41477-018-0189-7)
10. Gorobey IM, Osipova GM. The problem of bacterioses in plants and approaches to solving it. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2017;47(4):94-102. In Russian, English summary.
 11. Islam MR, Hossain MR, Kim HT, Jesse DMI, Abuyusuf M, Jong HJ, Park JI, Nou IS. Development of molecular markers for detection of *Acidovorax citrulli* strains causing bacterial fruit blotch disease in melon. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(11):2715:1-16. doi: [10.3390/ijms20112715](https://doi.org/10.3390/ijms20112715)
 12. Cuntly A, Audusseau C, Paillard S, Olivier V. First report of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, on melon (*Cucumis melo*) in Guadeloupe (France). *Plant Disease*. 2018;103(5):1017. doi: [10.1094/PDIS-10-18-1825-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1825-PDN)
 13. Kruse A, Fleites LA, Heck M. Lessons from one fastidious bacterium to another: What can we learn about *Liberibacter* species from *Xylella fastidiosa*. *Insects*. 2019;10(9):300:1-23. doi: [10.3390/insects10090300](https://doi.org/10.3390/insects10090300)
 14. Boykin LM, Sseruwagi P, Alicai T, Ateka E, Mohammed IU, Stanton JL, Kayuki C, Mark D, Fute T, Erasto J, Bachwenkizi H, Muga B, Mumo N, Mwangi J, Abidrabo P, Okao-Okuja G, Omuut G, Akol J, Apio HB, Osingada F, Kehoe MA, Eccles D, Savill A, Lamb S, Kinene T, Rawle CB, Muralidhar A, Mayall K, Tairo F, Ndunguru J. Tree lab: Portable genomics for early detection of plant viruses and pests in Sub-Saharan Africa. *Genes*. 2019;10(9):632:1-13. doi: [10.3390/genes10090632](https://doi.org/10.3390/genes10090632)
 15. PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli*. *EPPO Bulletin*. 2016;46(3):444-462. doi: [10.1111/epp.12330](https://doi.org/10.1111/epp.12330)
 16. PM 7/76 (5) Use of EPPO diagnostic standards. *EPPO Bulletin*. 2018;48(3):373-377. doi: [10.1111/epp.12506](https://doi.org/10.1111/epp.12506)
 17. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*. 2018;48(3):387-404. doi: [10.1111/epp.12508](https://doi.org/10.1111/epp.12508)
 18. Giovanardi D, Sutton SA, Stefani E, Walcott RR. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays. *Seed Science and Technology*. 2018;46(1):93-106. doi: [10.15258/sst.2018.46.1.09](https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.1.09)
 19. Cho MS, Park DH, Ahn T, Park SP. Rapid and specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using SYBR Green-based real-time PCR amplification of the YD-repeat protein gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015;25(9):1401-1409. doi: [10.4014/jmb.1502.02029](https://doi.org/10.4014/jmb.1502.02029)
 20. Zhong J, Lin ZY, Ma YM, Gao BD, Liu HQ, Zhao TC, Schaad NW. Rapid discrimination between groups I and II of *Acidovorax citrulli* using a primer pair specific to a pilL gene. *J Phytopathology*. 2015;1-5. doi: [10.1111/jph.12435](https://doi.org/10.1111/jph.12435)
 21. Zivanovic M, Walcott RR. Further characterization of genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* strains. *Phytopathology*. 2017;107(1): 29-35. doi: [10.1094/PHTO-06-16-0245-R](https://doi.org/10.1094/PHTO-06-16-0245-R)
 22. Lavrenchuk LS, Ermoshin AA. Mikrobiologiya: Praktikum [Microbiology: Workshop]. Berezina EV, editor. Yekaterinburg: Izdatel'stvo Ural'skogo universiteta Publ.; 2019. 107 p. In Russian
 23. King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Laboratory and Clinical Medicine*. 1954;44:301-307.
 24. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94:444-448.

Received 20 January 2020; Revised 29 April 2020 and 11 August 2020;
Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:

Slovaeva Olga Y, Graduate Student, Department of Genetics, Breeding and Seed Production, Faculty of Agronomy and Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya Str., Moscow 127550, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Bacteriology, Testing Laboratory Center, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogranichnaya Str., Bykovo 140150, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6022-5955>

E-mail: slovaeva.olga@gmail.com

Kornev Konstantin P, Cand. Sci. (Biol.), Deputy Director, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogranichnaya Str., Bykovo 140150, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3490-1857>

E-mail: konstantin.kornev@gmail.com

ЗООЛОГИЯ

УДК 598.26 (470.63)
doi: 10.17223/19988591/51/3

Л.В. Маловичко, Т.К. Железнова, А.М. Зубалий, А.В. Швыкова

*Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия*

Современное состояние кольчатой горлицы *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) в Ставропольском крае

Исследования экологии кольчатой горлицы в Ставропольском крае проведены в 2008–2019 гг. Проанализировано современное состояние вида: размер популяции, плотность населения, распределение по территории края. Анализ динамики обилия и гнездовой плотности кольчатой горлицы свидетельствует о прогрессирующем расселении и росте её численности в регионе. Установлено, что вид предпочитает районы с развитым животноводством в степной и полупустынно-сухостепной зонах, тогда как в лесостепи и особенно предгорьях его гнездовая плотность значительно ниже. Показана высокая степень синантропизации кольчатой горлицы: они гнездятся в сельских населённых пунктах, городах, а также в лесополосах агроландшафтов преимущественно на деревьях. Гнездовой период длится со 2-й декады марта до начала ноября. Горлицы делают 3–4 кладки за сезон, средняя величина кладки составляет 1,57 яйца, средние размеры яиц – 30,5×24,6 мм (n = 25), постэмбриональная смертность – 13,5%. Отмечены осенне-зимние кочёвки стаями до 500 особей. Установлено, что лимитирующие факторы для вида – гибель кладок и птенцов от хищников и непогоды, а также гибель взрослых птиц при аномально низких температурах зимой и на автодорогах.

Ключевые слова: динамика численности; плотность населения; биотопическое распределение; гнездовая биология; экологические факторы.

Введение

Кольчатая горлица *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838 – многочисленный осёдлый вид Ставропольского края. Её палеарктический ареал охватывает обширную территорию Евразии: от Британских островов, Бельгии, восточной Франции, северной Италии к востоку до Корейского полуострова и южной части Хэйлунцзяна; к северу до южной Норвегии, в Швеции до 60-й параллели, до северной Эстонии, восточнее в европейской части России к северу до 55-й параллели, восточнее Волги к северу до средней части доли-

ны Мургаба в Туркмении, северного Афганистана, бассейна Тарима, верхней части долины Или, северного Ордоса, восточнее к северу примерно до 40-й параллели; к югу до Балканского полуострова, Ирака, южного Ирана, восточнее к югу до океанического побережья Азии [1]. Природоохранный статус вида, согласно системе категорий МСОП, вызывает наименьшие опасения (LC), но требует дальнейшего изучения и систематического мониторинга [2].

На Ставрополье кольчатая горлица появилась в 1973–1978 гг. [3, 4]. Массовое расселение её началось в 1980–1990-х гг., и за последующие десятилетия она широко освоила всю территорию края. В период с 1990 по 2006 г. гнездовая численность вида в крае возросла в 3,5 раза – с 12,5 до 47 тыс. пар [5]. К настоящему времени численность увеличилась еще в 1,3 раза и составляет в среднем 65,5 тыс. пар. Малое число литературных источников не позволяет провести сравнительный анализ изменений плотности населения кольчатой горлицы в ретроспективе. В последние десятилетия условия обитания вида заметно изменились из-за перепрофилирования сельскохозяйственного производства. В 1990–2000 гг. численность овец и крупного рогатого скота на Ставрополье уменьшилась почти в 3 раза как в крупных сельхозпредприятиях, так и на частных подворьях [6]. К 2015–2019 гг. произошло увеличение площадей сельскохозяйственных культур, прежде всего зерновых, за счёт распашки пастбищ в зоне прежнего доминирования животноводства [7, 8].

Материалы по численности и распределению кольчатой горлицы, полученные в результате проведённых нами исследований, послужат основой для долговременного мониторинга вида, который, с одной стороны, демонстрирует пример стремительного расширения ареала, а с другой – его пульсации по не вполне понятным причинам. Количественные характеристики плотности населения и распределения кольчатой горлицы могут использоваться как важная составляющая при оценке воздействия различных антропогенных и природных факторов, а также позволяют прогнозировать дальнейшие изменения численности вида и векторов его расселения.

Цель работы – изучение современного состояния численности, распределения и экологии кольчатой горлицы на территории Ставропольского края.

Материалы и методики исследования

Ставропольский край расположен в центральной части Предкавказья и на северном склоне Большого Кавказа. Протяжённость края составляет 285 км с севера на юг и 370 км с запада на восток. Он граничит на юге с республиками Северная Осетия, Кабардино-Балкарская, Чеченская, на западе – с Краснодарским краем, на севере – с Ростовской областью и Республикой Калмыкия, на востоке – с Республикой Дагестан [9].

Сельскохозяйственные угодья составляют 86% земельных ресурсов края. Пашни занимают около 61%, пастбища – 24%, лесополосы – 1,5%, населён-

ные пункты – 7% [7, 8]. Ставрополье относится к малооблесённым регионам, общая площадь лесов по состоянию на 2018 г. – 130,1 тыс. га. Из них леса, расположенные на землях городских и сельских поселений, составляют всего 15,6 тыс. га. Площади естественных лесов незначительно превышают леса искусственного происхождения [8]. Степное лесоразведение в крае началось в конце XIX в., однако до середины XX столетия эти работы не носили массового характера. Подавляющее большинство защитных лесонасаждений в крае создано после принятия в 1948 г. так называемого «Сталинского плана преобразования природы». Особенно много лесополос создавалось с конца 1960-х гг., когда отмечались сильные пыльные бури.

Территория Ставропольского края подразделяется на 4 ландшафтные провинции: полупустынно-сухостепную, степную, лесостепную и предгорную [9] (рис. 1).

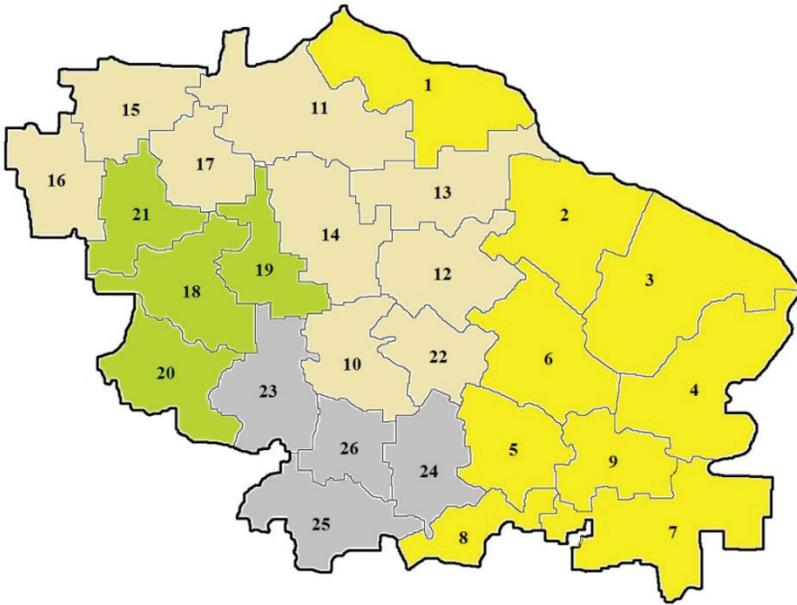


Рис. 1. Карта Ставропольского края с указанием муниципальных районов и преобладающих ландшафтных провинций.

Жёлтый цвет – ландшафты полупустынь и сухих степей; муниципальные районы 1–9.

Коричневый цвет – степные ландшафты; муниципальные районы 10–17.

Зеленый цвет – лесостепные ландшафты; муниципальные районы 18–22.

Серый цвет – ландшафты предгорий степей и лесостепей; муниципальные районы 23–26.

Обозначения районов см. табл. 1

[Fig. 1. The map of Stavropol Region with the municipal districts and the prevailing landscapes

Yellow color - Landscapes of semi-deserts and dry steppes; municipal districts 1-9.

Brown color - Steppe landscapes; municipal districts 10-17.

Green color - Forest-steppe landscapes; municipal districts 18-22.

Gray color - Landscapes of foothills of steppes and forest-steppes; municipal districts 23-26.

For municipal district designations see Table 1]

Полупустынно-сухостепная ландшафтная провинция простирается полосой на севере и востоке края. У оз. Маныч она узкая, а с продвижением на восток расширяется в южную сторону. Полупустыни расположены вдоль Кумо-Манычской впадины на севере края и Терско-Кумской низменности на востоке. Провинция степных ландшафтов расположена в северо-западной и центральной частях края, по которым протекают реки Егорлык, Ташла, Чла, Калаус, Карамык, Айгурка. Лесостепная ландшафтная провинция занимает Ставропольскую возвышенность в окрестностях г. Ставрополя, в Шпаковском и Грачёвском районах, Прикалаусские высоты в Александровском и Андроповском районах. Ландшафты предгорной провинции расположены на самом юге края – на этой территории расположены Минераловодский, Предгорный, Курской, Георгиевский районы.

Наши исследования охватили все природные зоны и муниципальные районы края. Приоритетные маршруты проложены с учётом экологических особенностей вида и задач мониторинга его состояния на ранее обследованных территориях (на основании как собственных данных, так и опубликованных в разные периоды материалов других исследователей).

Материал по биологии кольчатой горлицы собран в 2008–2019 гг. Всего проведено более 140 учётов птиц на всей территории Ставропольского края (в пределах географических координат 43°43'–46°14'N, 40°51'–45°43'E) в различных биотопах: сельских поселениях, кошарах, промышленных и сельских застройках, санаториях, лесополосах, байрачных лесах и т.д. Общая протяжённость пеших маршрутов составила не менее 500 км; учётов с автотранспорта – 42 000 км. Автомобильные учёты, помимо охвата больших территорий, позволили оценить приуроченность птиц к линейным объектам антропогенных ландшафтов (автомобильные дороги, ЛЭП). В данный обзор включены также результаты, полученные при проведении учётов птиц в Ставропольском крае в 2015–2018 гг. в рамках программы создания Атласа гнездящихся птиц Европы. Обследовано 39 квадратов размером 50×50 км. Круглогодичные маршрутные учёты проведены с применением общепринятых в орнитологии методик полевых исследований [10–12].

Обнаруженные жилые гнёзда кольчатых горлиц картировали и описывали по следующим параметрам: дата, погодные условия, биотоп, порода и высота дерева, высота расположения гнезда, строительный материал, содержимое гнезда, наличие и близость гнёзд других видов, особенности поведения птиц в гнездовой и внегнездовой периоды, факты элиминации и др. Оценивали также характер биоценологических связей вида (перекрывание гнездовых участков с другими видами птиц) и поведение в условиях урбанизированных ландшафтов. Успешность размножения гнездящихся пар изучали от начала откладки яиц до вылета птенцов из гнезда. Всего за период исследований выявлено 1 167 гнездящихся пар, обнаружено и описано 490 гнёзд, подробные наблюдения проведены за 58 гнёздами. Наблюдения за суточной активностью одной насиживающей самки провели в детском оздоровитель-

ном лагере «Степнячок» в Арзгирском районе [13], их общая продолжительность составила 35 ч 12 мин.

Результаты исследования и обсуждение

Территориальное распределение и обилие. За период исследований кольчатая горлица отмечена во всех административно-территориальных единицах Ставропольского края (муниципальные районы, города краевого значения – городские округа Невинномысск, Кисловодск). По результатам исследований общая среднегодовая плотность населения вида в крае составила 38,6 особи/км², что несколько выше, чем в 2006 г., – 32 особи/км² [5]. Оценочная современная гнездовая численность на обследованной территории составила около 65 тыс. пар, что в 1,3 раза выше по сравнению с 2006 г. (47 тыс. пар) [5]. Имеют место межгодовые различия числа гнездящихся пар: с 2015 по 2018 г. размер популяции кольчатой горлицы в крае варьировал от 11 949 до 119 100 (в среднем 65 524) гнездящихся пар.

Вид по территории края распределён неравномерно. Наибольшая гнездовая плотность населения (42,7 пары/км²) отмечена на севере и северо-востоке края – в зоне с преобладанием животноводства: Апанасенковский, Левокумский, Туркменский, Степновский, Курской районы (зона 1, рис. 2), где жители содержат в частных подворьях много скота и птицы. В южной и западной частях края (зона 2, рис. 2), где годовая сумма осадков выше 400 мм, в структуре хозяйства преобладает растениеводство, гнездовая плотность ниже – от 20 до 13 пар/км².

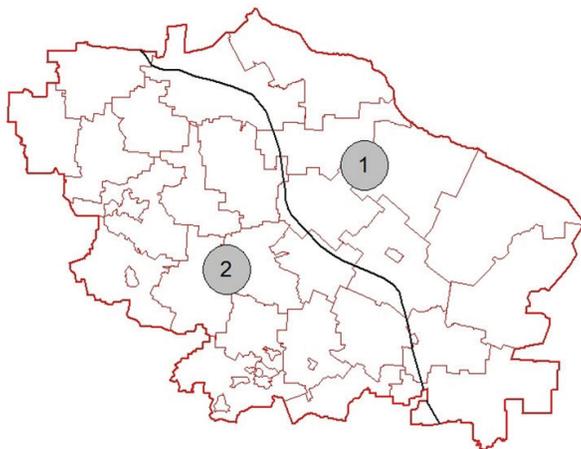


Рис. 2. Карта Ставропольского края с делением территории по хозяйственному принципу: 1 – зона с преобладанием животноводства; 2 – зона с преобладанием растениеводства. Жирной чертой обозначена изолиния, характеризующая уровень атмосферных осадков 400 мм в год
[Fig. 2. Stavropol Region map showing areas with prevalence of different economic activities: 1 - Area with prevalence of animal husbandry; 2 - Area with prevalence of plant growing. The bold line is a precipitation isoline, 400 mm per year]

Что касается ландшафтного распределения вида, то в полупустынной степи со светло-каштановыми почвами и сухой степи с тёмно-каштановыми и каштановыми почвами [14] кольчатая горлица многочисленна и повсеместно гнездится в населённых пунктах. Следует отметить, что в засушливых частях Арзгирского и Нефтекумского районов рост численности вида лимитируется недостатком древесной растительности на аридных пастбищах. В степной провинции, примыкающей к предыдущей, вид имеет также высокую плотность (42 пары/км²). В лесостепи плотность населения ниже в 1,5 раза и составляет 31 пары/км². Самая низкая в крае плотность населения кольчатой горлицы (13 пар/км²) зафиксирована в предгорной ландшафтной провинции, где отсутствует традиция подворного животноводства, – в Предгорном и Минераловодском районах.

Биотопическое распределение. Кольчатая горлица – птица культурных ландшафтов. Обитает преимущественно в населённых пунктах – как в небольших посёлках, так и в крупных городах. Заселяет участки с хорошо развитой высокой древесной растительностью. Чаще всего населяет старые парки, кладбища, скверы, участки жилой застройки с дворовыми насаждениями, уличные аллеи. Избегает селиться в глухих малопосещаемых парках и лесопарках [15–17]. В процессе расселения вид появляется сначала в крупных городах, затем постепенно заселяет небольшие населённые пункты, после чего распространяется по мелким деревням, хуторам, отдельным кордонам, а также лесополосам и лесным местообитаниям [18, 19].

Считается, что толчком к экспансии вида явилась смена мест гнездования: из лесных местообитаний горлицы перешли в городские парки и скверы [20, 21]. Способствовало этому и искусственное расселение горлиц в Турции и Болгарии. Вероятно, дальнейшее расселение вида на северо-восток и восток европейской части России приостановилось из-за климатических факторов, прежде всего суровых многоснежных зим [16]. На Северном Кавказе кольчатая горлица появилась в 1973–1978 гг. В настоящее время она является обычной или многочисленной синантропной птицей урбанизированных территорий Центрального Предкавказья [3, 5].

В каждом сельском населённом пункте Ставропольского края гнездятся от 30 до 100 пар кольчатой горлицы, в городах – от 100 до 300 пар. Если учесть, что в крае насчитывается 19 городов, 7 посёлков городского типа и 736 сельских населённых пунктов, то можно предположить, что гнездовая численность составляет около 62 тыс. пар. Еще около 2 тыс. пар встречаются по лесополосам и на территории действующих и заброшенных плодовых садов, около 1 тыс. – на кошарах, где есть хотя бы одно дерево.

Как показали наши исследования, основным типом местообитаний кольчатой горлицы на Ставрополье являются сельские населённые пункты, лесополосы (полезащитные, придорожные) и лесопосадки (насаждения нелинейной конфигурации различной площади) в агроландшафтах. Вследствие обилия корма на хозяйствах сёл и хуторов птицы не испытывают трофиче-

ской конкуренции, что позволяет им строить гнезда на расстоянии 300–400 м друг от друга. Очевидно, такие условия для вида являются оптимальными.

Приуроченность кольчатой горлицы к лесополосам в различных ландшафтных провинциях представлена в табл. 1. Сама возможность её обитания в лесополосах и плотность населения определяются, прежде всего, оптимальным сочетанием кормовых и защитных свойств угодий. Для кольчатой горлицы как зерно-семеноядного вида лесополосы вдоль полей, засеянных подсолнечником, кукурузой и просом, привлекательны тем, что на этих полях создаётся оптимальная кормовая база. Судя по визуальным наблюдениям, птицы предпочитают семена культурных растений [22, 23]. Мы также неоднократно наблюдали поедание горлицами семян пшеницы, кукурузы, гороха, подсолнечника.

Таблица 1 [Table 1]

**Плотность населения кольчатой горлицы в лесополосах
различных ландшафтных провинций (ЛП)
[Population density of the *Streptopelia decaocto* in the forest belts
of various landscape provinces (LP)]**

№ п/п	Муниципальный район [Municipal district]	Число лесополос, шт. [Number of forest belts, pcs]	Протяженность лесополос, км [Length of forest belts, km]	Площадь лесополос, га [Area of forest belts, ha]	Учтено пар [Considered pairs]	Плотность населения, пар/га [Density of population, pairs/ha]	Обнаружено гнёзд, шт. [Number of nests, pcs.]
1	Апанасенковский [Apanasenkovskiy]	17	42,5	85	23	0,27	8
2	Арзгирский [Arzgirskiy]	9	22,5	27	10	0,37	6
3	Левокумский [Levokumskiy]	11	27,5	33	12	0,36	7
4	Нефтекумский [Neftekumskiy]	3	7,5	9	7	0,78	2
5	Советский [Sovetskiy]	13	32,5	39	18	0,46	4
6	Буденновский [Budenновskiy]	19	47,5	95	12	0,13	3
7	Курский [Kurskiy]	13	32,5	65	7	0,11	3
8	Кировский [Kirovskiy]	8	20	40	5	0,13	1
9	Степновский [Stepnovskiy]	19	47,5	57	21	0,37	7
Итого в полупустынной ЛП [Total in the semi-desert LP]:		112	280	450	115	0,256	41
10	Александровский [Aleksandrovskiy]	10	25,5	51	2	0,04	1
11	Ипатовский [Ipatovskiy]	7	17,5	21	23	1,10	0
12	Благодарненский [Blagodarnenskiy]	5	12,5	15	10	0,67	3
13	Туркменский [Turkmenskii]	8	20	40	17	0,43	4
14	Петровский [Petrovskiy]	8	20	24	4	0,17	1
15	Красногвардейский [Krasnogvardeyskiy]	7	17,5	21	3	0,14	2
16	Новоалександровский [Novoaleksandrovskiy]	9	22,5	45	4	0,09	0
17	Труновский [Trunovskiy]	9	22,5	45	7	0,16	2

Окончание табл. 1 [Table 1 (end)]

№ п/п	Муниципальный район [Municipal district]	Число лесополос, шт. [Number of forest belts, pcs]	Протяженность лесополос, км [Length of forest belts, km]	Площадь лесополос, га [Area of forest belts, ha]	Учено пар [Considered pairs]	Плотность населения, пар/га [Density of population, pairs/ha]	Обнаружено гнезд, шт. [Number of nests, pcs.]
Итого в степной ЛП [Total in the steppe LP]:		63	158	262	70	0,267	13
18	Шпаковский [Shpakovskiy]	9	22,5	45	4	0,09	1
19	Грачевский [Grachevskiy]	11	27,5	33	2	0,06	0
20	Кочубеевский [Kochubeevskiy]	7	17,5	35	1	0,03	0
21	Изобильненский [Izobil'nenskiy]	11	27,5	55	3	0,05	1
22	Новоселицкий [Novoselitskiy]	6	15	18	10	0,56	3
Итого в лесостепной ЛП [Total in the forest-steppe LP]:		44	110	186	20	0,108	5
23	Андроповский [Andropovskiy]	5	12,5	25	2	0,08	1
24	Георгиевский [Georgievskiy]	5	12,5	25	1	0,04	0
25	Предгорный [Predgornyy]	7	17,5	21	0	0,00	0
26	Минераловодский [Mineralovodskiy]	10	25	50	3	0,06	0
Итого в предгорной ЛП [Total in the foothill LP]:		27	67,5	121	6	0,050	1
Всего [Total]:		246	615,5	1 019	211	0,207	60

На сельскохозяйственных угодьях, площадь которых в лесостепной и предгорной провинциях выше, чем в степных и полупустынных, доступность кормов меньше. Возможно, это связано с использованием в больших количествах высокоэффективных ядохимикатов при выращивании сельскохозяйственных культур (так называемые «нуль-технологии») [7, 24]. На слабую заселённость горлицей этих ландшафтных провинций также повлияли и изменения в структуре севооборотов: переход на выращивание преимущественно монокультуры – озимой пшеницы. Одновременно сильно сократилась площадь, занятая подсолнечником и кукурузой – основных кормовых объектов вида [7, 8].

Таким образом, в настоящее время гнездовая плотность кольчатой горлицы значительно выше в лесополосах на севере и востоке края в полупустынно-сухостепной и степной ландшафтных провинциях, чем в лесостепной и предгорной провинциях. Этот тренд, выявленный для лесополос, в целом совпадает с общими закономерностями ландшафтного распределения вида.

Гнездовая биология. В табл. 2 приведены данные по числу гнезд в различных административно-территориальных образованиях Ставропольского края. Видно, что население кольчатой горлицы имеет наибольшую гнездовую плотность в селитебных местообитаниях административных районов, расположенных в полупустынно-сухостепной ландшафтной провинции (Апанасенковский, Левокумский, Курский, Туркменский районы).

Таблица 2 [Table 2]

Число гнездящихся пар кольчатой горлицы в населённых пунктах (2006–2019 гг.)
[The number of the detected breeding pairs of *Streptopelia decaocto* in settlements (2006–2019)]

№ п/п	Муниципальный район / город краевого значения [Municipal district / city of regional significance]	Число пар [Number of the breeding pairs]	Доля от общего числа [Share of the total number], %
1	Город-курорт Кисловодск [Resort city of Kislovodsk]	82	7,03
2	Предгорный [Predgornyj district]	34	2,91
3	Апанасенковский [Apanasenkovskiy district]	124	10,63
4	Изобильненский [Izobil'nenskiy district]	55	4,71
5	Левокумский [Levokumskiy district]	127	10,88
6	Степновский [Stepnovskiy district]	114	9,77
7	Курский [Kurskiy district]	145	12,43
8	Туркменский [Turkmenskiiy district]	123	10,54
9	Шпаковский [Shpakovskiy district]	33	2,83
10	Минераловодский [Mineralovodskiy district]	13	1,11
11	Грачевский [Grachevskiy district]	42	3,60
12	Петровский [Petrovskiy district]	51	4,37
13	Ипатовский [Ipatovskiy district]	61	5,23
14	Нефтекумский [Neftekumskiy district]	51	4,37
15	Александровский [Aleksandrovskiy district]	35	3,00
16	Город Невинномыск [City of Nevinnomyssk]	77	6,60
Итого [Total]		1 167	100

Анализ биотопического распределения гнездовых участков кольчатой горлицы, высоты и характера расположения гнёзд показал, что она гнездится преимущественно в сельских населённых пунктах, а также на участках древесных насаждений городов; доля гнёзд, расположенных в лесополосах и садово-дачных участках, существенно ниже (табл. 3). Птицы используют для постройки гнёзд 20 видов деревьев, при этом наиболее предпочитаемыми являются хвойные породы с густой кроной – туя восточная (*Platyclusus orientalis* (L.) Franco) и ель обыкновенная (*Picea abies* (L.) H.Karst.). Установлено, что птицы предпочитают располагать гнёзда на высоте от 3 до 6 м (80,4%; $n=454$); доля гнёзд, расположенных выше 9 м, незначительна (9,1%).

Гнездятся горлицы отдельными парами в относительной близости друг от друга. Гнездо обычно устраивают на прочных горизонтальных ветвях деревьев или в развилке. Весь материал для гнезда приносит самец, укладывает его самка. По наблюдениям за процессом строительства 5 гнёзд в хуторе Поперечном Туркменского района, птицы собирали материал в радиусе не более 100 м от гнездового дерева. Гнездо представляет собой рыхлый, почти всегда просвечивающий настил сухих веток с очень плоским лотком. Однако ранние гнёзда, построенные в марте, и поздние, построенные в октябре–ноябре, имеют более плотную конструкцию из прутиков и сухой травы, что, видимо, улучшает теплоизоляцию.

Таблица 3 [Table 3]

**Стациальные параметры расположения гнёзд
кольчатой горлицы в различных биотопах**
[The parameters of the habitat location of *Streptopelia decaocto* nests in various biotopes]

№ п/п	Место располо- жения гнезда [Placement of nest location]	Высота располо- жения гнезда, м [Height of nest location, m]		Число гнёзд в разных биотопах [Number of nests in various biotopes]			Общее число гнёзд / Доля от общего числа [Total number of nests / Share of the total number], %
		$M \pm m_M$	CV, %	I	II	III	
1	<i>Platyclus orientalis</i> (L.) Franco	3,33±0,037	11,25	58	–	47	105/21,4
2	<i>Picea abies</i> (L.) H.Karst.	4,30±0,105	16,61	29	–	18	47/9,6
3	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	6,31±0,723	66,78	19	3	13	35/7,2
4	<i>Juglans regia</i> L.	6,13±0,537	46,29	16	1	12	29/5,9
5	<i>Prunus</i> subgen. <i>Cerasus</i> (Mill.) A.Gray	4,36±0,141	16,46	22	3	2	27/5,6
6	<i>Prunus domestica</i> L.	3,90±0,168	21,48	18	1	7	26/5,4
7	<i>Prunus armeniaca</i> L.	3,89±0,190	23,42	15	4	5	24/4,9
8	<i>Salix</i> L.	4,28±0,181	18,39	7	3	10	20/4,1
9	<i>Fraxinus lanceolata</i> L.	5,73±0,466	34,52	3	2	14	19/3,8
10	<i>Acer platanooides</i> L.	5,06±0,644	50,83	5	4	8	17/3,5
11	<i>Betula</i> L.	6,74±0,557	33,11	9	1	7	17/3,5
12	<i>Gleditsia triacanthos</i> L.	9,78±0,884	33,82	6	5	4	15/3,1
13	<i>Ulmus parvifolia</i> Jacq.	6,37±0,633	37,21	8	3	4	15/3,1
14	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	4,78±0,841	49,78	9	–	–	9/1,8
15	<i>Malus domestica</i> Borkh.	4,32±0,271	17,76	8	–	1	9/1,8
16	<i>Pyrus communis</i> L.	4,26±0,221	13,73	3	2	3	8/1,6
17	<i>Populus nigra</i> L.	9,76±1,964	53,23	3	1	4	8/1,6
18	<i>Catalpa speciosa</i> Warder ex Engelm.	4,04±0,280	18,34	–	–	8	8/1,6
19	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	2,81±0,148	12,88	–	6	1	7/1,4
20	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	4,00±0,359	21,98	1	1	5	7/1,4
21	Опоры ЛЭП [Pylons of power lines]	–	–	15	–	2	17/3,5
22	Люстры под навесом [Ceiling lights]	–	–	6	–	–	6/1,2
23	Виноградная беседка [Grape arbors]	–	–	6	–	–	6/1,2
24	Балкон [Balcony]	–	–	3	–	–	3/0,6
25	Сарай [Shed]	–	–	3	–	–	3/0,6
26	Таль электрическая [Electric hoists]	–	–	2	–	–	2/0,4
27	Вертикальная асбестовая труба [Vertical asbestos pipe]	–	–	1	–	–	1/0,2
Итого [Total]		4,81	–	275	40	175	490/100

Примечание: I – сельские населённые пункты; II – лесополосы, садово-дачные участки; III – озеленённые территории селитебных зон городов.

[Note: I - Rural settlements; II - Forest belts, garden plots; III - Greened residential areas of cities].

В зарубежных и отечественных научных публикациях встречаются упоминания о нетипичном гнездовании кольчатой горлицы [19, 26–28] – на различных жилых зданиях, опорах электропередач и других технических сооружениях. Чаще всего такие нетипичные места птицы используют для повторного гнездования после разорения первых кладок хищниками, в основном кошками [26]. В целом за период 2008–2019 гг. нами зафиксировано 36 (7,7%) случаев нетипичного гнездования (см. табл. 3). Интересный случай отмечен 5 мая 2020 г. на хуторе Поперечном Туркменского района (45°25'N; 43°16'E). Здесь обнаружено рыхлое, состоящее из нескольких веточек гнездо кольчатой горлицы, расположенное на высоте всего 120 см на сетчатом заборе около собачьей конуры. Спустя неделю, 12 мая, самка в этом гнезде плотно насиживала 2 яйца.

При обследовании различных типов биотопов отмечены факты частичного или полного перекрытия гнездовых участков кольчатой горлицы с участками других видов птиц. Зафиксированы случаи гнездования кольчатой горлицы:

– в заселённых грачевниках *Corvus frugilegus* (Апанасенковский район, с. Малая Джалга (46°01'00"N; 42°45'00"E) 26 апреля 2012 г.; Арзгирский район, с. Родниковское (45°26'19"N; 44°05'38"E) 8 июня 2012 г.; Лёвокумский район, с. Турксад (45°13'03"N; 44°52'48"E) 16 мая 2014 г.);

– в колонии черногрудого воробья *Passer hispaniolensis* (Лёвокумский район, с. Величаевское (44°56'47"N; 45°08'16"E) 30 июня 2006 г.);

– вблизи гнезда чернолобого сорокопута *Lanius minor* (Изобильненский район, пос. Рыздвянный (45°15'38"N; 41°50'46"E) 16 мая 2015 г., расстояние 50 м и с. Птичьё (45°31'23"N; 41°42'55"E) 18 мая 2015 г.).

Отмечено гнездование кольчатой горлицы вблизи гнёзд хищных птиц:

– могильника *Aquila heliaca* (Шпаковский район, пос. Новый Бешпагир (44°56'28"N; 42°21'52"E) 17 июня 2012 г., расстояние между гнёздами 100 м);

– обыкновенной пустельги *Falco tinnunculus* (Арзгирский район, детский оздоровительный лагерь «Степнячок» (45°32'18"N; 44°21'68"E) 20 июня 2015 г., расстояние 7 м; Курской район (44°03'19"N; 44°30'10"E) 2 июня 2017 г., расстояние 40 м; Изобильненский район, окрестности пос. Солнечнодольск (45°18'11"N; 41°30'31"E) 24 мая 2017 г., расстояние 20 м);

– орлана-белохоста *Haliaeetus albicilla* (Степновский район, Иргаклинский заказник (44°19'29"N; 44°44'00"E) 12 июня 2019 г., расстояние 50 м), там же были отмечены 2 гнезда чернолобого сорокопута в 5 и 12 м.

Наиболее раннее появление кольчатой горлицы на участках гнездования, отчетливые проявления токования отмечали с середины февраля – начала марта. Начало строительства гнезд происходило во 2–3-й декадах марта и начале апреля (16.03–4.04).

В Ставропольском крае кольчатая горлица за сезон в большинстве случаев делает 3 кладки, предполагается также возможность 4-й кладки в случае гибели предыдущей [5, 28]. За период наших наблюдений зарегистрированы

6 случаев 4-го цикла размножения, 2 из которых окончились неудачей, что связано с неблагоприятными погодными условиями (сильный ветер, дождь). Наши наблюдения подтверждаются литературными данными: появление первых кладок приходится на 1–2-ю декады апреля; также описаны 2 случая 4-го цикла размножения, один из которых оказался неудачным [28].

Наиболее ранние кладки найдены: 15 марта 2018 г., 17 марта 2019 г., 20 марта 2012 г. Из ранних гнезд в 21 случае отмечены кладки, в которых было одно (42,85%, $n = 9$) либо два яйца (57,15%, $n = 12$), в среднем $-1,57 \pm 0,15$, что согласуется с данными предыдущих исследований в регионе [5, 30]. Самые поздние кладки обнаружены 2 ноября 2019 г., 24 октября 2016 г., 13 октября 2011 г., 9 октября 2016 г. В Центральном Предкавказье известны неудачные попытки зимнего гнездования вида [29].

Горлицы откладывают по яйцу в сутки, реже через сутки [22]. Кладка обычно состоит из двух яиц, реже из одного [3, наши данные]. Так, из проверенных нами 58 кладок в апреле, мае и июне, только в 11 гнездах найдено по одному яйцу. Насиживание начинается с откладки первого яйца, о чём свидетельствует неодновременное вылупление птенцов. Второй птенец вылупляется на сутки, реже – на двое позже первого [3, 22, наши данные]. Полный гнездовой цикл с момента откладки первого яйца до вылета птенцов из гнезда у горлицы составляет 36–41 (в среднем 38) день [28, наши данные].

По литературным данным [30], размеры яиц кольчатой горлицы в Ставропольском крае составляют $33,5 \times 25,3 - 28,6 \times 21,9$ мм; в среднем $-30,9 \times 24,1$ мм ($n = 12$). Это согласуется с нашими промерами: $31,6 \times 25,0 - 29,1 \times 23,8$ мм, в среднем $-30,5 \times 24,6$ мм ($n = 25$).

По наблюдениям за суточной активностью насиживающей самки (рис. 3), процесс инкубации занял 91,5–97,4% общего времени, прерываясь только на 52–74 минуты при продолжительности наблюдений более 14 часов в сутки и на 26 минут за 6 часов наблюдений (в диаграмме отражено как показатель «кладка без насиживания»). При этом в перерывах между насиживанием птица находилась преимущественно рядом с гнездом. Поведение самки зависело от погодных условий. Она чаще покидала гнездо в ясную и солнечную погоду, нежели в пасмурную и дождливую. Различные виды птиц часто пролетали над её гнездом или сидели рядом с ней (рис. 4). При этом горлица плотно насиживала кладку, не реагируя как на мелких птиц, так и на крупных хищников. Однако при появлении людей самки покидают гнездо [29]. В наших исследованиях отмечено, что реакция на наблюдателя у насиживающей самки проявлялась при его приближении к гнезду на расстояние менее 3 м. При этом она незаметно покидала гнездо и спустя некоторое время также незаметно возвращалась. Самец всегда находился рядом с насиживающей самкой и охранял ее. Толерантность, проявляемая кольчатой горлицей к другим видам птиц, по-видимому, является поведенческой адаптацией, обеспечивающей виду высокую степень успешности размножения.

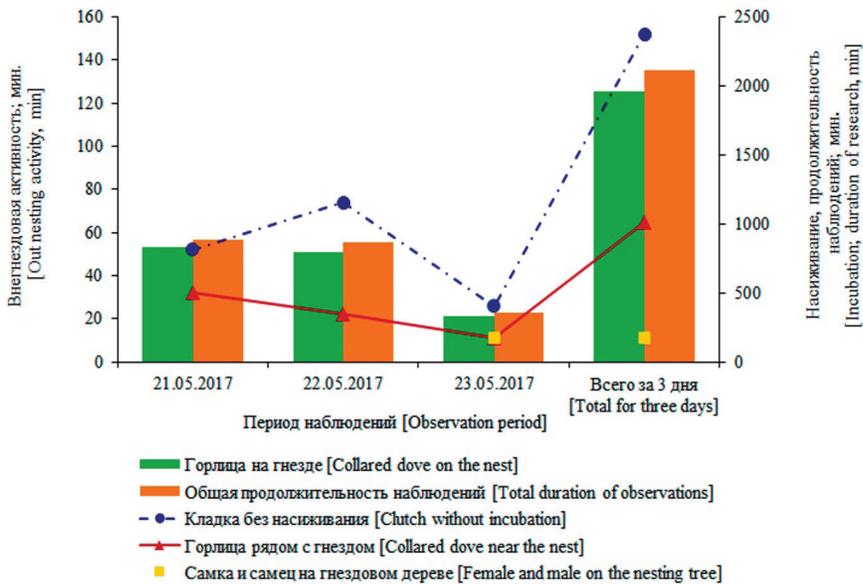


Рис. 3. Хронометраж суточной активности насиживающей самки (21–23.05.2017 г.; общая продолжительность наблюдений – 35 ч 12 мин)

[Fig. 3. Daily activity timing of incubating *Streptopelia decaocto* (21-23.05.2017; total duration of observations is 35 hours 12 minutes)]

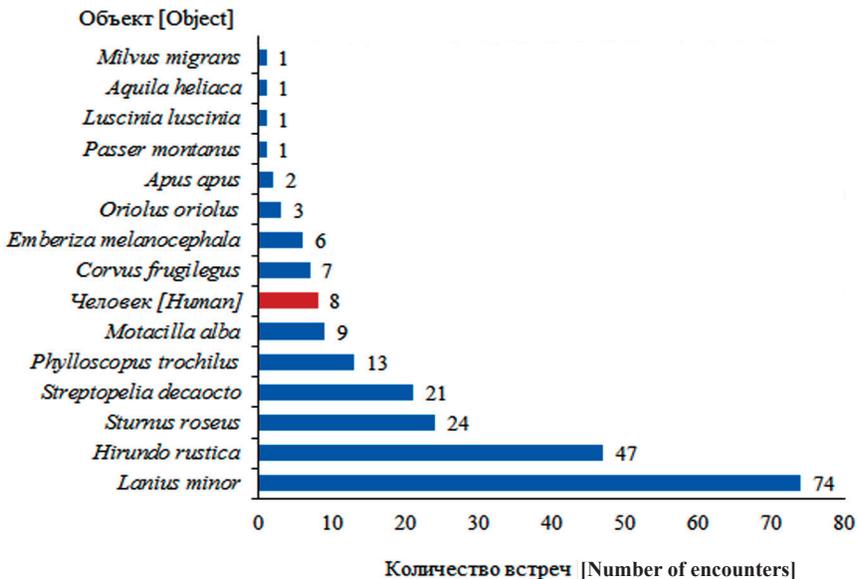


Рис. 4. Регистрация различных видов птиц и человека возле гнезда горлицы (21–23.05.2017 г.; общая продолжительность наблюдений – 35 ч 12 мин. Общее количество учтенных птиц – более 600, с учетом массовых групп и стай)

[Fig. 4. Log of various bird species and humans observed near the *Streptopelia decaocto*'s nest (21-23.05.2017; total duration of observations is 35 hours 12 minutes. Total recorded number of birds (including mass groups and flocks) is more than 600)]

Постэмбриональная смертность кольчатой горлицы в среднем за период 2008–2019 гг. составила 13,5% (из 490 гнёзд погибли 66). Как правило, гибнут ранние и поздние кладки. В частности, отмечено разорение кладок в марте и апреле, когда деревья ещё не облиственны, и гнёзда хорошо заметны. Так, в указанный период зафиксировано разорение гнёзд в 49 случаях кошками (в с. Иргаклы – 12 гнёзд, в с. Птичьё – 23, в хут. Среднем – 14); в 15 случаях – серыми воронами (хут. Поперечный – 11 гнёзд; пос. Чограйский – 4 гнезда). По одному гнезду в г. Ставрополе и в пос. Бородыновке Минераловодского района разорены сойкой. В 2019 г. октябрь и ноябрь на Ставрополье отличались прохладной и дождливой погодой, и постэмбриональная смертность поздних кладок (октябрь–ноябрь) оказалась высокой – 87,4%. Таким образом, успех размножения кольчатой горлицы зависит от сроков начала репродуктивного периода, характера погодных условий и влияния хищников (в основном, кошек и серых ворон).

Кочёвки и миграции. Известно, что у горлиц, несмотря на их осёдлость, имеется тенденция к разлётам молодняка – до 700 км от места, где они вывелись [31]. Осенью часть птиц образуют крупные скопления и, очевидно, совершают дальние кочёвки в восточном направлении. Кочёвки кольчатых горлиц описаны в литературе [32]: в первые годы появления в городах Восточной Украины они вели осёдлый образ жизни, резкие сезонные колебания численности стали отмечаться только в зимы 1975/76, 1976/77 гг. Уже адаптировавшаяся часть популяции совершает нерегулярные откочёвки из охваченных сильными похолоданиями мест в более южные районы. Другая же часть живёт оседло, гибнет в морозные зимы, что свидетельствует об отсутствии адаптации к новым условиям. Не исключено, что эти особи – новоселенцы, пополнившие местную популяцию из числа птиц, продолжающих широким фронтом своё расселение на восток.

Наши исследования подтверждают подобные тенденции. Так, мы наблюдали 23 сентября 2009 г. около 350 кольчатых горлиц на проводах около с. Зимняя Ставка (44°55'N; 45°20'E); 5 октября 2011 г. стая из 170 горлиц сидела на проводах у с. Новоселицкого (44°45'N; 43°26'E); 12 октября 2016 г. около 200 горлиц отмечено на проводах у с. Иргаклы (44°22'N; 44°45'E); 29 сентября 2019 г. на участке от с. Новоселицкого до с. Величаевского отмечены скопления из 50–200 особей (870 птиц на 150 км). Все встречи указывали на то, что горлицы перемещались в восточном направлении в сторону Каспийского моря.

Зимует данный вид, концентрируясь у элеваторов, зернотоков, вдоль дорог. Кормится часто на приусадебных хозяйствах с домашней птицей. Почти во всех районах Ставрополья имеются крупные элеваторы, зимой скопления птиц на них наблюдали в городах Изобильном, Светлограде, Новоалександровске, Ипатово, Благодарном, Зеленокумске и сёлах Арзгир, Левокумское, Сотниковское. В некоторые дни здесь скапливалось от 200 до 500 особей. Часть горлиц выбирает высокие и густые хвойные деревья – ели и туи, на

которых они ночуют скоплениями до 150 особей. Интересный факт удалось отметить в январе 2011 г. в г. Ставрополе: 5 кольчатых горлиц использовали для ночёвки крупные шары омелы белой (*Viscum album* L.).

Лимитирующие факторы. По нашим наблюдениям, одними из основных естественных врагов кольчатой горлицы на исследуемой территории являются домашние кошки, серая ворона, сойка, тетереvyтник, перепелятник, филин. Мы неоднократно наблюдали, как домашние кошки разоряют гнёзда горлиц с птенцами, особенно в частном секторе. Вблизи с. Киевка Апанасенковского района 23 июня 2015 г. найдена погибшая самка возле её гнезда с повреждениями головы, характерными для нападения тетереvyтника. Аналогичный случай отмечен в лесополосе у хут. Поперечного Туркменского района 18 мая 2016 г. В лесополосе у с. Киевка охота тетереvyтника на кольчатых горлиц зарегистрирована дважды в июне 2014 г. и трижды в июне 2015 г. Перепелятник, который охотится преимущественно на голубей, оказывает на кольчатых горлиц ещё большее влияние. Мы наблюдали, как 12 мая 2016 г. на краю леса у р. Кума в 3 км от с. Величаевское Левокумского района хищник сбил горлицу. Фрагменты костей и перьев кольчатой горлицы отмечены 23 июня 2018 г. в погадках филина, собранных в пос. Ясный Туркменского района. В целом, усиление пресса тетереvyтника и других хищников оказывает негативное влияние на птиц в урбанизированных ландшафтах [33].

Значительное воздействие на кольчатых горлиц оказывают и погодно-климатические факторы. В литературе есть сведения, что горлицы в условиях Восточного Казахстана нормально переносят морозы $-30...-40$ °С, а от частых ветров укрываются в хозяйственных постройках [34]. Однако на юге России зимой даже при -15 °С нами отмечены погибшие птицы (в Арзгирском, Советском, Нефтекумском и Туркменском районах Ставропольского края).

Также выявлено, что у кольчатых горлиц ранние и поздние кладки и птенцов часто сдувают сильные ветра как в сёлах, так и в лесополосах, особенно в восточных и северо-восточных районах. В конце июня – начале июля 2019 г. мы отмечали гибель птенцов в период значительного повышения скорости ветра, понижения среднесуточной температуры и продолжительных осадков.

Кроме того, как показывают наши наблюдения, большое число горлиц гибнет от столкновения с движущимся автотранспортом: чаще это происходит в середине лета и осенью, когда начинается транспортировка зерна. Птицы в этот период концентрируются на обочинах дорог и попадают под колёса автомобилей или разбиваются о лобовое стекло. Всего в период 2008–2019 гг. отмечено 14 случаев гибели горлиц при столкновении с машинами.

Заключение

Таким образом, гнездовая численность кольчатой горлицы в Ставропольском крае обнаруживает существенную межгодовую изменчивость. Уста-

новлено, что для края зарегистрирован почти 1,5-кратный рост гнездовой численности вида с 2006 по в 2019 г. – с 47 до 65 тыс. пар. Вид явно тяготеет к районам края с развитым животноводством. С ландшафтной точки зрения вид предпочитает степную провинцию, а также полупустынно-сухостепную; ниже плотность гнездового населения в лесостепи; самые низкие показатели характерны для предгорных районов. Основные местообитания вида – сельские населённые пункты, участки древесных насаждений в городах, а также лесополосы в агроландшафтах. Птицы гнездятся преимущественно на деревьях, установлены и случаи нетипичного расположения гнёзд. Кольчатая горлица делает 3–4 кладки за сезон, при этом часть из них могут быть повторными в случае неблагоприятного гнездования. Постэмбриональная смертность составляет в среднем 13,5%. Отмечены массовые осенне-зимние кочёвки птиц, при этом величина стай достигала 500 особей. Установлены лимитирующие факторы для вида: гибель кладок и птенцов от хищников и непогоды, а также гибель взрослых птиц при аномально низких температурах зимой и на автодорогах.

Литература

1. Степанян Л.С. Конспект орнитологической фауны России и сопредельных территорий (в границах СССР как исторической области). М. : Академкнига, 2003. 808 с.
2. BirdLife International. *Streptopelia decaocto*. Красный список угрожаемых видов МСОП. 2019. URL: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T22727811A154457750.en> (дата обращения: 03.02.2020).
3. Хохлов А.Н. Кольчатая горлица *Streptopelia decaocto* в урбанизированных ландшафтах Центрального Предкавказья // Русский орнитологический журнал. 2012. Т. 21, экспресс-выпуск 808. С. 2639–2640.
4. Тельпов В.А. Кольчатая горлица на Кавминводах // Экологические проблемы Ставропольского края и сопредельных территорий : материалы краевой научно-практической конференции / отв. ред. А.Н. Хохлов, В.В. Савельева. Ставрополь : Ставроп. краев. совет ВООП, 1989. С. 308.
5. Бобенко О.А. К экологии кольчатой горлицы в Ставропольском крае // Кавказский орнитологический вестник. 2006. Вып. 18. С. 3–15. URL: <https://zoomet.ru/zhurnal/Kov-2006-18.pdf> (дата обращения: 23.05.2020).
6. Дарда Е.С. Статистический анализ и прогнозирование производства основных видов продукции животноводства. М. : ИНО, 2011. 109 с.
7. Доклад о состоянии и использовании земель сельскохозяйственного назначения Российской Федерации в 2015 году / Исполнители: Н.С. Самойлова, А.В. Борисов. М. : Росинформагротех, 2017. 196 с.
8. Доклад о состоянии окружающей среды и природопользовании в Ставропольском крае в 2018 году / исполнитель А.А. Коровин. Ставрополь : Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Ставропольского края, 2019. 140 с.
9. Шальнев В.А. Ландшафты Северного Кавказа: эволюция и современность. Ставрополь : Изд-во СГУ, 2004. 264 с.
10. Новиков Г.А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных. М. : Советская наука, 1953. 502 с.
11. Наумов Р.Л. Методика абсолютного учета птиц в гнездовой период на маршрутах // Зоологический журнал. 1963. Ч. 44, вып. 1. С. 81–92.

12. Бибби К., Джонс М., Марсден С. Методы полевых экспедиционных исследований. Исследования и учёты птиц / пер. с англ. Е.А. Лебедевой. М. : Союз охраны птиц России, 2000. 186 с.
13. Маловичко Л.В., Швыкова А.В., Зубалий А.М. Характеристика орнитонаселения окултуренного ландшафта в субаридной зоне на северо-востоке Ставрополя // Экосистемы: экология и динамика. 2019. Т. 3, № 1. С. 191–203. doi: 10.24411/2542-2006-2019-10030
14. Годзевич Б.В., Каторгин И.Ю., Савельева В.В., Шальнев В.А. Атлас земель Ставропольского края. Ставрополь : Комитет по земельным ресурсам и землеустройству Ставроп. края, 2000. 118 с.
15. Климишин В.С. Кольчатая горлица в условиях г. Львова // Материалы 3-й Всесоюзной орнитологической конференции, 11–17 сентября 1962 г. Львов : Изд-во Львов. ун-та, 1962. Ч. 2. С. 28–29.
16. Delin H., Svensson L. Photographic Guide to the Birds of Britain and Europe. London : Hamlyn Publishing group, Octopus Publishing group, 1988. 288 p.
17. Gibbs D., Barnes E., Cox J. Pigeons and Doves. A Guide to the Pigeons and Doves of the World. New Haven : Yale University Press, 2001. 615 p.
18. Страутман Ф.И. О расселении некоторых видов птиц в Закарпатской и западных областях Украины // Природа. 1951. № 1. С. 68–69.
19. Rocha-Camarero G., Hidalgo de Trucios S. The spread of the Collared Dove *Streptopelia decaocto* in Europe: colonization patterns in the west of the Iberian Peninsula // Bird Study. 2002. № 49. PP. 11–16. <https://doi.org/10.1080/00063650209461239>
20. Ганя И.М. О новых элементах орнитофауны Молдавии // Известия Молдавского филиала АН СССР. 1959. № 8 (53). С. 43–54.
21. Hengeveld R. What to Do about the North American Invasion by the Collared Dove? // Journal of Field Ornithology. 1993. Vol. 64 (4). PP. 477–489. URL: www.jstor.org/stable/4513859 (дата обращения: 23.05.2020).
22. Талпош В.С. Кольчатая горлица *Streptopelia decaocto* на Украине // Русский орнитологический журнал. 2019. Т. 28, экспресс-выпуск 1862. С. 5859–5866.
23. Hayslette S. Seed-size selection in Mourning Doves and Eurasian Collared-Doves // The Wilson Journal of Ornithology. 2006. Vol. 118, № 1. PP. 64–69. [https://doi.org/10.1676/1559-4491\(2006\)118\[0064:SSIMDA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1676/1559-4491(2006)118[0064:SSIMDA]2.0.CO;2)
24. Свиридова Т.В., Маловичко Л.В., Гришанов Г.В., Венгеров П.Д. Условия размножения птиц в современном агроландшафте европейской части России: влияние интенсификации и поляризации сельского хозяйства. Ч. I: Местообитания // Поволжский экологический журнал. 2019. № 1. С. 61–77. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2Q19-1-61-77>
25. Кошелев А.И. Кольчатая горлица – *Streptopelia decaocto* (Frivaldszky, 1838) // Птицы России и сопредельных регионов: Рябкообразные, Голубеобразные, Кукушкообразные, Сорообразные / под ред. В.Д. Ильичёва, В.Е. Флинта. М. : Наука, 1993. С. 118–131.
26. Маловичко Л.В., Харин А.Н., Гутор Г.Н., Афанасова Т.В. Нетипичное гнездование кольчатой горлицы *Streptopelia decaocto* в Ставропольском крае // Русский орнитологический журнал. 2019. Т. 28, экспресс-выпуск 1865. С. 5970–5977.
27. Scheidt S.N., Hurlbert A.H. Range Expansion and Population Dynamics of an Invasive Species: The Eurasian Collared-Dove (*Streptopelia decaocto*) // PLoS ONE. 2014. 9(10): e111510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111510>
28. Бобенко О.А., Хохлов А.Н., Илюх М.П. Сроки и особенности гнездования голубеобразных в Ставропольском крае // Кавказский орнитологический вестник. 2011. Вып. 23. С. 9–14. URL: <https://zoomet.ru/zhurnal/Kov-2011-23.pdf> (дата обращения: 23.05.2020).

29. Хохлов А.Н., Харченко Л.П., Заболотный Н.Л. О необычных сроках гнездования кольчатой горлицы в Предкавказье // Актуальные вопросы экологии и охраны природы степных экосистем и сопредельных территорий : сборник материалов межреспубликанской научно-практической конференции. Краснодар : Изд-во Кубанского гос. ун-та, 1994. С. 174.
30. Ильяхов М.П., Хохлов А.Н. Кладки и размеры яиц птиц Центрального Предкавказья. Ставрополь : Ставропольское отделение Союза охраны птиц России, 2006. 220 с.
31. Stresemann E., Nowak E. Die Ausbreitung der Türkentaube in Asien und Europa // J. Ornithol. 1958. № 99. Vol. 3. PP. 243–296.
32. Кривицкий И.А., Кныш Н.П., Пекарская И.С., Садовская Н.Г., Ковалёв В.А. Местные миграции кольчатой горлицы на северо-востоке Украины // 2-я Всесоюзная конференция по миграциям птиц : тезисы сообщений / отв. ред. Е.В. Гвоздев. Алма-Ата : Наука, 1978. Ч. 2. С. 79–81.
33. Белик В.П. Хищничество тетеревины и его роль в биоценозах // Ястреб-тетеревины: Место в экосистемах России : сборник статей по ястребу-тетеревины (*Accipiter gentilis*) к IV конференции по хищным птицам Северной Евразии. Пенза ; Ростов, 2003. С. 146–168.
34. Березовиков Н.Н., Фельдман А.С., Брыгинский С.А. Зимовка кольчатых горлиц *Streptopelia decaocto* в селе Приречное в Семипалатинском Прииртышье в 2014–2019 годах // Русский орнитологический журнал. 2019. Т. 28, экспресс-выпуск 1748. С. 1354–1357.

Поступила в редакцию 13.02.2020; повторно 01.06.2020 г.;
принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Маловичко Любовь Васильевна – д-р биол. наук, профессор кафедры зоологии, факультет зоотехнии и биологии, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1040-2890>

E-mail: l-malovichko@yandex.ru

Железнова Татьяна Константиновна – д-р биол. наук, профессор кафедры зоологии, факультет зоотехнии и биологии, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

E-mail: larus-minutus@yandex.ru

Зубалий Анастасия Михайловна – канд. биол. наук, доцент кафедры зоологии, факультет зоотехнии и биологии, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5114-830X>

E-mail: zanast@mail.ru

Швыкова Анна Васильевна – студентка магистратуры кафедры зоологии, факультет зоотехнии и биологии, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

E-mail: haska548@yandex.ru

Для цитирования: Маловичко Л.В., Железнова Т.К., Зубалий А.М., Швыкова А.В. Современное состояние кольчатой горлицы *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) в Ставропольском крае // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 46–68. doi: 10.17223/19988591/51/3

For citation: Malovichko LV, Zheleznova TK, Zubalii AM, Shvykova AV. Current status of the *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) in Stavropol region. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:46-68. doi: 10.17223/19988591/51/3 In Russian, English Summary

Lubov V. Malovichko, Tatiana K. Zheleznova, Anastasiia M. Zubalii, Anna V. Shvykova

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Moscow, Russian Federation

Current status of the *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) in Stavropol region

The Eurasian collared dove *Streptopelia decaocto* is a Palearctic species that demonstrates an example of intensive and rapid dispersal across Eurasia. At the same time, the expansion of the area is combined with its pulsation, and the reasons for this phenomenon are not completely clear. The Eurasian collared dove shows synanthropic tendencies and prefers to occupy residential habitats and agricultural landscapes when settling. Conservation status of the species according to the IUCN category system is LC: of least concern, but requiring further study and systematic monitoring. All of the abovementioned makes the study of the species very relevant. The aim of our research is to study the current state of the number, distribution and ecology of the Eurasian collared dove in Stavropol region.

The studies were carried out in Stavropol region in 2008-2019 within geographical coordinates 43°43'-46°14'N, 40°51'-45°43'E in semi-desert, steppe and forest-steppe zones and foothills of the southern areas (See Fig. 1). We used methods of walking (over 500 km) and driving (42 000 km) route counts to estimate the population density, numbers of nesting birds, and their landscape distribution. This review also includes our results obtained during bird counts in Stavropol region in 2015-2018, as part of the program of the Atlas of breeding birds of Europe. In the course of this work, we examined 39 50×50 km squares. We studied the nesting biology of the species on the basis on discovering of 1167 breeding pairs, surveys of 490 nests and detailed observations of 58 nests. We conducted mapping of residential nests. Describing nesting structures, we noted the biotope, the species and height of the tree, the height of the nest location, the building material, the content of the nest, the presence and proximity of nests of other bird species, and we performed standard egg measurements. We determined if the breeding was successful by observations of nesting pairs in the period from the beginning of egg laying to the departure of chicks from nests. We studied the daily activity of the birds during the incubation period by visual observations for as long as 35+ hours.

The Eurasian collared dove *Streptopelia decaocto* appeared in Stavropol region in 1973-1978 of the last century and has digested the entire area of the region as a result of intensive settlement. In general, we noted an increase in the nesting population of the species by almost one and a half times over a decade (47 thousand pairs in 2006 to 65 thousand pairs in 2019). The highest nesting population density of the Eurasian collared dove was recorded for the North and North-East of Stavropol region where animal husbandry predominates (See Fig. 1 and 2; Table 1). From the landscape point of view, the species clearly prefers the steppe province (0.27 pairs/ha), as well as semi-desert-dry-steppe (0.25); the density of its breeding population is lower in the forest-steppe (0.1); the lowest indicators are typical of foothill areas (0.05) (See Fig. 1; Table 1 and 2). As we showed in our research in the species' biotopic distribution, the main types of its habitat are rural settlements, forest belts (protective, roadside) and forest plantations (plantings of nonlinear configuration of different areas) in agricultural landscapes. The Eurasian collared dove prefers eastern spruce (*Platyclusus orientalis*) (21.4%) and common spruce (*Picea abies*) (9.6%) for nesting; in total, 20 species of tree species were used. At the same time, we observed atypical cases of nest placement (7.7% of all examined nests) on various residential buildings, power poles and other technical structures (See Table 3). We found the earliest clutches in the second decade of March,

and the latest ones in late October and early November. The value of clutches amounted to an average of 1.57 eggs. The average size of the egg was 30.5 mm×24.6 mm (n=25). When observing the daily activity of the incubating females, we found that they spend 97.4% of the time on the incubation process (See Fig. 3 and 4). The Eurasian collared dove can make three or four clutches per season, while some of them may be repeated in case of poor nesting. Post-embryonic mortality in our studies was averaged 13.5%, often due to nest destruction by predators (mainly cats and grey crows), as well as due to adverse weather conditions. The Eurasian collared dove belongs to sedentary species, but at the same time, we observed mass autumn-winter roamings of the birds with the size of flocks of up to 500 individuals. We found that the limiting factors for the species are loss of clutches and chicks from predators and bad weather, as well as death of adult birds on the roads and as a result of abnormally low temperatures during winter. The results of our study confirmed the steady territorial expansion and growth of the Eurasian collared dove population in Stavropol region, mainly, due to the processes of synanthropization and urbanization and assimilation into agricultural landscapes.

The paper contains 4 Figures, 3 Tables and 34 References.

Key words: population dynamics; population density; biotopic distribution; nesting biology; environmental factors.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Stepanyan LS. Konspekt ornitologicheskoy fauny Rossii i sopredel'nykh territoriy (v granitsakh SSSR kak istoricheskoy oblasti) [Conspectus of the ornithological fauna of Russia and adjacent territories (within the borders of the USSR as a historic region)]. Moscow: Akademkniga Publ.; 2003. 808 p. In Russian
2. BirdLife International. *Streptopelia decaocto*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2019. [Electronic resource]. Available at: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T22727811A154457750.en> (access 03.02.2020).
3. Khokhlov AN. Kol'chataya gorlitsa *Streptopelia decaocto* v urbanizirovannykh landshaftakh Tsentral'nogo Predkavkaz'ya [The collared dove *Streptopelia decaocto* in the urban landscape of the Central Ciscaucasia]. *The Russian J Ornithology*. 2012;21(808):2639-2640. In Russian
4. Tel'pov VA. Kol'chataya gorlitsa na Kavminvodakh [The collared dove on the Caucasian mineral waters]. In: *Ekologicheskie problemy Stavropol'skogo kraya i sopredel'nykh territoriy*. Materialy kraevoy nauch.-prakt. konf. [Environmental problems of Stavropol region and neighboring territories. Proc. of the Regional Sci.-Pract. Conf. (Stavropol', Russia, 4-6 October, 1989)]. Khokhlov AN and Savel'eva VV, editors. Stavropol: Stavropol. kraev. sovet VOOB Publ.; 1989. p. 308. In Russian
5. Bobenko OA. K ekologii kol'chatoy gorlitsy v Stavropol'skom krae [Towards the ecology of the collared dove in Stavropol region]. *Kavkazskiy ornitologicheskii vestnik*. 2006;18:3-15. In Russian
6. Darda ES. Statisticheskii analiz i prognozirovaniye proizvodstva osnovnykh vidov produktsii zhivotnovodstva [Statistical analysis and forecasting of production of the main types of livestock products]. Moscow: INO Publ.; 2011. 109 p. In Russian
7. *Doklad o sostoyanii i ispol'zovanii zemel' sel'skokhozyaystvennogo naznacheniya Rossiyskoy Federatsii v 2015 godu* [Report on the state and use of agricultural land in the Russian Federation in 2015]. Samoylova NS and Borisov AV, editors. Moscow: Rosinformagrotekh Publ.; 2017. 196 p. In Russian
8. *Doklad o sostoyanii okruzhayushchey sredy i prirodopol'zovanii v Stavropol'skom krae v 2018 godu* [Report on the state of the environment and nature management in the Stavropol

- region in 2018]. Korovin AA, editor. Stavropol: Ministerstvo Prirodnikh Resursov i Okhrany Okruzhayushchey Sredy Stavropol'skogo Kraya Publ.; 2019. 140 p. In Russian
9. Shal'nev VA. Landshafty Severnogo Kavkaza: evolyutsiya i sovremennost' [Landscapes of the North Caucasus: evolution and modernity]. Stavropol: Stavropol State University Publ.; 2004. 264 p. In Russian
 10. Novikov GA. Polevyye issledovaniya po ekologii nazemnykh pozvonochnykh [Field studies of the ecology of Terrestrial Vertebrates]. Moscow: Nauka Publ.; 1953. 502 p. In Russian
 11. Naumov RL. Metodika absol'yutnogo ucheta ptits v gnezdovoy period na marshrutakh [Method of absolute counting of birds in the nesting period on routes]. *J Zoology*. 1963;44(1):81-92. In Russian
 12. Bibby C, Jones M, Marsden S. Expedition Field Techniques. Bird Surveys. Lebedeva EA, translated from English. Moscow: Russian Bird Conservation Union Publ.; 2000. 186 p. In Russian
 13. Malovichko LV, Chvikova AV, Zubalii AM. Birds' population of the cultivated landscape in the subarid zone of north-east of Stavropol region. *Ecosystems: Ecology and Dynamics*. 2019;3(1):191-203. doi: [10.24411/2542-2006-2019-10030](https://doi.org/10.24411/2542-2006-2019-10030) In Russian, English Summary
 14. Godzevich BV, Katorgin IYu, Savel'eva VV, Shal'nev VA. Atlas zemel' Stavropol'skogo kraya [Atlas of the lands of Stavropol region]. Stavropol: Komitet po zemelnym resursam i zemleustroystvu Stavrop. Kraya Publ.; 2000. 118 p. In Russian
 15. Klimishin VS. Kol'chataya gorlitsa v usloviyakh g. L'vova [Ringed dove in Lviv]. In: *Materialy 3-y Vsesoyuznoy ornitologicheskoy konferentsii* [Proc. of the 3rd All-Union Ornithol. Conf. (Lviv, USSR, 11-17 September, 1962)]. Voinstvenskiy MA, Gladkov NA, Dement'ev GP, Kistyakovskiy AB, Polushina NA, Strautman FI and Cherkashenko NI, editors. Lviv: Lviv State University Publ.; 1962. Vol. 2. pp. 28-29. In Russian
 16. Delin H, Svensson L. Photographic Guide to the Birds of Britain and Europe. London: Hamlyn Publ., Octopus Publ.; 1988. 288 p.
 17. Gibbs D, Barnes E, Cox J. Pigeons and Doves. A Guide to the Pigeons and Doves of the World. New Haven: Yale University Press; 2001. 615 p.
 18. Strautman FI. O rasselenii nekotorykh vidov ptits v Zakarpatskoy i zapadnykh oblastiakh Ukrainy [On the settlement of some bird species in the Transcarpathian and Western regions of Ukraine]. *Priroda*. 1951;1:68-69. In Russian
 19. Rocha-Camarero G, Hidalgo de Trucios S. The spread of the Collared Dove *Streptopelia decaocto* in Europe: Colonization patterns in the west of the Iberian Peninsula. *Bird Study*. 2002;49:11-16. doi: [10.1080/00063650209461239](https://doi.org/10.1080/00063650209461239)
 20. Ganya IM. O novykh elementakh ornitofauny Moldavii [On new elements of the avifauna of Moldova]. *Izvestiya Moldavskogo filiala AN SSSR*. 1959;8(53):43-54. In Russian
 21. Hengeveld R. What to Do about the North American Invasion by the Collared Dove? *J Field Ornithology*. 1993;64(4):477-489.
 22. Talposh VS. The Eurasian collared dove *Streptopelia decaocto* in Ukraine. *The Russian J Ornithology*. 2019;28(1862):5859-5866. In Russian
 23. Hayslette, S. Seed-size selection in Mourning Doves and Eurasian Collared-Doves. *The Wilson J Ornithology*. 2006;118(1):64-69. doi: [10.1676/1559-4491\(2006\)118\[0064:SSIM DA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1676/1559-4491(2006)118[0064:SSIM DA]2.0.CO;2)
 24. Sviridova TV, Malovichko LV, Grishanov GV, Vengerov PD. Breeding Conditions for Birds in the Nowadays Farmlands of the European Russia: The Impact of agriculture intensification and polarization. Part I. Habitats. *Povolzhskiy J Ecology*. 2019;1:61-77. doi: [10.35885/1684-7318-2Q19-1-61-77](https://doi.org/10.35885/1684-7318-2Q19-1-61-77) In Russian, English Summary
 25. Koshelev AI. Kol'chataya gorlitsa – *Streptopelia decaocto* (Frivaldszky, 1838) [Ringed dove – *Streptopelia decaocto* (Frivaldszky, 1838)]. In: *Birds of Russia and neighboring regions: Grouse-like, dove-like, cuckoo-like and owl-like*. Il'ichev VD and Flint VE, editors. Moscow: Nauka Publ.; 1993. pp. 118-131. In Russian

26. Malovichko LV, Kharin AN, Gutor GN, Afanasova TV. The atypical nesting of the Eurasian collared dove *Streptopelia decaocto* in the Stavropol Krai. *The Russian J Ornithology*. 2019;28(1865):5970-5977. In Russian
27. Scheidt SN, Hurlbert AH. Range expansion and population dynamics of an invasive species: The Eurasian Collared-Dove (*Streptopelia decaocto*). *PLoS ONE*. 2014;9(10):e111510. doi: [10.1371/journal.pone.0111510](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111510)
28. Bobenko OA, Khokhlov AN, Il'yukh MP. Sroki i osobennosti gnezdovaniya golubeobraznykh v Stavropol'skom krae [Terms and features of pigeon-like nesting in Stavropol region]. *Kavkazskiy ornitologicheskii vestnik*. 2011;23:9-14. In Russian
29. Khokhlov AN, Kharchenko LP, Zabolotnyy NL. O neobychnykh srokakh gnezdovaniya kol'chatoy gorlitsy v Predkavkaz'e [On unusual nesting times of the ringed dove in the Caucasus]. In: *Aktual'nye voprosy ekologii i okhrany prirody stepnykh ekosistem i sopredel'nykh territoriy*. Sbornik materialov Mezhhrespublikanskoj nauchno-prakticheskoy konferentsii [Current issues of ecology and nature protection of steppe ecosystems and adjacent territories. Proc. of the Int-Republ. Sci.-Pract. Conf. (Krasnodar, Russia, 24-25 April, 1994)]. Nagalevskiy VYa, Plotnikov GK, Emtyl' MKh and Krutolapov VA, editors. Krasnodar: Kuban State University Publ.; 1994. p. 174. In Russian
30. Il'yukh MP, Khokhlov AN. Kladki i razmery yaits ptits Tsentral'nogo Predkavkaz'ya [Clutches and egg sizes of birds of the Central Caucasus]. Stavropol: Stavropol branch of the Russian Bird Conservation Union Publ.; 2006. 220 p. In Russian
31. Stresemann E, Nowak E. Die Ausbreitung der Türkentaube in Asien und Europa [The spread of the dove in Asia and Europe]. *J Ornithol*. 1958;99(3):243-296. In German
32. Krivitskiy IA, Knysh NP, Pekarskaya IS, Sadovskaya NG, Kovalev VA. Mestnye migratsii kol'chatoy gorlitsy na severo-vostoke Ukrainy [Local migrations of the collared dove in the North-East of Ukraine]. In: *2-ya Vsesoyuznaya konferentsiya po migratsiyam ptits: Tezisy soobshhenij* [2nd All-Union conference on bird migrations (Alma-Ata, USSR, 8-10 August, 1978)]. Gvozdev EV, editor. Alma-Ata: Nauka Publ.; 1978. Vol. 2. pp. 79-81. In Russian
33. Belik VP. Khishchnichestvo teterevyatnika i ego rol' v biotsenozakh [Predation of the Goshawk and its role in biocenoses]. In: *Yastrebteterevyatnik: Mesto v ekosistemakh Rossii*. Sbornik statey po yastrebu-teterevyatniku (*Accipiter gentilis*) k IV konferentsii po khishchnym ptitsam Severnoy Evrazii [Goshawk (*Accipiter gentilis*). Proceedings for the IV Conf. on Birds of Prey of Northern Eurasia (Penza, Russia, 1-3 February, 2003)]. Galushin VM, editor. Penza-Rostov. 2003. pp.146-168. In Russian. Available at: <http://rrcn.ru/wp-content/uploads/2013/12/Goshawk2003.pdf> (access 23.05.2020).
34. Berezovikov NN, Fel'dman AS, Bryginskiy SA. Wintering of Eurasian collared doves *Streptopelia decaocto* in the village of Prirechnoe in the Semipalatinsk Priirtyshie in 2014-2019. *The Russian J Ornithology*. 2019;28(1865):1354-1357. In Russian

Received 13 February 2020; Revised 01 June 2020;

Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020.

Author info:

Malovichko Lubov V, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Zoology, Faculty of Animal Science and Biology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya Str., Moscow 127550, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1040-2890>

E-mail: l-malovichko@yandex.ru

Zheleznova Tatiana K, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Zoology, Faculty of Animal Science and Biology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya Str., Moscow 127550, Russian Federation.

E-mail: larus-minutus@yandex.ru

Zubalii Anastasiia M, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Zoology, Faculty of Animal Science and Biology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya Str., Moscow 127550, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5114-830X>

E-mail: zanast@mail.ru

Shvykova Anna V, Master's Degree Student, Department of Zoology, Faculty of Animal Science and Biology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya Str., Moscow 127550, Russian Federation.

E-mail: haska548@yandex.ru

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

UDC 577.21

doi: 10.17223/19988591/51/4

Yuri M. Novikov¹, Alexander I. Shevchenko²

¹*Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation*

²*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russian Federation*

Cryptic species of *Anopheles messeae* sensu lato (Diptera: Culicidae), their identification, features and nomenclature

*The paper describes the change in perspective in the composition of the *A. messeae* taxonomic unit. Initially, based on the disequilibrium of natural populations, the species was differentiated into A and B forms using chromosomal inversions as markers. The positive assortative mating, as well as the ecological features and geographical distribution of these forms, made it possible to give them the status of species in statu nascendi. Later, we additionally investigated the EcoRI restriction fragments of the genomic DNA and the ITS2 nucleotide sequences in the A and B *A. messeae* species. Unambiguous differences between the species in the former marker and semi-quantitative differences in the latter one, alongside with the absence of hybrids in the populations studied, led us to conclude that *A. messeae* s.l. is comprised of two homosequential cryptic species with parallel chromosomal polymorphisms. Unequivocal parallels between *A. lewisi* Ludlow, 1920 and *A. messeae* B in regards to their features, as well as the identity of *A. daciae* Linton et al., 2004 to *A. messeae* A in its ITS2 sequence, and to *A. messeae* Fall. in diagnostic chromosomal inversions, allowed us to consider *A. lewisi* Ludlow, 1920 and *A. messeae* B as two names of the same biological species, and *A. messeae* Fall., 1926, *A. messeae* A, and *A. daciae* Linton et al., 2004 as three names of the other one. Both are members of the palaeartic group of the *Maculipennis* complex under the names *Anopheles* (*Ano.*) *lewisi* Ludlow, 1920 and *Anopheles* (*Ano.*) *messeae* Falleroni, 1926, respectively.*

The paper contains 5 Figures, 4 Tables and 42 References.

Key words: *Anopheles*; cryptic species; ITS2; maculipennis; polymorphism; taxonprint.

Acknowledgments: The authors thank Tatyana Shelkovnikova for her help with proofreading the final version of the manuscript.

The Authors declare no conflict of interest.

Introduction

Anopheles messeae Fall. belongs to the Palaearctic group of sibling species of the *Maculipennis* complex. Its range extends from the British Isles in the west to the Zeya-Bureya Plains in the east, and from the Arctic Circle to the Transcaucasia

and northern China [1, 2]. Its widespread occurrence creates conditions for a significant epidemiological threat. The study was motivated by the identification of two genetically and ecologically different cryptic species in *A. messeae* Fall. [3, 4], the isolation of a new species *A. daciae* [5] and the uncertainty of taxonomic relationships between *A. messeae* Fall. and the previously described *A. lewisi* [6]. Another incentive for this publication is the fact that a number of authors [7-13] adhere to an alternative point of view and study *A. messeae* as a single species even after the evidence on the complex nature of *A. messeae* s.l. taxon was obtained. We are sure that the complex composition of the *A. messeae* Fall. taxonomic unit and significant physiological differences between its cryptic species, which likely confer different vector abilities, call for its comprehensive analysis. The development of effective control measures depends on the accurate identification of vector species i.e. on whether the taxonomy appropriately reflects the biological reality. Precise species identification should help determine their potential roles in the transmission of pathogens, elucidate larval ecology and the behavior of adult insects, as well as assess their resistance to insecticides.

Materials and methods

This study is based on published research works [4, 14-26] and analysis of samples from Tomsk (08/18/1999) and Teguldet (07/08/2000), which is presented here for the first time. Preparation of chromosomes for analysis, cytogenetic investigation and calculations were carried out as described in these publications.

Results and discussion

The history of identification. *Anopheles messeae* was first described by Domenico Falleroni in 1926 [27], based on the egg coloring, in samples from central Italy. This feature varies slightly between and inside populations but differs drastically from that of other Palaearctic species of the *Maculipennis* complex. The Pontine Marshes located 40 km south-east of Rome are considered to be the typical locality for the species [28].

Cytogenetic analysis of polytene chromosomes is a technique, which revolutionized the field of mosquito sibling species analysis. Guido Frizzi in 1947 [29] was the first to investigate the chromosomes of the salivary glands of *Anopheles maculipennis* s.l. larvae and construct polytene chromosome maps for *A. maculipennis* var. *atroparvus* van Thiel that have become a standard in the field. Kabanova and co-workers [30] initiated the studies of the West Siberian populations of *A. messeae* in the USSR. Following the principles laid by Frizzi [29] and Kitzmiller et al. [31], chromosomes are numbered 1 to 3, in the ascending order of length; long arms are marked with the letter R and short ones are denoted with the letter L. The polytenic complex of *A. messeae* is comprised of five elements, namely 1L, 2R, 2L, 3R and 3L (the right arm of the chromosome 1 is

not polytenized), and is divided into 39 sections, with each section being further divided into two to four segments. Kabanova et al. [32] identified five paracentric inversions in chromosomes within natural mosquito populations. The inverted disk sequences are labeled as 1L1, 1L2, 2R1, 3R1, and 3L1 [2, 32]. Stegnii et al. [14, 15] created more practical photomaps of polytene chromosomes (Fig. 1) and investigated the geographical distribution of inversions [33].

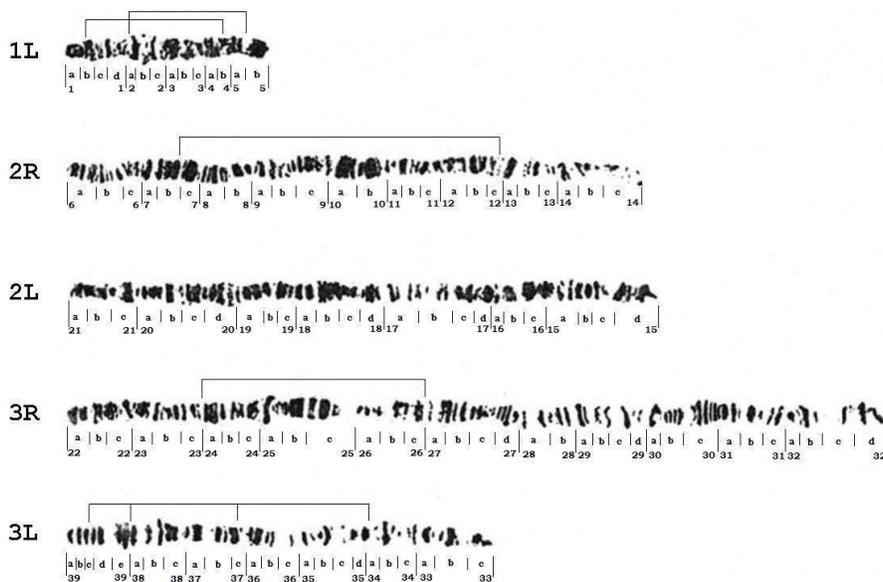


Fig. 1. Photomaps of polytene chromosomes of the salivary glands of *Anopheles messeae* s.l. larvae. Parentheses indicate chromosome regions involved in the inversions. From Stegnii et al. [14], with modifications

Polymorphisms in the sequences of all three chromosomes appeared to be widespread in the species natural populations. Alongside with the standard chromosomal variants, heterozygous and homozygous combinations of sequences that differ in the order of disks were identified. Six chromosome 1 variants (sex chromosome, heterozygotes: 1L/1L1, 1L/1L2, 1L1/1L2, and homozygotes: 1L/1L, 1L1/1L1, 1L2/1L2) were described in females, while males have only three hemizygous variants (1L/−, 1L1/−, 1L2/−, where the symbol ‘−’ denotes chromosome Y). Variants of polymorphic arms of chromosomes 2 and 3 (autosomes, three of each) were also described: 2R/2R, 2R/2R1, 2R1/2R1; 3R/3R, 3R/3R1, 3R1/3R1; 3L/3L, 3L/3L1, 3L1/3L1 (Fig. 2).

Combinations of arm variants of different chromosomes in the processes of recombination and fertilization allow generating a large variety of karyotypes: 162 karyotypes for females ($6 \times 3 \times 3 \times 3$) and 81 for males ($3 \times 3 \times 3 \times 3$) [18]. To shorten karyotype descriptions, we have adopted numeric symbols, first used by Novikov

and Shevchenko [4]: sequence variants of arm 1L are denoted by 1, 2, 3; standard and inverted sequence variants of arms 2R, 3R and 3L are denoted by 1 and 2, respectively. Thus, we describe a female with the standard karyotype 1L/1L-2R/2R-3R/3R-3L/3L as 11'11'11'11, a female heterozygous for four inversions 12'12'12'12, and a male with the karyotype 1L1/-2R/2R-3R1/3R1-3L/3L1 as 2-11'22'12. We adopted the following numeric symbols for individual inversions and combinations that do not include all the elements of the complex: .12. for the 2R/2R1 heterozygote; ..22. for the 3R1/3R1 homozygote; .22'11. for the 2R1/2R1-3R/3R combination. In the digital description of the karyotype, the dot indicates the degree of freedom. Therefore, dot can be preceded or followed by any variant of a polymorphic arm.

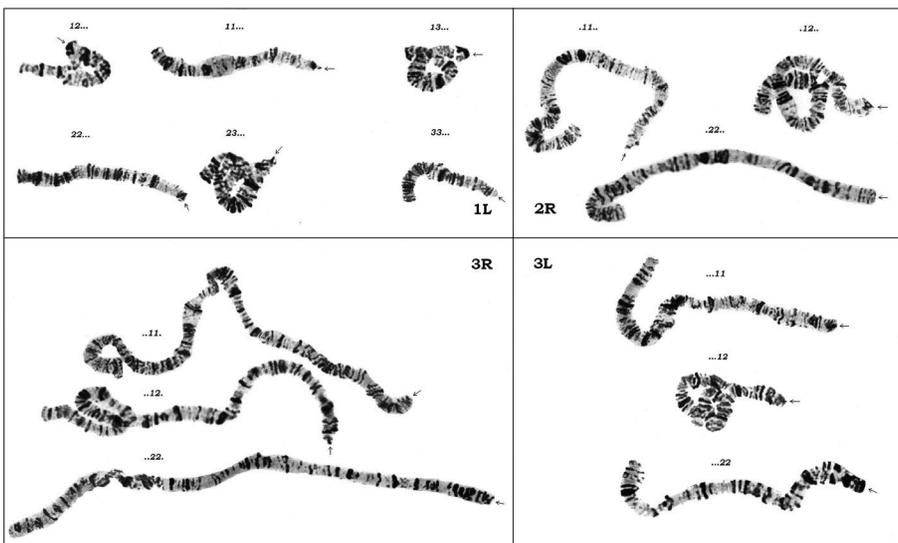


Fig. 2. Variants of polymorphic chromosome arms 1L, 2R, 3R and 3L. Arrows indicate the centromere areas. Numerical designation of variants is described in the text.

Analysis of mosquito populations using inversions as markers showed that neither the Hardy-Weinberg equilibrium nor equilibrium at the level of double-inversion combinations is typical of the central and western parts of the taxon range (Table 1).

In these areas, the karyotype pool appeared to be split into two associative groups of 'co-adapted' chromosomal variants, as it was proposed at the time (Fig. 3) [17, 18, 21]. The composition of the groups was as follows: the first is 1L/1L1, 1L1/1L1, 2R/2R, 3R1/3R1 and 3L/3L; the second is 1L/1L2, 1L2/1L2, 2R/2R1, 2R1/2R1, 3R/3R, 3L/3L1 and 3L1/3L1.

Variants of each group of karyotypes occurred together significantly more often than it is expected with random combinations. The degree of linkage disequilibrium (d) between different variants fluctuated significantly. As we subsequently

discovered, this fact and the fact that the 1L/1L and 3R/3R1 variants combined almost independently were statistically determined, namely by the degree of difference of cryptic species in the frequencies of the same inversions. Populations inhabiting the east of Krasnoyarsk, Altai region, and Kazakhstan with significant frequencies contained variants 1L/1L, 2R/2R and 3R/3R belonging to different associative groups, and most often were in equilibrium. At the next stage, we detected positive assortative mating of individuals in a natural population from the middle of the *A. messeae* range (Table 2) [18].

Table 1

Observed (n_o) and expected (n_e) numbers of variant combinations of the 2R and 3R chromosomal arms in the individual karyotypes in natural populations of Zelenodolsk (G, 55°51' N, 48°31' E; 07/08/1973), Kolarovo (K, 56°20' N; 84°56' E; 08/11/1975), Tomsk (Beloe Ozero; W, 56°50' N; 84°96' E; 08/18/1999) and Teguldet (T, 57°18' N; 88°10' E; 07/07/2000); G and K; by: Novikov [18]

Populations		Combinations of variants								Σ	
		.11'11.	.11'12.	.11'22.	.12'11.	.12'12.	.12'22.	.22'11.	.22'12.		.22'22.
G	n_o	13	25	13	15	29	7	5	9	2	118
	n_e	14.8	24.6	10.2	16.1	26.7	11.1	4.4	7.2	3.0	118.1
K	n_o	24	35	20	49	25	4	19	22	2	200
	n_e	30.8	31.0	7.8	42.8	43.1	10.9	14.9	15.0	3.8	200.1
T	n_o	9	24	55	1	2	5	92	144	66	398
	n_e	4.7	10.6	6.0	31.2	70.5	39.8	51.9	117.2	66.1	398.0
W	n_o	52	362	784	28	27	12	23	21	1	1310
	n_e	64.0	416.4	677.2	8.2	53.1	86.3	0.3	1.7	2.8	1310.0

Note: $d_G = 0.0133$; $d_K = 0.0311$; $d_T = 0.0533$; $d_W = 0.0273$; $p < 0.001$ for populations K, T, W; $p > 0.05$ for G; where d is a measure of linkage disequilibrium.

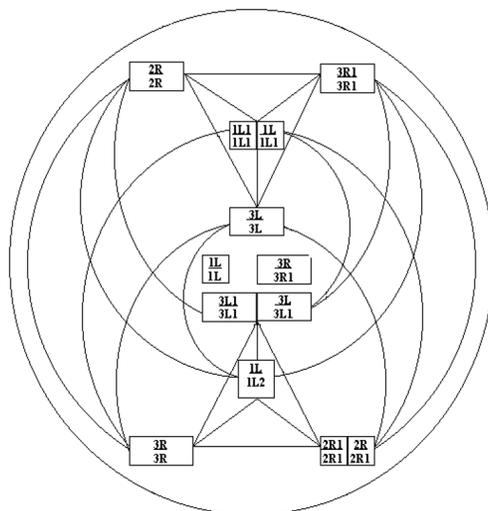


Fig. 3. Interactions of chromosome variants in the *A. messeae* populations from the central part of the range. Positive and negative interactions are indicated by straight lines and arcs, respectively. Variants of the first and the second associative group are presented at the top and at the bottom, correspondingly (from Novikov and Kabanova [21], with modifications)

The deviations of the observed frequencies of chromosome variant combinations from the expected frequencies assuming random pairing (Table 1) are in full agreement with the deviations from the random pair formation in the population (Table 2). In the Kolarovo population, 20 out of 200 individuals had the .11'22. combination of variants, whereas if combined independently, the number of carriers of such combination would be 7.8. In the same population, out of 122 pairs, 26 ♀.11.. × ♂..22. pairings were registered, while only 12.2 were expected in the panmictic population. Further, among the same number of pairs, 25 ♀..22. × ♂.11.. pairings were observed, while only 15.0 were expected.

Table 2

Observed (n_o) and expected (n_e) numbers of combinations of the 2R and 3R variants in the Kolarovo population of *Anopheles messeae* during mating (by: Novikov [18])

♀♀		♂♂					
		.11..	.12..	.22..	..11.	..12.	..22.
.11..	n_o	44	7	4	10	19	26
	n_e	28.4	17.7	9.9	21.2	21.6	12.2
.12..	n_o	14	17	11	23	18	1
	n_e	21.7	12.7	7.6	16.2	16.5	9.3
.22..	n_o	5	13	7	14	11	2
	n_e	12.9	7.6	4.5	9.6	9.8	5.5
..11.	n_o	13	16	12	23	16	2
	n_e	21.2	12.4	7.4	15.8	16.1	9.1
..12.	n_o	25	19	8	19	23	10
	n_e	26.8	15.8	9.4	20.0	20.5	11.5
..22.	n_o	25	2	2	5	9	15
	n_e	15.0	8.8	5.2	11.2	11.4	6.4

Note: 122 pairs were analysed, df in all 4 cases is 8 ($p < 0.001$).

The above data indicate the lack of homogeneity within the *A. messeae* Fall. taxonomic unit, a phenomenon clearly associated with the sexual behavior.

Features of the 'forms' identified within the *A. messeae* Fall. Inversion chromosomal variants, which constitute the first and second associative groups, were found to be confined to different regions of the taxon range. Those in the first group demonstrated higher frequencies in the populations of the western part of the range, whereas those in the second associative group were encountered with high frequencies in Siberia, up to the Transbaikalia region, as well as in the Altai and in Kazakhstan. The widely spread 1L/1L, 2R/2R and 3R/3R1 variants did not comply with the predicted patterns. Despite some regularity in the distribution of chromosomal variants over the species range, there was no reason to isolate the 'northern' and 'southern' karyotypes proposed in many studies. For instance, the 'northern' heterozygotes 2R/2R1 and homozygotes 2R1/2R1 had increased frequencies not in the northern regions, but rather in humid floodplains of major rivers in the central part of the species range [3].

Analysis of the seasonal dynamics of associative groups of inversion chromosomal variants showed that in the Tomsk suburbs (Kolarovo village), the

frequency of carriers of the first group increased early in the breeding season, dropped after 10 days and increased again by mid-August. Carriers of the second group of variants were found to have several peculiar features: during August, they disappeared from the territory of the settlement, being absent among wintering females in the cattle barns, houses and other buildings, and also in the first fraction of overwintered females emerging in the cattle barns in late April. However, they made their appearance among overwintered females in early May. Such dynamics could only be explained by an assumption that mosquitoes within the second group of chromosomal variants overwinter in wild habitats. We managed to collect a small number of mosquitoes in abandoned bath-houses ('banyas') and cellars located outside houses in the settlement. All of them had variants of chromosomes of the second group in their karyotypes or belonged to *A. beklemi-shevi* [20]. It became obvious that *A. messeae* Fall. taxon is deeply differentiated, which is manifested in the genetic, environmental, physiological and behavioral features. Based on these facts, we came to a conclusion of the existence of two 'forms', or species A and B, *in statu nascendi* within *A. messeae* Fall. [3]. The relatively rapid increase in the proportion of the first species from 12% in 1974 to 98% in 1994 and the respective decline of the second one from 88% to 2% in Tomsk region due to global warming was one of the striking pieces evidence in favor of their ecological differentiation [34].

Coluzzi et al. [35], while assessing the significance of disequilibrium in the populations of *Anopheles gambiae* and being able to estimate the degree of assortative mating only using indirect data, confidently interpreted the situation as the initial stage of the speciation process. However, our findings on divergence and specification in *A. messeae* s.l., confirmed by molecular genetic studies, were hushed up for many years [7-13].

Molecular genetic analysis of the identified species was initiated in order to bring additional arguments in favor of the existence of the two species. With the aid of the diagnostic combinations of chromosomal variants, we selected individuals of both cryptic species from several geographically distant populations; in parallel, using the same means of selection, pure 'strains' of species (isofemale broods) were assembled. Samples from these populations and isofemale broods were analyzed by taxonomic typing of restriction fragments of genomic DNA [4, 23].

Three patterns were observed in *EcoRI* taxonprints of the *A. messeae* individuals examined (Fig. 4):

- 1) major fraction (MJ) 170 bp (lanes 1, 2, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 15);
- 2) MJ 110 bp and MJ 65 bp, minor (MN) 170 bp (lanes 3, 4, 8, 9);
- 3) MJ 170 bp, MN 110 bp and MN 65 bp (lanes 10, 13).

The repeats detected in taxonprints are likely to represent an integral part of a bigger, more complex monomeric unit [23]. The first and second patterns are typical of the *A. messeae* B and *A. messeae* A, respectively. The absence of intermediate patterns in the co-habitat zones for these cryptic species can be considered as the proof of their reproductive isolation and of their genuine species status. In the

Altai and Kazakhstan populations, 85% of individuals had pattern 1, characteristic of *A. messeae* B, and 15% showed pattern 3, containing the major fraction typical of *A. messeae* B and two minor fractions were resembling repeats 110 bp and 65 bp of *A. messeae* A. The monomorphism in the 170 bp fraction and the population equilibrium revealed using chromosomal inversions as markers justified the classification of both groups of individuals as belonging to *A. messeae* B.

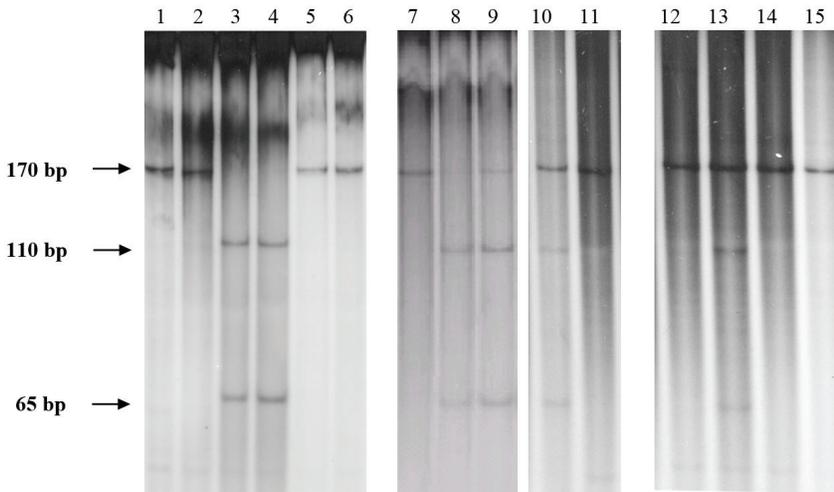


Fig. 4. Taxonprint of *Eco*RI DNA digests of *Anopheles messeae* individuals from natural populations: 1, 'Cherga'; 10, 11, 'Voevodskoe' (Altai); 2, 12-15, 'Pavlodar' (Kazakhstan); 3, 'Kireevsk'; 4, 5, 'Chernilshchikovo'; 7-9, 'Teguldet' (Tomsk region); 6, 'Yakutsk'. Arrows indicate the positions of DNA size markers. From Shevchenko and Novikov [24]

Within both species, individuals with different combinations of inversion chromosome variants had identical electropherograms. On the other hand, a fraction of individuals featuring identical karyotypes belonged to different species [4, 23]. For example, females with a karyotype $II'II'II'II$ (1L/1L-2R/2R-3R/3R-3L/3L) or males with a karyotype $I^{-}II'22'II$ (1L/ $\bar{\bar{}}2R/2R-3R1/3R1-3L/3L$) can equally belong to any of the two species. This finding indicates that isolation of 'northern' and/or 'southern' karyotypes is unsubstantiated. Consequently, the discrete differences of species A and B of the *A. messeae* Fall. taxon in repeated DNA sequences confirm their divergence at the genomic level but are not directly related to their inversion polymorphisms. Thus, even back in 2001, the taxonprint DNA analysis for the first time allowed to accurately identify the species for any *A. messeae* s.l. individual, regardless of its karyotype. This method strongly suggests that *A. messeae* A and *A. messeae* B represent cryptic homosequential species characterized by parallel inversion polymorphisms but significantly different in the frequencies of inversion variants of chromosomes (Table 3).

Table 3

Frequencies of inversion chromosome variants in cryptic species A and B of the *Anopheles messeae* s.l. taxon

Variants	1L	1L1*	1L1†	1L2*	2R	2R1	3R	3R1	3L	3L1
A	0.6-0.9	0.4-0.1	-	-	0.9-1.0	0.1-0.0	0.1-0.5	0.9-0.5	0.9-1.0	0.1-0.0
B	0.8-1.0	-	0.2-0.0	0.2-0.0	0.2-1.0	0.8-0.0	0.4-1.0	0.6-0.0	0.4-0.9	0.6-0.1

Note: Approximate frequencies for all geographically distant populations studied are given; 1L1* and 1L2* are diagnostic sequences for A and B species, respectively; 1L1† is the sequence of *A. messeae* B often found in the Altai and Kazakhstan populations, which is syntypic to 1L1 *A. messeae* A.

In the European part of the Russian Federation, in the Urals and in Western Siberia, hetero- and homozygotes 1L/1L1 and 1L1/1L1 are considered diagnostic for the species A, especially in combination with the homozygote 3R1/3R1. In the Altai and Kazakhstan populations of *A. messeae* B, 1L1 sequence is very similar or identical in its structure to 1L1 of *A. messeae* A; however, it randomly combined with all other sequences, including 1L2. In these populations, the frequency of 3R1/3R1 homozygotes is typically relatively low. The syntypic sequences (1L1* and 1L1†) of different species are likely to belong to isolated genotypic environments. Notably, the more pronounced polymorphism of *A. messeae* B, as compared to its sibling [4, 23], is in line with its larger range and wider ecological potential with respect to abiotic factors. It has been suggested that the Altai and Kazakhstan populations of the species on one side and Siberian populations on the other side are somewhat isolated [23].

In order to expand the panel of genomic markers that allow identifying individuals of the A and B species, restriction analysis of nucleotide sequences of the PCR products of their ITS2 was carried out [22]. Digestion of the PCR products with 14 restriction enzymes revealed differences between the two species at 15 recognition sites of the ITS2 sequence. The A and B species were found to have 33 and 28 such sites, respectively. Among these, 23 sites were common for both species; while ten sites in A and five ones in B were specific. These finding has improved our understanding of the degree of genomic divergence between the cryptic species of *A. messeae* A and *A. messeae* B.

Sequencing of the ITS2 of the two species revealed differences in five positions (Figure 5a). DNA samples studied originated from the same populations as the samples selected for taxonomic typing analysis of restriction fragments of genomic DNA (Tomsk region, Altai, Yakutia, Kazakhstan). Each of the twenty DNA samples used for sequencing of ITS2 PCR products was previously analyzed using *EcoRI* taxonprint to establish its species identity. ITS2 samples from Kazakhstan, Yakutsk and some of Tomsk populations corresponded to sequences of individuals identified as *A. messeae* B; the remaining Tomsk samples belonged to *A. messeae* A. The ITS2 PCR product was absent in the samples from the Altai region populations, apparently due to a mutation in one of the primer sites, which was affixed in all copies of ITS2 as a result of a concerted evolution process. In all five diagnostic positions of the ITS2 PCR products of *A. messeae* B individuals,

the nucleotide electropherograms of sequencing reactions were defined unequivocally (a single peak detected in each position of all electropherograms) (Figure 5a, samples Ya-B, P-B, C-B).

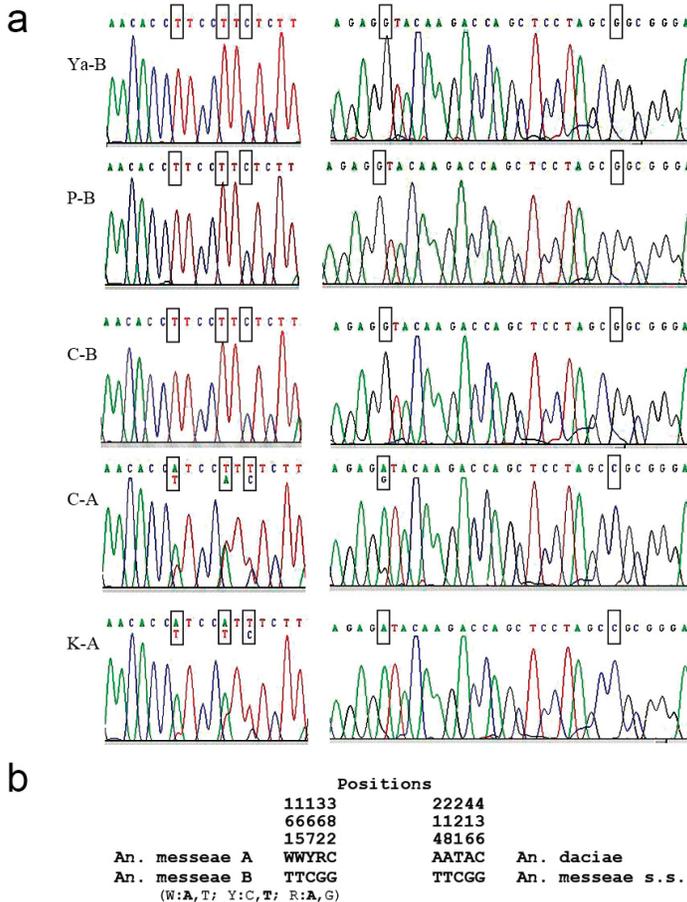


Fig. 5. Differences of ITS2 sequences within *Anopheles messeae* s.l. taxon: *a* – Fragments of electropherograms of the sequencing reactions for A and B *A. messeae* ITS2 sequence. Rectangles highlight the fragments used to establish differences between the two species. Results for *A. messeae* B: Ya-B (Yakutsk, MN481112), P-B (Pavlodar, MN481113), C-B (Chernilshchikovo, MN481111), and *A. messeae* A: K-A (Kireevsk, MN481110), C-A (Chernilshchikovo, MN481109) are shown in lanes 6, 2, 5 and 4, 3 of Figure 4, respectively; *b* – Summary of ITS2 sequence substitution described in A and B *A. messeae*, *A. messeae* s.s., and *A. daciae*

Consequently, almost all ITS2 copies in the *A. messeae* B genome are uniform. In contrast, in *A. messeae* A, in all ITS2 diagnostic positions, except the last one (i.e. 4 of 5), two peaks, major and minor, were revealed in each case (Fig. 5, *a*, samples C-A, K-A). The major peaks correspond to the nucleotides unique to

A. messeae A in these positions. This means that the major fraction of copies features the ITS2 pattern typical of this species. The minor peaks correspond to the nucleotides that are located in these ITS2 positions in *A. messeae* B. This means that the minor fraction of the ITS2 copies of *A. messeae* A corresponds to the ITS2 pattern of *A. messeae* B [23]. In other words, in four out of five diagnostic positions, the differences between the species A and B are *semi-quantitative* [24]. This circumstance led some authors to doubt the validity of isolating two distinct sibling species within the *A. messeae* s.l. taxon [36]. Another group of researchers [5] found the differences in the ITS2 sufficient to isolate the new species *A. daciae* Linton et al., 2004 despite the semi-quantitative nature of these differences (Fig. 5b). As an additional argument, the authors referred to the differences between the species in the color of the egg exochorion and the sequence of the mitochondrial marker COI. We made several attempts to find differences between the species in the color of exochorion on the single species strains, which were proven futile due to the interfamily and intrapopulation variability of this marker. The COI marker also proved impractical for the species identification [25, 37]. We believe that it is important to take the following into consideration: *is it possible to describe any traits in individuals of any species; however, will it be possible to identify individuals of this species in subsequent studies by analyzing these traits?* Thus, given the variability of the ITS2 sequence, it can be concluded that differences in its positions indicated above can only be considered as an additional evidence of the independence of the A and B *A. messeae* species. In addition to the genetic differences between the cryptic species *A. messeae* A and *A. messeae* B, as a result of observations and experiments carried out over many years, we have identified a deep differentiation between them in physiology, ecology and behavior (Table 4).

Table 4

Biological and ecological features of the cryptic species *Anopheles messeae* A and B

Species	<i>Anopheles messeae</i> A	<i>Anopheles messeae</i> B
Species range	From the British Isles and Atlantic coast of France to Krasnoyarsk; from Karelia to the Caucasus	From the British Isles and Atlantic coast of France to the Zeya-Bureya Plain; from the Arctic to Iran and northern China
Landscapes	From southern taiga to forest-steppe	From tundra to steppe
Connection with settlements	Very tight. Inhabits settlements and farms	Inhabits both settlements and wild habitats
Propensity for exophilia	Virtually absent	Clearly manifested.
Wintering places	Cattle barns, residential buildings and other above-ground buildings in settlements	Natural shelters on/in the ground, in villages – analogues of natural shelters and abandoned buildings.
Response to global warming	Extends the range to the north and east	See next position

Table 4 (end)

Species	<i>Anopheles messeae</i> A	<i>Anopheles messeae</i> B
Dynamics in the warming process	In regions of sympatry with B and <i>A. beklemishevi</i> , its frequency is rising	In regions of sympatry with A the frequencies of B and <i>A. beklemishevi</i> are declining
Potential epidemiological hazard	Hard to establish because of the widespread sympatry with B and/or <i>A. atroparvus</i>	High. Outbreaks of malaria are significant in the regions inhabited by species B only, or where its share is high as compared to species A
Aggressiveness	Moderate	High
Blood sucking	Female usually receives the full portion of blood from several shallow punctures	Female ordinarily makes one deep puncture and sucks the full portion of blood
Painfulness of bites	High	Moderate
Fecundity in culture (eggs per egg laying)	166.8	186.8
n_{σ} / n_{φ} in overpopulated larvae cultures	0.6	0.4
Vitality in single species cultures	Larvae – A > B; adults (females) – B > A	
Duration of development	A > B	
Size of females grown up under the same conditions	A > B	
Larvae competitiveness in mixed cultures	<i>A. messeae</i> A > <i>A. beklemishevi</i> > <i>A. messeae</i> B	

Species nomenclature. Let us consider the situation with the nomenclature of the cryptic species of the *A. messeae* s.l. taxon. Given the major peaks in the ITS2 diagnostic positions of *A. messeae* A and the differences in alignments performed by Novikov et al. [22] and Nicolescu et al. [5], it is easy to verify that the sequences ITS2 *A. messeae* A (AATAC) and *A. daciae* are identical. The second marker haplotype (TTCGG) was attributed by Nicolescu et al. [5] to the second cryptic species, named *A. messeae* s.s. Let us analyze this confusing situation.

Comparison of the ITS2 sequences which we carried out for *A. messeae* A and *A. messeae* B with samples of *A. messeae* from the UK (AF452699, Italy (Z50105), AF452700), Greece (AF342711, AF342712), Iran (AY050639), China (AF305556), published in the DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), showed that the ITS2 sample, defined as aligning to species A, is most similar to the sample from Italy [22]. All other ITS2 samples were similar to the ITS2 of *A. messeae* B. Di Luca et al. [37] found that the two ITS2 haplotypes absent in the Balkan Peninsula and in Kazakhstan are frequent in Italian populations of *A. messeae*. Furthermore, structural chromosomal identity of *A. messeae* A (and therefore *A. daciae*) and *A. messeae* Fall., 1926 argues for their conspecificity. Cryptic species *A. messeae* A is characterized by chromosomal sequences 1L, 1L1, 2R, 3R1 and 3L. Moreover, everywhere except Kazakhstan and the Altai, where in the *A. messeae* B

populations an inversion formally similar to 1L1 of *A. messeae* A is present, the combination of 1L1 and 3R1, the frequencies of which are highest in the west of its range, is the diagnostic combination. The 3R1 sequence of *A. messeae* Fall. is inverted with respect to the disk order in the 3R chromosomal arm of *A. atroparvus*. Frizzi [29], having studied a sample of larvae from the Pavia province (north of Italy), described the polytene chromosomes of *A. messeae*, as compared to *A. atroparvus* van Thiel in the following way: ‘... *messeae* has a small inversion in the X-chromosome and a large inversion in the right arm of chromosome III’. Frizzi [38, 39] also described polymorphisms of these arms. Similarly, Stegnii [7] also described, the variants of chromosome arms 1L and 3R which are typical of western populations of *A. messeae* Fall., as compared to *A. atroparvus*. Thus, on the one hand, *A. messeae* A is identical to *A. messeae* Fall., 1926 based on the structure of chromosomes, while on the other hand, *A. messeae* A is identical to *A. daciae* Linton et al., 2004 based on the ITS2 nucleotide sequence. Therefore, *A. messeae* Fall., 1926 and *A. daciae* Linton et al., 2004 are identical in both chromosome structure and nucleotide sequence in the ITS2. In other words, we are dealing with three different names of a single biological species. In agreement with the results of Sharakhova et al. [40], chromosomal variants of *A. daciae* are identical to those of *A. messeae* A. Therefore, the authors of the above study, similar to Nicolescu et al., 2004, name the second cryptic species *A. messeae* s.s., recognizing its identity to the *A. messeae* B. In this case, there is no place for *A. messeae* s.s. in the *A. messeae* s.l. taxon, because the name *A. lewisi* (syn. *selengensis*) Ludlow, 1920 takes precedence over *A. messeae* Fall., 1926 [2, 41]. We note that Aitken knew the distribution of *A. messeae* Fall. but refrained from recognizing its synonymy with *A. lewisi* until more detailed information about the species became available [41].

Cryptic species of *A. messeae* s.l., whilst showing some variation of their features, do not differ morphologically at all stages of development. A Diptera expert A.V. Danilov did not find any differences between the larvae A and B species at the 4th instar we passed to him in 1986 (personal communication). Similar to Aitken [41], he did not find differences between the imago of *A. messeae* Fall. and *A. lewisi* Ludlow [2]. Analysis of over 500 individuals from a number of malaria mosquito populations of the Transbaikalia region [20] showed that, the geographical area of typical locality for *A. lewisi* (near the city of Ulan-Ude), is only inhabited by the cryptic species *A. messeae* B. Its presence in the extreme northeast region of the taxon range (Yakutsk) was confirmed by taxonprint analysis [4]. It is important to note the correspondence of the cytogenetic structure of the Yakut and Transbaikalia populations of *A. messeae* B. These facts and arguments allow us to consider the names *A. lewisi* and *A. messeae* B as belonging to a biological species other than *A. messeae* Fall. and to return *A. lewisi* from the *nomen oblitum* status [42] to the status of a valid (an existing) taxon. Thus, the *Anopheles messeae* s.l. taxon includes two homosequential cryptic species, namely *Anopheles* (*Ano.*) *lewisi*, Ludlow, 1920 and *Anopheles* (*Ano.*) *messeae* Falleroni, 1926.

Conclusions

In this study, we state that *Anopheles messeae* s.l. taxon includes two homosequential cryptic species with parallel chromosomal polymorphisms. In our research, we termed the cryptic species *A. messeae* A and *A. messeae* B. However, other names, particularly *A. lewisi* Ludlow, 1920; *A. messeae* s.s. Fall., 1926 and *A. daciae* Linton et al., 2004 are also known to refer to the species. Considering data on chromosomal polymorphisms in paracentric inversions, ecology divergence, geographic distribution and molecular markers, we concluded that *A. messeae* s.s. Fall., 1926, *A. messeae* A and *A. daciae* Linton et al., 2004 are synonyms for one of the cryptic species, while *A. lewisi* Ludlow, 1920 and *A. messeae* B are synonyms for the other one. It means that despite the current trend it is not correct to name the cryptic species *A. messeae* Fall., 1926 and *A. daciae* Linton et al., 2004, because in fact they are the same biological species. Thus, we propose to term the two homosequential cryptic species as *Anopheles (Ano.) lewisi*, Ludlow, 1920 and *Anopheles (Ano.) messeae* Falleroni, 1926.

References

1. Beklemishev VN. Ekologiya malyariynogo komara [Ecology of the malaria mosquito]. Moscow: Medgiz Publ.; 1944. 299 p. In Russian
2. White GB. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. *Mosq. Syst.* 1978;10(1):13-44
3. Novikov YuM. *Anopheles messeae* Fall. (Diptera, Culicidae) – dva vida *in statu nascendi* [*Anopheles messeae* Fall. (Diptera, Culicidae) – two species *in statu nascendi*]. In: Makroevolyutsiya (Materialy I Vsesoyuznoy konferentsii po problemam evolyutsii) [Macroevolution]. Yanshin AL, editor. Moscow: Nauka Publ.; 1984. p. 13-14. In Russian
4. Novikov YuM, Shevchenko AI. Inversion polymorphism and the divergence of two cryptic forms of *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) at the level of genomic DNA repeats. *Russ. J. Genet.* 2001;37(7):754-763. doi: [10.1023/A:1016790724790](https://doi.org/10.1023/A:1016790724790)
5. Nicolescu G, Linton Y-M, Vladimirescu A, Howard TM, Harbach RE. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence. *Bull. Entomol. Res.* 2004;94(6):525-535. doi: [10.1079/ber2004330](https://doi.org/10.1079/ber2004330)
6. Ludlow C. Siberian *Anopheles*. *Psyche.* 1920;27:74-78.
7. Stegnyy VN. Populyatsionnaya genetika i evolyutsiya malyariynykh komarov [Population genetics and evolution of malaria mosquitoes]. Il'inskikh NN, editor. Tomsk: Tomsk State University Publ.; 1991. 137 p. In Russian
8. Stegnyy VN, Sharakhova MV. Systemic reorganization of the polytene chromosomes architecture at ontogenic and phylogenetic levels in malarial mosquitoes – structural peculiarities of chromosomes attachment to nuclear-envelope. *Genetika.* 1991;27(5):828-835. In Russian
9. Stegnii VN, Sharakhov IV, Sharakhova MV, Sibataev A, Wasserlauf IE. Evolution-genetic analysis of the palearctic *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae) complex. In: *Proceedings of XX International Congress of Entomology* (Firenze, Italy, August 25-31, 1996). Italy: Congress Scientific Committee Publ.; 1996. p. 256.
10. Stegnyy VN, Pishchelko AO, Sibataev AK, Abylkassymova G. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion frequencies across the range of malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Culicidae) during the 40-year monitoring period. *Russ. J. Genet.* 2016;52(6):578-584. doi: [10.1134/S1022795416060132](https://doi.org/10.1134/S1022795416060132)

11. Sharakhova MV, Stegnyy VN, Braginets OP. Interspecific differences in structure of pericentromeric heterochromatin in ovarian trophocytes and evolution of malaria mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* species complex. *Genetika*. 1997;33(12):1640-1648. In Russian
12. Gordeev MI, Bezzhonova OV, Moskaev AV. Chromosomal polymorphism in the populations of malaria vector mosquito *Anopheles messeae* at the south of Russian Plain. *Russ. J. Genet.* 2012;48(9):962-965. doi: [10.1134/S1022795412090037](https://doi.org/10.1134/S1022795412090037)
13. Gordeev MI, Moskaev AV. Chromosomal Polymorphism in the populations of malaria mosquito *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) in the Volga Region. *Russ. J. Genet.* 2016;52(6):597-602. doi: [10.1134/S1022795416040050](https://doi.org/10.1134/S1022795416040050)
14. Stegnii VN, Kabanova VM, Novikov YuM. Study of karyotype of *Anopheles-messeae* Fall. *Tsitologiya*. 1976;18(6):760-766. In Russian
15. Stegnii VN, Kabanova VM, Novikov YuM, Pleshkova GN. Inversional polymorphism in *Anopheles-messeae*. 1. Distribution of inversions over area of species. *Genetika*. 1976;12(4):47-55. In Russian
16. Stegnii VN, Novikov YuM, Pleshkova GN, Kabanova VM. Inversional polymorphism in *Anopheles messeae*. 2. Interpopulational variability of inversion frequencies. *Genetika*. 1978;14(6):1017-1023. In Russian
17. Novikov YuM. Vliyaniye assortativnogo skreshchivaniya na populyatsionnyuyu strukturu malyariynogo komara *Anopheles messeae* [Effect of assortative mating on the population structure of malaria mosquito *Anopheles messeae*]. In: *Proceedings of XIV International Genetic Congress* (Moscow, USSR, August 21-30, 1978). Belyaev DK, editor. Moscow: Nauka Publ.; 1981. Vol. 1. p. 471. In Russian
18. Novikov YuM. Interaction between inversions in populations, karyotype pool differentiation, and mechanisms of maintaining the population-genetic homeostasis in malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. In: *New data on karyosystematics of Diptera*. Chubareva LA, editor. *Trudy Zoologicheskogo instituta Akademii nauk SSSR* [Proceedings of the Zoological Institute. Academy of Sciences of the USSR]. 1980;95:40-49. In Russian
19. Novikov YuM. Gomologiya struktury i analogiya funktsiy inversiy khromosom u kripticheskikh vidov *Anopheles messeae* [Structural homology and functional analogy of the chromosome inversions in the cryptic species of *Anopheles messeae*]. In: *Pervye Mezhdunarodnye Bekkerovskie chteniya* [First International Becker's Readings (Volgograd, Russia, May 27-29, 2010)]. Volgograd: Volgograd State University Publ; 2010. Vol. 2. pp. 142-144. In Russian
20. Novikov YuM. On the ecology and range of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) with reference to the taxonomy of *A. lewisi*. *J Vector Ecol.* 2016;41(2):204-214. doi: [10.1111/jvec.12215](https://doi.org/10.1111/jvec.12215)
21. Novikov YuM, Kabanova VM. Adaptive association of inversions in the natural populations of malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. *Genetika* =. 1979;15(6):1033-1045. In Russian
22. Novikov YuM, Shevchenko AI, Vaulin OV. O molekulyarno-geneticheskoy divergentsii kripticheskikh vidov taksona *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) i filogenii kompleksa *Maculipennis* [On molecular-genetic divergence of cryptic species of the *Anopheles messeae* taxon (Diptera, Culicidae) and phylogeny of the *Maculipennis* complex]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta = Tomsk State University J.* 2004;(10, Suppl.):69-77. In Russian
23. Shevchenko AI, Novikov YuM. Kripticheskie vidy *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae): khatius i svyazi na molekulyarno-geneticheskom urovne [Cryptic species of *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae): Hiatus and relations at the molecular-genetic level]. In: *Genetika v XXI veke: sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya*. III s'ezd VOGiS [Genetics in the XXI century: Current state and development prospects. 3rd Congress of VOGiS (Moscow, Russia, June 6-12, 2004)]. Moscow: URSS Publ.; 2004. p. 230. In Russian

24. Vaulin OV, Shevchenko AI, Novikov YuM. Izmenchivost' markernykh genomnykh posledovatel'nostey ITS2 i COI vnutri kompleksa *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) [Variability of marker genomic sequences ITS2 and COI within the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera, Culicidae)]. In: *Genetika v XXI veke: sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya*. III s'ezd VOGiS [Genetics in the XXI century: Current state and development prospects. 3rd Congress of VOGiS (Moscow, Russia, June 6-12, 2004)]. Moscow: URSS Publ; 2004. p. 197. In Russian
25. Vaulin OV, Novikov YuM. Geograficheskaya izmenchivost' ITS2 rDNK i COI mtDNK i kripticheskie vidy malyariynogo komara *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) [Geographical variability of ITS2 rDNA and COI mtDNA and cryptic species mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae)]. *Informatsionnyy vestnik VOGIS*. 2010;14(3):546-557. In Russian
26. Novikov YuM, Vaulin OV. Expansion of *Anopheles maculipennis* s.s. (Diptera: Culicidae) to northeastern Europe and northwestern Asia: Causes and Consequences. *Parasite Vector*. 2014;7:e389. doi: [10.1186/1756-3305-7-389](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-389)
27. Falleroni D. Fauna anofelica italiana e suo 'habitat' (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria. *Riv. Malariol.* 1926;5(5-6):553-593.
28. Bates M. The nomenclature and taxonomic status of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1940;33:343-356.
29. Frizzi G. Salivary gland chromosomes of *Anopheles*. *Nature*. 1947;160(4059):226-227. doi: [10.1038/160226a0](https://doi.org/10.1038/160226a0)
30. Kabanova VM, Kartashova NN, Stegnii VN. Karyological investigation of natural populations of malarial mosquitos in Middle Ob River. 1. Characteristics of the karyotype of *Anopheles maculipennis-messeae* Fall. *Tsitologiya*. 1972;14(5):630-636. In Russian
31. Kitzmiller JB, Frizzi G, Baker RH. Evolution and speciation within the Maculipennis Complex of the genus *Anopheles*. In: *Genetics of Insect Vectors of Disease*. Wright JW, Pal R, editors. Amsterdam: Elsevier Publ.; 1967. pp. 151-210.
32. Kabanova VM, Kartashova NN, Stegnii VN. Karyological investigation of natural populations of malarial mosquitos in Middle Ob River. 2. Chromosome polymorphism of *Anopheles maculipennis-messeae*. *Tsitologiya*. 1972;14(8):1027-1033. In Russian
33. Stegnyi VN, Kabanova VM. Inversional polymorphism in *Anopheles*. 6. Local selection and the spatial differentiation of inversional gene-complexes for fertility. *Genetika*. 1985;21(12):1970-1973. In Russian
34. Novikov YuM. Effekty global'nogo potepleniya: napravlenneya dinamika proporsiy vidov *Anopheles* i tsitogeneticheskoy struktury taksona *Anopheles messeae* Fall. v Zapadnoy Sibiri [Effects of global warming: Directed dynamics of *Anopheles* species proportions and cytogenetic structure of the taxon *Anopheles messeae* Fall. in Western Siberia]. In: *Problemy evolyutsionnoy tsitogenetiki, seleksii i introduksii*. Materialy nauchnykh chteniy, posvyashchennykh 100-letiyu professora V.P. Chekhova. [Problems of evolutionary cytogenetics, selection and introduction. Materials of Scientific Readings dedicated to the 100th anniversary of Professor VP Chekhov (Tomsk, Russia, December 2-5, 1997). Tomsk: Tomsk Polytechnic University Publ.; 1997. pp. 39-41. In Russian
35. Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *B. Zool.* 1985;52(1-2):45-63. doi: [10.1080/11250008509440343](https://doi.org/10.1080/11250008509440343)
36. Bezzhonova, OV, Goryacheva II. Intragenomic heterogeneity of rDNA internal transcribed spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 2008;45(3):337-341. doi: [10.1603/0022-2585\(2008\)45\[337:IHORIT\]2.0.CO;2.short](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[337:IHORIT]2.0.CO;2.short)
37. Di Luca M, Boccolini D, Marinucci M, Romi R. Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*A. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis. *J. Med. Entomol.* 2004;41(4):582-586. doi: [10.1603/0022-2585-41.4.582](https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.582)

38. Frizzi G. Dimorfismo cromosomico in *Anopheles maculipennis messeae*. *Sci. Genet.* 1951;4(1-2):79-93. In Italian
39. Frizzi G. Nuovi contributi e prospettive di ricerca nel gruppo *Anopheles maculipennis* in base allo studio del dimorfismo cromosomico (ordinamento ad X invertito e tipico) nel messeae. In: Italy, Centro di Genetica del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Symposia genetic. Pavia. 1952. Vol. 3, p. 231. In Italian
40. Sharakhova MV, Naumenko AN, Karagodin DA, Yurchenko AI, Gordeev MI, Moskaev AV, Martin OI, Baricheva EM, Sharakhov IV. Genomic divergence and chromosomal differentiation in the malaria mosquito *Anopheles messeae* sensu lato. In: *Chromosome 2018: International Conference* (Novosibirsk, Russia, August 20-24, 2018). Abstracts. Novosibirsk: Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS; Novosibirsk State University Publ.; 2018. pp. 73-74.
41. Aitken THG. Studies of the anopheline complex of western America. *Univ. Calif. Publ. Ent.* 1945;(7):273-364.
42. Knight KL, Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). Thomas Say Found., 2nd edition. Vol. 6. Maryland: Entomological Society of America Publ.; 1977. xi+611 p.

*Received 11 March 2020; Revised 21 June 2020;
Accepted 25 June 2020; Published 25 September 2020.*

Author info:

Novikov Yuri M, Assoc. Prof., Department of Cytology and Genetics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenina Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: yu.m.novikov@gmail.com

Shevchenko Alexander I, PhD (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Ac. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>

E-mail: epigene@bionet.nsc.ru

For citation: Novikov YuM, Shevchenko AI. Cryptic species of *Anopheles messeae* sensu lato (Diptera: Culicidae), their identification, features and nomenclature. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2020;51:69-85. doi: 10.17223/19988591/51/4

Для цитирования: Novikov Yu.M., Shevchenko A.I. Cryptic species of *Anopheles messeae* sensu lato (Diptera: Culicidae), their identification, features and nomenclature // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 69–85. doi: 10.17223/19988591/51/4

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821

doi: 10.17223/19988591/51/5

А.А. Михайлова¹, В.В. Белалов¹, Ю.О. Дягилева¹, В.Б. Павленко¹

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь, Россия

Особенности изменений тета-ритма ЭЭГ при восприятии речи у детей-сирот раннего возраста

Исследование выполнено в рамках поддержанного федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» гранта № ВГ12/2018.

Исследованы особенности реакций электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в индивидуально определенном диапазоне тета-ритма при восприятии речи у детей, воспитывающихся в разных социальных условиях: 54 ребенка, проживающих в детском доме, и 53 – в биологических семьях. ЭЭГ регистрировали в 12 отведениях в состоянии относительного покоя (фоновая запись) и при прослушивании естественного и реверсированного речевых сигналов. Обнаружено, что при восприятии естественной речи статистически значимые реакции у детей, воспитывающихся в семьях, представлены как ростом (в 4 отведениях), так и падением (в 4 отведениях) мощности тета-ритма. У детей-сирот данная экспериментальная ситуация вызывала увеличение мощности лишь в височном отведении правого полушария (Т6). При прослушивании реверсированного сигнала выявлена большая выраженность увеличения мощности тета-ритма по сравнению с ситуацией восприятия естественного речевого сигнала у детей обеих групп. В ответ на такой сигнал увеличение мощности тета-ритма обнаружено у детей, воспитывающихся в семьях, в 8 отведениях, а у детей-сирот – в 4. Выявлены отличия в степени выраженности и направленности реакций исследуемого ритма ЭЭГ при восприятии речевых сигналов у детей, воспитывающихся в разных социальных условиях. Выдвинуто предположение, что меньшая реактивность тета-ритма у детей-сирот указывает на сниженные способности к вовлечению когнитивных ресурсов в процесс восприятия речи, что обусловлено отсутствием достаточного объема социальных взаимодействий со «значимыми взрослыми».

Ключевые слова: восприятие речи; ЭЭГ; тета-ритм; естественная речь; реверсированная речь; Дом ребёнка.

Введение

В настоящее время в Российской Федерации, несмотря на ежегодное снижение, остается высоким число детей-сирот, проживающих в детских домах.

Известно, что у детей-сирот могут наблюдаться отклонения в социально-эмоциональном и когнитивном развитии [1–3]. Причинами таких нарушений чаще всего считают материнскую депривацию, отсутствие «значимого взрослого», ранние стрессы, обедненную сенсорную среду и специфику воспитания в группах в специализированных учреждениях [4–6]. Перечисленные негативные факторы при воздействии в ранние критические и сенситивные периоды постнатального созревания мозга повышают риск возникновения нервно-психических расстройств и задержек в развитии, которые могут сохраняться и в более старшем возрасте [7]. Установлено, что пребывание детей-сирот в детском доме в первые годы жизни, несмотря на последующее воспитание в благополучных приемных семьях, приводит к изменениям в структуре и функционировании мозга во взрослом возрасте [8, 9].

Первые годы жизни являются критическим периодом для развития когнитивных функций, в частности, освоения речи [10]. Процесс осознания смысла целостного речевого сообщения является ключевым элементом речевой деятельности ребенка [11]. При этом способность к пониманию предложений проходит в онтогенезе ряд ключевых этапов. Считают [12], что для обучения восприятию фонем родного языка критическим является первый год жизни ребенка, тогда как обучение восприятию предложения (освоение синтаксиса) происходит в возрастном периоде от 18 до 36 месяцев. Бурное развитие словарного запаса начинается в 18-месячном возрасте. Благодаря этому в возрасте двух лет дети уже воспринимают целостный смысл простых высказываний. Предложения несут как синтаксическую (роль слов в предложении и их порядок), так и семантическую (смысловую) составляющую. Для восприятия и осознания смысла предложения необходима одновременная обработка речевого сигнала как на уровне фонем, так и на уровне отдельных слов, а также уточнение значения этих слов в их взаимодействии и в соответствии с занимаемым местом в предложении [13]. В данном процессе участвуют обширные регионы коры, включая ассоциативные, моторные и сенсомоторные области обоих полушарий [14]. Ранее нами [15] и другими исследователями [1, 16] с применением различных тестовых методик выявлены задержки в развитии речи у детей-сирот. Можно предположить, что воздействие ранней психосоциальной депривации в условиях воспитания в специализированных учреждениях нарушает типичное созревание областей мозга, связанных с речевыми функциями.

Объективными методами оценки уровня восприятия речи у детей в раннем возрасте являются как тестовые методики, так и анализ ритмов осцилляторной активности мозга, регистрируемой в виде магнито- и электроэнцефалограмм (ЭЭГ) [17–20], а также компонентов вызванных ЭЭГ-потенциалов [21–23]. Анализ особенностей вызванных потенциалов в ответ на предъявление сочетаний слогов у детей весьма информативен, так как обеспечивает раннюю диагностику речевого развития и позволяет предсказать успешность будущего освоения речи ребенком [12, 24]. Однако для регистрации

таких потенциалов путем усреднения отрезков ЭЭГ требуется многократное предъявление одних и тех же по возможности кратких стимулов. В связи с этим при изучении восприятия речевых сообщений, состоящих из отдельных слов или предложений, более информативным является анализ текущей ЭЭГ [18–20, 25, 26]. Согласно С. Krause, предъявление естественной (нативной) речи и записи речи в реверсном режиме (речеподобный сигнал, лишенный семантики языка) позволяет оценить особенности реакций ЭЭГ в ответ на смысловые сообщения [27]. Ранее нами анализировались особенности электрической активности мозга при восприятии естественной и реверсированной речи у детей раннего возраста [15]. В данной работе было показано, что восприятие естественной речи сопровождается десинхронизацией альфа-, и синхронизацией тета-, бета- и гамма-ритмов, а прослушивание обратной речи вызывает у участников исследования преимущественно десинхронизацию всех ритмов ЭЭГ. При этом у детей, воспитывающихся в детском доме, количество отведений со значимым увеличением гамма-ритма при прослушивании естественной речи, относительно ситуации восприятия реверсированного речевого сигнала, было существенно меньше по сравнению с детьми, воспитывающимися в семьях. Однако нами не учитывались индивидуальные частотные диапазоны ритмов ЭЭГ, которые, согласно современным данным, могут отличаться у каждого ребенка в зависимости от возраста и индивидуальных особенностей развития ЦНС (см. обзор [28]). С учетом этого в недавней работе нами анализировались особенности реакций ЭЭГ в индивидуально определенном частотном диапазоне мю-ритма при восприятии прямой и реверсированной речи у детей-сирот раннего возраста [29]. Однако нейрофизиологические процессы, принимающие участие в восприятии речи, могут отражаться в изменениях мощности ЭЭГ в индивидуальном частотном диапазоне не только сенсомоторного, но и тета-ритма. Синхронизацию данного ритма преимущественно над ассоциативными областями коры (теменными, височными и фронтальными) связывают как с эмоциональными состояниями, так и с когнитивной нагрузкой. Е.В. Орехова и соавт. выявили, что у младенцев и дошкольников спектральная мощность тета-ритма ЭЭГ увеличивается в ситуации восприятия ребенком речи взрослого в затылочных, теменных и височных отведениях, а также при исследовании детьми игрушек преимущественно над задней височной корой [26]. Другими авторами при исследовании особенностей тета-ритма у детей четырех лет выявлена большая мощность ЭЭГ в частотном диапазоне 3–6 Гц над фронтомедиальной областью неокортекса во время выполнения различных когнитивных задач. При этом повышение мощности тета-ритма наблюдалось в лобно-височных отведениях левого полушария во время выполнения речевой задачи (называние цвета) по сравнению с двигательной задачей (имитация движения) [30].

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что условия психосоциальной депривации, в которых находятся дети-сироты, могут оказывать

влияние на формирование и функционирование нейрофизиологических механизмов восприятия речи. В свою очередь, это может отражаться в изменениях мощности ЭЭГ при восприятии речевого сообщения в индивидуально определенном частотном диапазоне тета-ритма.

Цель данного исследования – анализ реактивности мощности ЭЭГ в индивидуальном частотном диапазоне тета-ритма при восприятии естественной и реверсированной речи у детей-сирот раннего возраста, воспитывающихся в детском доме, по сравнению с их сверстниками, воспитывающимися в своих биологических семьях.

Материалы и методики исследования

Всего в исследовании приняли участие 107 детей в возрасте от 24 до 42 месяцев. Основная группа включала 54 ребенка (19 девочек и 35 мальчиков), которые воспитывались в Доме ребенка г. Симферополя (группа ДР). Контрольную группу составили 53 ребенка (21 девочка и 32 мальчика), которые воспитывались в родных биологических семьях (группа БС). Средний возраст в обеих группах составил $33,5 \pm 0,5$ месяца в группе ДР и $31,9 \pm 0,7$ – в группе БС (здесь и далее приводятся средние значения и стандартная ошибка среднего ($M \pm m_M$)). Статистически значимые различия по этому показателю отсутствовали ($p > 0,05$). Использованы следующие критерии включения детей в группы: масса тела при рождении не менее 2,5 кг, отсутствие генетических заболеваний, заболеваний ЦНС, зарегистрированного фетального алкогольного синдрома, а также очевидное преобладание правой руки при манипуляциях с предметами и при рисовании.

Проведение исследований одобрено этическим комитетом Крымского федерального университета (КФУ) им. В.И. Вернадского. Исследование детей-сирот проводили на основании официального разрешения руководителя Дома ребенка и в присутствии психолога данного учреждения. Родители детей из группы БС дали письменное согласие на участие ребенка в экспериментах.

ЭЭГ регистрировали с использованием электроэнцефалографа «*TREDEX*» (г. Харьков) во фронтальных (F3, F4, F7, F8), центральных (C3, C4), височных (T3, T4, T5, T6) и теменных (P3, P4) отведениях. В качестве референтного использовался виртуальный электрод, сигнал которого был равен усредненному по всем отведениям потенциалу. Запись проводилась в трех экспериментальных ситуациях:

- 1) в спокойном состоянии при открытых глазах (фоновая ЭЭГ, продолжительность записи 20–30 с);
- 2) при прослушивании естественной речи (стихотворение, персонажами которого являлись животные, продолжительность 20 с, женский голос);
- 3) при прослушивании записи той же речи, реверсированной с помощью компьютерной программы «*Wave Editor*» (реверсированная речь).

Чередование второй и третьей ситуаций определялось случайным образом.

Одновременно с записью ЭЭГ велась аудио- и видеорегистрация. Участки записей ЭЭГ, содержащие артефакты с амплитудой более 250 мкВ и помехи, связанные с активацией ЭМГ мышц лба, а также сопровождающиеся многочисленными движениями глаз (заметными на видеозаписи), исключались из обработки. Безартефактные отрезки ЭЭГ разбивались на эпохи длительностью по 5 с.

Верхнюю границу тета-ритма выявляли индивидуально для каждого ребенка в тесте «Восприятие и повторение действия» [31] (в данной статье результаты этого теста не анализировались). При наблюдении и выполнении ребенком действий частотный диапазон, в котором наблюдалось снижение амплитуды в отведении С3, принимался за индивидуальный диапазон мю-ритма (подробнее см.: [29]), а значение частоты, ниже которой наблюдалось повышение амплитуды в данном отведении, – за верхнюю границу тета-ритма. Такой способ позволил выявить индивидуальные частотные диапазоны мю- и тета-ритмов ЭЭГ. В качестве нижней границы частотного диапазона тета-ритма на основании ЭЭГ-исследования детей младше семи лет [26] принималось значение 3,8 Гц. Для частотной полосы тета-ритма рассчитывалась средняя спектральная плотность мощности (СПМ), которая подвергалась логарифмированию для нормализации распределения ($\lg \text{мкВ}^2/\text{Гц}$).

Для сравнения реактивности мощности ЭЭГ в диапазоне тета-ритма у детей обеих групп рассчитывали индекс реактивности (ИР) в каждом из исследуемых отведений по формулам: $\text{ИР} = 100\% \times [\lg \text{СПМ}(\text{речь}) - \lg \text{СПМ}(\text{фон})] / \lg \text{СПМ}(\text{фон})$, где $\lg \text{СПМ}(\text{речь})$ – логарифм средней мощности тета-ритма ЭЭГ при восприятии естественной или реверсированной речи, $\lg \text{СПМ}(\text{фон})$ – логарифм средней мощности тета-ритма ЭЭГ, записанной в ситуации относительно покоя. Положительные значения ИР свидетельствовали об увеличении СПМ тета-ритма ЭЭГ по сравнению с фоном, а отрицательные – о снижении.

Особенности СПМ тета-ритма ЭЭГ при прослушивании естественной или реверсированной речи по сравнению с фоном у детей обеих групп выявляли с использованием дисперсионного анализа с повторными измерениями с учетом внутригрупповых факторов СТИМУЛ (2 уровня: естественная речь и фон, реверсированная речь и фон) и ОТВЕДЕНИЕ (12 отведений), а также учитывалось влияние межгруппового фактора ПОЛ (2 уровня). Межгрупповые различия в ИР анализировались с учетом влияния межгрупповых факторов СЕМЬЯ / ДЕТДОМ (2 уровня: дети БС и ДР) и ПОЛ, а также внутригруппового фактора ОТВЕДЕНИЕ. Для расчета статистической значимости изменений тета-ритма в каждом отведении использовался метод априорных контрастов. Затем проводилась коррекция на множественные сравнения с использованием поправки Бонферрони на количество отведений ЭЭГ.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь, Россия). Остальные особенности методики описаны ранее [29].

Результаты исследования

Особенности частоты тета-ритма ЭЭГ. Установлено, что средние значения верхней границы тета-ритма ЭЭГ у детей группы БС составили $6,4 \pm 0,1$ Гц, а у детей ДР – $6,3 \pm 0,1$ Гц. Данный показатель не отличался статистически значимо ($p = 0,62$) у детей исследуемых групп. Для всей совокупности испытуемых минимальные и максимальные показатели частоты верхней границы тета-ритма составили 5,0 и 7,6 Гц соответственно.

Изменение тета-ритма ЭЭГ при прослушивании естественной и реверсированной речи. Дисперсионный анализ позволил выявить характерные изменения мощности тета-ритма ЭЭГ при прослушивании естественной и реверсированной речи по сравнению с фоновой записью у детей БС и ДР (табл. 1). Из таблицы видно, что у детей обеих групп на реакции в диапазоне тета-ритма при восприятии естественной речи статистически значимо влияли факторы ОТВЕДЕНИЕ ($p < 0,001$) и взаимодействие факторов ОТВЕДЕНИЕ \times СТИМУЛ ($p < 0,001$). Фактор СТИМУЛ оказывал статистически значимый ($p = 0,02$) эффект лишь для группы ДР. При восприятии реверсированной речи влияние указанного фактора достигало статистической значимости ($p < 0,001$) для изменений мощности тета-ритма у детей обеих групп.

Таблица 1 [Table 1]

Результаты дисперсионного анализа мощности тета-ритма ЭЭГ при прослушивании естественной и реверсированной речи у детей из биологических семей и Дома ребёнка
[ANOVA results for the EEG theta rhythm powers in children reared in biological families and the orphanage, when listening to normal and reversed speech]

Сравниваемые ситуации [Compared conditions]	СТИМУЛ [STIMULUS]		ОТВЕДЕНИЕ [LOCUS]		СТИМУЛ \times ОТВЕДЕНИЕ [STIMULUS \times LOCUS]	
	Дети из биологических семей [Family-reared children]					
	F _{1,51}	p	F _{11,561}	p	F _{11,561}	p
ЕР и фон [NS vs baseline]	0,10	0,750	19,66	< 0,001	19,69	< 0,001
РР и фон [RS vs baseline]	65,17	< 0,001	24,60	< 0,001	11,80	< 0,001
	Дети из Дома ребёнка [Institution-reared children]					
	F _{1,52}	p	F _{11,572}	p	F _{11,572}	p
ЕР и фон [NS vs baseline]	5,79	0,020	46,79	< 0,001	9,50	< 0,001
РР и фон [RS vs baseline]	26,59	< 0,001	66,20	< 0,001	3,30	< 0,001

Примечание. Ситуации: фон – исходная запись; ЕР – естественная речь; РР – реверсированная речь; ОТВЕДЕНИЕ – 12 отведений ЭЭГ.

[Note. Conditions: baseline - Baseline record; NS - Normal speech; RS - Reversed speech; LOCUS - 12 EEG sites].

Для оценки статистической значимости изменений мощности тета-ритма при действии речевых стимулов по сравнению с ее значениями в условиях покоя в каждом из 12 отведений ЭЭГ рассчитывались априорные контра-

сты на основе F-статистики (рис. 1). Мощность тета-ритма у детей группы БС в ответ на естественную речь изменялась разнонаправленно – росла в четырех и падала также в четырех отведениях левого и правого полушарий. Предъявление реверсированной речи приводило к статистически значимому росту тета-активности в восьми отведениях обоих полушарий. У детей ДР изменения тета-ритма менее выражены. Предъявление естественной речи приводило к статистически значимому изменению данного ритма в виде прироста СПМ лишь в задневисочном отведении правого полушария. Восприятие реверсированной речи сопровождалось ростом мощности тета-ритма в четырех отведениях обоих полушарий. Статистически значимых эффектов фактора ПОЛ не выявлено.

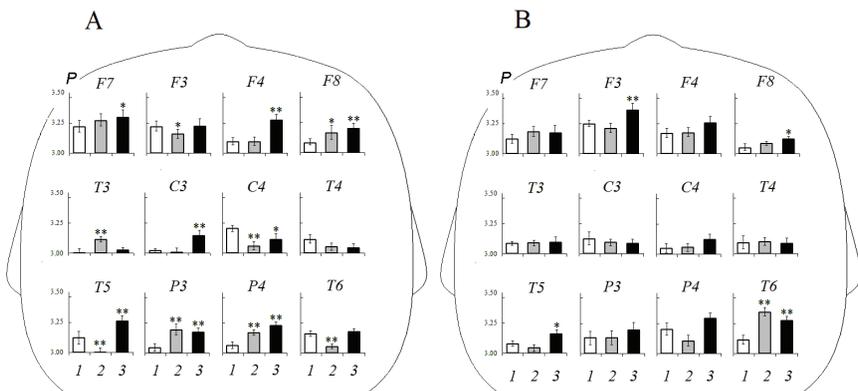


Рис. 1. Мощность ЭЭГ (P , $\lg \mu\text{В}^2/\text{Гц}$; $M \pm m_M$) в диапазонах тета-ритма у детей из биологических семей (А) и детей-сирот, воспитывающихся в детском доме (В), в ситуациях относительного покоя (фон) и при восприятии речевых стимулов. Цифрами указаны экспериментальные ситуации, в которых происходила регистрация ЭЭГ: 1 – фон, 2 – восприятие естественной речи, 3 – восприятие реверсированной речи (белые, серые и черные столбцы соответственно). Звездочками отмечены случаи статистически значимых различий по сравнению с фоном, выявленные методом априорных контрастов ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$) [Fig. 1. Theta rhythm powers (P , $\lg \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; $M \pm m_M$) in family-reared (A) and institution-reared (B) children under conditions of a wakeful rest (baseline) and when attending to speech stimuli. Numbers indicate certain experimental conditions: 1 - Baseline, 2 - Attending to normal speech, 3 - Attending to reversed speech (white, gray and black columns, respectively). Significant differences (assessed by a priori contrasts) relative to baseline are marked by asterisks ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$)]

Особенности ИР тета-ритма ЭЭГ у детей-сирот по сравнению с детьми из семей. Для выявления различий в изменениях СПМ тета-ритма ЭЭГ при восприятии естественной и реверсированной речи по отношению к фоновой активности у детей из БС, по сравнению с детьми из ДР, проводился анализ показателей ИР (табл. 2). На ИР тета-ритма статистически значимо влияли фактор ОТВЕДЕНИЕ ($p < 0,001$) и взаимодействие факторов ОТВЕДЕНИЕ \times СЕМЬЯ / ДЕТДОМ ($p < 0,001$).

Таблица 2 [Table 2]

Результаты дисперсионного анализа индексов реактивности тета-ритма ЭЭГ при восприятии естественной и реверсированной речи у детей из биологических семей и Дома ребёнка в зависимости от отведения
 [ANOVA results for the EEG theta rhythm reactivity indices in children reared in biological families and the orphanage, when listening to normal and reversed speech, depending on EEG loci]

СЕМЬЯ / ДЕТДОМ [FAMILY / ORPHANAGE]		ОТВЕДЕНИЕ [LOCUS]		СЕМЬЯ / ДЕТДОМ × ОТВЕДЕНИЕ [FAMILY / ORPHANAGE × LOCUS]	
При восприятии естественной речи [Attending to normal speech]					
$F_{1,105}$	p	$F_{11,1155}$	p	$F_{11,1155}$	p
3,436	0,066	12,716	< 0,001	17,903	< 0,001
При восприятии реверсированной речи [Attending to reversed speech]					
$F_{1,105}$	p	$F_{11,1155}$	p	$F_{11,1155}$	p
0,0001	0,990	7,804	< 0,001	7,388	< 0,001

Примечание. СЕМЬЯ/ДЕТДОМ – принадлежность детей к группам БС или ДР, ОТВЕДЕНИЕ – 12 отведений ЭЭГ.

[Note. FAMILY/ORPHANAGE - Groups of children: family-reared vs institution-reared; LOCUS - 12 EEG sites].

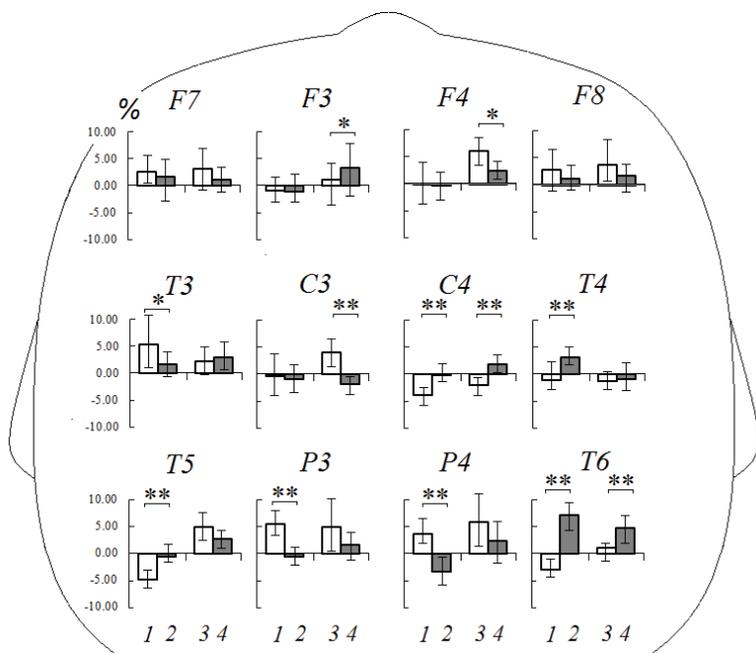


Рис. 2. Индексы реактивности (ИР; $M \pm m_{\text{гр}}$) ритмов ЭЭГ в частотном диапазоне тета-ритма при восприятии естественной (1, 2) и реверсированной (3, 4) речи у детей из биологических семей (белые столбцы) и Дома ребенка (темные столбцы). Звездочками отмечены случаи статистически значимых межгрупповых различий, выявленные методом априорных контрастов (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

[Fig. 2. EEG theta rhythm power reactivity indices (RI; $M \pm m_{\text{гр}}$) when attending to the normal (1, 2) and reversed (3, 4) speech stimuli in children reared in biological families (white columns) and in the orphanage institution (dark columns). Significant inter-group differences assessed by a priori contrasts are marked with asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)]

Использование метода априорных контрастов выявило отведения, в которых величина ИР у детей обследованных групп статистически значимо отличалась (рис. 2).

В диапазоне тета-ритма статистически значимые различия между группами в ИР при восприятии естественной речи выявлены в височных и теменных отделах обоих полушарий, а также в центральном отведении правого полушария. При восприятии реверсированного сигнала также обнаружены статистически значимые различия, локализованные в основном во фронтальных и центральных отведениях. В случае статистически значимых межгрупповых различий ИР при восприятии естественной и реверсированной речи имели преимущественно противоположную направленность.

Обсуждение результатов исследования

При анализе показателей частоты верхней границы тета-ритма определена достаточно высокая вариативность данного показателя у детей в раннем возрасте. Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований о необходимости выделения индивидуальных частотных диапазонов ритмов ЭЭГ у детей [29, 32].

При восприятии естественной речи обнаружены статистически значимые, но разнонаправленные изменения тета-ритма у детей группы БС. Его мощность росла во фронтальном отведении справа, передневисочном отведении слева и теменных отведениях обоих полушарий, падала – во фронтальном отведении левого полушария, в задневисочном отведении того же полушария, в центральном и задневисочном отведениях правого полушария (см. рис. 1, А). Рост мощности тета-ритма при слуховом восприятии был выявлен другими авторами у младенцев в возрасте до года и дошкольников четырех-семи лет [26], детей 10–12 [19, 20] и 13 лет [27], а также у взрослых испытуемых при визуальном предъявлении вербальных стимулов [33–37]. Изменения мощности данного ритма М. Bastiaansen и соавт. [33] связывают с двумя группами когнитивных операций при восприятии речи: поиске в ресурсах памяти фонологических, синтаксических и семантических свойств воспринимаемых слов, а также интеграции слов в целостное сообщение. Как отмечалось, у детей группы БС выявлен рост СПМ тета-ритма в передневисочной области левого полушария. Рядом авторов показано, что у взрослых испытуемых при восприятии речи также наблюдается рост мощности тета-ритма в данном регионе, причем именно здесь он достигает наибольших значений, что связывают с активацией в указанной корковой области процессов лексического поиска [33, 34, 38]. Также нами выявлен рост мощности тета-ритма в теменных отведениях. Усиление тета-ритма в данной области при восприятии речи ранее обнаружено [26] у детей четырех-семи лет. Поскольку теменной регион неокортекса имеет тесные связи с задней поясной извилиной, входящей в состав лимбической системы, авторы указанного ис-

следования связывают такие изменения ЭЭГ дошкольников с восприятием эмоционально значимой информации.

Выявленное в группе БС падение мощности тета-ритма во фронтальном и задневисочном отведениях левого полушария, а также центральном и задневисочном отведениях правого полушария отличается от результатов, которые были получены ранее при анализе тета-ритма без учета индивидуального частотного диапазона при прослушивании детьми естественной речи [15]. В обзоре N.A. Herweg и соавт. [39] обсуждается роль как увеличения, так и снижения мощности тета-ритма в реализации процессов эпизодической памяти и пространственной ориентации. При этом, с одной стороны, рост мощности тета-ритма связывают с формированием и извлечением из памяти эпизодических воспоминаний. С другой стороны, указывают, что снижение мощности тета-ритма в определенных регионах неокортекса и повышение мощности в высокочастотном диапазоне ЭЭГ отражают процессы внимания, так как эти изменения положительно связаны как с успешностью запоминания и воспроизведения информации, так и с аудиовизуальным восприятием, движениями рук и решением арифметических задач. Предполагают, что в процессе обработки новой информации синхронизируется лишь часть гиппокампаально-корковых петель обратной связи, поскольку тета-активность возникает избирательно только в некоторых областях коры, где происходит кодирование новой информации или извлечение недавней информации из памяти [40].

Таким образом, вероятно, восприятие речи у типично развивающихся детей связано как с процессами поиска в памяти фонологических, синтаксических и семантических свойств воспринимаемых слов и их интеграции в целостное сообщение, так и с процессами активации внимания, что сопровождается увеличением и снижением мощности тета-ритма ЭЭГ в различных областях коры мозга.

Нами впервые обнаружено, что по сравнению с естественной речью предъявление реверсированного сигнала вызывает более выраженное и широко представленное в разных регионах коры усиление тета-активности. Поскольку чем сложнее воспринимаемое сообщение, тем больше у детей увеличивается мощность тета-ритма [20, 27], логично предположить, что обнаруженный нами феномен связан с усилением нагрузки на ресурсы памяти при попытках опознать в реверсированном звуковом сигнале знакомые слова.

В целом при восприятии как естественной речи, так и реверсированного сигнала у детей, воспитывающихся в детском доме, статистически значимые изменения мощности тета-ритма выявляются в меньшем числе отведений, чем у детей группы БС. У детей группы ДР при восприятии естественной речи выявлялось статистически значимое увеличение СПМ лишь в одном отведении, а при восприятии реверсированного сигнала – только в четырех (см. рис. 1, В). Сравнение ИР тета-ритма при восприятии естественной и реверсированной речи у детей групп БС по сравнению с ДР также выявило большое количество статистически значимых различий данного показателя

в разных отведениях (см. рис. 2). Анализируя указанные различия и учитывая связь тета-осцилляций с процессами памяти [36], можно заключить, что представительство памятных следов речи в разных регионах неокортекса у детей указанных групп значительно отличается благодаря различному опыту их формирования при воспитании в семье и Доме ребенка. Кроме того, меньшая реактивность тета-ритма у воспитанников детского дома позволяет выдвинуть следующее предположение: при опознании или попытках опознания отдельных слов, смысла и эмоциональной значимости предложений дети группы ДР вовлекают существенно меньшие когнитивные ресурсы, чем дети БС. Вероятно, это отражается на уровне развития речи у таких детей. Ранее нами было установлено, что у детей-сирот, воспитывающихся в детском доме снижен уровень понимания и генерации речи [15, 29]. Мы считаем, что пониженная способность к вовлечению когнитивных ресурсов в указанных ситуациях и как следствие сниженный уровень развития речи обусловлены отсутствием у детей-сирот достаточного объема тесных социальных взаимодействий со взрослыми. В биологических семьях при активном освоении новых слов и словосочетаний дети получают позитивное эмоциональное подкрепление от родителей [21]. К сожалению, в домах ребенка на одного воспитателя, как правило, приходится слишком большое количество детей (до 10 и более). Воспитанникам редко приходится общаться с взрослым один на один, труднее получить эмоциональную поддержку, что снижает мотивацию к обучению. В современных условиях количество детей-сирот в детских домах медленно, но верно снижается, что, безусловно, является отражением благоприятных изменений в обществе. Однако необходимо отказаться от практики параллельного уменьшения числа воспитателей. В домах ребенка должно быть такое количество педагогических сотрудников, которое позволит уделить достаточно внимания и эмоционального тепла каждому ребенку. Конечно, даже в этом случае воспитатель не заменит полноценную семью, но вероятность того, что воспитанник получит поддержку «значимого взрослого», без которой невозможно полноценное развитие психики, будет намного выше.

Выводы

1. У детей, воспитывающихся в семьях, прослушивание естественной речи вызывает разнонаправленные изменения мощности тета-ритма ЭЭГ во фронтальных, центральных, височных и теменных отведениях. У детей, воспитывающихся в Доме ребенка, восприятие естественной речи сопровождалось увеличением мощности тета-ритма лишь в задневисочном отведении правого полушария.

2. Предъявление реверсированного речевого сигнала сопровождается более выраженными изменениями мощности тета-ритма по сравнению с восприятием естественной речи у детей обеих групп.

3. У воспитанников Дома ребенка при восприятии естественной и реверсированной речи характер реакций тета-ритма существенно отличается по выраженности и направленности изменений по сравнению с детьми, воспитывающимися в биологических семьях, что может быть связано с отсутствием достаточного объема социальных взаимодействий со «значимыми взрослыми».

Литература

1. Колесникова М.А., Солодунова М.Ю., Жукова М.А., Аникина В.О. Особенности когнитивного развития детей в домах ребенка с различным социальным окружением // Вестник Санкт-Петербургского университета. Психология и педагогика. 2017. Т. 7, № 4. С. 365–381.
2. Авдеева Н.Н. Социально-эмоциональное развитие воспитанников дома ребенка в первые три года жизни // Проблема сиротства в современной России: психологический аспект / под ред. А.В. Махнач, А.М. Прихожан, Н.Н. Толстых. М. : Институт психологии РАН, 2015. С. 83–104.
3. The St. Petersburg-USA Orphanage Research Team. The effects of early social-emotional and relationship experience on the development of young orphanage children // Monographs of the Society for Research in Child Development. 2008. Vol. 73, № 3. PP. vii–295.
4. Barrero-Castillero A., Morton S.U., Nelson C.A., Smith V.C. Psychosocial stress and adversity: effects from the perinatal period to adulthood // Neoreviews. 2019. № 20 (12). PP. e686–e696.
5. Прихожан А.М., Толстых Н.Н. Психология сиротства (2-е изд.). СПб. : Питер, 2005. 400 с.
6. Малиновская Н.А., Моргун А.В., Лопатина О.Л., Панина Ю.А., Волкова В.В., Гасымлы Э.Д., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б. Стресс раннего периода жизни: последствия для развития головного мозга // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2016. Т. 66, № 6. С. 643–668.
7. Nelson C.A. 3rd, Gabard-Durnam L.J. Early adversity and critical periods: neurodevelopmental consequences of violating the expectable environment // Trends Neurosci. 2020. № 43 (3). PP. 133–143.
8. Debnath R., Tang A., Zeanah C.H., Nelson C.A., Fox N.A. The long-term effects of institutional rearing, foster care intervention and disruptions in care on brain electrical activity in adolescence // Dev Sci. 2020. № 23 (1): e12872.
9. Mackes N.K., Golm D., Sarkar S., Kumsta R., Rutter M., Fairchild G., Mehta M.A., Sonuga-Barke E.J.S. ERA Young Adult Follow-up team. Early childhood deprivation is associated with alterations in adult brain structure despite subsequent environmental enrichment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. № 117 (1). PP. 641–649.
10. Werker J.F., Hensch T.K. Critical periods in speech perception: new directions // Annu. Rev. Psychol. 2015. № 66. PP. 173–196.
11. Rossi S., Telkemeyer S., Wartenburger I., Obrig H. Shedding light on words and sentences: Near-infrared spectroscopy in language research // Brain Lang. 2012. № 121 (2). PP. 152–163.
12. Kuhl P.K. Brain mechanisms in early language acquisition // Neuron. 2010. № 67 (5). PP. 713–727.
13. Friederici A.D. Towards a neural basis of auditory sentence processing // Trends Cogn. Sci. 2002. Vol. 6. PP. 78–84.
14. Hickok G., Poeppel D. The cortical organization of speech processing // Nat. Rev. Neurosci. 2007. № 8 (5). PP. 393–402.

15. Belalov V., Dyagileva Yu., Pavlenko V., Kochukhova O. Neurophysiological analysis of speech perception in 2.5 to 3.5-year-old orphans and children raised in a family // *Neurophysiology*. 2014. № 46 (1). PP. 79–87.
16. Windsor J., Glaze L.E., Koga S.F. Bucharest Early Intervention Project Core Group. Language acquisition with limited input: Romanian institution and foster care // *J. Speech Lang. Hear. Res.* 2007. № 50 (5). PP. 1365–1381.
17. Bell M.A., Cuevas K. Using EEG to study cognitive development: Issues and practices // *J. Cogn. Dev.* 2012. № 13 (3). PP. 281–294.
18. Antognini K., Daum M. Toddlers show sensorimotor activity during auditory verb processing // *Neuropsychologia*. 2019. Vol. 126. PP. 82–91.
19. Schneider J.M., Abel A.D., Ogiela D.A., Middleton A.E., Maguire M.J. Developmental differences in beta and theta power during sentence processing // *Dev. Cogn. Neurosci.* 2016. Vol. 19. PP. 19–30.
20. Schneider J.M., Abel A.D., Ogiela D.A., McCord C., Maguire M.J. Developmental differences in the neural oscillations underlying auditory sentence processing in children and adults // *Brain Lang.* 2018. Vol. 186. PP. 17–25.
21. Kuhl P.K., Ramirez R.R., Bosseler A., Lin J.-F. L., Imada T. Infants' brain responses to speech suggest Analysis by Synthesis // *PNAS*. 2014. № 111 (31). PP. 11238–11245.
22. Strotseva-Feinschmidt A., Cunitz K., Friederici A.D., Gunter T.C. Auditory discrimination between function words in children and adults: A mismatch negativity study // *Front. psychol.* 2015. Vol. 6 (1930). PP. 1–9.
23. Harwood V., Preston J., Grell B., Roy D., Harold O., Turcios J., Andrada K., Landi N. Electrophysiology of perception and processing of phonological information as indices of toddlers' language performance // *J. Speech. Lang. Hear. Res.* 2017. № 60 (4). PP. 999–1011.
24. Kuhl P.K., Conboy B.T., Coffey-Corina S., Padden D., Rivera-Gaxiola M., Nelson T. Phonetic learning as a pathway to language: new data and native language magnet theory expanded (NLM-e) // *Philos. Trans. Royal Soc. B*. 2008. № 363 (1493). PP. 979–1000.
25. Бушов Ю.В., Светлик М.В., Есипенко Е.А., Джафарова С.Р. Корковые взаимодействия и спектральные характеристики мио-ритма у человека при наблюдении, произнесении и мысленном воспроизведении эмоционального слова // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2019. № 45. С. 91–105.
26. Orekhova E.V., Stroganova T.A., Posikera I.N., Elam M. EEG theta rhythm in infants and preschool children // *Clin. Neurophysiol.* 2006. № 117 (5). PP. 1047–1062.
27. Krause C., Porn B., Lang H., Laine M. Relative alpha desynchronization and synchronization during speech perception // *Cogn. Brain Res.* 1997. Vol. 5, № 4. PP. 295–299.
28. Hobson H.M., Bishop D.V.M. The interpretation of mu suppression as an index of mirror neuron activity: past, present and future // *R. Soc. Open Sci.* 2017. Vol. 4. PP. 1606–1662.
29. Белалов В.В., Базанова О.М., Михайлова А.А., Дягилева Ю.О., Павленко В.Б. Реактивность мио-ритма ЭЭГ при восприятии речи у детей в возрасте от двух до трех с половиной лет: влияние условий воспитания // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2020. Т. 70, № 2. С. 193–205.
30. Meyer M., Endedijk H.M., van Ede F., Hunnius S. Theta oscillations in 4-year-olds are sensitive to task engagement and task demands // *Sci. Rep.* 2019. № 9 (1): 6049.
31. Nyström P., Ljunghammar T., Rosander K., von Hofsten C. Using mu rhythm desynchronization to measure mirror neuron activity in infants // *Dev. Sci.* 2011. № 14 (2). PP. 327–335.
32. Кайда А.И., Махин С.А., Эйсмонт Е.В., Павленко В.Б. Возрастная динамика и топография реактивности индивидуального мио-ритма ЭЭГ у детей 4–14 лет // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2019. № 45. С. 106–127.
33. Bastiaansen M., Hagoort P. Oscillatory neuronal dynamics during language comprehension // *Prog. Brain. Res.* 2006. Vol. 159. PP. 179–196.

34. Bastiaansen M.C., Linden M.V., Keurs M.T., Dijkstra T., Hagoort P. Theta responses are involved in lexical semantic retrieval during language processing // *J. Cogn. Neurosci.* 2005. Vol. 17, № 3. PP. 530–541.
35. Bastiaansen M.C., Magyari L., Hagoort P. Syntactic unification operations are reflected in oscillatory dynamics during on-line sentence comprehension // *J. Cogn. Neurosci.* 2010. № 22 (7). PP. 1333–1347.
36. Hart J.Jr., Maguire M.J., Motes M., Mudar R.A., Chiang H.S., Womack K.B., Kraut M.A. Semantic memory retrieval circuit: Role of pre-SMA, caudate, and thalamus // *Brain Lang.* 2013. № 126 (1). PP. 89–98.
37. Приводнова Е.Ю., Вольф Н.В. Топографические особенности тета-активности у молодых и пожилых испытуемых на начальном этапе решения креативной задачи: sLORETA-анализ // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2018. Т. 68, № 3. С. 304–312.
38. Lam N.H., Schoffelen J., Uddén J., Hultén A., Hagoort P. Neural activity during sentence processing as reflected in theta, alpha, beta, and gamma oscillations // *NeuroImage.* 2016. № 142. PP. 43–54.
39. Herweg N.A., Solomon E.A., Kahana M.J. Theta oscillations in human memory // *Trends Cogn. Sci.* 2020. № 24 (3). PP. 208–227.
40. Новикова С.И. Ритмы ЭЭГ и когнитивные процессы [Электронный ресурс] // *Психологическая наука и образование psyedu.ru.* 2015. Т. 4, № 1. С. 91–108. URL: <http://psyjournals.ru/jmfp/2015/n1/76178.shtml> (дата обращения: 13.08.2020).

*Поступила в редакцию 26.05.2020 г.; повторно 13.08.2020 г.;
принята 03.09.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.*

Авторский коллектив:

Михайлова Анна Андреевна – канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных и биофизики, факультет биологии и химии, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского (Россия, 295007, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4).

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-6386-9147>

E-mail: anna.kulenkova@gmail.com

Белалов Вадим Вадимович – ассистент кафедры физиологии нормальной, международный медицинский факультет, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского (Россия, 295007, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4).

E-mail: vadym.bielalov@gmail.com

Дягилева Юлия Олеговна – канд. биол. наук, доцент кафедры общей психологии и психофизиологии, факультет психологии, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского (Россия, 295007, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4).

E-mail: yulia.dyagileva@gmail.com

Павленко Владимир Борисович – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой общей психологии и психофизиологии, факультет психологии, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского (Россия, 295007, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4).

E-mail: vpav55@gmail.com

Для цитирования: Михайлова А.А., Белалов В.В., Дягилева Ю.О., Павленко В.Б. Особенности изменений тета-ритма ЭЭГ при восприятии речи у детей-сирот раннего возраста // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология.* 2020. № 51. С. 86–104. doi: 10.17223/19988591/51/5

For citation: Mikhailova AA, Belalov VV, Dyagileva YuO, Pavlenko VB. Patterns of the EEG theta rhythm modulations when attending to speech by orphans in early childhood. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2020;51:86-104. doi: 10.17223/19988591/51/5 In Russian, English Summary

Anna A. Mikhailova¹, Vadim V. Belalov¹, Yuliya O. Dyagileva¹, Vladimir B. Pavlenko¹

V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

Patterns of the EEG theta rhythm modulations when attending to speech by orphans in early childhood

The first years of a child's life are a critical period for the development of cognitive functions, in particular, a capacity for speech. Rearing conditions when applied to orphans may have an effect on neurophysiological mechanisms underlying their speech understanding, which is reflected in the EEG theta rhythm power changes. Individual theta rhythm frequency ranges are to be determined first, as they may vary for each child depending on age and individual characteristics of the central nervous system. The aim of our work was to analyze the EEG theta rhythm power reactivity in its individually determined frequency ranges when institutionally reared early-aged orphans attended to normal speech and speech-like signals, compared to their peers reared in their biological families.

The study involved 107 children aged 24 to 42 months. The main group included 54 children (19 girls and 35 boys) brought up in the orphanage. The control group comprised 53 children (21 girls and 32 boys) reared by their biological parents. The EEG was recorded at frontal (F3, F4, F7, F8), central (C3, C4), temporal (T3, T4, T5, T6) and parietal (P3, P4) sites in three experimental conditions: in a wakeful rest state with open eyes (baseline EEG, duration 20-30 s); when listening to a normal speech (a verse with animal-characters, duration 20 s, female voice); when listening to the same speech reversed with the help of the Wave Editor software application (reversed speech). The order of presentation for the second and third conditions was randomized. To determine individual theta rhythm frequency bands, we calculated means of spectral density power, first log-transformed to help normalize distributions. To compare the EEG theta rhythm power reactivity when children in both groups attended to the normal and reversed speech stimuli relative to the baseline condition, power reactivity indices were calculated for each of the EEG sites. Significance of changes in the EEG theta rhythm power when attending to the normal or reversed speech relative to the baseline, as well as inter-group differences in reactivity indices, were assessed with the repeated measures ANOVA.

The study revealed the patterns of the EEG theta rhythm power changes depending on experimental situations and EEG sites characteristic for children in both groups (*See Table 1*). We found significant theta rhythm power changes yet of opposite directions for the control group under the normal speech condition. Theta rhythm power increased in the right frontal locus, the left anterior temporal locus and the parietal loci in both hemispheres, and decreased in the left frontal and posterior temporal loci and the right central and posterior loci (*See Fig. 1, a*). It seems plausible that the process of speech perception in typically developing children is associated both with searching one's memory for phonological, syntactic and semantic features in heard words and their integration into a holistic message, and with attentional processes, associated with increases and decreases in theta rhythm power in different areas of the cerebral cortex. Compared to normal speech, presentation of a reversed signal to the control group children caused a more pronounced and widespread theta activity growth in different cortex areas. This phenomenon is likely to be associated with an increase in load on memory when children tried to recognize familiar words in a reversed audio signal. In the group of institution-reared children, when they attended both to the normal and reversed speech stimuli, significant changes in theta rhythm power were found at fewer

sites compared to the control group children. When they attended to the normal speech, a significant power increase occurred only at the right posterior temporal site. When attending to the reversed signal, theta rhythm power increased in the frontal (F3, F8) and posterior temporal (T5, T6) loci (See Fig. 1, b). We found differences in theta rhythm reactivity indices under conditions of attending to the normal and reversed speech in children as depending on group and site factors (See Table 2). Theta rhythm reactivity when attending to the normal and reversed speech in the main group compared to the control revealed a large number of significant differences at different sites (See Fig. 2). It is suggested that when recognizing or trying to recognize individual words, meaning and emotional load in sentences, institutionally reared children tend to contribute considerably less cognitive resources than family-reared children. We consider the reduced orphans' capacity to engage cognitive resources in mentioned situations to be the result of insufficient experience of close social interactions with adults. Given the established association between theta oscillations and memory processes, we can assume that speech memory traces in children belonging to the studied groups are represented differently in various neocortex areas due to a different experience of their formation when raised in the family and the orphanage.

The paper contains 2 Tables, 2 Figures and 40 References.

Key words: speech perception; EEG; theta rhythm; normal speech; reversed speech; Orphanage.

Funding: The study was conducted within the framework of the grant supported by V.I. Vernadsky Crimean Federal University (Project No BF12/2018).

References

1. Kolesnikova MA, Solodunova MYu, Zhukova MA, Anikina VO. Cognitive development of young children in institutions with different social environment. *Vestnik of St Petersburg University. Psychology and Education*. 2017;7(4):365-381. doi: [10.21638/11701/spbu16.2017.405](https://doi.org/10.21638/11701/spbu16.2017.405) In Russian, English Summary
2. Avdeeva N.N. Sotsial'no-emotsional'noe razvitiye vospitannikov doma rebenka v pervye tri goda zhizni [Socio-emotional development of children in infant orphanages during the first three years of life]. In: *Problema sirotstva v sovremennoi Rossii: psikhologicheskii aspekt [The problem of orphanhood in modern Russia: The psychological aspect]*. Mahnach AV, Prikhozhan AM and Tolstykh NN, editors. Moscow: Psychology Institute RAN Publ.; 2015. pp. 83-104. In Russian
3. *The St. Petersburg-USA Orphanage Research Team*. The effects of early social-emotional and relationship experience on the development of young orphanage children. *Monographs of the Society for Research in Child Development*. Liben LS, editor. 2008;73(3):vii-295. doi: [10.1111/j.1540-5834.2008.00483.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-5834.2008.00483.x)
4. Barrero-Castillero A, Morton SU, Nelson CA, Smith VC. Psychosocial stress and adversity: effects from the perinatal period to adulthood. *Neoreviews*. 2019;20(12):e686-e696. doi: [10.1542/neo.20-12-e686](https://doi.org/10.1542/neo.20-12-e686)
5. Prikhozhan AM, Tolstykh NN. *Psikhologiya sirotstva*. 3-e izd [The psychology of orphanhood. 3rd ed.]. St. Petersburg: Piter Publ.; 2007. p. 416. In Russian
6. Malinovskaya NA, Salmina AB, Morgun AV, Lopatina OL, Taranushenko TE, Gasymlly ED, Panina YuA, Volkova VV. Early life stress: implications for the brain development. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova = I.P. Pavlov Journal Of Higher Nervous Activity*. 2016;66(6):643-668. doi: [10.7868/S0044467716050051](https://doi.org/10.7868/S0044467716050051) In Russian, English Summary
7. Nelson CA 3rd, Gabard-Durnam LJ. Early adversity and critical periods: neurodevelopmental consequences of violating the expectable environment. *Trends Neurosci*. 2020;43(3):133-143. doi: [10.1016/j.tins.2020.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.002)

8. Debnath R, Tang A, Zeanah CH, Nelson CA, Fox NA. The long-term effects of institutional rearing, foster care intervention and disruptions in care on brain electrical activity in adolescence. *Dev Sci.* 2020;23(1):e12872. doi: [10.1111/desc.12872](https://doi.org/10.1111/desc.12872). Epub 2019 Jun 14
9. Mackes NK, Golm D, Sarkar S, Kumsta R, Rutter M, Fairchild G, Mehta MA, Sonuga-Barke EJS, ERA Young Adult Follow-up team. Early childhood deprivation is associated with alterations in adult brain structure despite subsequent environmental enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117(1):641-649. doi: [10.1073/pnas.1911264116](https://doi.org/10.1073/pnas.1911264116)
10. Werker JF, Hensch TK. Critical periods in speech perception: New directions. *Annu. Rev. Psychol.* 2015;66:173-196. doi: [10.1146/annurev-psych-010814-015104](https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015104)
11. Rossi S, Telkemeyer S, Wartenburger I, Obrig H. Shedding light on words and sentences: Near-infrared spectroscopy in language research. *Brain Lang.* 2012;121(2):152-163. doi: [10.1016/j.bandl.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.bandl.2011.03.008)
12. Kuhl PK. Brain mechanisms in early language acquisition. *Neuron.* 2010;67(5):713-727. doi: [10.1016/j.neuron.2010.08.038](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.038)
13. Friederici AD. Towards a neural basis of auditory sentence processing. *Trends Cogn. Sci.* 2002;6:78-84. doi: [10.1016/s1364-6613\(00\)01839-8](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(00)01839-8)
14. Hickok G, Poeppel D. The cortical organization of speech processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8(5):393-402. doi: [10.1038/nrn2113](https://doi.org/10.1038/nrn2113)
15. Belalov V, Dyagileva Yu, Pavlenko V, Kochukhova O. Neurophysiological analysis of speech perception in 2.5 to 3.5-year-old orphans and children raised in a family. *Neurophysiology.* 2014;46(1):79-87. doi: [10.1007/s11062-014-9409-6](https://doi.org/10.1007/s11062-014-9409-6)
16. Windsor J, Glaze LE, Koga SF, Bucharest Early Intervention Project Core Group. Language acquisition with limited input: Romanian institution and foster care. *J. Speech Lang. Hear. Res.* 2007;50(5):1365-1381. doi: [10.1044/1092-4388\(2007\)095](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2007)095)
17. Bell MA, Cuevas K. Using EEG to study cognitive development: Issues and practices. *J. Cogn. Dev.* 2012;13(3):281-294. doi: [10.1080/15248372.2012.691143](https://doi.org/10.1080/15248372.2012.691143)
18. Antognini K, Daum M. Toddlers show sensorimotor activity during auditory verb processing. *Neuropsychologia.* 2019;126:82-91. doi: [10.1016/j.neuropsychologia.2017.07.022](https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2017.07.022)
19. Schneider JM, Abel AD, Ogiela DA, Middleton AE, Maguire MJ. Developmental differences in beta and theta power during sentence processing. *Dev. Cogn. Neurosci.* 2016;19:19-30. doi: [10.1016/j.dcn.2016.01.001](https://doi.org/10.1016/j.dcn.2016.01.001)
20. Schneider JM, Abel AD, Ogiela DA, McCord C, Maguire MJ. Developmental differences in the neural oscillations underlying auditory sentence processing in children and adults. *Brain Lang.* 2018;186:17-25. doi: [10.1016/j.bandl.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.bandl.2018.09.002)
21. Kuhl PK, Ramirez RR, Bosseler A, Lin J-F L, Imada T. Infants' brain responses to speech suggest Analysis by Synthesis. *PNAS.* 2014;111(31):11238-11245. doi: [10.1073/pnas.1410963111](https://doi.org/10.1073/pnas.1410963111)
22. Strotseva-Feinschmidt A, Cunitz K, Friederici AD, Gunter TC. Auditory discrimination between function words in children and adults: A mismatch negativity study. *Front. psychol.* 2015; 6(1930):1-9. doi: [10.3389/fpsyg.2015.01930](https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01930)
23. Harwood V, Preston J, Grela B, Roy D, Harold O, Turcios J, Andrada K, Landi N. Electrophysiology of perception and processing of phonological information as indices of toddlers' language performance. *J. Speech. Lang. Hear. Res.* 2017;60(4):999-1011. doi: [10.1044/2016_JSLHR-L-15-0437](https://doi.org/10.1044/2016_JSLHR-L-15-0437)
24. Kuhl PK, Conboy BT, Coffey-Corina S, Padden D, Rivera-Gaxiola M, Nelson T. Phonetic learning as a pathway to language: new data and native language magnet theory expanded (NLM-e). *Philos. Trans. Royal Soc. B.* 2008;363(1493):979-1000. doi: [10.1098/rstb.2007.2154](https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2154)
25. Bushov YuV, Svetlik MV, Esipenko EA, Djafarova SR-K. Cortical interactions and spectral characteristics of the mu rhythm in humans during observation, pronunciation and mental pronunciation of non-emotional words. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo*

- universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2019;45:91-105. doi: [10.17223/19988591/45/5](https://doi.org/10.17223/19988591/45/5) In Russian, English Summary
26. Orekhova EV, Stroganova TA, Posikera IN, Elam M. EEG theta rhythm in infants and preschool children. *Clin. Neurophysiol.* 2006;117(5):1047-1062. doi: [10.1016/j.clinph.2005.12.027](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.12.027)
 27. Krause C, Porn B, Lang H, Laine M. Relative alpha desynchronization and synchronization during speech perception. *Cogn. Brain Res.* 1997;5(4):295-299. doi: [10.1016/s0926-6410\(97\)00009-8](https://doi.org/10.1016/s0926-6410(97)00009-8)
 28. Hobson HM, Bishop DVM. The interpretation of mu suppression as an index of mirror neuron activity: Past, present and future. *R. Soc. Open Sci.* 2017;4:1606-1662. doi: [10.1098/rsos.160662](https://doi.org/10.1098/rsos.160662)
 29. Belalov VV, Bazanova OM, Mikhailova AA, Dyagileva YuO, Pavlenko VB. EEG mu rhythm reactivity during speech perception in children aged from two to three years: influence of rearing conditions. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2020;70(2):193-205. doi: [10.31857/S0044467720020045](https://doi.org/10.31857/S0044467720020045) In Russian, English Summary
 30. Meyer M, Endedijk HM, van Ede F, Hunnius S. Theta oscillations in 4-year-olds are sensitive to task engagement and task demands. *Sci. Rep.* 2019;9(1):6049. doi: [10.1038/s41598-019-42615-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-42615-x)
 31. Nyström P, Ljunghammar T, Rosander K, von Hofsten C. Using mu rhythm desynchronization to measure mirror neuron activity in infants. *Dev. Sci.* 2011;14(2):327-335. doi: [10.1111/j.1467-7687.2010.00979.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2010.00979.x)
 32. Kaida AI, Makhin SA, Eismont EV, Pavlenko VB. Age dynamics and topography of an individual EEG mu rhythm reactivity in children aged 4-14 years. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2019;45:106-127. doi: [10.17223/19988591/45/6](https://doi.org/10.17223/19988591/45/6) In Russian, English Summary
 33. Bastiaansen M, Hagoort P. Oscillatory neuronal dynamics during language comprehension. *Prog. Brain. Res.* 2006;159: 179-196. doi: [10.1016/S0079-6123\(06\)59012-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)59012-0)
 34. Bastiaansen MC, Linden MV, Keurs MT, Dijkstra T, Hagoort P. Theta responses are involved in lexical semantic retrieval during language processing. *J. Cogn. Neurosci.* 2005;17(3):530-541. doi: [10.1162/0898929053279469](https://doi.org/10.1162/0898929053279469)
 35. Bastiaansen MC, Magyari L, Hagoort P. Syntactic unification operations are reflected in oscillatory dynamics during on-line sentence comprehension. *J. Cogn. Neurosci.* 2010;22(7):1333-1347. doi: [10.1162/jocn.2009.21283](https://doi.org/10.1162/jocn.2009.21283)
 36. Hart JJr, Maguire MJ, Motes M, Mudar RA, Chiang HS, Womack KB, Kraut MA. Semantic memory retrieval circuit: Role of pre-SMA, caudate, and thalamus. *Brain Lang.* 2013;126(1):89-98. doi: [10.1016/j.bandl.2012.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bandl.2012.08.002)
 37. Privodnova EYu, Volf NV. Topographic features of theta activity in young and elderly subjects at the initial stage of creative problem solving: sLORETA analysis. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova = I.P. Pavlov Journal Of Higher Nervous Activity*. 2018;68(3):304-312. doi: [10.7868/S0044467718030048](https://doi.org/10.7868/S0044467718030048) In Russian, English Summary
 38. Lam NH, Schoffelen J, Uddén J, Hultén A, Hagoort P. Neural activity during sentence processing as reflected in theta, alpha, beta, and gamma oscillations. *NeuroImage*. 2016;142:43-54. doi: [10.1016/j.neuroimage.2016.03.007](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.03.007)
 39. Herweg NA, Solomon EA, Kahana MJ. Theta oscillations in human memory. *Trends Cogn. Sci.* 2020;24(3):208-227. doi: [10.1016/j.tics.2019.12.006](https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.12.006)
 40. Novikova SI. EEG rhythms and cognitive processes [Electronic resource]. *Sovremennaiia zarubezhnaia psikhologiya = J Modern Foreign Psychology*. 2015;4(1):91-108. doi: <https://psyjournals.ru/jmfp/index.shtml>

Received 26 May 2020; Revised 13 August 2020;

Accepted 03 September 2020; Published 25 September 2020

Author info:

Mikhailova Anna A., Cand. Sci. (Biol.), Assist. Prof., Department of Human and Animal Physiology and Biophysics, Faculty of Biology and Chemistry, VI Vernadsky Crimean Federal University, 4 Vernadskogo Pr., Simferopol 295007, Russian Federation.

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-6386-9147>

E-mail: anna.kulenkova@gmail.com

Belalov Vadim V., Assistant, Department of Normal Physiology, International Faculty of Medicine, VI Vernadsky Crimean Federal University, 4 Vernadskogo Pr., Simferopol 295007, Russian Federation.

E-mail: vadym.bielalov@gmail.com

Dyagileva Yuliya O., Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of General Psychology and Psychophysiology, Faculty of Psychology, VI Vernadsky Crimean Federal University, 4 Vernadskogo Pr., Simferopol 295007, Russian Federation.

E-mail: yulia.dyagileva@gmail.com

Pavlenko Vladimir B., Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of General Psychology and Psychophysiology, Faculty of Psychology, VI Vernadsky Crimean Federal University, 4 Vernadskogo Pr., Simferopol 295007, Russian Federation.

E-mail: vpav55@gmail.com

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

doi: 10.17223/19988591/51/6

Ю.Е. Колупаев^{1,2}, А.И. Кокорев¹, М.А. Шкляревский¹

¹ Харьковский национальный аграрный университет
им. В.В. Докучаева, г. Харьков, Украина

² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

Кальцийзависимое изменение активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина

Полиамины – важные стрессовые метаболиты растений, участвующие в регуляции редокс-гомеостаза и сигнальных процессах. Исследовали участие ионов Ca^{2+} в процессе индуцирования антиоксидантной системы и теплоустойчивости проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) экзогенным диаминном путресцином с использованием антагонистов кальция. Отмечено существенное повышение содержания пероксида водорода в корнях через 2 ч после начала обработки проростков 1 мМ раствором путресцина. Этот эффект полностью устранялся хелатором внеклеточного кальция – этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусной кислотой (ЭГТА), но не ингибитором поступления кальция из внутриклеточных компартментов неомицином. Обработка проростков путресцином вызывала повышение активности супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы в корнях и способствовала сохранению активности антиоксидантных ферментов после повреждающего прогрева проростков (10 мин при 45 °С). ЭГТА устранял индуцируемое путресцином повышение активности всех трех исследуемых антиоксидантных ферментов. Неомицин снимал эффекты повышения активности каталазы и гваяколпероксидазы в корнях проростков пшеницы, вызываемые действием путресцина. Обработка проростков путресцином способствовала сохранению целостности мембран клеток корней и повышала выживаемость проростков после повреждающего прогрева. Антагонисты кальция устраняли эти эффекты. Обсуждается роль различных пулов кальция в индуцировании образования активных форм кислорода в клетках корней, регуляции редокс-гомеостаза и развитии устойчивости к тепловому стрессу под действием путресцина.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; полиамины; путресцин; редокс-гомеостаз; кальций; теплоустойчивость.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; СОД – супероксиддисмутазы; ЭГТА – этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусная кислота.

Введение

Полиамины относят к стрессовым метаболитам растений [1]. В обычных условиях они содержатся в растительных тканях в концентрациях, близких

к фитогормональным, – 10^{-9} – 10^{-5} М [2]. Однако при действии стрессоров различной природы их количество может увеличиваться в несколько раз и даже на порядок [1, 3, 4]. Считается, что увеличение содержания полиаминов является не столько отображением вызываемой стресс-факторами активации катаболического потока, сколько важной стресс-протекторной реакцией растений [5, 6]. Достаточно давно показана обусловленная катионным состоянием полиаминов способность оказывать стабилизирующее действие на отрицательно заряженные макромолекулы белков, нуклеиновых кислот, а также на мембранные структуры [2]. Позднее было установлено, что полиамины могут вовлекаться в сложные сигнальные процессы в растительных клетках. Такие эффекты отчасти могут быть обусловлены образованием активных форм кислорода (АФК) и оксида азота при метаболизме полиаминов [7]. С другой стороны, полиамины могут влиять на редокс-гомеостаз путем связывания свободных радикалов [8] и участия в регуляции экспрессии генов антиоксидантных ферментов [7, 9].

Отдельной составляющей физиологической активности полиаминов может быть их влияние на состояние ионных каналов. Феноменология таких эффектов зарегистрирована достаточно давно [10]. Согласно современным моделям, полиамины оказывают сложное и неоднозначное влияние на ионные каналы различных типов. Так, есть сведения об их способности ингибировать калиевые и неспецифические потенциалнезависимые катионные каналы [11]. С другой стороны, показано, что путресцин способен вызывать повышение концентрации цитозольного кальция в растительных клетках [12]. По крайней мере отчасти такой эффект может быть связан с усилением образования АФК при деградации путресцина диаминооксидазой и как следствие открыванием чувствительных к действию пероксида водорода и гидроксильного радикала неселективных кальциевых каналов [11].

Известно, что между АФК и ионами кальция как сигнальными посредниками существуют сложные связи [13]. С одной стороны, состояние кальциевых каналов (как потенциалзависимых, так и механочувствительных) зависит от содержания АФК [14–16]. С другой – АФК-генерирующие ферменты, прежде всего НАДФН-оксидаза, могут активироваться кальцием [17, 18]. Однако функциональное взаимодействие между АФК и ионами кальция при реализации эффектов полиаминов на растительные клетки изучено пока очень слабо. Тем более остается открытым вопрос о роли таких взаимодействий в реализации стресс-протекторных эффектов полиаминов.

Экзогенные полиамины, в том числе диамин путресцин, обладают способностью повышать устойчивость растений к абиотическим стрессорам различной природы [7, 19], в частности, к гипертермии [20]. Ранее нами показано участие АФК в проявлении стресс-протекторного действия путресцина на проростки пшеницы при повреждающем нагреве [21]. Данные ингибиторного анализа указывали на участие как НАДФН-оксидазы, так и диаминооксидазы в формировании сигнального пула пероксида водорода

в корнях проростков пшеницы. Однако неисследованной оставалась роль кальция как в образовании АФК при действии путресцина, так и в активации защитных реакций, в частности, компонентов антиоксидантной системы. В связи с этим целью работы явилось исследование ингибиторными методами участия различных пулов кальция в регуляции образования пероксида водорода, активности антиоксидантных ферментов и индуцировании путресцином теплоустойчивости проростков пшеницы.

Материалы и методики исследования

Объект исследования – этиолированные проростки мягкой озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, полученные из коллекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины, репродукция 2019 г. Зерновки поверхностно обеззараживали в течение 30 мин в 6% растворе H_2O_2 и проращивали при температуре 20–22 °С на воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, включающей в себя фильтр механической очистки, угольный фильтр и полупроницаемую обратноосмотическую мембрану с размером ячеек 1 нм. На третьи сутки проращивания семян в среду добавляли путресцин в концентрации 1 мМ и выдерживали проростки на его растворе в течение одних суток, проростки контрольного варианта продолжали инкубировать на очищенной водопроводной воде. Концентрация путресцина, индуцирующая максимальное развитие теплоустойчивости проростков, установлена ранее [21]. В отдельных вариантах опыта проростки в течение 26 ч обрабатывали антагонистами кальция – 500 мкМ ЭГТА (хелатор внеклеточного Ca^{2+}) и 200 мкМ неомицином – ингибитором зависимо от фосфолипазы С поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов. В вариантах по изучению комбинированного действия путресцина и антагонистов кальция последние вносили в среду инкубации проростков за 2 ч до добавления в нее путресцина. Концентрации антагонистов Ca^{2+} , существенно модифицирующие эффекты экзогенного путресцина, но не вызывающие заметных токсических эффектов, выбирали в предварительных опытах.

Все биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны к воздействиям экзогенных соединений и нагрева [22]. Содержание пероксида водорода в корнях определяли через 2 ч после начала их обработки путресцином [21] либо через 4 ч от начала обработки антагонистами Ca^{2+} . Количество H_2O_2 анализировали с помощью ферроцианиднатного метода, экстрагируя пероксид водорода из растительного материала на льду 5% трихлоруксусной кислотой [23].

Активность антиоксидантных ферментов определяли через 4 и 24 ч после начала инкубации проростков на растворе путресцина, а также через 5 ч после повреждающего прогрева проростков (10 мин при 45 °С). В вариантах с изучением эффектов кальциевых антагонистов время инкубации корней в

их растворах, а также в растворах путресцина и его комбинаций с ЭГТА или неомиицином составляло 24-26 ч.

При определении активности антиоксидантных ферментов навески корней гомогенизировали на холоде в 0,15 М К, Na-фосфатном буфере (рН 7,6), содержащем ЭДТА (0,1 мМ) и дитиотрейтол (1 мМ) [24]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С на центрифуге MPW 350R («MPW MedInstruments», Польша). Активность цитозольной супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли при рН 7,6, используя метод, в основе которого способность фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата; оптическую плотность определяли при 540 нм на спектрофотометре СФ-46 («ЛЮМО», Россия). Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при рН 7,0 по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода. Оптическую плотность продукта окисления гваякола определяли при 470 нм. Активность СОД выражали в усл. ед./г сырой массы × мин), каталазы – в ммоль H_2O_2 /г сырой массы × мин), гваяколпероксидазы – в ммоль гваякола/г сырой массы × мин).

Для определения теплоустойчивости проростков их подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре $45,0 \pm 0,1$ °С в течение 10 мин. После этого проростки всех вариантов переносили на очищенную воду. Через 3 суток оценивали относительное количество выживших проростков [22].

Состояние мембран клеток корней оценивали через 5 ч после повреждающего прогрева по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра (преимущественно свободных нуклеотидов) [25]. Корни интактных проростков погружали в стаканчики с дистиллированной водой на 1 ч, после чего отделяли от проростков и взвешивали. Оптическую плотность инкубационного раствора определяли при A_{252} и A_{264} на спектрофотометре СФ 46 («ЛЮМО», Россия). Выход веществ рассчитывали как отношение усредненной величины, измеренной при указанных длинах волны, к массе корней и выражали в процентах к величинам, вычисленным для корней проростков, не подвергнутых повреждающему прогреву.

Опыты проводили в 5-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизводили два раза. На рисунках и в таблице приведены средние арифметические величины и их стандартные ошибки ($M \pm m_M$). Статистическую значимость различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждаются эффекты, значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Проведенное нами ранее исследование динамики содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при обработке 1 мМ путресцином показало, что уже через 1 ч после ее начала количество H_2O_2 увеличивалось. Максимальное повышение его содержания наблюдалось через 2 ч, через 4 ч содержание пероксида водорода в опытном варианте несколько снижалось, хотя и существенно превышало значения контроля, а к 24 ч от начала обработки почти возвращалось к величинам контрольного варианта [21]. В связи с этим влияние антагонистов кальция на проявление эффекта накопления пероксида водорода, вызываемого обработкой путресцином, оценивали через 2 ч после его воздействия на корни проростков. В это время в варианте с путресцином оно увеличивалось более чем на 30% (рис. 1).

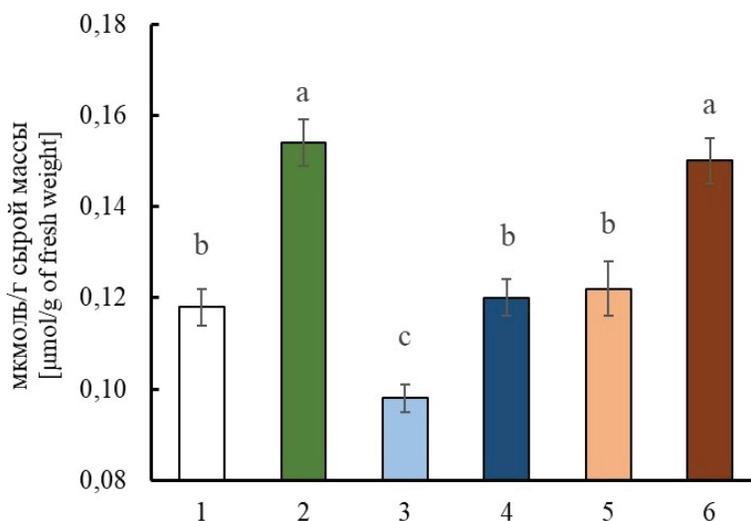


Рис. 1. Содержание пероксида водорода (мкмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином и антагонистами кальция ($M \pm m_M$): 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ЭГТА (500 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (500 мкМ); 5 – неомицин (200 мкМ); 6 – путресцин (1 мМ) + неомицин (200 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми статистически не значимы ($p \leq 0,05$)

[Fig. 1. The content of hydrogen peroxide ($\mu\text{mol/g}$ of fresh weight) in the roots of wheat seedlings when treated with putrescine and calcium antagonists ($M \pm m_M$). 1 - Control; 2 - Putrescine (1 mM); 3 - EGTA (500 μM); 4 - Putrescine (1 mM) + EGTA (500 μM); 5 - Neomycin (200 μM); 6 - Putrescine (1 mM) + neomycin (200 μM). The data are expressed as the mean with standard error using Student's t -test. The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant ($p \leq 0,05$)]

Обработка корней проростков хелатором внеклеточного кальция ЭГТА сама по себе вызывала небольшое, но статистически не значимое ($p \leq 0,05$) снижение содержания H_2O_2 в корнях. При комбинированной обработке ЭГТА и путресцином количество пероксида водорода в корнях не отлича-

лось от величины контроля. Иными словами, обработка ЭГТА устраняла эффект повышения содержания H_2O_2 в тканях корней, вызываемый действием путресцина (см. рис. 1). Под влиянием другого антагониста кальция – неомицина – количество пероксида водорода в корнях не изменялось. Этот ингибитор поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартов не устранял и повышение содержания H_2O_2 в корнях в присутствии путресцина. Таким образом, усиление образования пероксида водорода в корнях, происходящее при их обработке путресцином, зависело в основном от поступления кальция в цитозоль из внеклеточного пространства.

Обработка проростков путресцином вызывала изменение активности антиоксидантных ферментов в корнях. Так, уже через 4 ч после начала обработки отмечалось повышение активности СОД, каталазы и гваяколпероксидазы (таблица). Еще более высокие значения активности СОД проявлялись через 24 ч инкубации проростков в среде с путресцином. Активность других исследуемых ферментов в этот период также была повышенной.

Через 5 ч после повреждающего прогрева активность СОД и каталазы в корнях проростков контрольного варианта снижалась, а гваяколпероксидазы – существенно не изменялась (см. таблицу).

Активность антиоксидантных ферментов в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином и действии теплового стресса
[The activity of antioxidant enzymes in the roots of wheat seedlings during treatment with putrescine and the action of heat stress] ($M \pm m_M$)

Вариант [Sample]	Фаза эксперимента [Experiment phase]		
	Через 4 ч после начала обработки путресцином [4 hours after the start of treatment with putrescine]	Через 24 ч после начала обработки путресцином [24 hours after the start of treatment with putrescine]	Через 5 ч после повреждающего прогрева [5 hours after damaging warm-up]
СОД, усл. ед./г сырой массы • мин [SOD, con. u./g of fresh weight • min]			
Контроль [Control]	22,8 ± 0,64 b*	22,6 ± 0,52 b	18,2 ± 0,62 c
Путресцин (1 мМ) [Putrescine (1 mM)]	27,7 ± 0,71 a	29,8 ± 0,76 a	22,6 ± 0,66 b
Каталаза (ммоль H_2O_2 /г сырой массы • мин) [Catalase, mmol H_2O_2 /g of fresh weight • min]			
Контроль [Control]	0,83 ± 0,05 b	0,80 ± 0,04 b	0,67 ± 0,03 c
Путресцин (1 мМ) [Putrescine (1 mM)]	1,12 ± 0,04 a	1,17 ± 0,06 a	0,96 ± 0,06 ab
Пероксидаза, ммоль тетрагваякола/(г сырой массы • мин) [Peroxidase, mmol tetra guaiacol/(g of fresh weight • min)]			
Контроль [Control]	0,110 ± 0,005 b	0,122 ± 0,004 b	0,104 ± 0,006 b
Путресцин (1 мМ) [Putrescine (1 mM)]	0,143 ± 0,006 a	0,148 ± 0,004 a	0,139 ± 0,003 a

* Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не значимы при $p \leq 0,05$.

[The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant for $p \leq 0.05$].

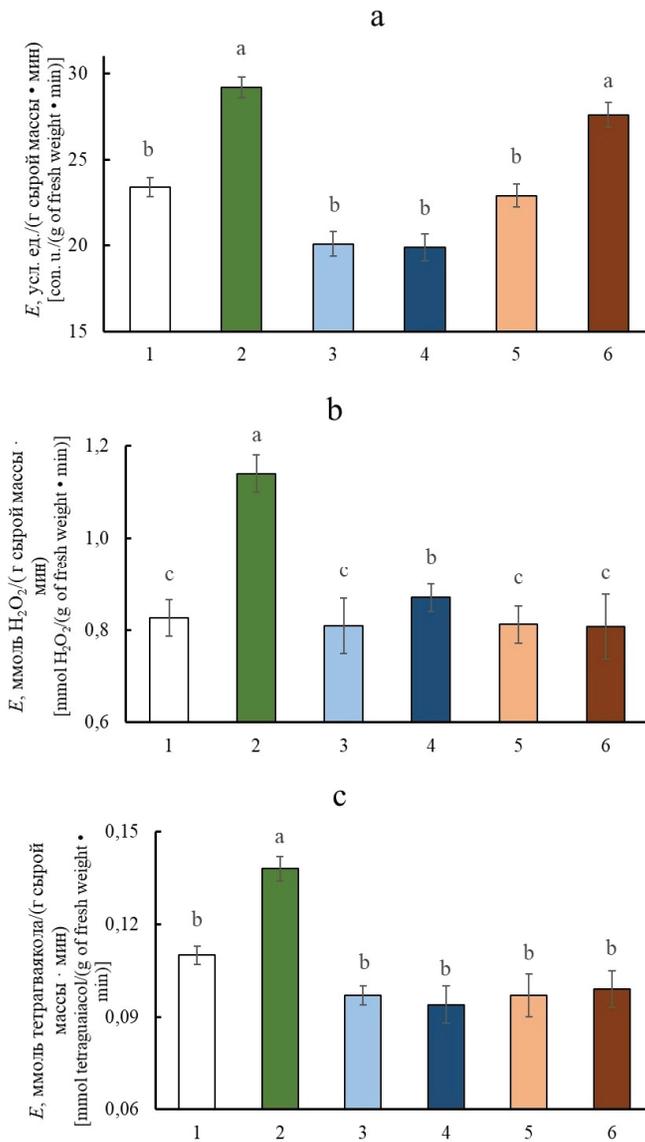


Рис. 2. Активность СОД (а), каталазы (b) и гваяколпероксидазы (с) в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином и антагонистами кальция ($M \pm m_M$): 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ЭГТА (500 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (500 мкМ); 5 – неомицин (200 мкМ); 6 – путресцин (1 мМ) + неомицин (200 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми статистически не значимы ($p \leq 0,05$)

[**Fig. 2.** SOD activity (a), catalase (b), and guaiacol peroxidase (c) in the roots of wheat seedlings when treated with putrescine and calcium antagonists ($M \pm m_M$). 1 - Control; 2 - Putrescine (1 mM); 3 - EGTA (500 μM); 4 - Putrescine (1 mM) + EGTA (500 μM); 5 - Neomycin (200 μM); 6 - putrescine (1 mM) + neomycin (200 μM). The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant ($p \leq 0.05$)]

При этом в варианте с обработкой путресцином значения активности всех трех исследуемых ферментов существенно превышали соответствующие величины контроля.

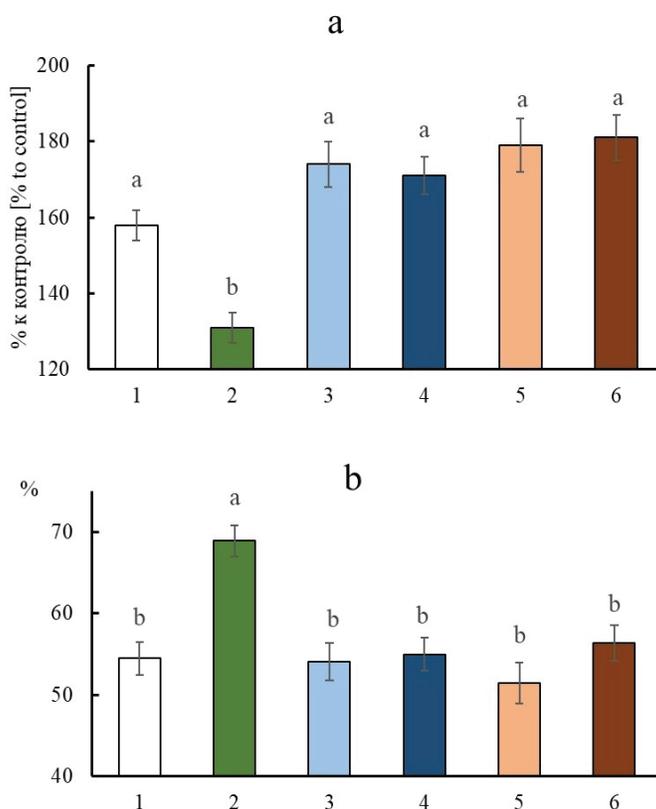


Рис. 3. Выход веществ, поглощающих в УФ-области спектра, из корней проростков пшеницы (а) и выживание проростков (б) после повреждающего прогрева ($M \pm m_M$):

1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ЭГТА (500 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (500 мкМ); 5 – неомицин (200 мкМ); 6 – путресцин (1 мМ) + неомицин (200 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не значимы при $p \leq 0,05$

[**Fig. 3.** Yield substances, absorbing in the UV region of the spectrum, from the roots of wheat seedlings (a) and seedling survival (b) after a damaging heating ($M \pm m_M$). 1 - Control; 2 - Putrescine (1 mM); 3 - EGTA (500 μM); 4 - Putrescine (1 mM) + EGTA (500 μM); 5 - Neomycin (200 μM); 6 - Putrescine (1 mM) + neomycin (200 μM). The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant for $p \leq 0.05$]

Для оценки зависимости индуцирования антиоксидантных ферментов путресцином от кальциевого гомеостаза изучали влияние антагонистов Ca^{2+} на величины их активности через 24 ч после начала обработки путресцином или через 26 ч воздействия антагонистов кальция. Обработка корней ЭГТА

существенно не влияла на наблюдаемые величины активности СОД, каталазы и гваяколпероксидазы (рис. 2). В то же время хелатор ионов кальция почти полностью устранял вызываемый путресцином эффект повышения активности всех трех исследуемых ферментов.

Обработка проростков неомицином сама по себе существенно не влияла на активность СОД, каталазы и гваяколпероксидазы. Этот ингибитор почти не влиял и на проявление эффекта повышения активности СОД, вызываемого путресцином (см. рис. 2). Однако неомицин практически полностью нивелировал вызываемое путресцином повышение активности каталазы и гваяколпероксидазы.

Действие на проростки теплового стресса вызывало повышение выхода из клеток корней веществ, поглощающих в области УФ, почти на 60% (рис. 3, *a*). Обработка путресцином способствовала сохранению целостности биомембран. Под влиянием антагонистов кальция ЭГТА и неомицина отмечалась тенденция к усилению повреждений мембран, хотя этот эффект был статистически не значимым ($p \leq 0,05$). При этом как ЭГТА, так и неомицин нивелировали эффект снижения выхода веществ, поглощающих в УФ-В, вызываемый обработкой проростков путресцином.

Антагонисты кальция сами по себе в условиях наших экспериментов практически не влияли на теплоустойчивость проростков пшеницы (рис. 3, *b*). Однако они практически полностью снимали эффект повышения выживаемости проростков после стресса, вызываемый обработкой путресцином. Таким образом, оба антагониста кальция (ЭГТА и неомицин) устраняли положительное влияние путресцина на состояние мембран и выживание проростков после теплового стресса.

Обсуждение результатов исследования

Полученные результаты свидетельствуют об участии кальция как сигнального посредника в реализации протекторного действия путресцина на проростки пшеницы при тепловом стрессе. По-видимому, ионы Ca^{2+} задействованы в процессе усиления образования пероксида водорода, происходящего при обработке корней путресцином и формировании АФК-сигнала. Об этом свидетельствует устранение индуцированного путресцином повышения содержания H_2O_2 хелатором кальция ЭГТА (см. рис. 1). Примечательно, что другой антагонист кальция – неомицин, который, ингибируя фосфолипазу С, угнетает поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов [26], не влиял на эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях при обработке путресцином.

В литературе имеются немногочисленные и весьма неоднозначные сведения о влиянии полиаминов, в том числе путресцина, на кальциевый гомеостаз. Так, показано, что этот полиамин может активировать Ca^{2+} -насосы плазмалеммы и тем самым усиливать выход кальция из цитозоля во внекле-

точное пространство [27]. С другой стороны, как отмечалось, происходящая при увеличении содержания полиаминов активация диаминооксидазы и полиаминооксидазы приводит к усилению образования АФК за счет окисления полиаминов [11]. При этом пероксид водорода и образующийся в результате неферментативных реакций гидроксильный радикал могут способствовать открыванию неселективных кальциевых каналов и поступлению кальция в цитозоль. Следует отметить, что ранее нами показано устранение вызываемого путресцином усиления образования пероксида водорода в корнях при их обработке ингибитором диаминооксидазы гуанидином, что указывает на значительный вклад этого фермента в индуцируемую путресцином генерацию АФК клетками корней проростков пшеницы [21].

Влияние кальция на активность диаминооксидазы у растений исследовано слабо. Хотя в корнях и побегах проростков гороха зарегистрировано повышение ее активности при обработке экзогенным Ca^{2+} (10 мМ) [28]. Похожие эффекты под влиянием экзогенного кальция обнаружены и у семядольных листьев сои [29], проростков конских бобов [30], клеток корнеплодов моркови [31]. Диаминооксидаза, генерирующая пероксид водорода, локализована в клеточных стенках [32]. Не исключено, что в ее активации задействован кальций, попадающий в апопласт при активации путресцином его выхода из клеток [27]. Кроме того, известна способность полиаминов вытеснять кальций из его комплексов с пектиновыми веществами клеточных стенок [33]. Тем не менее возможность прямой активации диаминооксидазы кальцием пока не доказана. В связи с этим для выяснения вопроса о том, требует ли вызываемый путресцином процесс активации диаминооксидазы ионов кальция, необходимы специальные исследования.

Другим источником АФК, генерируемых при обработке корней проростков пшеницы путресцином, очевидно, является НАДФН-оксидаза. На это указывает существенное угнетение вызываемого путресцином увеличения содержания H_2O_2 в тканях корней под действием имидазола – ингибитора НАДФН-оксидазы [21]. Вполне вероятно, что открывание части кальциевых каналов под влиянием АФК, образующихся вследствие окисления путресцина диаминооксидазой, может приводить к активации НАДФН-оксидазы. Как известно, НАДФН-оксидаза может непосредственно активироваться ионами кальция при их присоединении к кальцийсвязывающим доменам, локализованным на цитозольной стороне белка [17, 34]. Показан эффект активации зависимой от НАДФН-оксидазы генерации супероксидного анион-радикала клетками колеоптилей пшеницы при их обработке кальциевым ионофором А23187 [18]. Поскольку, как обнаружено ранее, повышение содержания пероксида водорода в корнях под влиянием путресцина развивается во времени постепенно, можно предположить участие в этом процессе двух ферментов – диаминооксидазы и НАДФН-оксидазы [21]. Как уже упоминалось, о роли двух ферментов в процессе генерации АФК свидетельствуют и результаты ингибиторного анализа (угнетение образования пероксида

водорода под влиянием ингибиторов диаминооксидазы и НАДФН-оксидазы). В целом полученные результаты свидетельствуют, по крайней мере, о зависимости процесса усиления генерации АФК под влиянием путресцина от кальциевого гомеостаза.

По-видимому, кальций задействован и в последующих процессах повышения активности антиоксидантных ферментов в ответ на обработку путресцином (см. рис. 2). Примечательно, что вызываемое экзогенным путресцином повышение активности СОД полностью устранялось ЭГТА, но не неомицином. Вероятно, данный процесс зависит в основном от поступления кальция из внеклеточного пространства. В то же время путресцин-индуцированное повышение активности двух других антиоксидантных ферментов – каталазы и гваяколпероксидазы – угнеталось не только ЭГТА, но и неомицином, что указывает на зависимость этого процесса от поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов.

Наконец, изменение интегральных показателей (стабильности биомембран и выживания проростков после повреждающего прогрева), вызываемое экзогенным путресцином, также зависит от поступления кальция в цитозоль, притом как из внеклеточного пространства, так и из внутренних компартментов. На это указывает практически полное нивелирование протекторных эффектов путресцина как ЭГТА, так и неомицином (см. рис. 3). Следует отметить, что феномен повышения стабильности биомембран при тепловом стрессе под влиянием экзогенного путресцина согласуется с результатами работы [20], в которой показано повышение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в корнях и снижение в стрессовых условиях количества продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида.

Итак, индуцирование теплоустойчивости проростков пшеницы путресцином зависит от функционального взаимодействия между ионами кальция и АФК как сигнальными посредниками.

Заключение

Последовательность развития процессов в тканях корней проростков пшеницы в ответ на обработку путресцином можно представить в виде следующей гипотетической схемы: повышение концентрации путресцина во внеклеточном пространстве → активация диаминооксидазы и изменение содержания кальция в апопласте → повышение содержания АФК в апопласте → открывание кальциевых каналов → повышение $[Ca^{2+}]_{цит.}$ → увеличение активности НАДФН-оксидазы → усиление генерации АФК и поступление их в цитозоль (в первую очередь H_2O_2) → дополнительная модификация кальциевого гомеостаза → формирование Ca^{2+} - и АФК-сигналов, усиливающих экспрессию генов антиоксидантных ферментов → активация ферментативной антиоксидантной и других протекторных систем → повышение теплоустойчивости. Безусловно, для подтверждения такой последователь-

ности развития событий необходимы специальные исследования, в частности, непосредственное изучение динамики активности диаминооксидазы и НАДФН-оксидазы, исследование механизма влияния кальция на активность диаминооксидазы, определение экспрессии генов антиоксидантных ферментов и ее зависимости от кальциевого гомеостаза при действии путресцина.

Литература

1. Gill S.S., Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants // *Plant Signaling Behavior*. 2010. Vol. 5, № 1. PP. 26–33. <https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291>
2. Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция // *Физиология растений*. 2006. Т. 53, № 5. С. 658–683.
3. Szalai G., Pap M., Janda T. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants // *Journal Plant Physiology*. 2009. Vol. 166. PP. 1826–1831. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.016>
4. Alcazar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance // *Planta*. 2010. Vol. 231, № 6. PP. 1237–1249. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0>
5. Campestre M.P., Bordenave C.D., Origone A.C., Menendez A.B., Ruiz O.A., Rodriguez A.A., Maiale S.J. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls // *Journal Plant Physiology*. 2011. Vol. 168. PP. 1234–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.007>
6. Kuznetsov V.I.V., Shevyakova N.I. Polyamines and plant adaptation to saline environment // *Desert Plants. Biology and Biotechnology*, ed. Ramawat K.B. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. PP. 261–297. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02550-1_13
7. Pal M., Szalai G., Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling // *Plant Science*. 2015. Vol. 237. PP. 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003>
8. Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M., Casero R.A.Jr. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1998. Vol. 95, № 19. PP. 11140–11145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140>
9. Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress // *Plant, Cell & Environment*. 2014. Vol. 37, № 4. PP. 864–885. <https://doi.org/10.1111/pce.12204>
10. Dobrovinskaya O.R., Muniz J., Pottosin I. Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines // *The Journal of Membrane Biology*. 1999. Vol. 167. PP. 127–140. <https://doi.org/10.1007/s002329900477>
11. Pottosin I., Shabala S. Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5, Art. 154. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00154>
12. Bose J., Pottosin I.I., Shabala S.S., Palmgren M.G., Shabala S. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants // *Frontiers in Plant Science*. 2011. Vol. 2, Art. 85. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00085>
13. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, № 4. PP. 18–35. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.04.018>
14. Mori I.C., Schroeder J.S. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels.

- A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // *Plant Physiology*. 2004. Vol. 135. PP. 702–708. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042069>
15. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiology*. 2006. Vol. 141. PP. 336–340. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078089>
 16. Demidchik V., Maathuis F.J.M. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development // *New Phytologist*. 2007. Vol. 175. PP. 387–404. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x>
 17. Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N., Akashi S., Hayashi K., Kojima C., Wong H.L., Kawasaki T., Shimamoto K., Sato M., Shimizu T. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications // *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285. PP. 1435–1445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058909>
 18. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., and Dmitriev O.P. Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide // *Cytology and Genetics*. 2012. Vol. 46, № 6. PP. 354–359. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060059>
 19. Ghalati R.E., Shamili M., Homaei A. Effect of putrescine on biochemical and physiological characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) seedlings under salt stress // *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 261. Art. 108961. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108961>
 20. Asthir B., Kumar R., Bains N.S. Why and how putrescine modulates thermotolerance in wheat? // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2018. Vol. 55, № 6. PP. 404–412.
 21. Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine // *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2019. Vol. 91, № 6. PP. 103–111. <https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103>
 22. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы // *Физиология растений*. 2013. Т. 60, № 2. С. 221–229. <https://doi.org/10.7868/S0015330313020127>
 23. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiology*. 1976. Vol. 57, № 2. PP. 308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
 24. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Влияние модификации NO-статуса, закаливающего прогрева и пероксида водорода на активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы // *Физиология растений*. 2015. Т. 62, № 3. С. 317–323. <https://doi.org/10.7868/S0015330315030094>
 25. Мелехов Е.И., Ефремова Л.К. Влияние экзогенных фитогормонов на устойчивость растительных клеток к нагреву и 2,4-Д // *Физиология растений*. 1990. Т. 37, № 3. С. 561–568.
 26. Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H., Weng F.H., Zhan J.C., Liu Y., Wan S.B., Liu Y.Y. Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation induced thermotolerance in pea leaves // *Journal of Plant Physiology*. 2006. Vol. 163, № 4. PP. 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.027>
 27. Pottosin I., Velarde-Buendía A.M., Bose J., Fuglsang A.T., Shabala S. Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca²⁺, and modulate H⁺-ATPase pump activity in pea roots // *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 65, № 9. PP. 2463–2472. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru133>
 28. Piterková J., Luhová L., Zajoncová L., Šebela M., Petřiválský M. Modulation of polyamine catabolism in pea seedlings by calcium during salinity stress // *Plant Protection Science*. 2012. Vol. 48, № 2. PP. 53–64. <https://doi.org/10.17221/62/2011-PPS>
 29. Guo Y., Yang R., Chen H., Song Y., Gu Z. Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia // *European Food Research and*

- Technology. 2012. Vol. 234. PP. 679–687. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1678-y>
30. Yang R., Chen H., Gu Z. Factors influencing diamine oxidase activity and γ -aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59. PP. 11616–11620. <https://doi.org/10.1021/jf202645p>
31. Wang K., Xu F., Cao S., Wang H., Wei Y., Shao X., Zhou W., Zheng Y. Effects of exogenous calcium chloride (CaCl₂) and ascorbic acid (AsA) on the γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism in shredded carrots // Postharvest Biology and Technology. 2019. Vol. 152. PP. 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.005>
32. Шарова Е.И., Медведев С.С. Редокс-реакции в апопласте растущих клеток // Физиология растений. 2017. Т. 64, № 1. С. 3–18. <https://doi.org/10.7868/S0015330317010146>
33. Messiaen J., Van Cutsem P. Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction // Planta. 1999. Vol. 208. PP. 247–256. <https://doi.org/10.1007/s004250050556>
34. Глянько А.К., Ищенко А.А. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 5. С. 509–518.

Поступила в редакцию 09.07.2020 г.;
принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Колупаев Юрий Евгеньевич – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой ботаники и физиологии растений, факультет защиты растений, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2); профессор кафедры физиологии и биохимии растений и микроорганизмов, биологический факультет, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина (Украина, 61002, г. Харьков, пл. Свободы, 4).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7151-906X>

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Кокорев Александр Игоревич – аспирант кафедры ботаники и физиологии растений, факультет защиты растений, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2).

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Шкляревский Максим Анатольевич – ассистент кафедры лесоводства, факультет лесного хозяйства, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2)

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0001-7781-4481>

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Для цитирования: Колупаев Ю.Е., Кокорев А.И., Шкляревский М.А. Кальцийзависимое изменение активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 105–122. doi: 10.17223/19988591/51/6

For citation: Kolupaev YE, Kokorev AI, Shklyarevskiy MA. Calcium-dependent changes in the activity of antioxidant enzymes and heat resistance of wheat seedlings under the influence of exogenous putrescine. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:105-122. doi: 10.17223/19988591/51/6 In Russian, English Summary

Yuriy E. Kolupaev^{1,2}, Alexandr I. Kokorev¹, Maxim A. Shkliarevskiy¹

¹ Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, Ukraine

² Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Calcium-dependent changes in the activity of antioxidant enzymes and heat resistance of wheat seedlings under the influence of exogenous putrescine

Polyamines are important stress plant metabolites involved in the regulation of redox homeostasis and other signaling processes. Polyamines can affect redox homeostasis by binding free radicals and participating in the regulation of gene expression of antioxidant enzymes. However, their metabolism produces hydrogen peroxide and other reactive oxygen species (ROS). A separate component of the physiological activity of polyamines may be their effect on the state of ion channels. It is known that there are complex bonds between ROS and calcium ions as signal mediators. However, the functional interaction between ROS and calcium ions in the implementation of the effects of polyamines on plant cells has been studied very poorly. Moreover, the question of the role of such interactions in the realization of stress-protective effects of polyamines remains open. The aim of this research was to study the inhibitory methods of the involvement of different pools of calcium in the regulation of the formation of hydrogen peroxide, the activity of antioxidant enzymes and inducing putrescine thermostability of wheat seedlings.

The object of the study was etiolated seedlings of soft winter wheat (*Triticum aestivum* L.) of Doskonala variety. Three-day-old seedlings were treated with putrescine at a concentration of 1 mM. In certain experimental variants, the seedlings were treated with calcium antagonists - EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid - extracellular Ca²⁺ chelator) and neomycin - an inhibitor of phospholipase C-dependent calcium intake into the cytosol from intracellular compartments, as well as with the indicated inhibitors in combination with putrescine. In the roots of seedlings some time after treatment with test compounds, we determined hydrogen peroxide content and the activity of antioxidant enzymes. One day after seedling treatment with putrescine, calcium antagonists and a combination of effectors, the seedlings were subjected to damaging heating in a water thermostat (10 min at 45 °C). 5 hours after heating, we assessed damage to the root cell membranes by the yield of compounds absorbing in the UV-B, as well as the activity of antioxidant enzymes.

2 hours after the start of root treatment with putrescine, we noted a significant increase in the content of hydrogen peroxide in them (See Fig. 1). This effect was eliminated by treatment with EGTA, but not with neomycin. The treatment of seedlings with putrescine caused a change in the activity of all three studied antioxidant enzymes in roots (superoxide dismutase - SOD, catalase, and guaiacol peroxidase) (See Table). The increased activity of these enzymes in the roots of seedlings treated with putrescine was also observed after damaging heating. The calcium ion chelator completely eliminated the putrescine-induced effect of increasing the activity of all three studied enzymes (See Fig. 2). Neomycin almost did not affect the manifestation of the effect of increasing the activity of SOD, however, it neutralized the increase in the activity of catalase and guaiacol peroxidase caused by putrescine. The effect of heat stress on the seedlings caused an increase in the yield of substances absorbing in the UV from the root cells. Treatment with putrescine helped preserve the integrity of biomembranes. Calcium antagonists EGTA and neomycin leveled off the effect of reducing the yield of substances absorbing in the UV-B caused by putrescine (See Fig. 3). They also almost completely eliminated the putrescine-induced increase in survival of seedlings after stress.

We can conclude that the induction of heat resistance of wheat seedlings by putrescine depends on the functional interaction between calcium ions and ROS as signaling agents. The activation process of the enzymatic antioxidant system, necessary for the formation of heat resistance of plants, depends on the formation of ROS, which occurs with the participation of diamine oxidase and NADPH oxidase. At the same time, the accumulation of the signal pool of hydrogen peroxide is dependent on the influx of calcium into cytosol from extracellular space. The further activation process of the antioxidant enzyme complex under the influence of putrescine treatment also depends on the influx of calcium into cytosol, not only from extracellular space, but also from intracellular compartments.

The paper contains 3 Figures, 1 Table and 34 References.

Key words: *Triticum aestivum*; polyamines; putrescine; redox homeostasis; calcium; heat resistance.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Gill SS, Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling Behavior*. 2010;5(1):26-33. doi: [10.4161/psb.5.1.10291](https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291)
2. Kuznetsov VIV, Radyukina NL, Shevyakova NI. Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian J Plant Physiology*. 2006;53(5):583-604. doi: [10.1134/S1021443706050025](https://doi.org/10.1134/S1021443706050025)
3. Szalai G, Pap M, Janda T. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants. *J Plant Physiology*. 2009;166:1826-1831. doi: [10.1016/j.jplph.2009.04.016](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.016)
4. Alcazar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. 2010;231(6):1237-1249. doi: [10.1007/s00425-010-1130-0](https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0)
5. Campestre MP, Bordenave CD, Origone AC, Menendez AB, Ruiz OA, Rodriguez AA, Maiale SJ. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *J Plant Physiology*. 2011;168:1234-1240. doi: [10.1016/j.jplph.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.007)
6. Kuznetsov VIV, Shevyakova NI. Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: *Desert Plants. Biology and Biotechnology*. Ramawat KB, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Publ.; 2011. pp. 261-297. doi: [10.1007/978-3-642-02550-1_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02550-1_13)
7. Pal M, Szalai G, Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Science*. 2015;237:16-23. doi: [10.1016/j.plantsci.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003)
8. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RAJr. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1998;95(19):11140-11145. doi: [10.1073/pnas.95.19.11140](https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140)
9. Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, Christou A, Filippou P, Job D, Fotopoulos V, Molassiotis A. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant, Cell & Environment*. 2014;37(4):864-885. doi: [10.1111/pce.12204](https://doi.org/10.1111/pce.12204)
10. Dobrovinskaya OR, Muniz J, Pottosin I. Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *The J Membrane Biology*. 1999;167:127-140. doi: [10.1007/s002329900477](https://doi.org/10.1007/s002329900477)
11. Pottosin I, Shabala S. Polyamines control of cation transport across plant membranes: Implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:154. doi: [10.3389/fpls.2014.00154](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00154)
12. Bose J, Pottosin II, Shabala SS, Palmgren M., Shabala S. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2011;2:85. doi: [10.3389/fpls.2011.00085](https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00085)

13. Kolupaev YuE, Karpets YuV. Reactive oxygen species and stress signaling in plants. *The Ukrainian Biochemical J.* 2014;86(4):18-35. doi: [10.15407/ubj86.04.018](https://doi.org/10.15407/ubj86.04.018)
14. Mori IC., Schroeder JS. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology.* 2004;135:702-708. doi: [10.1104/pp.104.042069](https://doi.org/10.1104/pp.104.042069)
15. Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology.* 2006;141:336-340. doi: [10.1104/pp.106.078089](https://doi.org/10.1104/pp.106.078089)
16. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist.* 2007;175:387-404. doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x)
17. Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL., Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *The J Biological Chemistry.* 2010;285:1435-1445. doi: [10.1074/jbc.M109.058909](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058909)
18. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Dmitriev OP. Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide. *Cytology and Genetics.* 2012;46(6):354-359. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452712060059>
19. Ghalati RE, Shamili M, Homaei A. Effect of putrescine on biochemical and physiological characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) seedlings under salt stress. *Scientia Horticulturae.* 2020;261:108961. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108961>
20. Asthir B, Kumar R, Bains NS. Why and how putrescine modulates thermotolerance in wheat? *Indian J Biochemistry and Biophysics.* 2018;55(6):404-412.
21. Kolupaev YuE, Kokorev AI, Yastreb TO, Horielova EI. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *The Ukrainian Biochemical J.* 2019;91(6):103-111. doi: [10.15407/ubj91.06.103](https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103)
22. Kolupaev YuE., Oboznyi AI, Shvidenko NV. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russian J Plant Physiology.* 2013;60(2):227-234. doi: [10.1134/S102144371302012X](https://doi.org/10.1134/S102144371302012X)
23. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiology.* 1976;57(2):308-309. doi: [10.1104/pp.57.2.308](https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308)
24. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Oboznyi AI. Effects OF NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russian J Plant Physiology.* 2015;62(3):292-298. doi: [10.1134/S1021443715030097](https://doi.org/10.1134/S1021443715030097)
25. Melekhov EI, Efremova LK. Effect of phytohormones on plant cell stability to heating and to 2,4-D treatments. *Fiziologiya rasteniy = Russian J Plant Physiology.* 1990;37(3):561-568. In Russian
26. Liu HT, Huang WD, Pan QH, Weng FH, Zhan JC, Liu Y, Wan S, Liu YY. Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation induced thermotolerance in pea leaves. *J Plant Physiology.* 2006;163(4):405-416. doi: [10.1016/j.jplph.2005.04.027](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.027)
27. Pottosin I, Velarde-Buendía AM, Bose J, Fuglsang AT, Shabala S. Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca²⁺-, and modulate H⁺-ATPase pump activity in pea roots. *J Experimental Botany.* 2014;65(9):2463-2472. doi: [10.1093/jxb/eru133](https://doi.org/10.1093/jxb/eru133)
28. Piterková J, Luhová L, Zajoncová L, Šebela M, Petřivalský M. Modulation of polyamine catabolism in pea seedlings by calcium during salinity stress. *Plant Protection Science.* 2012;48(2):53-64. doi: [10.17221/62/2011-PPS](https://doi.org/10.17221/62/2011-PPS)
29. Guo Y, Yang R, Chen H, Song Y, Gu Z. Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia. *European Food Research and Technology.* 2012;234:679-687. doi: [10.1007/s00217-012-1678-y](https://doi.org/10.1007/s00217-012-1678-y)

30. Yang R, Chen H, Gu Z. Factors influencing diamine oxidase activity and γ -aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. *J Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:11616-11620. doi: [10.1021/jf202645p](https://doi.org/10.1021/jf202645p)
31. Wang K, Xu F, Cao S, Wang H, Wei Y, Shao X, Zhou W, Zheng Y. Effects of exogenous calcium chloride (CaCl₂) and ascorbic acid (AsA) on the γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism in shredded carrots. *Postharvest Biology and Technology*. 2019;152:111-117. doi: [10.1016/j.postharvbio.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.005)
32. Sharova EI, Medvedev SS. Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russian J Plant Physiology*. 2017;64(1):1-14. doi: [10.1134/S1021443717010149](https://doi.org/10.1134/S1021443717010149)
33. Messiaen J, Van Cutsem P. Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta*. 1999;208:247-256. doi: [10.1007/s004250050556](https://doi.org/10.1007/s004250050556)
34. Glyan'ko AK, Ischenko AA. Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010;46(5):463-471. doi: [10.1134/S0003683810050017](https://doi.org/10.1134/S0003683810050017)

Received 09 July 2020;

Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:

Kolupaev Yuriy E, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Plant Protection, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483, Ukraine; Professor, Department of Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms, Faculty of Biology, Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody square, Kharkiv 61002, Ukraine.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7151-906X>

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Kokorev Alexandr I, Graduate Student, Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Plant Protection, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483, Ukraine.

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Shkliarevskiy Maxim A, Assistant of the Department of Forestry, Faculty of Forestry, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483, Ukraine.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7781-4481>

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

УДК 57.088

doi: 10.17223/19988591/51/7

О.К. Мурган, А.Д. Казакова, М.В. Ефимова

*Национальный исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, Россия*

Сравнение методов экстракции РНК из растения картофеля для проведения ПЦР в реальном времени

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-34-90094.

*Экстракция нуклеиновых кислот – основной этап молекулярной биологии. В настоящее время существует большое количество протоколов и методических рекомендаций для экстракции РНК и ДНК из разных групп организмов. От выбора соответствующего метода и в конечном итоге качества пробы РНК напрямую зависит результат проведения высокочувствительных методов, например полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ). Сложности, возникающие при экстракции РНК из растительной ткани, связаны с присутствием в растениях большого количества вторичных метаболитов и полисахаридов. Проведено сравнение трех методов экстракции РНК из листьев растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Луговской с целью дальнейшего исследования экспрессии генов. Качество экстрагируемой РНК и ее количество оценивали спектрофотометрически, с помощью электрофореза в агарозном геле и применения метода кратных разведений для ПЦР в реальном времени. Показано, что для растений картофеля наиболее подходящим является коммерческий набор фирмы Qiagen из-за наименьшего ингибирующего влияния на протекание ПЦР, другие применяемые методы нуждаются в модификациях по очищению образца РНК от ингибиторов реакции.*

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L.; РНК; фенол; электрофорез; наноспектрофотометр; ПЦР в реальном времени.

Введение

Применение молекулярных методов позволяет решать как фундаментальные, так и прикладные вопросы биологии. Данное направление в методологии появилось сравнительно недавно – в 1950-х гг. [1]. К настоящему времени доля молекулярных исследований продолжает стремительно увеличиваться, в том числе в области ботаники и физиологии растений. Использование данных подходов позволяет определить не только систематическое положение организма, но и выявить дифференциальную экспрессию тех или иных групп генов в ответ на действие регуляторных факторов [2]. Процесс экстракции РНК подразумевает следующие основные этапы – лизис (разрушение) клетки, экстракцию макромолекул и очистку РНК. Основные

способы их проведения описаны ещё в 1987 г. [3]. Однако из-за низкой повторяемости экспериментов потребность в формировании оценки качества полученного препарата нуклеиновой кислоты для исследуемых образцов появилась только в начале 2000-х гг. [4–8]. В 2009 г. разработаны минимальные требования для опубликования результатов ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) – MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time Experiments), в которых также прописаны требования к образцам РНК и ДНК: допустимое присутствие примесей белков и полисахаридов, концентрация и целостность препарата [9]. Экстракция РНК необходима не только для проведения ПЦР РВ, но и для ряда других манипуляций (секвенирование, определение вирусной нагрузки и т.д.), в ходе выполнения которых рекомендации могут быть дополнены. К примеру, для реализации задач, связанных с изучением полного транскриптома, необходимо получение образца, характеризующегося не только высоким содержанием мРНК и коротких интерферирующих последовательностей, но и отсутствием рибонуклеаз (РНКаз) и ингибиторов ПЦР [10]. Известно, что способ осуществления этапов экстракции нуклеиновых кислот (НК) напрямую определяет параметры получаемого образца РНК [3, 9]. Среди методических статей, посвящённых молекулярным исследованиям в области физиологии растений, основной интерес уделяется способам экстракции тотальной РНК с использованием экстракционного буфера с сильным окислителем – гуанидинтиоционатом и фенолом (например, реагентов TRIzol™ и Tri Reagent® (Invitrogen, США)) [11, 12], LiCl и/или NaCl [13, 14], а также диоксида кремния, включая колонки для центрифугирования (далее спин-колонки) фирм Qiagen (Германия), Norgen Biotek (Канада) и Invitrogen (США)) [15–17]. В основном при экстракции коротких последовательностей из тканей различного происхождения оценивают эффективность методов, в которых применяются или фенол в составе буфера с кислым рН, или спин-колонки, или их совместное использование [18–23].

Сложность экстракции НК определяется химическим составом растений, в связи с чем универсальных методологических рекомендаций для каждого вида растений не существует. Необходимо проводить сравнение методов экстракции для объектов-интересантов и при необходимости осуществлять модификации этапов, направленные на улучшение качества экстрагируемых препаратов НК; степень чистоты последних определяет корректность и достоверность результатов молекулярных исследований и их практических приложений [6, 17, 24–28].

Относительно растений картофеля на данный момент не существует стандартного метода экстракции нуклеиновых кислот. В то же время картофель, являясь одним из важных объектов исследования, отличается высоким содержанием полисахаридов, в связи с чем усложняется экстракция РНК высокого качества из его тканей. Нами впервые выполнено сравнение эффективности трёх методов экстракции РНК из листьев растений карто-

феля в соответствии с рекомендациями MIQE [9] и с целью дальнейшего проведения ПЦР РВ.

Материалы и методики исследования

В основе исследования лежали наиболее распространённые методы экстракции РНК из листьев растений: с использованием (1) додецилсульфата натрия (SDS) и хлорида лития [13, 29], (2) коммерческого набора RNeasy® Plant Mini Kit [30] и (3) фенола с гуанидинтиоционатом в составе реагента TRIzol™ [11, 12].

Методы экстракции РНК оценены с точки зрения количественного выхода препарата, качества получаемых нуклеиновых кислот и присутствия в образцах ингибиторов ПЦР. Выявление качества РНК и ее количественного выхода проведено с помощью спектрофотометрических критериев, электрофоретического анализа и ПЦР в реальном времени.

Исследования проведены на двухнедельных растениях *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской (идентификатор 8301891). Ткань листа измельчали в жидком азоте, после чего тотальную РНК экстрагировали тремя методами.

Первый метод описан Manickavelu et al. [13] и представлен в модификации Zlobin et al. [29] (далее метод Manickavelu et al.). Ткань листа (0,2 г) переносили в пробирку и добавляли 800 мкл экстракционного буфера (0,1 M Tris-HCl (pH 9,0), 0,1 M LiCl, 1 mM ЭДТА (pH 8,0), 1% SDS), перемешивали на центрифуге-вортексе Микроспин («BioSan», Латвия) в течение 1 мин, а затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Затем добавляли 600 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (ФХИ) в соотношении 25:24:1, перемешивали и инкубировали непродолжительное время при комнатной температуре. Пробы центрифугировали 10 мин при 15 000 g (4 °C) («Eppendorf», Германия). Надосадочную жидкость (450 мкл) переносили в новую пробирку и добавляли равный объем ФХИ, после чего смесь перемешивали и центрифугировали 15 000 g (4 °C). Супернатант (450 мкл) переносили в чистую пробирку и добавляли 45 мкл 3M NaOAc и 1 350 мкл 100% этанола, после чего полученный раствор выдерживали 3 ч при -20 °C.

Образцы центрифугировали 20 мин при 15 000 g (4 °C), к осадку добавляли 1 мл 75% этанола и инкубировали в течение 20 мин при -20 °C. После этого центрифугировали 5 мин 7 000 g (4 °C). Осадок, содержащий РНК, подсушивали на льду. Затем осадок растворяли в 45 мкл воды, центрифугировали 15 мин 15 000 g (4 °C), отбирали 40 мкл супернатанта и переносили его в новую пробирку, в которую добавляли 11 мкл 3 M NaOAc и 100 мкл 80% этанола, инкубировали 45 мин и центрифугировали 15 мин 15 000 g (4 °C). Промывали осадок 1 мл 80% этанола, центрифугировали 5 мин 7 000 g (4 °C). Подсушивали осадок при 4 °C и растворяли его в воде.

Модификации метода [29] заключались в (1) последовательности добавления фенол-хлороформа и экстракционного буфера к растительному образцу (в методе Manickavelu et al., растения напрямую подвергались лизирующему действию фенол-хлороформа); (2) изменении температурного режима на этапе осаждения РНК, с $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и увеличении продолжительности этапа с одного часа до трёх; (3) исключении стадии добавления LiCl к осаждённой РНК; (4) добавлен этап дополнительной очистки РНК после её экстракции, позволяющий снизить содержание нерастворимых примесей. Продолжительность экстракции данным методом составляет около 6 ч для 1–6 проб.

Второй анализируемый метод основан на применении коммерческого набора RNeasy® Plant Mini Kit [30] фирмы Qiagen (Германия). К растертой растительной ткани (0,1 г) добавляли 450 мкл экстракционного буфера (RLT или RLC) и тщательно перемешивали. Пробу переносили на колонку QIAshredder spin, центрифугировали 2 мин 15 000 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли 96% этанола объемом в два раза меньшим, чем объем супернатанта, и затем пипетировали. Пробу аккуратно помещали в колонку RNeasy Mini spin, центрифугировали 15 с 8 000 g. Колонку сначала промывали 700 мкл буфера RW1, потом дважды 500 мкл буфера RPE; в ходе каждого промывания колонку центрифугировали 15 с, 15 с и 2 мин соответственно при 8 000 g. Колонку переносили в чистую пробирку на 2 мл и центрифугировали 1 мин 15 000 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Связанную с мембранной РНК элюировали 1 мин 8 000 g. Данный метод позволяет получать готовый продукт РНК за 30 мин, возможна одновременная экстракция большого количества проб, ограниченного вместимостью центрифуги.

Третий метод (далее – TRIzol™) основан на реакции фенола с гуанидинтиоцианатом, состав буфера предложен Chomczynski и Sacchi [17], методические рекомендации приведены в следующей ссылке [18]. Для экстракции РНК с использованием реагента TRIzol™ навеску растительной ткани (0,2 г), переносили в пробирку и добавляли 0,5 мл буфера (38% фенол, водный 0,8 М гуанидинтиоцианат, водный 0,4 М аммонийтиоцианат, водный 0,1 М ацетат натрия (рН 5), 5% глицерин). Перемешивали на центрифуге-вортексе Микроспин («BioSan», Латвия) и добавляли повторно 0,5 мл реагента. Инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Добавляли 0,2 мл смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1, перемешивали и инкубировали 2–3 мин. Центрифугировали 15 мин 12 000 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). После разделения фракций верхнюю прозрачную фазу (~500 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 50 мкл 3 М NaOAc и 500 мкл охлажденного изопропанола. Инкубировали 20 мин при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого содержимое пробирки аккуратно перемешивали и центрифугировали 10 мин 12 000 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Осадок (РНК) промывали 75% этанолом. Центрифугировали 5 мин 7 500 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Данную процедуру повторяли дважды. Подсушивали РНК при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Осадок растворяли водой. Для одновременной экстракции РНК (до 12 проб) данным методом требуется не менее 1,5 ч.

Концентрацию РНК и примесей (белков, полисахаридов) оценивали при помощи спектрофотометра («Implen», Германия) при длинах волн 230, 260 и 280 нм.

Электрофоретическое разделение экстрагируемых нуклеиновых кислот проводили в 1,5% агарозном геле на основе ТВЕ буфера (Tris base, борная кислота, ЭДТА, рН 8,0) с добавлением 2,5 мкл бромистого этидия (10 мг/мл). В лунки вносили разбавленный в 5 раз раствор РНК (суммарно 10 мкл) и 2 мкл окрашивающего буфера (6X DNA Loading dye «Fermentas», Латвия).

Для предотвращения контаминации образцов РНК геномной ДНК пробы обработаны DNase I, RNase-free («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция проведена согласно протоколу производителя: 2 мкл пробы РНК (2 мкг), 2 мкл ДНКазы, 2 мкл буфера, смесь доводили до объема 20 мкл водой и инкубировали 30 мин при 37 °С, после чего добавляли 2 мкл 25 мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65 °С. Синтез кДНК проведен с использованием наборов реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) при помощи праймера Oligo(dT)₁₈. В пробирку вносили 5,5 мкл РНК, ранее очищенной ДНКазой, 1 мкл праймера Oligo(dT)₁₈ в концентрации 20 мкМ, перемешивали и осаждали на центрифуге-вортексе Микроспин («BioSan», Латвия). Инкубировали 2 мин при 70 °С, охлаждали в термостате («Biosan», Латвия) и осаждали конденсат. Добавляли 11 мкл смеси, состоящей из 4 мкл 5х буфера для обратной транскриптазы, 2 мкл dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ), и 2 мкл обратной транскриптазы MMLV (100 ед./мкл). Смесь перемешивали и инкубировали 60 мин при 42 °С; реакции синтеза останавливали нагреванием при 70 °С в течение 10 мин.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры для гена пролиндегидрогеназы, характеризующегося относительно высоким уровнем экспрессии в стандартных условиях. Транскрипт данного гена имеет сравнительно небольшой размер – 2 000 п.н. Нуклеотидную последовательность гена деградации пролина PDH получали из базы данных NCBI (The National Center for Biotechnology Information, USA). Специфические праймеры (F (5'–3') – АТААСТГСААТТТГТАСАССА; R (5'–3') – GGCGAAAAGTGGAAGCG) конструировали в программе Vector NTI 11 (Invitrogen, США), специфичность оценивали на веб-платформе Primer-BLAST [31].

Оценка уровней транскриптов генов проведена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени после обратной транскрипции на ПЦР-амплификаторе LightCycler 96 («Roche», Швейцария). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 4 мкл qPCRmix HS SYBR («Евроген», Россия), матрицу кДНК (4 мкл) предположительной концентрации 1, 10 и 100 нг в расчёте на одну реакцию; 0,3 мкМ прямого и обратного праймера. В качестве отрицательного контроля вместо матрицы кДНК использовали воду, положительного – ДНК.

Экстрагирование РНК каждым из 3 анализируемых методов проведено в 2–4 повторностях на двух группах растений картофеля, состоящих не менее,

чем из 3 листьев среднего яруса. ПЦР-РВ проведено в трехкратной аналитической повторности для каждого из разведений: исходная концентрация кДНК (100 нг), разведенная в десять и сто раз соответственно.

Сравнение методов основывали на показателях качества препарата и количества экстрагируемой РНК; ПЦР в реальном времени (метод десятикратных разведений) использовали для выявления в препаратах РНК ингибиторов реакции, в качестве которых могут выступать различные полисахариды, металлы и РНКазы.

Результаты исследования и обсуждение

Нами оценены три метода экстракции РНК, первый основан на способности SDS и хлорида лития ингибировать активность РНКазы, второй – на взаимодействии НК с диоксидом кремния в коммерческих колонках (Qiagen, Германия), третий – с применением реагента TRIzol™ (Invitrogen, США), в котором сильный окислитель гуанидотиоцианат совместно с фенолом в составе буфера выступают как лизирующий агент и ингибитор РНКаз. Известно, что фенол дополнительно ингибирует нуклеазы и упрощает депротенизацию нуклеиновых кислот, но вместе с тем создает с НК устойчивые фенол-хиноновые комплексы, которые выпадают в осадок на этапе осаждения РНК [32, 33] и тем самым снижают ее общий выход.

Анализируемые нами методы, прежде всего, отличаются продолжительностью экстракции РНК и применяемыми реагентами. Например, в первом методе из-за повторения этапов отмывания образца от солей хлорида лития этанолом и изопропанолом значительно увеличивается продолжительность экстракции; для удаления белков используется фенол-хлороформная смесь. Во втором методе для экстракции РНК использовали колонки (QIAshredder spin, RNeasy Mini spin, Qiagen, Германия). Данный метод является самым малозатратным по времени и исключает самостоятельное приготовление реактивов, что снижает риск загрязнения материала рибонуклеазами.

Третий метод экстракции РНК с реагентом TRIzol™ основывается на применении фенола, среди компонентов буфера присутствуют также гуанидотиоцианат и аммонийтиоцианат, которые являются сильными окислителями и ингибируют внутриклеточные и внеклеточные РНКазы. Данная методика характеризуется средней продолжительностью экстракции.

Распространённые критерии качества РНК заключаются в оценке нуклеиновых кислот методом электрофореза в агарозном геле. О высоком качестве препарата свидетельствует присутствие трех выраженных полос. Для эукариотической РНК верхняя полоса представляет собой большую рибосомальную РНК 28S/25S (рРНК) длиной около 4,8 т.п.н.; средняя полоса является 18S рРНК (около 2,0 т.п.н.) и третья полоса – 5,8S (154 н.) и 5S (117 н.) РНК. Транспортные РНК (73–93 н.) могут визуальнo и не обнаруживаться. Наличие в геле нечётких полос или отношение интенсивности полос

28S:18S меньше 2:1 указывают на низкое качество выделенного препарата РНК [34].

Отсутствие визуального преобладания полосы рибосомальной 25S/28S РНК над 18S для препаратов РНК, экстрагированных первым методом (Manickavelu et al.), а также для одной из проб, полученной с помощью колонок RNeasy, свидетельствуют о низком качестве РНК (рис. 1). В то же время первый метод после проведения электрофореза позволил обнаружить на геле отдельные полосы, которые по своему размеру предположительно соответствуют тРНК, что, возможно, свидетельствует о щадящем воздействии реактивов на препарат РНК или о проведении более полной экстракции. К недостаткам первого метода относится высокое загрязнение РНК геномной ДНК, которая впоследствии разрушалась на этапе ДНКазирования. Опираясь на соотношение 28S:18S, можно предположить, что третий метод способствовал экстрагированию наиболее качественной РНК. Об этом свидетельствует и четкое разграничение на агарозном геле трех типов рРНК (28S, 18S и 5S), что характерно также и для препарата, полученного набором RNeasy® Plant Mini Kit.

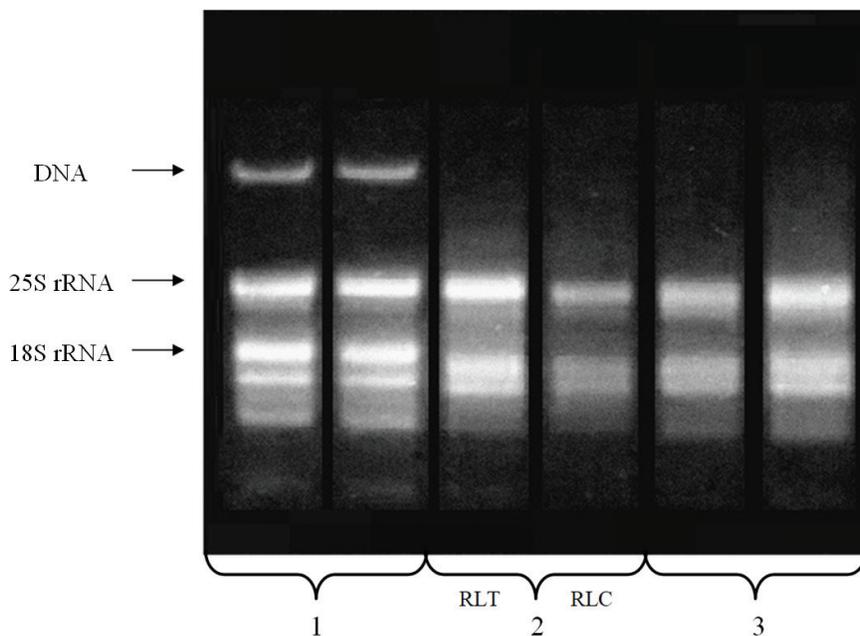


Рис. 1. Электрофорез нуклеиновых кислот в 1,5% агарозном геле:
1 – РНК, экстрагированная согласно методу Manickavelu et al.; 2 – РНК, экстрагированная с использованием RNeasy® Plant Mini Kit (экстракционный буфер RLT или RLC); 3 – РНК, экстрагированная реагентом TRIzol™
[Fig. 1. Nucleic acid electrophoresis in 1.5 % agarose gel: 1 - RNA extracted by Manickavelu et al. method; 2 - RNA extracted by RNeasy® Plant Mini Kit (extraction buffer RLT or RLC); 3 - RNA extracted by TRIzol™ reagent]

Дополнительный фактор, влияющий на целостность РНК, – наличие контаминации образца рибонуклеазами. РНКазы активируются при разрушении клеток, их ингибирование возможно низкими отрицательными температурами [22]. Для обнаружения примесей белков и полисахаридов в образце РНК используют спектрофотометрические характеристики – поглощение раствора РНК при 230, 260 и 280 нм [35, 36].

Количество РНК и степень её загрязнения (табл. 1) оценивали с помощью спектрофотометра Implen 300 (Германия). В качестве контроля использовали очищенную от РНКаз воду.

Таблица 1 [Table 1]

Концентрации препаратов РНК и оценка качества
[Concentration and quality of RNA]

Методы [Methods]	Концентрация РНК, нг/мкл [Concentration of RNA, ng / μ l]	Спектрофотометри- ческие показатели качества РНК [Spectrophotometric qual- ity indicators of RNA]		Общий выход РНК, мкг [The total yield of RNA, mcg]
		$A_{260/280}$ *	$A_{260/230}$ *	
Manickavelu et al.	2 076	1,970	2,307	41,52
	2 332	1,950	2,327	46,66
RNeasy® Plant Mini Kit	RLT 1 980	2,089	1,725	49,50
	RLC 750	2,083	2,404	18,75
TRIzol™	1 344	1,931	1,626	80,64
	1 720	1,955	1,614	103,20
	1 482	1,966	1,843	88,92
	1 436	1,935	1,693	86,16

* – Очищенная РНК имеет величины: $A_{260/280} \approx 1,7-2,0$; $A_{260/230} \approx 2,0-2,2$.

[* - Expected values for pure RNA is $A_{260/280} \approx 1.7-2$; $A_{260/230} \approx 2.0-2.2$].

Значения соотношений $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ отражают состав полученного образца РНК. Соотношение $A_{260/280}$ свидетельствует о степени загрязнения пробы белками, соотношение $A_{260/230}$ – полисахаридами. Белки и полисахариды, связываясь с РНК, осаждают её, уменьшая общий выход РНК и ингибируя протекание полимеразной цепной реакции (ПЦР) [32, 33]. Анализ соотношений $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ показывает, что меньше всего белков и полисахаридов содержит препарат РНК, экстрагируемый первым методом; высокая степень загрязнения белками и полисахаридами характерна для образцов РНК, экстрагированных третьим методом. В связи с этим можно отметить преимущество первого метода – отсутствие непосредственного контакта фенола с растительным материалом, что позволяет повысить качественный выход продукта. Количественная оценка показала, что наибольший выход РНК получен при использовании реагента TRIzol™.

Следующий способ оценки качества РНК – проведение количественной ПЦР с кДНК в различных кратностях разбавления [38]. Степень ингибирования ПЦР показана на графиках (рис. 2), значения пороговых циклов представлены в табл. 2.

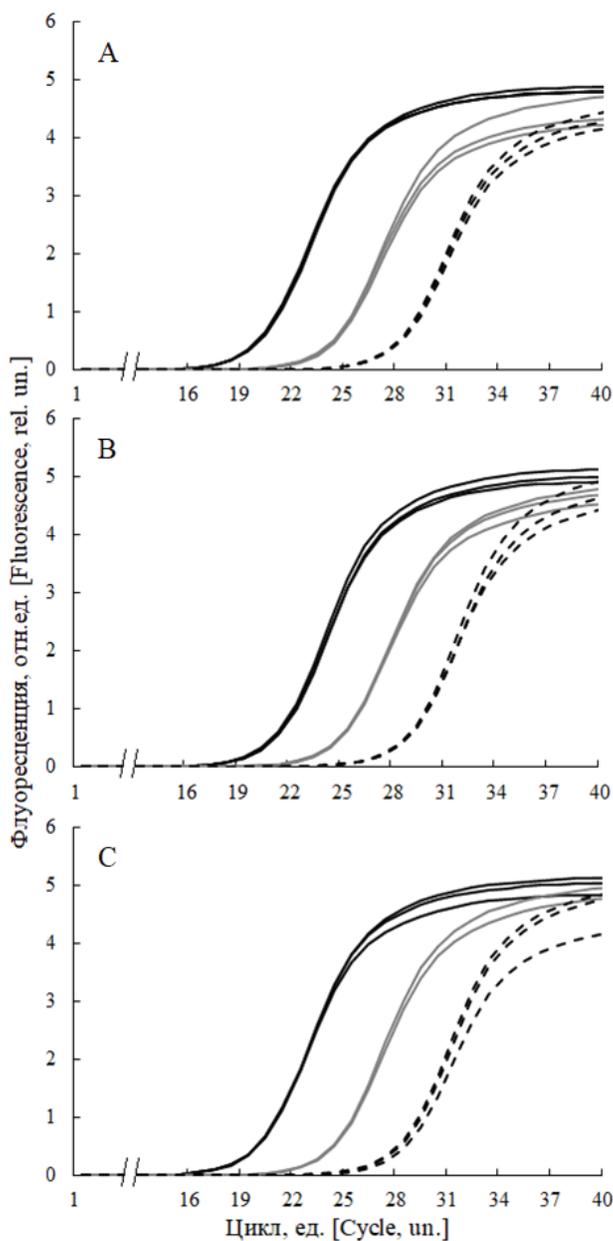


Рис. 2. Кривая флуоресценции: *A* – метод Manickavelu et al.; *B* – RNeasy® Plant Mini Kit (RLT); *C* – реагент TRIzol™; чёрной линией обозначена цельная концентрация; пунктирной – разведение в 10 раз; серой – разведение в 100 раз
[Fig. 2. Fluorescence curve: *A* - method of Manickavelu et al.; *B* - RNeasy® Plant Mini Kit (RLT); *C* - TRIzol™ reagent; the black line indicates the native concentration; dashed line is 10-fold dilution; gray line is 100-fold dilution]

Точка подъёма кривой флуоресценции от оси X является началом стадии экспоненциального роста, данное значение на оси абсцисс называют пороговым циклом (C_q); ось ординат отображает уровень флуоресценции, превышающий фоновую для данного прибора и отображающий накопление двухцепочечных структур (N). Начальное количество матрицы (N_0) соответствовало цельной концентрации, для которой определены C_{q1} , значения порогового цикла для кДНК и при разбавлении в 10 (C_{q2}) и 100 (C_{q3}) раз представлены ниже (см. табл. 2).

$$N = N_0 \times 2^{C_q} \quad (1)$$

Деление N_0 на 10 соответствует разведению концентрации, следовательно, N_0 необходимо умножить на 10 или на 2 в степени 3,3:

$$N = \frac{N_0}{10} \times 2^{C_q+3,3} \quad (2)$$

Основываясь на теоретических расчётах, разведение начальной концентрации матрицы кДНК в 10 раз приводит к смещению порогового цикла в норме на 3,3. Наши эмпирические данные (разница (Δ) между пороговыми циклами) продемонстрированы в табл. 2.

Таблица 2 [Table 2]

Влияние кратности разведения на величину порогового цикла амплификации
[The effect of multiple dilutions on quantitative cycle value]

Методы [Methods]	C_{q1}	C_{q2}	C_{q3}	Разница (Δ) между пороговыми циклами [The difference (Δ) between quantification cycles]	
				$\Delta_{C_{q1}-C_{q2}}$	$\Delta_{C_{q2}-C_{q3}}$
Manickavelu et al.	18,29±0,05	22,61±0,1	26,43±0,08	4,32	3,82
RNeasy® Plant Mini Kit	19,43±0,09	23,21±0,03	27,06±0,07	3,78	3,85
Trizol™	18,18±0,02	22,58±0,05	26,34±0,11	4,4	3,76

Примечание. Пороговый или количественный цикл обозначается C_q или C_t . Индексы указывают на степень разведения кДНК: (1) – без разведения, (2) – 10-кратное, (3) – 100-кратное.

[Note. Threshold or quantification cycle is denoted by C_q or C_t . Indexes indicate the degree of cDNA dilution: (1) - without dilution, (2) - 10-fold, (3) - 100-fold].

Отклонение в различии между пороговыми циклами от значения 3,3 свидетельствует о нарушении прохождения ПЦР и, следовательно, присутствии дополнительных соединений, влияющих на протекание реакции. Чем выше концентрация кДНК, используемая в ПЦР, тем больше ингибитора присутствует в реакционной смеси, поэтому при последующих разведениях подавление полимеразной цепной реакции снижалось.

Различия между пороговыми циклами для препарата РНК, полученного коммерческим набором RNeasy® Plant Mini Kit, в меньшей степени отклоня-

лись от значения 3,3 при разведении кДНК, следовательно, экстрагируемая РНК имела меньше примесей в растворе. Образцы, полученные двумя другими методами, характеризовались значительным отклонением от $\Delta_{Cq1-Cq2}$, что свидетельствует о присутствии в образцах остатков реагентов – фенола или солей.

Таким образом, метод Manickavelu et al. позволяет получить препарат РНК из растений картофеля с самой высокой степенью чистоты (по соотношениям $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$), но относительно низким количественным выходом (в среднем 220 мкг из 1 г растительной ткани). Применение реагента TRIzol™ способствовало экстракции большого количества РНК (в среднем, 450 мкг из 1 г растительной ткани), однако значительно уступало по степени очистки другими методами. Качество и количество нуклеиновой кислоты, экстрагируемой коммерческим набором RNeasy® Plant Mini Kit, определялось используемым буфером (RLT или RLC), средний выход РНК из 1 г растительной ткани составлял 340 мкг.

Заключение

Проведено сравнение эффективности экстракции РНК из листьев картофеля тремя методами, основываясь на качественных и количественных характеристиках полученного препарата РНК. Методы, требующие самостоятельного приготовления реактивов, отличались времязатратностью и значительным риском контаминации, но являлись экономически эффективными. Показано, что применение метода с использованием реагента TRIzol™ нуждается в дополнительных способах очистки РНК от примесей, которые изменяют соотношения $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ для препарата РНК и негативно влияют на протекание ПЦР РВ. Использование колонок коммерческого набора RNeasy® Plant Mini Kit значительно сокращает время экстракции РНК и способствует наиболее оптимальному протеканию реакции амплификации, однако не подходит для экстракции короткоразмерных мРНК. Производитель Qiagen предусмотрел отдельные наборы для экстракции РНК длиной менее 200 нуклеотидов, например MiRNeasy Mini Kit. Метод, описанный Manickavelu et al., с модификациями, несмотря на его продолжительность, позволяет снизить степень загрязнения препарата РНК белками и полисахаридами, а также визуализировать малые РНК в агарозном геле, что свидетельствует о щадящем воздействии реактивов на препарат РНК, позволяющем сохранить целостность молекул, или об осуществлении более полной экстракции. Однако для данного метода требуется дополнительная очистка от составляющих буфера и / или других реагентов, участвующих в экстракции, чтобы исключить ингибирование ПЦР РВ.

Литература

1. Morange M. A new revolution? The place of systems biology and synthetic biology in the history of biology // The European Molecular Biology Organization reports. 2010. № 10. PP. S50–S53. doi: 10.1038 / embor.2009.156

2. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов ; под ред. Д.В. Ребрикова. 3-е изд. М. : Бином. Лаборатория знаний, 2011. 223 с.
3. Wallace D.M. Precipitation of nucleic acids // *Methods in enzymology*. 1987. № 152. PP. 41–48. doi: [10.1016/0076-6879\(87\)52008-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)52008-0)
4. Swift G.H., Peyton M.J., MacDonald R.J. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA // *Biotechniques*. 2000. № 28(3). PP. 524–531. doi: [10.2144/00283rr01](https://doi.org/10.2144/00283rr01)
5. Imbeaud S., Graudens E., Boulanger V., Barlet X., Zaborski P., Eveno E., Mueller O., Schroeder A., Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces // *Nucleic acids research*. 2005. № 33(6). PP. e56–e56. doi: [10.1093/nar/gni054](https://doi.org/10.1093/nar/gni054)
6. Simone F., Michael W.P. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance // *Molecular Aspects of Medicine*. 2006. № 27(2–3). PP. 126–139. doi: [10.1016/j.mam.2005.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003)
7. Pérez-Novo C.A., Claeys C., Speleman F., Van Cauwenberge P., Bachert C., Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability // *Biotechniques*. 2005. № 39 (1). PP. 52–56. doi: [10.2144/05391BM05](https://doi.org/10.2144/05391BM05)
8. Bustin S., Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular // *European Journal of Clinical Investigation*. 2017. № 10 (47). PP. 756–774. doi: [10.1111/eci.12801](https://doi.org/10.1111/eci.12801)
9. Bustin S., Benes V., Garson J., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M., Shipley G., Vandesompele J., Wittwer C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR Experiments // *Clinical Chemistry*. 2009. № 55 (4). PP. 611–622. doi: [10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797)
10. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., John R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal // *J. Appl Microbiol*. 2012. №113. PP. 1014–1026. doi: [10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x)
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal Biochem*. 1987. № 162(1). PP. 156–159. doi: [10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
12. TRIzol™ reagent user guide. In: *Thermo Fisher Scientific*. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf (accessed: 16.03.2020).
13. Manickavelu A., Kambara K., Mishina K., Koba T. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007. № 54. PP. 254–258. doi: [10.1016/j.colsurfb.2006.10.024](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.024)
14. Mazzara M., James D.J. The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa duch.*) tissue // *Mol Biotechnol*. 2000. № 15. PP. 237–241. doi: [10.1385/MB:15:3:237](https://doi.org/10.1385/MB:15:3:237)
15. Liu L., Han R., Yu N., Zhang W., Xing L., Xie D., Peng D. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense* // *PLoS ONE*. 2018. № 13(5). P. e0196592. doi: [10.1371/journal.pone.0196592](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196592)
16. Yaffe H., Buxdorf K., Shapira I., Ein-Gedi S., Zvi M.M.-B., Fridman E., Moshelion M., Levy M. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues // *BMC research notes*. 2012. № 5. P. 45. doi: [10.1186/1756-0500-5-45](https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-45)
17. Yang Y., Moore M.J., Brockington S.F., Timoneda A., Feng T., Marx H.E., Walker J.F., Smith S.A. An efficient field and laboratory workflow for plant phylotranscriptomic projects // *Applications in plant sciences*. 2017. № 5 (3). P. 1600128. doi: [10.3732/apps.1600128](https://doi.org/10.3732/apps.1600128)
18. Pearson J.D., Trcka D., Hyduk S.J., Aynaud M.-M., Hernández J.J., Peidis F., Lu S., Chan K., Woodgett J., Mazzulli T., Attisano L., Pelletier L., Cybulsky M.I., Wrana J.L.,

- Bremner R. Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct detection methods // BioRxiv. 2020. Preprint. doi:10.1101/2020.05.12.092387
19. Pritchard C., Cheng H., Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations // Nature Reviews Genetics. 2012. № 13. PP. 358–369. doi: 10.1038/nrg3198
 20. Castoldi M., Benes V., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. MiChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes // Methods. 2007. № 43 (2). PP. 146–152. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.04.009
 21. Podolska A., Kaczkowski B., Litman T., Fredholm M., Cirera S. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results // Acta Biochimica Polonica. 2011. № 58 (4). PP. 535–540. doi:10.18388/abp.2011_2221
 22. Accerbi M., Schmidt S.A., De Paoli E., Park S., Jeong D.H., Green P.J. Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species // Methods in Molecular Biology. 2010. № 592. PP. 31–50. doi: 10.1007/978-1-60327-005-2_3
 23. Häntzsch M., Tolios A., Beutner F., Nagel D., Thiery J., Teupser D., Holdt L.M. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles // PLOS ONE. 2014. № 9 (12). P. e113298. doi: 10.1371/journal.pone.0113298
 24. Luypaert G., Witters J., Van Huylenbroeck J., De Clercq P., De Riek J., De Keyser E. Induced expression of selected plant defence related genes in pot azalea, *Rhododendron simsii* hybrid // Euphytica. 2017. № 213(10). P. 227. doi: 10.1007/s10681-017-2010-5
 25. Abdel-Latif A., Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize // Plant Methods. 2017. № 13(1). P. 1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4
 26. Fasiludeen N., Narayanannair A., Appukuttannair G., Kalluvettankuzhy K.S. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols // Analytical Biochemistry. 2015. № 485. PP. 25–27. doi: 10.1016/j.ab.2015.05.017
 27. Ranatunge I., Adikary S., Dasanayake P., Fernando C.D., Soysa P. Development of a rapid and simple method to remove polyphenols from plant extracts // International Journal of Analytical Chemistry. 2017. № 2017. PP. 1–7. doi: 10.1155/2017/7230145
 28. Gupta P., Salava H., Sreelakshmi Y., Sharma R. A low-cost high-throughput method for plant genomic DNA isolation // Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, 2020. Vol. 2072. PP. 1–7. doi: 10.1007/978-1-4939-9865-4_1
 29. Zlobin I.E., Pashkovskiy P.P., Kartashov A.V., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Kuznetsov V.V. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells // Environmental and Experimental Botany. 2020. Vol. 176. P. 104104. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104104
 30. Quick-Start Protocol RNeasy® Plant Mini Kit. In: QIAGEN. URL: <https://www.qiagen.com/jp/> (accessed: 16.03.2020).
 31. Primer-BLAST // NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (accessed: 16.03.2020).
 32. Shu C., Sun S., Chen J., Zhou E. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani* // Electronic Journal of Biotechnology. 2014. № 17. PP. 50–54. doi: 10.1016/j.ejbt.2013.12.009
 33. Prasanta K.D. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*) // 3 Biotech. 2013. № 3 (2). PP. 109–114. doi: 10.1007/s13205-013-0171-z
 34. Aranda P.S., LaJoie D.M., Jorcyk C.L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality // Electrophoresis. 2012. № 33 (2). PP. 366–369. doi: 10.1002/elps.201100335
 35. De Keyser E., Desmet L., Losschaert M., De Riek J. A General protocol for accurate gene expression analysis in plants // Quantitative Real-Time PCR. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, 2020. Vol. 2065. doi: 10.1007/978-1-4939-9833-3_9

36. Japelaghi R.H., Haddad R., Garoosi G. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides // *Mol Biotechnol.* 2011. № 49. PP. 129–137. doi: [10.1007/s12033-011-9384-8](https://doi.org/10.1007/s12033-011-9384-8)
37. Die J.V., Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies // *Journal of Experimental Botany.* 2012. № 63(17). PP. 6069–6077. doi: [10.1093/jxb/ers276](https://doi.org/10.1093/jxb/ers276)
38. Wieczorek D., Delauriere L., Schagat T. Methods of RNA quality assessment. In: *Promega corporation web site.* URL: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment> (accessed: 16.03.2020)

*Поступила в редакцию 04.04.2020 г.; повторно 12.07.2020 г.; 14.08.2020 г.
принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.*

Авторский коллектив:

Мурган Ольга Константиновна – аспирант кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7535-0441>

E-mail: reborn_rinni@mail.ru

Казакова Анна Дмитриевна – студентка кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Ефимова Марина Васильевна – канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: stevmv555@gmail.com

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9703-9304>

Для цитирования: Мурган О.К., Казакова А.Д., Ефимова М.В. Сравнение методов экстракции РНК из растения картофеля для проведения ПЦР в реальном времени // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология.* 2020. № 51. С. 123–140. doi: [10.17223/19988591/51/7](https://doi.org/10.17223/19988591/51/7)

For citation: Murgan OK, Kazakova AD, Efimova MV. Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2020;51:123-140. doi: [10.17223/19988591/51/7](https://doi.org/10.17223/19988591/51/7) In Russian, English Summary

Olga K. Murgan, Anna D. Kazakova, Marina V. Efimova

Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

**Comparison of methods for RNA extraction
from potato plants for real-time PCR**

Molecular methods allow solving both fundamental and applied problems of biology. The use of these methods makes it possible to determine not only the systematic position of the organism, but also to reveal the differential expression of certain groups of genes in response to the action of regulatory factors. RNA extraction involves the following main stages: cell lysis (destruction), deproteinization and RNA purification. The main methods for their implementation were described in 1987, and in 2009 the minimum requirements for publishing the results of real-time PCR (RT-PCR) - MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time Experiments) were developed. There are requirements for RNA samples and DNA – allowable presence of protein and polysaccharide contaminants, concentration and integrity of the nucleic acid sample.

Nucleic acid extraction is a major step in molecular biology. Currently, a large number

of protocols and guidelines for the extraction of RNA and DNA from different groups of organisms are described. Among the methodological articles devoted to molecular research in the field of plant physiology, interest is mainly focused on methods for the extraction of total RNA using phenol in a buffer with a low pH value (for example, TRIzol™ and Tri Reagent® reagents (Invitrogen, USA)), chloride lithium and / or sodium chloride, as well as silicon dioxide (including columns for centrifugation from companies such as Qiagen (Germany), Norgen Biotek (Canada) and Invitrogen (USA)).

The complexity due to extraction is directly determined by the general chemical composition of the plant. There are no universal methodological recommendations for each type of plant; therefore, researchers are forced to carry out comparative analysis of extraction methods based on their own research objects and, if necessary, carry out stage modifications aimed at improving the quality of the nucleic acid preparations released, since their purity depends on the correctness and reliability of the results of molecular studies and their practical applications. The high content of polysaccharides in plants complicates the isolation and purification of total RNA. Their excessive content in RNA disrupts the optimal real-time PCR and can lead to an erroneous assessment of the level of expression of target genes. There is a need to assess the quality of the obtained nucleic acid preparation for the test samples due to the low repeatability of the experiments. Regarding potato plants, there is currently no standard method for extracting nucleic acids. At the same time, potato, being one of the important objects of study, is characterized by a high content of polysaccharides, which complicates the extraction of high-quality RNA from potato tissues. In this connection, for the first time, we compared the effectiveness of the three methods of RNA extraction from the leaves of potato plants with the aim of subsequent real-time PCR in accordance with the recommendations of MIQE. The first method is based on the use of a surfactant - SDS and a monovalent metal salt - lithium chloride to inhibit the activity of RNase. This method was described by Manickavelu et al. in 2007 and modified by a team of scientists from the Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences in 2020. The second is based on the mechanism of binding nucleic acids with silica gel membrane in commercial columns RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) in the presence of chaotropic. The third is based on using the TRIzol™ reagent in which phenol with a strong oxidizing agent - guanidine thiocyanate is included in the extraction buffer and act as a lysing agent and an RNase inhibitor.

To assess the quality of total RNA, the following was used: (1) agarose gel electrophoresis, which demonstrates the integrity of RNA; (2) measuring the concentration of RNA and evaluating the ratios ($A_{260/280}$ and $A_{260/230}$) with a spectrophotometer, which indicates the RNA yield and the degree of purification of the sample from proteins and polysaccharides; and (3) real-time PCR using the ten-fold dilution method to detect the presence of additional compounds in RNA samples that affect the functioning of the enzymes and as a consequence, the efficiency of the reaction.

In the process of choosing the method of RNA extraction, it is important to take into account not only the chemical composition of the reagents, but also the requirements for the method, such as the quantitative yield of the obtained RNA, duration of extraction, throughput, or quality of the final reaction product.

Methods requiring self-preparation of reagents, the first (Manickavelu et al.) and the third methods (using the TRIzol™ reagent), were time consuming and had a significant risk of contamination, but were more cost effective. In addition, they were distinguished by the need to use phenol, which forms stable complexes with nucleic acids as a result of the oxidation reaction. These compounds can lead to darkening of the sample, reduce the total quantitative yield of RNA and inhibit key enzymes for real-time PCR.

During our research, we demonstrated that the use of the TRIzol™ reagent needs additional steps for RNA purifying from impurities, which negatively affects the ratios $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ for the RNA (See Table 1) and optimal real-time PCR (See Table 2 and Fig. 2). The use of the commercial RNeasy® Plant Mini Kit spin-columns significantly reduces the time of RNA extraction and contributes to the most optimal amplification reaction (See Table 2 and Fig. 2), but is not suitable for the extraction of short-sized mRNAs. The Manickavelu's method, despite its duration, allows to reduce the degree of contamination of the RNA with proteins and polysaccharides (See Table 1), as well as visualizes small RNAs in an agarose gel (See Fig. 1), which indicates the sparing effect of the reagents on the RNA and allows to preserve the integrity of the molecules or a more complete extraction. However, this method requires additional purification from the components of the buffer and/or other reagents involved in the extraction in order to exclude inhibition of real-time PCR.

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

Key words: *Solanum tuberosum* L.; RNA; phenol; electrophoresis; nanospectrophotometer; Real-time PCR.

Funding: This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No 20-34-90094).

References

1. Morange M. A new revolution? The place of systems biology and synthetic biology in the history of biology. *EMBO reports*. 2010;10:S50-S53. doi: [10.1038/embor.2009.156](https://doi.org/10.1038/embor.2009.156)
2. Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DYu, Semenov PA, Savilova AM, Kofiadi IA, Abramov DD. PTsR v real'nom vremeni [Real-time PCR. 3rd ed.]. Rebrikova DV, editor. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy Publ.; 2011. 223 p. In Russian
3. Wallace DM. Precipitation of nucleic acids. *Methods in Enzymology*. 1987;152:41-48. doi: [10.1016/0076-6879\(87\)52008-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)52008-0)
4. Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques*. 2000;28(3):524-531. doi: [10.2144/00283rr01](https://doi.org/10.2144/00283rr01)
5. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(6):e56-e56. doi: [10.1093/nar/gni054](https://doi.org/10.1093/nar/gni054)
6. Simone F, Michael WP. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):126-139. doi: [10.1016/j.mam.2005.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003)
7. Pérez-Novo CA, Claeys C, Speleman F, Van Cauwenberge P, Bachert C, Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques*. 2005;39(1):52-56. doi: [10.2144/05391BM05](https://doi.org/10.2144/05391BM05)
8. Bustin S, Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular. *Eur J Clin Invest*. 2017;10(47):756-774. doi: [10.1111/eci.12801](https://doi.org/10.1111/eci.12801)
9. Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M, Shipley G, Vandesompele J, Wittwer C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611-622. doi: [10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797)
10. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johnes R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113:1014-1026. doi: [10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x)

11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159. doi: [10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
12. *TRIzol™ reagent user guide*. In: *Thermo Fisher Scientific*. Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf (accessed 16.03.2020).
13. Manickavelu A, Kambara K, Mishina K, Koba T. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2007;54:254-258. doi: [10.1016/j.colsurfb.2006.10.024](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.024)
14. Mazzara, M, James, DJ. The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa duch.*) tissue. *Mol Biotechnol.* 2000;15:237-241. doi: [10.1385/MB:15:3:237](https://doi.org/10.1385/MB:15:3:237)
15. Liu L, Han R, Yu N, Zhang W, Xing L, Xie D, Peng D. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium Huoshanense*. *PLoS ONE.* 2018;13(5):e0196592. doi: [10.1371/journal.pone.0196592](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196592)
16. Yaffe H, Buxdorf K, Shapira I, Ein-Gedi S, Zvi MMB, Fridman E, Moshelion M, Levy M. LogSpin: A simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Research Notes.* 2012;5:45. doi: [10.1186/1756-0500-5-45](https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-45)
17. Yang Y, Moore MJ, Brockington SF, Timoneda A, Feng T, Marx HE, Walker JF, Smith SA. An efficient field and laboratory workflow for plant phylotranscriptomic projects. *Applications in Plant Sciences.* 2017;5(3):1600128. doi: [10.3732/apps.1600128](https://doi.org/10.3732/apps.1600128)
18. Pearson JD, Trcka D, Hyduk SJ, Aynaud MM, Hernández JJ, Peidis F, Lu S, Chan K, Woodgett J, Mazzulli T, Attisano L, Pelletier L, Cybulsky MI, Wrana JL, Bremner R. Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct detection methods. *BioRxiv.* 2020;Preprint. doi: [10.1101/2020.05.12.092387](https://doi.org/10.1101/2020.05.12.092387)
19. Pritchard C, Cheng H, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13:358-369. doi: [10.1038/nrg3198](https://doi.org/10.1038/nrg3198)
20. Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. MiChip: A microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods.* 2007;43(2):146-152. doi: [10.1016/j.ymeth.2007.04.009](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.04.009)
21. Podolska A, Kaczkowski B, Litman T, Fredholm M, Cirera S. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta Biochimica Polonica.* 2011;58(4):535-540. doi: [10.18388/abp.2011_2221](https://doi.org/10.18388/abp.2011_2221)
22. Accerbi M, Schmidt SA, De Paoli E, Park S, Jeong DH, Green PJ. Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. *Methods in Molecular Biology.* 2010;592:31-50. doi: [10.1007/978-1-60327-005-2_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-005-2_3)
23. Häntzsch M, Tolios A, Beutner F, Nagel D, Thiery J, Teupser D, Holdt LM. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and miRNA profiles. *PLOS ONE.* 2014;9(12):e113298. doi: [10.1371/journal.pone.0113298](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113298)
24. Luybaert G, Witters J, Van Huylbroeck J, De Clercq P, De Riek J, De Keyser E. Induced expression of selected plant defence related genes in pot azalea, *Rhododendron simsii* hybrid. *Euphytica.* 2017;213(10):227. doi: [10.1007/s10681-017-2010-5](https://doi.org/10.1007/s10681-017-2010-5)
25. Abdel-Latif A, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods.* 2017;13(1):1. doi: [10.1186/s13007-016-0152-4](https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4)
26. Fasiludeen N, Narayanannair A, Appukuttannair G, Kalluvettankuzhy KS. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols. *Analytical Biochemistry.* 2015;485:25-27. doi: [10.1016/j.ab.2015.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.017)
27. Ranatunge I, Adikary S, Dasanayake P, Fernando CD, Soysa P. Development of a rapid and simple method to remove polyphenols from plant extracts. *Analytical Chemistry.* 2017;2017:1-7. doi: [10.1155/2017/7230145](https://doi.org/10.1155/2017/7230145)

28. Gupta P, Salava H, Sreelakshmi Y, Sharma R. A Low-cost high-throughput method for plant genomic DNA isolation. In: *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology*. Vol. 2072. Vaschetto LM, editor. New York: Humana Publ.; 2020. pp. 1-7. doi: [10.1007/978-1-4939-9865-4_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9865-4_1)
29. Zlobin IE, Pashkovskiy PP, Kartashov AV, Nosov AV, Fomenkov AA, Kuznetsov VV. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells. *Environmental and Experimental Botany*. 2020;176:104104. doi: [10.1016/j.envexpbot.2020.104104](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104104)
30. *Quick-start protocol RNeasy® Plant Mini Kit*. In: *QIAGEN*. Available at: <https://www.qiagen.com/jp/> (accessed 16.03.2020).
31. Primer-BLAST. In: *NCBI*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (accessed 16.03.2020).
32. Shu C, Sun S, Chen J, Zhou E. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. *Electron J Biotechnology*. 2014;17:50-54. doi: [10.1016/j.ejbt.2013.12.009](https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.009)
33. Prasanta KD. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). *3 Biotech*. 2013;3(2):109-114. doi: [10.1007/s13205-013-0171-z](https://doi.org/10.1007/s13205-013-0171-z)
34. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 2012;33(2):366-369. doi: [10.1002/elps.201100335](https://doi.org/10.1002/elps.201100335)
35. De Keyser E, Desmet L, Losschaert M, De Riek J. A General protocol for accurate gene expression analysis in plants. In: *Quantitative Real-Time PCR. Methods in Molecular Biology*. Vol. 2065. Biassoni R and Raso A, editors. New York: Humana Publ.; 2020. pp. 105-118. doi: [10.1007/978-1-4939-9833-3_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_9)
36. Japelaghi RH, Haddad R, Garoosi G. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Mol Biotechnol*. 2011;49:129-137. doi: [10.1007/s12033-011-9384-8](https://doi.org/10.1007/s12033-011-9384-8)
37. Die JV, Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *Experimental Botany*. 2012;63(17):6069-6077. doi: [10.1093/jxb/ers276](https://doi.org/10.1093/jxb/ers276)
38. Wieczorek D, Delauriere L, Schagat T. Methods of RNA quality assessment. In: *Promega Corporation Web site*. Available at: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment> (accessed 16.03.2020)

Received 04 April 2020; Revised 12 July 2020 and 14 August 2020;

Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:

Murgan Olga K, Post-graduate Student, Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7535-0441>

E-mail: reborn_rinni@mail.ru

Kazakova Anna D, Student, Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Efimova Marina V, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9703-9304>

E-mail: stevmv555@gmail.com

ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.5

doi: 10.17223/19988591/51/8

Р.Х. Гиниятуллин¹, З.Б. Бактыбаева²

¹ Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Россия

² Уфимский научно-исследовательский институт медицины
труда и экологии человека, г. Уфа, Россия

Особенности накопления Cd и Ni лиственницей Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях техногенеза

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки
России № 075-00326-19-00 по теме АААА-А18-118022190102-3.

Часть результатов получена с использованием оборудования
Регионального центра коллективного пользования «Агидель».

*Изучены особенности накопления и распределения тяжелых металлов (кадмия и никеля) в надземных и подземных органах лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях Стерлитамакского промышленного центра. Проведена сравнительная оценка относительного жизненного состояния санитарно-защитных лиственничных лесонасаждений, расположенных в непосредственной близости от промышленной зоны города и в зоне условного контроля. Выявлено, что повышение концентрации металлов в почве приводит к увеличению их содержания в хвое, ветвях и корневой системе деревьев. В подземной части никель в основном аккумулируется поглощающими корнями, кадмий – поглощающими и полускелетными. В надземной части концентрация металлов в ветвях выше, чем в хвое. В то же время у здоровых деревьев сохранена барьерная функция корневой системы, препятствующая избыточному поступлению поллютантов в надземные органы, у ослабленных деревьев барьерная функция снижена. Изучение корненасыщенности почвенного покрова показало, что в зоне условного контроля на глубине 0–20 см масса поглощающих корней достигает $78,51 \pm 4,10$ г/м². В зоне влияния Стерлитамакского промышленного центра с повышением уровня тяжелых металлов в грунте происходит снижение доли поглощающих корней: у здоровых деревьев в 2 раза, у ослабленных – в 2–3 раза. На загрязненном участке наблюдаются внешние признаки угнетения деревьев: уменьшение густоты кроны на 20–25%, увеличение количества мертвых ветвей до 25–30%, поражение ассимиляционного аппарата хлорозами и некрозами до 15%. Деревья, относящиеся к категории «ослабленные», составляют 55% древостоя, а сухостой достигает 10%.*

Ключевые слова: тяжелые металлы; санитарно-защитные лесонасаждения; относительное жизненное состояние древостоя; корненасыщенность почвы; Стерлитамакский промышленный центр; Предуралье.

Введение

Среди загрязнителей промышленно развитых территорий особую опасность представляют тяжелые металлы (ТМ), так как в отличие от органических веществ они не подвергаются процессам разложения и легко переходят из одной среды в другую [1]. В составе выбросов ТМ способны рассеиваться на десятки километров и затем оседать, загрязняя почвенный покров. Дальнейшая миграция и перераспределение поллютантов в компонентах экосистем зависят от многих природных факторов, а также от интенсивности техногенеза. С повышением концентрации тяжелые металлы становятся токсичными для живых организмов [2, 3].

Одним из эффективных способов оздоровления окружающей среды загрязненных территорий является создание санитарно-защитных лесонасаждений, которые способствуют осаждению аэрополлютантов, а также поглощению токсикантов из почвы. Однако выполнение в течение длительного времени функции фитофильтра негативно сказывается на жизненном состоянии самих деревьев, вследствие чего могут наблюдаться такие явления, как замедление их роста и развития, преждевременное частичное усыхание, а также общее ослабление всего древостоя [4–7]. Результаты исследований по изучению поглощательной способности разных видов древесных растений и их реакции на действие ТМ позволяют выявлять перспективные виды-фиторе медиаторы [8–12], а также прогнозировать устойчивость лесных насаждений и проектировать лесохозяйственные мероприятия [13–16].

На территории Республики Башкортостан во второй половине XX столетия при формировании санитарно-защитных зон вокруг городов широко применялась лиственница Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) [17, 18]. Популярность данного представителя семейства Pinaceae Lindl. связана с такими характеристиками, как быстрый рост и морозоустойчивость. В то же время адаптационные возможности вида к повышенному содержанию ТМ в окружающей среде остаются малоизученными. Недостаточно сведений и по аккумуляции металлов в различных органах лиственницы Сукачева.

Цель данного исследования – выявить особенности накопления и распределения тяжелых металлов (Cd и Ni) лиственницей Сукачева и оценить относительное жизненное состояние древостоя в условиях Стерлитамакского промышленного центра.

Материалы и методики исследования

Район исследования расположен на стыке Предбельского лесостепного и Предуральского степного района. Средняя годовая температура воздуха составляет 3,2 °С, среднее годовое количество осадков – 498,9 мм. Преимущественное направление ветра – южное (35%). Почвообразующими породами служат делювиальные и аллювиально-делювиальные отложения. В почвенном покрове преобладают черноземы типичные и выщелоченные [19, 20].

Город Стерлитамак (53°38'00"N, 55°57'00"E) характеризуется относительно высокой техногенной нагрузкой, свойственной территориям с развитой химической и нефтеперерабатывающей промышленностью. Крупные производственные объекты сосредоточены в северной части города. На сегодняшний день загрязнение атмосферного воздуха и почвенного покрова в Стерлитамаке, в первую очередь, связано с работой таких предприятий, как «Башкирская содовая компания», «Синтез-Каучук», «Стерлитамакский нефтехимический завод», «ХайдельбергЦементРус». Кроме того, вклад в загрязнение компонентов окружающей среды вносят предприятия машиностроения, электроэнергетики и автотранспорта. За последние 20 лет общий объем валовых выбросов по городу варьировал в пределах 54–119 тыс. тон в год. При этом наиболее высокие показатели (более 100 тыс. т в год) приходились на 2000 г. и период с 2006 по 2011 г. Начиная с 2012 г. наблюдается постепенное снижение объема валовых выбросов. Несмотря на это, плотность выбросов загрязняющих веществ от стационарных и передвижных источников на территории Стерлитамака остается самой высокой среди городов республики и в 2018 г. составила 5,63 т в расчете на 1 га. Количество твердых загрязняющих веществ, выброшенных в атмосферу, составило 1,88 тыс. т/год [21]. Специфика производственных процессов обуславливает высокое содержание в выбросах оксида кальция (до 0,56 тыс. т/год) и неорганической пыли (до 0,50 тыс. т/год). Периодически регистрируются превышения предельно допустимых концентраций в 3–4 раза по бенз(а)пирену, формальдегиду, этилбензолу, аммиаку, сероводороду, ксилолам, взвешенным веществам; в 2–3 раза – по хлориду водорода, оксиду углерода, оксиду азота, диоксиду азота, диоксиду серы, фенолу. Как известно, в результате функционирования предприятий нефтехимической отрасли в воздушный бассейн поступает более 200 специфических поллютантов, среди которых особо опасными считаются канцерогены. К их числу относятся в том числе кадмий и никель [22]. Согласно санитарно-гигиеническому мониторингу, многолетние показатели концентрации никеля в атмосферном воздухе г. Стерлитамак находятся в пределах нормы. Кадмий не входит в перечень определяемых загрязнителей. В почвенном покрове на территории города валовые формы никеля, кадмия, свинца, меди и цинка превышают фоновые концентрации в 1,2–2,5 раза [23].

Санитарно-защитные полосы с участием лиственницы Сукачева расположены в северной и южной части города. При создании лиственничных культур использован однородный в генетическом отношении посадочный материал из питомника. Исследования проведены в 2007–2018 гг. на двух постоянных пробных площадях (ППП). Закладка и описание пробных площадей выполнены по общепринятым методикам [24, 25]. ППП заложены на однородных по почвенно-эдафическим условиям участках в одновозрастных (около 55 лет) и чистых по составу древостоях. ППП № 1 размером 20×50 м – в 1–2 км от источников нефтехимического и химического загрязнения Стерлитамакского промышленного центра (рис. 1). Общая длина санитарно-за-

щитного лиственничного лесонасаждения – 500 м, ширина – 30 м. ППП № 2 размером 18×50 м – в зоне условного контроля (25 км от промышленной зоны). Общая длина данного санитарно-защитного лесонасаждения – 800 м, ширина – 30 м. Уровень залегания грунтовых вод на исследуемых участках – высокий (1,2 м) [19].

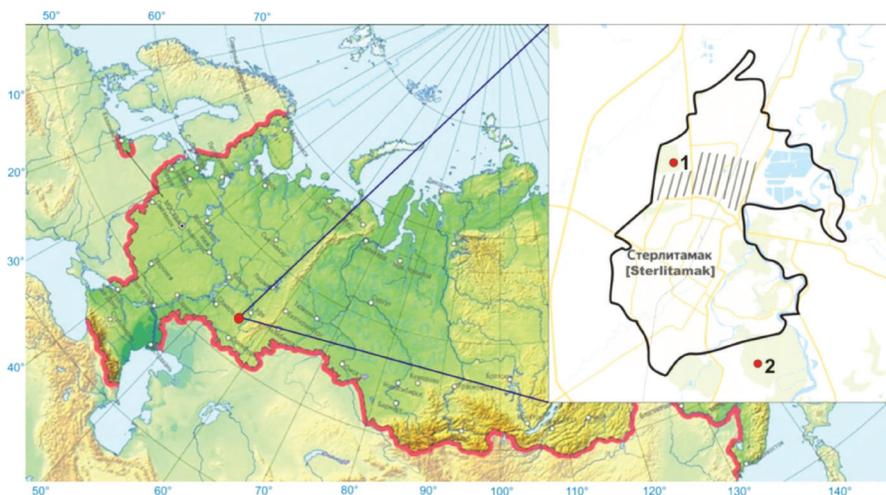


Рис. 1. Местоположение постоянных пробных площадей на территории г. Стерлитамак.

Условные обозначения: 1 – постоянная пробная площадь в условиях промышленного центра; 2 – постоянная пробная площадь в зоне условного контроля;  – промышленная зона

[Fig. 1. Location of permanent trial plots in the city of Sterlitamak.

Legend: 1 - Permanent trial plot in the industrial center; 2 - Permanent trial plot in the area of conditional control;  - Industrial zone]

Для определения лесотаксационных параметров лиственничных насаждений применен метод сплошных перечетов на ППП. В течение 12 лет в эксперименте задействовали по 110 модельных экземпляров на участок. У каждой лиственницы измеряли высоту с помощью высотомера «Haglof Electronic Clinometer» (Швеция), а также диаметр ствола на высоте 1,3 м. Средний диаметр элемента леса определяли через среднюю площадь сечения: сумма площадей сечений модельных экземпляров поделена на их общее количество. Средняя высота древостоя установлена по графику высот для среднего диаметра. График высот построен на основании замеров у 20 деревьев. Краткая таксационная характеристика изученных насаждений представлена в табл. 1.

Относительное жизненное состояние деревьев определяли по методике В.А. Алексева [26], согласно которой проведена визуальная оценка таких диагностических признаков как густота кроны (в % от нормальной густоты), наличие на стволе мертвых сучьев (в % от общего количества сучьев на стволе), степень повреждения хвои токсикантами, патогенами и насекомыми.

ми (средняя площадь в % от площади хвой). Категория жизненного состояния отдельного дерева определена по вспомогательной таблице (табл. 2).

Таблица 1 [Table 1]

Краткая таксационная характеристика насаждений лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля
[Brief taxation characteristics of *Larix sukaczewii* Dyl. plantations
in the industrial center and in the area of conditional control] ($M \pm SD$)

Состав [Stand composition]	Класс возраста [Age class]	Диаметр, см [Diameter, cm]	Высота, м [Height, m]	Класс бонитета [Quality class]
В условиях промышленного центра [In the industrial center]				
10Ls	III	17,60±0,4	20,90±0,6	I
В зоне условного контроля [In the area of conditional control]				
10Ls	III	20,80±0,8	23,10±1,0	I

Примечание [Note]: Ls – *Larix sukaczewii*

Таблица 2 [Table 2]

Вспомогательная таблица для определения категорий деревьев (Алексеев, 1990)
[Auxiliary table for determining categories of trees (Aleksseev, 1990)]

Категория дерева [Category]	Диагностические признаки [Diagnostic features]		
	Густота кроны [Crown density], %	Наличие мертвых сучьев [Dry branches], %	Степень повреж- дения листьев [Leaf damage degree], %
Здоровое [Healthy]	86–100	0–15	0–10
Ослабленное [Weakened]	56–85	16–45	11–45
Сильно ослабленное [Strongly weakened]	21–55	46–70	46–65
Отмирающее [Dying]	1–20	71–99	71–100
Сухое [Dead]	0	100	Нет листьев [No leaves]

После суммирования количества деревьев по категориям проведена оценка относительного жизненного состояния всего насаждения по следующей формуле:

$$L_N = \frac{100 \cdot n_1 + 70 \cdot n_2 + 40 \cdot n_3 + 5 \cdot n_4}{N},$$

где L_N – относительное жизненное состояние древостоя, рассчитанное по числу деревьев; n_1 – число здоровых деревьев на пробной площади; n_2 , n_3 , n_4 – то же для ослабленных, сильно ослабленных и отмирающих деревьев соответственно; 100, 70, 40, 5 – коэффициенты, выражающие (в процентах) жизненное состояние здоровых, ослабленных, сильно ослабленных и отмирающих деревьев; N – общее число деревьев на пробной площади (включая сухостой).

При показателе от 100 до 80% древостой оценивался как «здоровый», 79–50% – «ослабленный», 49–20% – «сильно ослабленный», 19% и ниже – «полностью разрушенный».

Исследование насыщенности почвы поглощающими корнями проведено методом монолита [27]. Траншеи (почвенные разрезы) на пробных площадях заложены перпендикулярно направлению роста горизонтальных корней. В связи с тем, что расстояние между рядами деревьев составляло 1,7 м, а между деревьями в ряду 2,0 м, почвенные разрезы расположены на удалении 0,7 м от ствола. Все почвенные разрезы имели одинаковые размеры – 1×1 м. Глубина траншеи – 1 м. В каждой траншее заложено по 10 почвенных монолитов размером 10×10×10 см. Выборка корней при помощи пинцета с последующей отмывкой водой. Дробность фракций: менее 1 мм в диаметре (поглощающие корни), 1–3 мм (полускелетные корни), более 3 мм (скелетные корни). Масса поглощающих корней определена в воздушно-сухом состоянии на электронных лабораторных весах «ВЛТЭ-150» (Россия). Корненасыщенность почвы определена на единицу площади горизонтальной поверхности (г/м²).

Для изучения содержания металлов ежегодно в течение вегетационного сезона (июнь–август) проводили многократный повторный отбор проб хвои, ветвей и корней. Пробы отбирали после пятидневного сухого бездождевого периода. Образцы хвои и ветвей собирали из верхней, средней и нижней части кроны деревьев со стороны источника загрязнения. Далее из точечных проб одного дерева составлялась усредненная проба. Отмывку хвои и веток не проводили [28]. В лабораторных условиях растительные образцы высушивали до воздушно-сухого состояния. В дальнейшем пробы хвои, веток и корней тщательно измельчали в агатовых ступках и с помощью мельницы.

На тех же пробных площадях одновременно с растительными отбирали почвенные пробы с глубины 0–20 см. Вокруг одного дерева пробы отбирали в 5 повторностях – в точках, равноудаленных друг от друга, независимо от сторон света. Далее образцы объединяли путем квартования в одну усредненную пробу. В лабораторных условиях почвенные образцы высушивали до воздушно-сухого состояния, перетирали в фарфоровой ступке и просеивали через капроновое сито с размером ячеек 1 мм.

Пробоподготовка проведена с использованием мокрого озоления в концентрированной HNO₃. Пробы анализировали на содержание Cd и Ni на атомно-абсорбционном спектрометре «ZEEnit-650» (Германия) [29]. В почвенных образцах определяли массовые концентрации валовых и подвижных форм металлов, извлекаемые ацетатно-аммонийным буфером с pH=4,8. Всего проанализировано 648 проб хвои, 648 проб ветвей, 600 проб корней и 360 проб почвы. Кроме того, в почвенных образцах определяли величину pH солевой вытяжки (KCl) потенциометрическим методом.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета программы Microsoft Office Excel. Данные представлены в виде средней арифметической ± стандартное отклонение (M ± SD). Оценка статистической значимости различий проведена согласно *t*-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05.

Результаты исследования и обсуждение

Нарушение химического равновесия в окружающей среде, вызванное избыточным поступлением токсических веществ, со временем отражается на жизненном состоянии древостоев, приводя к их ослаблению и отмиранию. Однако на первых этапах могут проявляться признаки ускоренного старения лишь отдельных систем организма или отдельных экземпляров деревьев.

Таблица 3 [Table 3]

Относительное жизненное состояние насаждений лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля [Relative vital state of *Larix Sukaczewii* Dyl. in the industrial center and in the area of conditional control]

ППП [PTP]	Количество деревьев по категориям на ППП, шт. [Number of trees by category at the PTP, pcs.]						ОЖС насаждения [RVS of plantations]	
	Всего [Total]	Здоровые [Healthy]	Ослабленные [Weakened]	Сильно ослабленные [Strongly weakened]	Отмирающие [Dying]	Сухие [Dead]	L_N , %	Категория [Category]
№ 1	20	6	11	1	0	2	71,50	Ослабленное [Weakened]
№ 2	20	15	4	0	0	1	86,20	Здоровое [Healthy]

Примечание. ППП – постоянная пробная площадь; ОЖС – относительное жизненное состояние; L_N – относительное жизненное состояние древостоя, рассчитанное по числу деревьев; № 1 – в условиях промышленного центра; № 2 – в зоне условного контроля. [Note. PTP - Permanent Trial Plot; RVS - Relative Vital State; L_N - Relative vital state of the stand, calculated by the number of trees; 1 - In the industrial center; 2 - In the area of conditional control].

Изучение относительного жизненного состояния насаждений лиственницы Сукачева показало, что на ППП № 1 растения более ослаблены по сравнению с контрольным участком. Внешние признаки угнетения деревьев выражались в уменьшении густоты кроны на 20–25%, увеличении количества мертвых ветвей до 25–30%, поражении ассимиляционного аппарата хлорозами и некрозами (в среднем на 15%). При этом распространение хлорозов и некрозов хвои у лиственницы Сукачева в условиях влияния промышленного центра происходило однотипно – от кончика к ее основанию. Вышеперечисленные факторы способствовали снижению устойчивости защитных лесных насаждений в промышленной зоне. Деревья, относящиеся к категории «ослабленные», составляли 55% древостоя, сухостой достигал 10%, к категории «здоровые» отнесены 30%. Соответственно, относительное жизненное состояние всего насаждения на ППП № 1 характеризовалось как «ослабленное» ($L_N = 71,50\%$) (табл. 3). В то же время снижения класса бонитета не наблюдалось (см. табл. 1).

На удаленном от промышленных предприятий контрольном участке деревья имели лучше сформированную крону (средняя густота – 82%) и меньшее количество мертвых сучьев на стволе (в среднем 21%). Повреждение хвои хлорозами не превышало 11%. Общее число здоровых лиственниц на ППП № 2 составляло 75%, ослабленных – 20%, сухих – 5%. Показатель L_N , равный 86,20%, характеризовал древостой как «здоровый».

Результаты химического анализа почвенных образцов выявили различия между содержанием рассматриваемых металлов в зоне влияния Стерлитамакского промышленного центра и в зоне условного контроля (табл. 4). Так, на ППП № 1 концентрация валовой формы Cd статистически значимо ($p < 0,01$) выше, чем на ППП № 2, в 4 раза, а содержание валовой формы Ni статистически значимо выше в 5 раз ($p < 0,05$). Обобщение многолетних данных по содержанию подвижных (биологически доступных) форм анализируемых металлов показало, что на ППП № 1 средняя концентрация Cd составляет 0,58 мг/кг, что статистически значимо ($p < 0,01$) выше показателя контрольного участка в 6 раз. Среднее содержание Ni на ППП № 1, равное 9,40 мг/кг, статистически значимо ($p < 0,05$) выше показателя ППП № 2 в 3 раза.

Таблица 4 [Table 4]

**Усредненные концентрации валовых и подвижных форм металлов
в почвенном покрове под насаждениями лиственницы Сукачева
(*Larix sukaczewii* Dyl.)**

[Averaged concentrations of gross and mobile forms of metals in the soil
cover under the stands of *Larix sukaczewii* Dyl.] ($M \pm SD$)

ППП [РТР]	Валовая форма, мг/кг [Gross form, mg / kg]		Подвижная форма, мг/кг [Mobile form, mg / kg]	
	Cd	Ni	Cd	Ni
№ 1	5,04±0,32	108,07±7,40	0,58±0,04	9,40±0,59
№ 2	1,22±0,07*	23,50±2,14**	0,10±0,01*	3,61±0,31**

Примечание. ППП – постоянная пробная площадь; № 1 – в условиях промышленного центра; № 2 – в зоне условного контроля; * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

[Note. РТР - Permanent Trial Plot; № 1 - In the industrial center; № 2 - In the area of conditional control; * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$].

Как известно, ТМ проникают в ткани древесных растений в основном через корневую систему при процессе поглощения, в меньшей степени выражено фолиарное поступление. Интенсивность процесса поглощения тяжелых металлов из почвенного покрова определяется целым рядом факторов – катионообменной способностью и гранулометрическим составом почвы, температурой, уровнем концентрации макро- и микроэлементов в среде, присутствием различных органических соединений и т.д. Однако главным фактором, контролирующим поглощение металлов, выступает рН почвы. Отмечается, что щелочная среда снижает подвижность ТМ, в то время как кислая, наоборот, повышает. Например, кадмий наиболее подвижен в кислых почвах в диапазоне 4,5–5,5 ед. рН [30]. Установлено, что значитель-

ное количество элементов, в том числе и Ni, иммобилизуется в почвенном покрове из-за ее защелачивания [16]. На территории г. Стерлитамак, где также наблюдается высокое содержание в выбросах оксида кальция, значение рН почвы под насаждениями лиственницы Сукачева варьировало в пределах 6,55–6,90 ед. В то же время показатели загрязненного и контрольного участков между собой статистически значимо не различались.

При изучении корненасыщенности почвенного покрова выявлено, что для зоны условного контроля характерно поверхностное распространение поглощающих корней (рис. 2). Согласно результатам количественного учета, основная их масса (55–60%) располагалась в верхнем 30-сантиметровом слое почвы. При этом максимальная масса поглощающих корней лиственницы Сукачева обнаруживалась на глубине от 10 до 20 см – $78,51 \pm 4,10$ г/м². На глубине от 0 до 10 см показатель корненасыщенности составлял $61,33 \pm 3,09$ г/м². В зоне влияния Стерлитамакского промышленного центра наблюдалась несколько иная картина – поглощающих корней в слоях почвы 0–10 и 10–20 см содержалось в 2–3 раза меньше. Так, у здоровых деревьев в верхнем слое почвенного покрова корненасыщенность составляла $26,42 \pm 1,52$ г/м², на глубине 10–20 см – $49,34 \pm 2,50$ г/м², а на глубине 20–30 см – $58,30 \pm 3,21$ г/м². У ослабленных деревьев на ППП № 1 наблюдалась такая же закономерность, однако показатели корненасыщенности оказались ниже, чем у здоровых лиственниц. Минимальными значениями насыщенности почвы поглощающими корнями характеризовались более глубокие слои (от 50 до 100 см) как в зоне условного контроля, так на загрязненном участке.

Характер распространения корней в почве в определенной степени зависит от почвенного профиля, в том числе уровня залегания грунтовых вод. Так как условия произрастания на изученных ППП идентичные и различие заключалось лишь в уровне техногенного загрязнения, можно предположить, что снижение насыщенности почвы поглощающими корнями в зоне влияния Стерлитамакского промышленного центра связано с повышением концентрации ТМ в грунте. Длительное воздействие поллютантов в высоких концентрациях привело к существенной перестройке всасывающего аппарата корневой системы лиственницы Сукачева. Как отмечают I.V. Seregin and A.D. Kozhevnikova [31], в связи с тем, что ТМ поступают в растения в основном через подземные органы, токсическое действие этих загрязнителей четко прослеживается по ингибированию роста и развития корневой системы. При проведении исследований с непродолжительным воздействием высоких концентраций кадмия на клональные проростки лиственницы подавления роста корня не наблюдалось [10].

Однако аналогичные опыты, но с более длительным временем воздействия кадмия привели к снижению массы как подземных, так и надземных органов лиственницы [11].

Распределение кадмия по фракциям корневой системы лиственницы Сукачева показано на рис. 3. Как видно, наиболее высокие концентрации ме-

талла обнаруживались в полускелетных и поглощающих корнях у здоровых деревьев ППП № 1 ($4,73 \pm 0,24$ и $4,52 \pm 0,18$ мг/кг соответственно). В корневой системе ослабленных деревьев с ППП № 1 данный элемент содержался в меньших количествах – от $2,33 \pm 0,12$ до $3,21 \pm 0,17$ мг/кг. При этом имели место статистически значимые различия ($p < 0,05$). На ППП № 2 кадмий также больше аккумулировался в полускелетных корнях ($p < 0,05$), однако его содержание не превышало $1,80 \pm 0,08$ мг/кг.

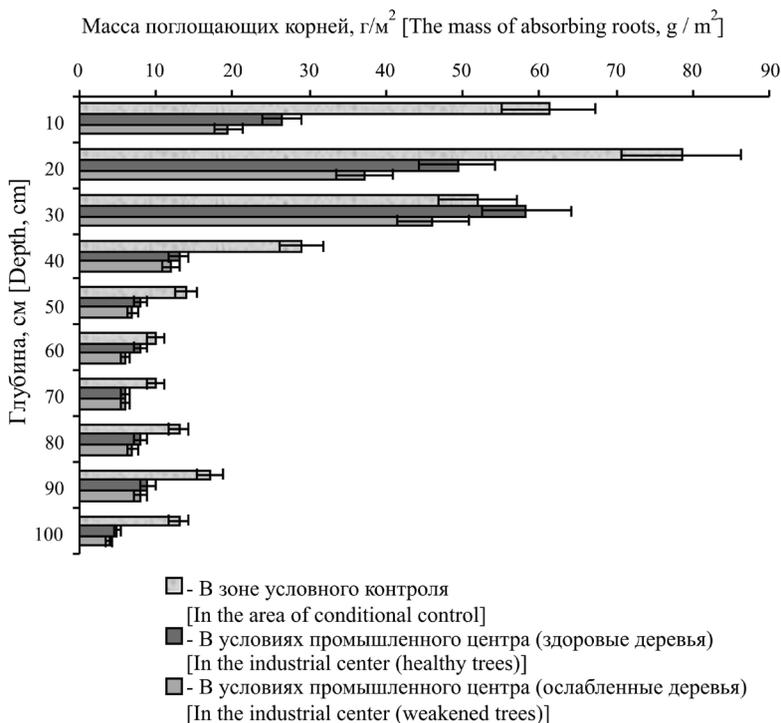


Рис. 2. Насыщенность почвы поглощающими корнями лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля ($M \pm SD$)

[Fig. 2. Soil saturation with absorbing roots of *Larix sukaczewii* Dyl. in the industrial center and in the area of conditional control. On the X-axis - The mass of absorbing roots, g / m²; on the Y-axis - Depth, cm ($M \pm SD$)]

Распределение никеля по фракциям корневой системы лиственницы несколько отличалось (рис. 4). Максимальная концентрация металла определялась в поглощающих корнях как у здоровых, так и у ослабленных деревьев – $98,45 \pm 14,60$ и $65,30,52 \pm 7,81$ мг/кг соответственно. При этом и в зоне условного контроля, и на загрязненной территории процесс перемещения никеля из поглощающих корней в проводящие корни выражен в меньшей степени, чем у кадмия.

На рис. 5 и 6 представлены усредненные данные по содержанию металлов в хвое, ветвях и корневой системе лиственницы.

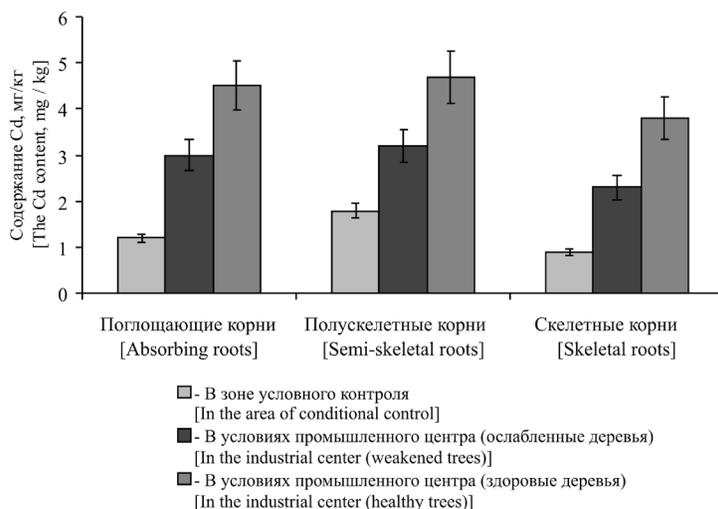


Рис. 3. Содержание Cd (мг/кг) в поглощающих, полускелетных и скелетных корнях лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля ($M \pm SD$)
[Fig. 3. The content of Cd (mg / kg) in the absorbing, semi-skeletal and skeletal roots of *Larix sukaczewii* Dyl. in the industrial center and in the area of conditional control.
 On the X-axis - Types of *Larix sukaczewii* roots; on the Y-axis - The Cd content, mg / kg ($M \pm SD$)]

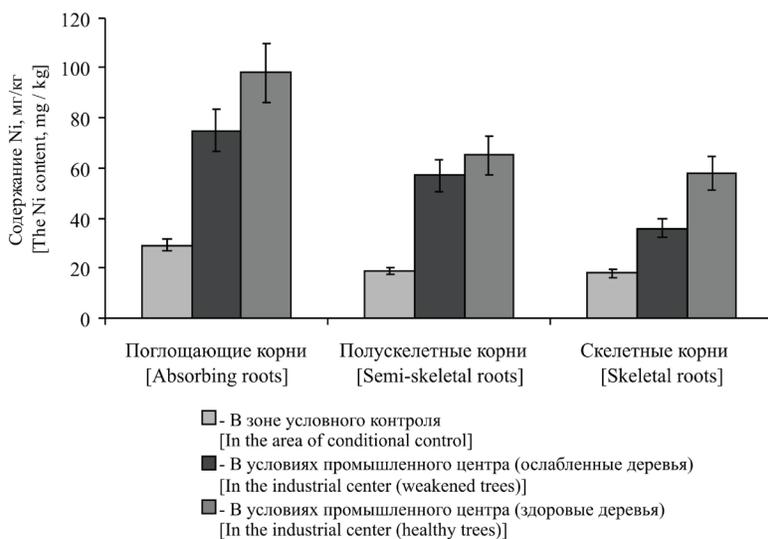


Рис. 4. Содержание Ni (мг/кг) в поглощающих, полускелетных и скелетных корнях лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля ($M \pm SD$)
[Fig. 4. The content of Ni (mg / kg) in the absorbing, semi-skeletal and skeletal roots of *Larix sukaczewii* Dyl. in the industrial center and in the area of conditional control.
 On the X-axis - Types of *Larix sukaczewii* roots; on the Y-axis - The Ni content, mg / kg ($M \pm SD$)]

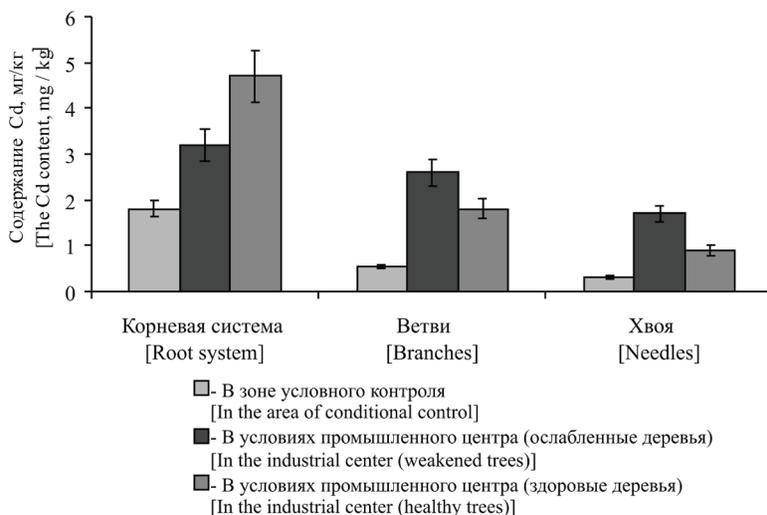


Рис. 5. Содержание Cd (мг/кг) в надземных и подземных органах лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля ($M \pm SD$)

[Fig. 5. The content of Cd (mg / kg) in the aboveground and underground organs of *Larix sukaczewii* Dyl. in the industrial center and in the area of conditional control. On the X-axis - Aboveground and underground organs of *Larix sukaczewii*; on the Y-axis - The Cd content, mg / kg ($M \pm SD$)]

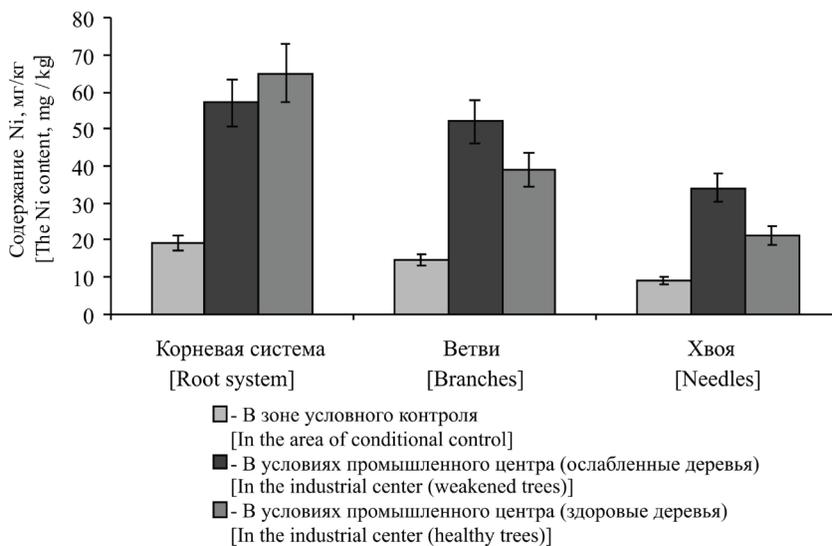


Рис. 6. Содержание Ni (мг/кг) в надземных и подземных органах лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях промышленного центра и в зоне условного контроля ($M \pm SD$)

[Fig. 6. The content of Ni (mg / kg) in the aboveground and underground organs of *Larix sukaczewii* Dyl. in the industrial center and in the area of conditional control. On the X-axis - Aboveground and underground organs of *Larix sukaczewii*; on the Y-axis - The Ni content, mg / kg ($M \pm SD$)]

Хвоя характеризовалась наименьшими концентрациями кадмия и никеля. Вместе с тем в тканях лиственницы Сукачева никель аккумулировался в больших количествах, чем кадмий. При сравнении данных по двум пробным площадям можно видеть, что в условиях Стерлитамакского промышленного центра концентрация ТМ в надземных и подземных органах достоверно выше, чем на контрольном участке ($p < 0,05$).

Согласно А. Kabata-Pendias [32], фоновое содержание кадмия в надземной части растений составляет 0,05–0,60 мг/кг сухого вещества, токсичное – 1,0–70,0 мг/кг. Нормальное содержание никеля в надземных органах большинства видов растений определяется на уровне 0,1–5,0 мг/кг сухого вещества, а концентрация выше 10,0 мг/кг считается токсичной. На изученной нами территории в надземных органах лиственницы Сукачева средняя концентрация кадмия в зоне условного контроля варьировала от 0,30 до 0,55 мг/кг, в условиях Стерлитамакского промышленного центра – в диапазоне, токсичном для растений (1,5–3,0 мг/кг). Концентрация никеля в надземных органах лиственницы чаще определялась как токсичная: в зоне условного контроля варьировала от 9,0 до 15,0 мг/кг, в условиях Стерлитамакского промышленного центра – от 21 до 52,0 мг/кг.

Кадмий принадлежит к наиболее токсичным для растений элементам. Установлено, что его высокие концентрации приводят к изменениям в проницаемости клеточных мембран и активности ряда ферментов, снижают интенсивность фотосинтеза, вызывая тем самым окислительный стресс [31, 33, 34]. В отличие от кадмия, никель считается необходимым для растений элементом, однако при повышенных концентрациях также оказывает ингибирующее действие на физиологические процессы. Интоксикация может проявляться в замедлении процессов роста и фотосинтеза, нарушении водного и минерального обмена, внешне проявляющимися как межжилковый хлороз и некроз листьев [31, 35–37]. Как отмечено выше, внешние признаки токсического действия ТМ у лиственничных насаждений на ППП № 1 выявлялись чаще, чем на ППП № 2.

В зависимости от интенсивности накопления и распределения металлов по органам растений выделяют две контрастные группы – исключатели и аккумуляторы. К исключателям относят растения, накапливающие металлы преимущественно в подземных органах. Аккумуляторы накапливают металлы главным образом в надземной части, а при определенных условиях проявляют себя как гипераккумуляторы. К гипераккумуляторам никеля относят растения, способные концентрировать металл в листьях на уровне более 1 000 мг/кг сухой массы, к гипераккумуляторам кадмия – при концентрировании металла в листьях свыше 100 мг/кг сухой массы [38]. Как видно из результатов количественного химического анализа по распределению изученных металлов в надземных и подземных частях, лиственница Сукачева является исключателем. При этом переход из корней в надземные побеги у кадмия выражен в меньшей степени по сравнению с никелем. I.V. Seregin

and A.D. Kozhevnikova [31] отмечают, что низкое содержание металлов в надземных органах растений-исключателей определяется барьерной функцией корневой системы. В то же время ткани, выполняющие барьерную функцию (эндодерма и экзодерма), преимущественно ограничивают транспорт только «апопластических» ионов (Cd), в то время как транспорт «симпластических» ионов (Ni) – незначительно.

Следует отметить, что в распределении элементов по органам у здоровых и ослабленных деревьев также обнаруживаются различия. У здоровых лиственниц в надземной части сосредотачивается от 35 до 40% кадмия, а в корнях – 60–65%. У ослабленных деревьев по сравнению со здоровыми, отмечаются более высокие концентрации элемента в надземных органах. То есть в их корневой системе кадмий иммобилизуется в меньшей степени. Такая же закономерность наблюдается и при аккумуляции никеля. В данном случае можно говорить о снижении барьерной функции корневой системы у ослабленных деревьев.

Заключение

Проведенные исследования позволили выявить, что в непосредственной близости от промышленной зоны г. Стерлитамак деревья лиственницы Сукачева более ослаблены по сравнению с условным контролем. Внешние признаки угнетения проявляются в уменьшении густоты кроны, увеличении количества мертвых ветвей, поражении ассимиляционного аппарата хлорозами и некрозами. Повышение концентрации тяжелых металлов в корнеобитаемом слое почвы приводит к снижению доли поглощающих корней. На загрязненном участке содержание кадмия в хвое и ветвях выше в 5–6 раз, никеля – в 3–4 раза. В подземных органах содержание элементов по сравнению с условным контролем повышено в 2,5–4 раза. У ослабленных деревьев концентрация металлов в надземной части выше, чем у здоровых лиственниц, что может свидетельствовать о снижении барьерной функции корневой системы. Несмотря на то, что относительное жизненное состояние древостоя на загрязненном участке характеризуется как «ослабленное», снижения класса бонитета не наблюдается. Проведение оперативных лесохозяйственных мероприятий в санитарно-защитных насаждениях лиственницы не требуется. Рекомендуются своевременные санитарные рубки и дальнейший мониторинг.

Литература

1. Ali H., Khan E., Sajad M.A. Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications // *Chemosphere*. 2013. Vol. 91, № 7. PP. 869–881. doi: [10.1016/j.chemosphere.2013.01.075](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075)
2. Kakkar P., Jaffery F.N. Biological markers for metal toxicity // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005. Vol. 19, № 2. PP. 335–349. doi: [10.1016/j.etap.2004.09.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.09.003)
3. *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. Alloway B.J., ed. Dordrecht, Netherlands ; New York : Springer, 2013. 632 p.

4. Неверова О.А., Колмогорова Е.Ю. Ксерофитизация листьев древесных растений как показатель загрязнения атмосферного воздуха (на примере г. Кемерово) // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2002. № 3. С. 29–33.
5. Кулагин А.А., Шагиева Ю.А. Древесные растения и биологическая консервация промышленных загрязнителей. М. : Наука, 2005. 190 с.
6. Кирдянов А.В., Мыглан В.С., Пименов А.В., Кнопре А.А., Экарт А.К., Ваганов Е.А. Динамика усыхания лиственницы сибирской в зоне влияния техногенных эмиссий предприятий Норильского промышленного района // Сибирский экологический журнал. 2014. Т. 21, № 6. С. 945–952.
7. Giniyatullin R., Baktybaeva Z., Gabidullina G., Teltsova L. State and Environment Purifying Functions of Forest Stands Under Conditions of Polymetallic Pollution in the Industrial Center of Sterlitamak // Ecological-Socio-Economic Systems: Models of Competition and Cooperation (ESES 2019). Advances in Social Science, Education and Humanities Research / Shelomentsev A, Vasilieva O, Chepelyuk N and Orlov S, editors. 2020. Vol. 392. PP. 130–133. doi: [10.2991/assehr.k.200113.027](https://doi.org/10.2991/assehr.k.200113.027)
8. Касимов Н.С., Кошелева Н.Е., Сорокина О.И., Гунин П.Д., Бажа С.Н., Энх-Амгалан С. Эколого-геохимическая оценка состояния древесной растительности в г. Улан-Батор (Монголия) // Аридные экосистемы. 2011. Т. 17, № 4 (49). С. 14–31.
9. Гиниятуллин Р.Х., Кулагин А.Ю. Особенности содержания свинца в органах у здоровых и ослабленных деревьев березы повислой (*Betula pendula* Roth) в условиях промышленного загрязнения // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3. С. 39–44.
10. Moudouma C.F.M., Riou C., Gloaguen V., Saladin G. Hybrid larch (*Larix* × *eurolepis* Henry): a good candidate for cadmium phytoremediation? // Environmental Science and Pollution Research. 2013. Vol. 20, № 3. PP. 1889–1894. doi: [10.1007/s11356-012-1419-6](https://doi.org/10.1007/s11356-012-1419-6)
11. Bonet A., Lelu-Walter M., Faugeron C., Gloaguen V., Saladin G. Physiological responses of the hybrid larch (*Larix* × *eurolepis* Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets // Environmental Science and Pollution Research. 2016. Vol. 23, № 9. PP. 8617–8626. doi: [10.1007/s11356-016-6094-6](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6094-6)
12. Juranović Cindrić I., Zeiner M., Starčević A., Stinger G. Metals in pine needles: characterisation of bio-indicators depending on species // International Journal of Environmental Science and Technology. 2019. Vol. 16. PP. 4339–4346. doi: [10.1007/s13762-018-2096-x](https://doi.org/10.1007/s13762-018-2096-x)
13. Коротева Е.В., Веселкин Д.В., Куянцева Н.Б., Мумбер А.Г., Чашина О.Е. Накопление тяжелых металлов в разных органах березы повислой возле Карабашского медеплавильного комбината // Агрехимия. 2015. № 3. С. 88–96.
14. Kandziora-Ciupa M., Ciepał R., Nadgórska-Socha A., Barczyk G. Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Pinus sylvestris* L. needles in polluted and non-polluted sites // Ecotoxicology. 2016. Vol. 25, № 5. PP. 970–981. doi: [10.1007/s10646-016-1654](https://doi.org/10.1007/s10646-016-1654)
15. Vorobeichik E.L., Pishchulin P.G. Industrial pollution reduces the effect of trees on forming the patterns of heavy metal concentration fields in forest litter // Russian Journal of Ecology. 2016. Vol. 47, № 5. PP. 431–441. doi: [10.1134/S1067413616050155](https://doi.org/10.1134/S1067413616050155)
16. Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Ivanova A.I., Ivanov V.P., Marchenko S.I., Nartov D.I., Kuznetsov V.V. Long-term impact of cement plant emissions on the elemental composition of both soils and pine stands and on the formation of Scots pine seeds // Environmental Pollution. 2018. Vol. 243. Pt. B. PP. 1383–1393. doi: [10.1016/j.envpol.2018.09.099](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.099)
17. Путенихин В.П., Фарушкина Г.Г., Шигапов З.Х. Лиственница Сукачева на Урале: изменчивость и популяционно-генетическая структура. М. : Наука, 2004. 275 с.
18. Николаева М.А., Орлова Л.В., Крестьянов А.А., Каматов Д.Е. Географическая изменчивость лиственницы в опытных лесных культурах Республики Башкортостан // Сибирский лесной журнал. 2019. № 1. С. 30–43. doi: [10.15372/SJFS20190103](https://doi.org/10.15372/SJFS20190103)
19. Атлас Республики Башкортостан / под ред. И.М. Япарова. Уфа : Китап, 2005. 420 с.

20. Реестр особо охраняемых природных территорий Республики Башкортостан / под ред. Б.М. Миркина. Уфа : Гилем, 2006. 414 с.
21. О состоянии природных ресурсов и окружающей среды Республики Башкортостан в 2018 году: Государственный доклад. Уфа : Министерство природопользования и экологии Республики Башкортостан, 2019. 276 с.
22. Бактыбаева З.Б., Сулейманов Р.А., Валеев Т.К., Рахматуллин Н.Р. Оценка воздействия нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленности на эколого-гигиеническое состояние объектов окружающей среды и здоровье населения (Обзор литературы) // Медицина труда и экология человека. 2018. № 4. С. 12–26.
23. Курамшин Э.М., Курамшина Н.Г., Нуртдинова Э.Э., Имашев У.Б. Геохимическая оценка загрязнения тяжелыми металлами городских почв Башкортостана // Башкирский химический журнал. 2015. Т. 22, № 2. С. 74–79.
24. Андреева Е.Н., Баккал И.Ю., Горшков В.В., Лянгузова И.В., Мазная Е.А., Нешатаев В.Ю., Ставрова Н.И., Ярмишко В.Т., Ярмишко М.А. Методы изучения лесных сообществ. СПб. : НИИХимии СПбГУ, 2002. 240 с.
25. Forest Ecology and Conservation: A handbook of techniques. Newton A., editor. Oxford : University Press, 2007. 454 p.
26. Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение / под ред. В.А. Алексеева. Л. : Наука, 1990. 200 с.
27. Root Methods: A Handbook. Smit A.L., Bengough A.G., Engels C., Noordwijk M. van, Pellerin S., Geijn S.C. van de, editors. Berlin : Springer, 2000. 587 p.
28. Bargagli R. Trace Elements in Terrestrial Plants: An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery. Berlin : Springer, 1998. 324 p.
29. Hill S.J., Fisher A.S. Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. 3rd ed. Lindon J.C., editor-in-chief. UK, London : Elsevier Publ.; 2017. pp. 37–43. doi: [10.1016/B978-0-12-803224-4.00099-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00099-6)
30. Rademacher P. Atmospheric heavy metals and forest ecosystems: Work report of the Institute for World Forestry. Hamburg : Federal Research Centre for Forestry and Forest Products (BFH), Institute for World Forestry, 2003/12.
31. Seregin I.V., Kozhevnikova A.D. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium // Russian Journal of Plant Physiology. 2008. Vol. 55, № 1. PP. 1–22. doi: [10.1007/s11183-008-1001-8](https://doi.org/10.1007/s11183-008-1001-8)
32. Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. 4th ed. Boca Raton, FL, USA : CRC Press/Taylor & Francis Group, 2010. 548 p.
33. Seregin I.V., Ivanov V.B. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants // Russian Journal of Plant Physiology. 2001. Vol. 48, № 4. PP. 523–544. doi: [10.1023/A:1016719901147](https://doi.org/10.1023/A:1016719901147)
34. Andresen E., Kupper H. Cadmium toxicity in plants // Cadmium: From Toxicity to Essentiality. Metal Ions in Life Sciences. Sigel A., Sigel H., Sigel R.C.O., ed. Netherlands : Springer, 2013. Vol. 11. PP. 395–413.
35. Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2011. Vol. 86, № 1. PP. 1–17. doi: [10.1007/s00128-010-0171-1](https://doi.org/10.1007/s00128-010-0171-1)
36. Sreekanth T.V.M., Nagajyothi P.C., Lee K.D., Prasad T.N.V.K.V. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants // International Journal of Environmental Science and Technology. 2013. Vol. 10, № 5. PP. 1129–1140. doi: [10.1007/s13762-013-0245-9](https://doi.org/10.1007/s13762-013-0245-9)
37. Parlak K.U. Effect of nickel on growth and biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings // NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences. 2016. Vol. 76. PP. 1–5. doi: [10.1016/j.njas.2012.07.001](https://doi.org/10.1016/j.njas.2012.07.001)
38. Reeves R.D., Baker A.J.M., Jaffré T., Erskine P.D., Echevarria G., van der Ent A. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloïd trace elements // New Phytologist. 2018. Vol. 218, № 2. PP. 407–411. doi: [10.1111/nph.14907](https://doi.org/10.1111/nph.14907)

Поступила в редакцию 28.05.2020 г.; повторно 09.07.2020 г.; 17.08.2020 г.
принята 03.09.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Гиниятуллин Рафак Хизбуллинович – д-р с.-х. наук, с.н.с. лаборатории лесоведения Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, Россия, пр. Октября, 69).

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0001-5729-3754>

E-mail: grafak2012@yandex.ru

Бактыбаева Зулфия Булатовна – канд. биол. наук, с.н.с. отдела медицинской экологии Уфимского научно-исследовательского института медицины труда и экологии человека (Россия, 450106, г. Уфа, Россия, ул. С. Кувыкина, 94)

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0003-1249-7328>

E-mail: baktybaeva@mail.ru

Для цитирования: Гиниятуллин Р.Х., Бактыбаева З.Б. Особенности накопления Cd и Ni листовницей Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) в условиях техногенеза // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 141–161. doi: 10.17223/19988591/51/8

For citation: Giniyatullin RKh, Baktybaeva ZB. Features of Cd and Ni accumulation by *Larix sukaczewii* Dyl. under technogenesis. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:141-161. doi: 10.17223/19988591/51/8 In Russian, English Summary

Rafak Kh. Giniyatullin¹, Zulfiya B. Baktybaeva²

¹ Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

² Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russian Federation

Features of Cd and Ni accumulation by *Larix sukaczewii* Dyl. under technogenesis

In industrially developed cities, sanitary-protective afforestation promotes the deposition of aeropollutants, as well as the absorption of toxicants from the soil. However, performing a function of a phytofilter for a long time negatively affects the vitality of the trees themselves. Among numerous pollutants of technogenic origin, the most toxic for living organisms, including plants, are heavy metals. Studying the absorption capacity of different species of woody plants and their reaction to increased concentrations of toxicants allows us to predict the stability of protective forest stands and design forestry measures. One of the species, widely used in creating sanitary protection zones in the Republic of Bashkortostan, is *Larix sukaczewii* Dyl., characterized by its resistance to extreme environmental factors. The adaptive abilities of this species to an increased content of heavy metals remain poorly studied. The aim of this study is to identify the features of the accumulation and distribution of heavy metals (Cd and Ni) by *Larix sukaczewii* and assess the relative living condition of the stand in Sterlitamak industrial center.

We conducted studies in 2007-2018 in the city of Sterlitamak (53°38'00"N, 55°57'00"E), a major center of the chemical and oil refining industry of the Russian Federation. The establishment and description of trial plots was carried out according to generally accepted methods [Andreeva EN et al., 2002; Forest ecology..., 2007]. Permanent trial plot No. 1 measuring 20×50 m was located 1-2 km from sources of petrochemical and chemical pollution (See Fig. 1). Permanent trial plot No. 2 measuring 18×50 m was located in the area of conditional control (25-30 km from pollution sources). Trial areas were laid in coeval (about 55 years) and clean tree stands (See Table 1). The category of the vital state of an individual tree was determined by the auxiliary table (See Table 2). After summing up the number of trees by categories, we assessed the relative living

conditions of the entire stand [Alekseev VA, 1990]. At a rate of 100% to 80%, the stand was assessed as “healthy”, at 79-50% as “weakened”, at 49-20% as “strongly weakened”, and at 19% and below as “completely destroyed”. The study of the soil saturation with absorbing roots was carried out by the method of soil sections 1×1×1 m in size [Root Methods, 2000]. The roots were sorted by fractions: less than 1 mm in diameter (absorbing roots), 1-3 mm (half-skeletal roots), and more than 3 mm (skeletal roots). We determined the weight of the roots in the air-dry state. To study the metal content, annually during the growing season, we performed repeated re-selection of needles, branches and roots. At the same time, we took soil samples from the depth of 0-20 cm. The samples were dried to an air-dry state and analyzed on a “ZEEnit-650” atomic absorption spectrometer (Germany) [Hill SJ, Fisher AS, 2017]. In soil samples, we determined gross and mobile forms of metals. Data are presented as arithmetic mean ± standard deviation ($M \pm SD$). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

We found that at the permanent trial plot No. 1, the trees are more weakened in comparison to the conditional control. External signs of oppression were expressed in a crown density decrease to 75-80%, an increase in the number of dead branches to 25-30%, and damage to the assimilation apparatus by chlorosis and necrosis (on average by 15%). Trees classified as “weakened” accounted for 55% of the stand, and deadwood reached 10%. The relative vital condition of the entire stand was characterized as “weakened” (See Table 3). In the area of conditional control, the forest stand corresponded to the “healthy” category. Moreover, the trees had a better formed crown (average density is 82%) and fewer dead branches on the trunk (21% on average). Needles damage by chlorosis was not more than 11%. The results of chemical analysis of soil samples revealed statistically significant differences ($p < 0.05$) between the content of the metals in the zone of influence of the industrial center of Sterlitamak and in the area of conditional control (See Table 4). Higher concentrations of cadmium and nickel were found at the permanent trial plot No. 1. The leached chernozem prevailed in the soil cover. The pH of the soil according to many years of research ranged from 6.55-6.90 units. The bulk of the absorbing larch roots was located at a depth of 0-30 cm (See Fig. 2). Moreover, in the control area, the root saturation of the soil reached $78.51 \pm 4.10 \text{ g / m}^2$. In the influence zone of Sterlitamak industrial center, we observed a decrease in the proportion of absorbing roots: in healthy trees 2 times and in weakened trees 2-3 times. Perhaps, this is due to higher concentrations of metals in the surface of soil layer at a permanent trial plot No. 1, which led to a significant restructuring of the larch suction root apparatus. Chemical analysis of plant samples showed that in the contaminated area the content of cadmium in needles and branches is statistically significantly ($p < 0.05$) higher by 5-6 times and that of nickel by 3-4 times. In underground organs, the content of elements in comparison to the conditional control increased 2.5-4 times ($p < 0.05$). Besides, in the underground part, nickel is mainly accumulated in absorbing roots, and cadmium in absorbing and semi-skeletal ones (See Fig. 3 and 4). The movement of nickel from absorbing roots to conductive roots is less expressed than cadmium. In the aerial part of trees, the metal content in the branches is higher than in the needles (See Fig. 5 and 6). At the same time, in healthy trees, the barrier function of the root system is preserved, which prevents the excess intake of pollutants in the aboveground organs. Despite the fact that the relative vital condition of the stand at the contaminated site is characterized as “weakened”, there is no decrease in the quality class. It is not required to carry out operational forestry activities in the sanitary-protective larch plantations. Timely sanitary felling and further monitoring are recommended.

The paper contains 6 Figures, 4 Tables and 38 References.

Key words: heavy metals; sanitary-protective afforestation; relative living state of the stand; root saturation of the soil; Sterlitamak industrial center; Cis-Urals.

Funding: This work was performed as a part of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia (Project No 075-00326-19-00 on the topic AAAA-A18-118022190102-3). A part of the results was obtained using the equipment of the Regional Center for Collective Use “Agidel”.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere*. 2013;91(7):869-881. doi: [10.1016/j.chemosphere.2013.01.075](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075)
2. Kakkar P, Jaffery FN. Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005;19(2):335-349. doi: [10.1016/j.etap.2004.09.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.09.003)
3. *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. Alloway BJ, editor. Dordrecht, Netherlands; New York: Springer Publ.; 2013. 632 p.
4. Neverova OA, Kolmogorova EYu. Kserofitizatsiya list'ev drevesnykh rasteniy kak pokazatel' zagryazneniya atmosfernogo vozdukha (na primere g. Kemerovo) [Xerophytization of wood plant leaves as index of atmospheric air pollution (on the example of Kemerovo)]. *Lesnoy Zhurnal = Russian Forestry Journal*. 2002;3:29-33. In Russian
5. Kulagin AA, Shagieva YuA. Drevesnye rasteniya i biologicheskaya konservatsiya promyshlennykh zagryazniteley [Woody plants and biological conservation of industrial pollutants]. Moscow: Nauka Publ.; 2005. 190 p. In Russian
6. Kirdyanov AV, Pimenov AV, Knorre AA, Ekart AK, Vaganov EA, Myglan VS. Die-off dynamics of Siberian larch under the impact of pollutants emitted by Norilsk enterprises. *Contemporary Problems of Ecology*. 2014;7(6):679-684. doi: [10.1134/S1995425514060055](https://doi.org/10.1134/S1995425514060055)
7. Giniyatullin R, Baktybaeva Z, Gabidullina G, Teltsova L. State and Environment Purifying Functions of Forest Stands Under Conditions of Polymetallic Pollution in the Industrial Center of Sterlitamak. *Ecological-Socio-Economic Systems: Models of Competition and Cooperation (ESES 2019). Advances in Social Science, Education and Humanities Research*. Shelomentsev A, Vasilieva O, Chepelyuk N and Orlov S, editors. 2020;392:130-133. doi: [10.2991/assehr.k.200113.027](https://doi.org/10.2991/assehr.k.200113.027)
8. Kasimov NS, Kosheleva NE, Sorokina OI, Gunin PD, Bazha SN, Enkh-Amgalan S. An ecological-geochemical assessment of the state of woody vegetation in Ulaanbaatar city (Mongolia). *Arid Ecosystems*. 2011;1(4):201-213. doi: [10.1134/S2079096111040081](https://doi.org/10.1134/S2079096111040081)
9. Giniyatullin RKH, Kulagin AYu. Osobennosti soderzhaniya svintsa v organakh u zdorovykh i oslablennykh derev"ev berezy povisloy (*Betula pendula* Roth) v usloviyakh promyshlennogo zagryazneniya [Features of lead content in healthy and weakened drooping birch trees (*Betula pendula* Roth) under industrial pollution conditions]. *Izvestia Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*. 2018;3:39-44. In Russian
10. Moudouma CFM, Riou C, Gloaguen V, Saladin G. Hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry): a good candidate for cadmium phytoremediation? *Environmental Science and Pollution Research*. 2013;20(3):1889-1894. doi: [10.1007/s11356-012-1419-6](https://doi.org/10.1007/s11356-012-1419-6)
11. Bonet A, Lelu-Walter M, Faugeton C, Gloaguen V, Saladin G. Physiological responses of the hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23(9):8617-8626. doi: [10.1007/s11356-016-6094-6](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6094-6)
12. Juranović Cindrić I, Zeiner M, Starčević A, Stinger G. Metals in pine needles: characterisation of bio-indicators depending on species. *Int J of Environmental Science and Technology*. 2019;16:4339-4346. doi: [10.1007/s13762-018-2096-x](https://doi.org/10.1007/s13762-018-2096-x)
13. Koroteeva EV, Veselkin DV, Kuyantseva NB, Mumber AG, Chashchina OE. Nakoplenie tyazhelykh metallov v raznykh organakh berezy povisloy vozle karabashskogo medeplavil'nogo kombinata [Accumulation of heavy metals in the different *Betula*

- pendula* Roth organs near the karabash copper smelter]. *Agrokhimiya = Agrochemistry*. 2015;3:88-96. In Russian
14. Kandziora-Ciupa M, Ciepał R, Nadgórska-Socha A, Barczyk G. Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Pinus sylvestris* L. needles in polluted and non-polluted sites. *Ecotoxicology*. 2016;25(5):970-981. doi: [10.1007/s10646-016-1654](https://doi.org/10.1007/s10646-016-1654)
 15. Vorobeichik EL, Pishchulin PG. Industrial pollution reduces the effect of trees on forming the patterns of heavy metal concentration fields in forest litter. *Russian J Ecology*. 2016;47(5):431-441. doi: [10.1134/S1067413616050155](https://doi.org/10.1134/S1067413616050155)
 16. Ivanov YV, Kartashov AV, Ivanova AI, Ivanov VP, Marchenko SI, Nartov DI, Kuznetsov VV. Long-term impact of cement plant emissions on the elemental composition of both soils and pine stands and on the formation of scots pine seeds. *Environmental Pollution*. 2018;243(Pt B):1383-1393. doi: [10.1016/j.envpol.2018.09.099](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.099)
 17. Putenikhin VP, Farukshina GG, Shigapov ZKh. Listvennitsa Sukacheva na Urale: izmenchivost' i populyatsionno-geneticheskaya struktura [*Larix sukaczewii* in the Urals: Variability and population-genetic structure]. Moscow: Nauka Publ.; 2004. 275 p. In Russian
 18. Nikolaeva MA, Orlova LV, Krest'yanov AA, Kamatov DN. Geographical variability of larch in the experimental forest crops of the Republic of Bashkortostan. *Sibirskij Lesnoj Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science*. 2019;1:30-43. doi: [10.15372/SJFS20190103](https://doi.org/10.15372/SJFS20190103) In Russian
 19. *Atlas Respubliki Bashkortostan* [Atlas of the Republic of Bashkortostan]. Yaparov IM, editor. Ufa: Kitap Publ.; 2005. 420 p. In Russian
 20. *Reestr osobo okhranyaemykh prirodnykh territoriy Respubliki Bashkortostan* [The list of specially protected natural areas of the Republic of Bashkortostan]. Mirkin BM, editor. Ufa: Gilem Publ.; 2006. 414 p. In Russian
 21. *O sostoyanii prirodnykh resursov i okruzhayushchey sredy Respubliki Bashkortostan v 2018 godu: Gosudarstvennyy doklad* [On the state of natural resources and the environment of the Republic of Bashkortostan in 2018: State report]. Ufa: Ministerstvo prirodopol'zovaniya i ekologii Respubliki Bashkortostan; 2019. 276 p. In Russian
 22. Baktybaeva ZB, Suleymanov RA, Valeev TK, Rakhmatullin NR. Evaluation of oil refining and petrochemical industry impact on environmental and hygienic state of environmental objects and population health (Literature review). *Occupational Health and Human Ecology*. 2018;4:12-26. In Russian
 23. Kuramshin EM, Kuramshina NG, Nurtdinova EE, Imashev UB. Geokhimicheskaya otsenka zagryazneniya tyazhelymi metallami gorodskikh pochv bashkortostana [Geochemical assessment of heavy metal pollution urban soils of Bashkortostan]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal = Bashkir Chemistry J*. 2015;22(2):74-79. In Russian
 24. Andreeva EN, Bakkal IYu, Gorshkov VV, Lyanguzova IV, Maznaya EA, Neshataev VYu, Stavrova NI, Yarmishko VT, Yarmishko MA. Metody izucheniya lesnykh soobshchestv [Methods for studying forest communities]. St. Petersburg: Research Institute of Chemistry of St. Petersburg State University Publ.; 2002. 240 p. In Russian
 25. *Forest Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. Newton A, editor. Oxford: University Press Publ.; 2007. 454 p.
 26. *Lesnye ekosistemy i atmosfernoe zagryaznenie* [Forest ecosystems and air pollution]. Alekseev VA, editor. Leningrad: Nauka Publ.; 1990. 200 p. In Russian
 27. *Root Methods: A Handbook*. Smit AL, Bengough AG, Engels C, Noordwijk M van, Pellerin S and Geijn SC van de, editors. Berlin: Springer Publ.; 2000. 587 p.
 28. Bargagli R. Trace Elements in Terrestrial Plants: An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery. Berlin: Springer Publ.; 1998. 324 p.
 29. Hill SJ, Fisher AS. Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. 3rd ed. Elsevier Publ.; 2017. pp. 37-43. doi: [10.1016/B978-0-12-803224-4.00099-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00099-6)

30. Rademacher P. Atmospheric heavy metals and forest ecosystems: Work report of the Institute for World Forestry. Hamburg: Federal Research Centre for Forestry and Forest Products (BFH), Institute for World Forestry, 2003/12.
31. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008;55(1):1-22. doi: [10.1007/s11183-008-1001-8](https://doi.org/10.1007/s11183-008-1001-8)
32. Kabata-Pendias A. *Trace Elements in Soils and Plants*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group Publ.; 2010. 548 p.
33. Seregin IV, Ivanov VB. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian J Plant Physiology*. 2001;48(4):523-544. doi: [10.1023/A:1016719901147](https://doi.org/10.1023/A:1016719901147)
34. Andresen E, Kupper H. Cadmium toxicity in plants. In: *Cadmium: From Toxicity to Essentiality. Metal Ions in Life Sciences*. Sigel A, Sigel H and Sigel RCO, editors. Netherlands: Springer Publ.; 2013;11:395-413.
35. Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011;86(1):1-17. doi: [10.1007/s00128-010-0171-1](https://doi.org/10.1007/s00128-010-0171-1)
36. Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *Int J Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129-1140. doi: [10.1007/s13762-013-0245-9](https://doi.org/10.1007/s13762-013-0245-9)
37. Parlak KU. Effect of nickel on growth and biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *NJAS - Wageningen J Life Sciences*. 2016;76:1-5. doi: [10.1016/j.njas.2012.07.001](https://doi.org/10.1016/j.njas.2012.07.001)
38. Reeves RD, Baker AJM, Jaffré T, Erskine PD, Echevarria G, van der Ent A. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytologist*. 2018;218(2):407-411. doi: [10.1111/nph.14907](https://doi.org/10.1111/nph.14907)

Received 28 May 2020; Revised 09 July and 17 August 2020;

Accepted 03 September 2020; Published 25 September 2020

Author info:

Giniyatullin Rafak Kh, Dr. Sci. (Agr.), Senior Researcher, Laboratory of Forestry, Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 69 October Pr., Ufa 450054, Russian Federation.

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0001-5729-3754>

E-mail: grafak2012@yandex.ru

Baktybaeva Zulfiya B, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Medical Ecology, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, 94 S. Kuvykin Str., Ufa 450106, Russian Federation.

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0003-1249-7328>

E-mail: baktybaeva@mail.ru

УДК 504.054

doi: 10.17223/19988591/51/9

**Т.С. Лопатина¹, Ю.В. Александрова¹, О.В. Анищенко¹,
И.В. Грибовская¹, Н.А. Оськина¹, Т.А. Зотина^{1,2}, Е.С. Задереев^{1,2}**

¹ Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН,
г. Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

Влияние растворов противогололёдной смеси на *Moina macradora* и *Allium sera* в биотестовом эксперименте

Исследование выполнено при финансовой поддержке совместного гранта РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности № 19–44–240014.

*В острых и хронических тестах исследовано действие растворов противогололёдного материала «Бионорд», содержащего в своём составе хлориды натрия и кальция (до 85% от общего состава), на параметры роста и размножения ветвистоусого рачка *Moina macradora* и лука репчатого *Allium sera*. Установлена гибель 50% рачков при концентрации антигололёдной смеси в растворе 5,1 г/л в острых 48-часовых тестах. В хронических тестах смесь в диапазоне концентраций 0,3–5,0 г/л не оказывала значимого влияния на среднюю продолжительность жизни, удельную скорость ювенильного роста и плодовитость самок рачков. Средняя длина корней, суммарная длина корней на каждой луковице и пролиферативная активность в кончиках корней (митотический индекс) лука снижались на 50% по сравнению с контролем при концентрациях смеси в растворе 6,3; 5,2 и 10,4 г/л соответственно. Электропроводность растворов смеси, оказавших негативное влияние на выбранные тест-объекты, совпадала с ранее полученными значениями электропроводности растворов хлорида натрия, токсичных для ракообразных. На основании этого можно предположить, что основное действие противогололёдной смеси «Бионорд» на исследуемые объекты связано с входящими в её состав солями хлора и натрия. Основываясь на критических для роста и развития использованных тест-объектов концентрациях смеси «Бионорд» в растворе и нормативах ее применения установлено, что сток с 1 м² обработанной поверхности может привести к загрязнению 8–13 л пресной воды. Таким образом, регламентированная правилами использования препарата очистка обработанных поверхностей от «Бионорда» – базовое требование к применению соледержащих средств. Иначе постепенное накопление в водоёмах хлоридов натрия и кальция может привести к серьёзным нарушениям в функционировании водных экосистем.*

Ключевые слова: солёность; биотестирование; ветвистоусые ракообразные; *Allium*-тест; водные экосистемы.

Введение

Антропогенное химическое загрязнение окружающей среды антигололёдными реагентами вызывает повышение солёности в водных экосистемах во многих регионах мира [1]. Наиболее популярными средствами для борьбы со льдом на дорогах являются хлористые соли [2–4]. Использование таких средств приводит к поступлению катионов (Na^+ , Ca^{2+} и т.д.) и хлорид-аниона (Cl^-) в поверхностные и подземные водоёмы и водотоки прилегающих территорий [2, 5]. Известно, что функционирование водных экосистем в значительной степени зависит от солёности воды, поскольку это один из ключевых факторов, определяющих видовой состав, структуру трофических сетей и продуктивность сообществ в водоёмах [5, 6]. В последние годы опубликовано значительное количество работ, рассматривающих регулярное и долговременное применение солесодержащих смесей как причину постепенного химического загрязнения водных экосистем [1–4, 7, 8]. В Северной Америке и Европе применение соли для удаления наледи на автомобильных дорогах, практикуемое уже более 50 лет [3], признано одним из основных источников хлоридов в подземных водах, ручьях, реках и озёрах [9].

Во многих городах Российской Федерации в последние годы резко возросла интенсивность применения солесодержащих смесей для борьбы с обледенением дорожных покрытий и пешеходных зон [10]. Использование таких смесей вызывает обеспокоенность общественности и привлекает внимание контролирующих органов. Для прогноза последствий возможного химического загрязнения водных и наземных экосистем в результате долговременного применения солесодержащих смесей необходимо иметь представление о пределах устойчивости организмов, населяющих пресноводные объекты и почвенные системы, к компонентам, входящим в их состав [11]. На территории России исследования, устанавливающие такие пределы, немногочисленны и представлены преимущественно работами по изучению влияния противогололёдных средств на микробиоту почвенного покрова вдоль дорожных полотен и высшие растения [12, 13].

Цель данной работы – определить пороговые концентрации растворов противогололёдной солевой смеси «Бионорд», содержащей в своем составе хлориды натрия и кальция, при которых наблюдаются негативные эффекты на параметры развития животных и растительных тест-объектов.

Материалы и методики исследования

Для оценки пороговых концентраций растворов противогололёдной солевой смеси использованы стандартный для экологического мониторинга луковый тест (*Allium*-тест) на основе лука репчатого *Allium cepa* L. (Liliopsida: Amaryllidaceae) [14–17], а также острый и хронический тесты с пресноводным рачком *Moina macroscopa* (Straus, 1820) (Cladocera: Moinidae) [18, 19].

Во всех экспериментах в качестве модельного антигололёдного средства протестирована содесодержащая смесь «Бионорд» [20, 21]. Тестируемые растворы готовили путем разведения исходного стокового раствора с концентрацией смеси 200 г/л. Элементный состав всех тестируемых растворов и контрольной среды определяли с помощью ИСП-спектрометра iCAP 6300 Duo («Thermo Scientific», Великобритания) [18], удельную электропроводность – с помощью кондуктометра STARTER ST300C («Ohaus Corporation», США), водородный показатель – с помощью рН-метра РВ-11 («Sartorius», Германия). Калибровка приборов проводилась перед каждой серией измерений. Измерения выполнены в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН (г. Красноярск).

Физико-химическая характеристика растворов антигололёдной смеси. На основании химического анализа выделены элементы, концентрация которых в воде линейно зависела от концентрации растворенной смеси (коэффициент детерминации R^2 от 0,99 до 0,60). Сумма этих элементов составляла 85,0% от количества растворенной смеси (Cl: 48,0±5,8%; Na: 28,7±2,1%; Ca: 7,9±0,5%; S: 0,2±0,1%; K: 0,20±0,01%; Mg: 0,01±0,01%; Sr: 0,006±0,001%; B, Ba, Cr, Cu, Ga, Li, Mn, Mo, V в сумме: 0,003%). Концентрации Al, As, Bi, Cd, Co, Fe, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sn, Ti, Zn слабо зависели от концентрации смеси в растворе (R^2 от 0,5 до 0,003). Доля неучтенных при анализе растворов элементов в массе смеси не превышала 15%.

Доля нерастворимой минеральной фракции в массе смеси составила 1,18±0,15% (n = 4). Для её определения раствор смеси центрифугировали в течение 30 мин при 8 000 г, 20 °С. После первичного центрифугирования осадок трижды промывали дистиллированной водой и центрифугировали, затем высушивали при температуре 105 °С и взвешивали на аналитических весах.

Зависимость удельной электропроводности раствора (y) от концентрации растворенной смеси (x) описывается линейным уравнением $y = 1,22x + 1,57$ ($R^2 = 0,99$). Величина рН растворов не зависела от концентрации смеси, в острых и хронических тестах на ветвистоусых ракообразных составляла 7,7±0,2, в тестах на луке репчатом – 7,0±0,7.

Allium-тест. Для экспериментов использовали головки лука репчатого сорта Штуттгартер Ризен диаметром 1,8±0,1 см, массой 2,27±0,17 г. Перед экспериментом луковицы вынимали из холодильника, где они хранились при температуре 5 °С в течение двух недель, далее вымачивали несколько часов в дистиллированной воде и после удаляли отмершие поверхностные ткани. Подготовленные луковицы помещали на 48 ч корневой частью в пробирки, содержащие по 20 мл растворов смеси в различной концентрации или водопроводной воды. Для каждой концентрации смеси и в контроле протестировано по три луковицы. Проведено два последовательных эксперимента, в каждом из которых протестировали растворы со следующими концентрациями смеси в дистиллированной воде: 1,0; 2,5; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0; 20,0; 50,0 г/л.

Для оценки общей токсичности измеряли длину корней и рассчитывали среднюю и суммарную длину корней на каждой луковице (см). Для оценки цитотоксичности рассчитывали митотический индекс (МИ) – отношение числа делящихся клеток в апикальной меристеме корней к общему числу клеток. Для подсчета МИ для каждой концентрации реагента отбирали по пять корешков лука длиной 0,8–1,4 см случайным образом из корней, выросших на трех луковицах. Корешки фиксировали, красили 2% раствором ацеоорсеина и готовили из них препараты по ранее описанной методике [14]. Препараты просматривали под микроскопом ($\times 400$). В каждом препарате просматривали такое количество полей, чтобы набрать в сумме около тысячи интерфазных и делящихся клеток. МИ рассчитывали как долю делящихся клеток, находящихся в стадиях профазы, метафазы, анафазы и телофазы, к сумме делящихся и интерфазных клеток и выражали в процентах.

Острые и хронические тесты с рачками. В работе тестировали лабораторную культуру *M. macroscopa*, полученную из покоящихся яиц. Культура рачков вместе с грунтом предоставлена В.К. Чугуновым из временного пересыхающего пруда в окрестностях Института биологии внутренних вод РАН (пос. Борок, Ярославская область).

Для всех экспериментов тестируемых ювенильных самок получали от материнских особей, которых культивировали индивидуально в благоприятных для партеногенетического размножения условиях (температура 26 °С; фотопериод 16 ч свет : 8 ч темнота; концентрация пищи 200×10^3 кл./мл; объем среды 20 мл) [18, 19]. В острых и хроническом экспериментах самок в первые сутки их жизни (размер тела 0,5–0,6 мм) рассаживали по одной в стаканчики с отстоянной (не менее 72 ч) водопроводной водой (20 мл) с добавкой смеси в определенной концентрации. Контроль – группа животных в водопроводной воде. Стаканчики с животными во время острых и хронического экспериментов находились в контролируемых условиях (температура 26 °С; фотопериод 16 ч свет : 8 ч темнота). Для каждой концентрации смеси в растворе и контроля протестировано по 20 животных в острых и по 15 животных в хроническом экспериментах.

На основе литературных данных о влиянии солености на пресноводных ветвистоусых ракообразных [22, 23] и оценки элементного состава смеси, для острых тестов выбраны следующие концентрации «Бионорда»: 1,3; 2,5; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 г/л. Животных в острых тестах не кормили. Смертность рачков определяли через 24 и 48 ч после начала эксперимента. Для всей линейки концентраций проведено три последовательных эксперимента.

В хроническом эксперименте протестирован следующий ряд концентраций «Бионорда» в среде: 0,3; 0,6; 1,3; 2,5; 5,0; 6,0 и 8,0 г/л. Исходные тестируемые растворы смеси «Бионорд» готовили в объеме, достаточном для проведения всего хронического эксперимента. В качестве корма в хроническом тесте использовали неаксеничную культуру зелёной водоросли *Chlorella vulgaris* (Chlorellales: Chlorellaceae) [18, 19]. Среду культивирова-

ния в опытных и контрольных стаканах меняли ежедневно. В начале эксперимента и каждые следующие сутки при обновлении среды вносили корм в концентрации 200×10^3 клеток/мл. Хронический эксперимент вели до гибели всех тестируемых животных. В первые сутки жизни и за сутки до отрождения первого потомства у каждой самки определяли линейные размеры тела как длину от вершины головы до конца створок панциря под бинокулярной лупой ($\times 16$). На основе линейных размеров тела рассчитывали удельную скорость ювенильного роста животных [19]. Каждые сутки фиксировали количество мертвых животных, для каждой самки подсчитывали количество отрожденных потомков, которых после этого удаляли. На основании этих данных для каждой концентрации смеси рассчитывали среднюю продолжительность жизни и среднюю плодовитость рачков.

Статистический анализ. Для анализа регрессионных зависимостей результаты двух независимых *Allium*-тестов объединили в один массив данных на основе попарного сравнения индикаторных параметров, полученных для одинаковых концентраций, с помощью двухвыборочного *t*-теста, который не выявил статистически значимого различия сравниваемых выборок ($T \leq t$, $p > 0,05$, предварительно оценивалась статистическая значимость различия дисперсий с помощью *F*-теста); три последовательных острых эксперимента с рачками объединили в один массив данных на основе отсутствия статистически значимых отличий выживаемости рачков в контроле (тест различия между двумя пропорциями, $p > 0,32$).

Параметры регрессионных зависимостей представлены в виде значений угла наклона (*b*), верхнего предела показателя теста (*d*), концентраций смеси, при которых происходит снижение значений показателей теста на 50% по сравнению с верхним предельным значением (EC_{50} , LC_{50}), и стандартной ошибки этих значений ($\pm SE$). Значения параметров и их статистическую значимость определяли с помощью пакета программного обеспечения «drc» в программе R [24].

Данные по влиянию растворов противогололёдной смеси на параметры жизненного цикла *Moina macroscopa* в хроническом эксперименте представлены в виде средних значений продолжительности жизни самок (*L*, сутки), удельной скорости роста ювенильных самок (μ_{juv} , 1/сутки), плодовитости (*F*, потомков/самку) со стандартным отклонением ($\pm SD$). Статистическую значимость влияния концентрации противогололёдной смеси на параметры жизненного цикла оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA).

Результаты исследования и обсуждение

Для экологического прогнозирования качества среды обитания и осуществления мер по защите экосистем от химического загрязнения соледержащими смесями чрезвычайно важно иметь представление о том, насколько солёность может превысить фоновые концентрации в среде, не

оказав негативного воздействия на биоту. В настоящей работе исследовалось влияние противогололёдного реагента на живые организмы с помощью нескольких контактных биотестов на основе растительных и животных тест-объектов (лук репчатый *A. cepa*, ветвистоусый рачок *M. macroscopa*). Угнетающее действие реагента оценивалось на уровне организма (выживаемость и параметры жизненного цикла рачков, ростовые параметры лука) и клеточном уровне (митотический индекс).

Концентрации смеси, при которых наблюдалось 50% угнетение роста корней лука (EC_{50}) и 50% смертность рачков (LC_{50}), оказались достаточно близкими (табл. 1).

Таблица 1 [Table 1]

**Влияние растворов противогололёдной смеси на индикаторные
параметры *Allium*-тест и острых тестов с *Moina macroscopa*
[The effect of deicing salt solutes on the endpoints
of *Allium*-test and acute tests with *Moina macroscopa*]**

Показатель теста [Test indicator]	df	Параметр [Parameter]	Значение параметра \pm SE [Parameter value \pm SE]	<i>p</i> -value
<i>Allium</i> -тест [<i>Allium</i> -test]				
Средняя длина корня, см [Average root length, cm]	33	b	1,23 \pm 0,50	0,019
		d	1,18 \pm 0,12	<0,001
		EC_{50}	6,30 \pm 1,94	0,003
Сумма длин корней, см [Sum of the root lengths, cm]	30	b	1,48 \pm 0,81	0,080
		d	44,80 \pm 6,02	<0,001
		EC_{50}	5,17 \pm 1,91	0,011
Митотический индекс [Mitotic index], %	32	b	23,28 \pm 93,79	0,805
		d	6,93 \pm 0,37	<0,001
		EC_{50}	10,40 \pm 1,65	<0,001
24/48-часовой тест на ветвистоусых рачках [24/48-hour Cladocera test]				
Выживаемость рачков, шт. [Survival of animals, numbers]	22	b	8,1 \pm 1,7/9,5 \pm 1,8	<0,001
		d	19,7 \pm 0,7/19,8 \pm 0,6	<0,001
		LC_{50}	5,8 \pm 0,2/5,1 \pm 0,1	<0,001

Примечание. df – число степеней свободы. Параметры логистической функции: b – угол наклона, d – верхнее предельное значение показателя теста, EC_{50} , LC_{50} – концентрация смеси, при которой происходит снижение значения показателя теста на 50% по сравнению с верхним предельным значением.

[*Note.* df - degrees of freedom. Parameters of logistic function: b - The relative slope, d - Upper limit of the test indicator, EC_{50} , LC_{50} - The concentration producing a response of the test indicator 50% below the upper limit].

Дозовые зависимости средней длины лука и выживаемости рачков отличались скоростью реакции на увеличение концентрации растворенной смеси (рис. 1). Для индикаторных показателей лука наблюдалось относительно равномерное снижение показателя по мере увеличения концентрации (рис. 1, *a*). Выживаемость рачков резко снижалась при достижении пороговой концентрации смеси 4 г/л (рис. 1, *b*). Полное ингибирование роста корней лука наблюдалось при концентрации смеси 20 г/л, тогда как гибель всех тестируемых животных в острых опытах происходила при концентрации 8 г/л.

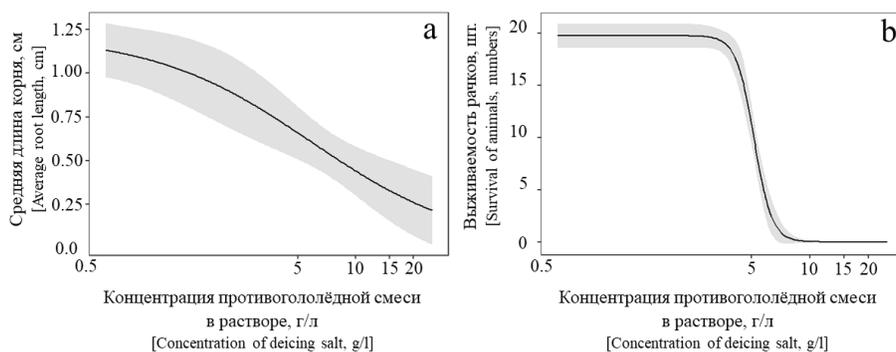


Рис. 1. Регрессионные зависимости средней длины корня лука *Allium cepa* в *Allium*-тесте (а) и выживаемости рачков *Moina macroscopa* в остром 48-часовом тесте (б) от концентрации противогололёдной смеси в растворе. Область, выделенная серым цветом вокруг регрессионной кривой, – границы 95% доверительного интервала [Fig. 1. Regression curves for average root lengths of *Allium cepa* in *Allium*-test (a) and survival of *Moina macroscopa* females in an acute 48-hour test (b) under the effect of the concentration of deicing salt. The gray band around the regression curve is the 95% confidence interval for predicted values]

Хронический тест не показал значимого влияния растворов смеси в диапазоне концентраций от 0,3 до 5,0 г/л на выживаемость и плодовитость самок *M. macroscopa*. Удельная скорость ювенильного роста рачков статистически значимо ($p \leq 0,05$) отличалась от контроля только при концентрации смеси в растворе 5,0 г/л. Полная гибель животных наблюдалась на вторые сутки эксперимента при концентрации смеси в растворе 6,0 г/л и выше (табл. 2).

Таблица 2 [Table 2]

**Влияние растворов противогололёдной смеси на параметры
жизненного цикла *Moina macroscopa***

[The effect of deicing salt solutes on the life cycle parameters of *Moina macroscopa*]

Концентрация смеси, г/л [Concentration of deicing salt, g/l]	$L \pm SD$	$\mu_{\text{juv}} \pm SD$	$F \pm SD$
Control	$9,0 \pm 3,6$	$0,38 \pm 0,03$	$53,93 \pm 31,10$
0,3	$8,7 \pm 3,8$	$0,40 \pm 0,03$	$56,20 \pm 31,61$
0,6	$11,1 \pm 4,9$	$0,39 \pm 0,03$	$80,00 \pm 48,23$
1,3	$9,7 \pm 4,5$	$0,38 \pm 0,03$	$66,93 \pm 37,76$
2,5	$9,3 \pm 5,9$	$0,39 \pm 0,03$	$58,73 \pm 47,15$
5,0	$9,2 \pm 4,0$	$0,33 \pm 0,08^{**}$	$51,47 \pm 33,69$
6,0	$1,3 \pm 0,5^*$	–	–
8,0	$1,0 \pm 0,0^*$	–	–

Примечание. L – продолжительность жизни, сутки; μ_{juv} – удельная скорость роста ювенильных самок, 1/сутки; F – плодовитость, потомков/самку; * $p < 0,001$, ** $p = 0,038$.

[*Note.* L - Lifespan, days; μ_{juv} - Specific growth rate of juvenile females, 1/day; F - Fecundity, neonates/female; * $p < 0,001$, ** $p = 0,038$].

В работе зафиксированы схожие по величине концентрации соледержащей смеси в растворе, при которых наблюдаются угнетение роста корней лука и снижение выживаемости рачков. Эти величины в целом соответству-

ют величине критической солёности 5–8‰, при превышении которой происходят качественные изменения во внешней и внутренней среде организмов [25].

Как и большинство часто используемых химических средств для борьбы со льдом на дорогах, соледержащая смесь «Бионорд» содержит большое количество (около 85% от общей массы) хлоридов натрия и кальция [3]. Механизм действия растворов соледержащей смеси на живые организмы может быть связан как с непосредственным действием солей, так и других примесей, которые входят в её состав.

Литературные данные по влиянию хлорида натрия на *M. macroscopa* показывают, что параметры жизненного цикла представителей этого вида [26] и скорость роста популяции [22] практически не изменяются в диапазоне концентраций соли от 0 до 4,0–4,5 г/л. В настоящем исследовании параметры жизненного цикла не снижались при воздействии концентраций модельной смеси до 5,0 г/л, что с учётом массовой доли хлоридов натрия и кальция даёт схожие оценки.

Удельная электропроводность – интегральный показатель, который позволяет оценить количество растворённых в воде катионов и анионов и указывает на условия, к которым должна приспособиться система осмотической регуляции пресноводных организмов. Сравнение полученных в работе полулетальных концентраций используемой смеси с литературными данными по влиянию хлорида натрия на выживаемость рачка *Daphnia magna* показывает сопоставимые значения концентраций и удельной электропроводности растворов. Так, LC_{50} для NaCl в острых 48-часовых тестах на *D. magna* составляла 5,5 и 6,6 г/л, а соответствующие этим концентрациям электропроводности – 9,8 и 10,0 мС/см [23, 27]. В проведённой работе значению LC_{50} 5,1 г/л в остром 48-часовом тесте соответствует электропроводность 8,2 мС/см. Можно предположить, что негативный эффект растворов соледержащей смеси, протестированной в экспериментах, в первую очередь связан с действием входящих в её состав хлористых солей и может оцениваться по величине электропроводности раствора. Если бы в её состав входили токсичные вещества, действующие в низких концентрациях, следовало бы ожидать проявления негативных эффектов при более низких концентрациях или значениях электропроводности, не совпадающих с литературными данными по воздействию солей хлора на пресноводные организмы.

На основании результатов экспериментов и нормативов применения смеси «Бионорд» можно оценить опасность загрязнения пресных вод этим реагентом. Рекомендованная норма расхода смеси, в зависимости от погодных условий, составляет 40–65 г/м² [21]. В качестве наихудшего сценария рассмотрим случай, когда при отсутствии своевременной уборки обработанной поверхности, регламентированной правилами использования [20, 21], смесь вместе со сточными водами попадёт в водоём. В такой ситуации, основываясь на полученных в работе значениях LC_{50} для выживаемости пре-

сноводного ветвистоусого рачка (5,1 г/л) и EC_{50} для угнетения роста корней лука (5,2 г/л), сток с 1 м² обработанной поверхности может привести к загрязнению 8–13 л пресной воды. В реальной ситуации степень загрязнения антигололёдными смесями окружающей среды зависит от режима уборки и характеристики обрабатываемых территорий, климатических и других факторов [8]. Поэтому для конкретной местности или ситуации оценка уровня потенциального загрязнения требует детального исследования.

При оценке концентраций растворов соледержащей смеси, которые оказывают негативное воздействие на ветвистоусых ракообразных и репчатый лук, показано статистически значимое ($p \leq 0,05$) влияние на выживаемость рачка *M. macroscopa* и ингибирование роста корней лука *A. cepa* при концентрациях смеси, близких к уровню критической солености для биологических объектов (5–8%). При этом последствия химического загрязнения поверхностных и подземных вод необходимо рассматривать в долгосрочной перспективе. Тенденцию постепенного накопления хлоридов в водных экосистемах, расположенных вблизи территорий, где в течение продолжительного периода времени применялись соледержащие антигололёдные средства, подтверждают многочисленные исследования [1–3, 8, 28, 29]. Более того, в литературе приведены данные о достаточно высоких концентрациях солей в пробах воды из природных источников во время стока дорожных солей. Например, концентрация солей в пробах, отобранных из ручьев в районе города Милуоки (США) достигала 10 г/л [30]. Также следует отметить работы исследователей, продемонстрировавших негативное влияние дорожных солей на структуру пищевых сетей и взаимоотношения водных организмов даже при относительно низком уровне химического загрязнения [1, 3, 4].

Заключение

Таким образом, проведена оценка полулетальных (LC_{50}) концентраций противогололёдной соледержащей смеси «Бионорд» в острых 24- и 48-часовых опытах на ветвистоусых рачках *M. macroscopa* (5,8 и 5,1 г/л соответственно). С применением *Allium*-тест оценены полуэффективные (EC_{50}) концентрации противогололёдной смеси для угнетения показателей роста корней лука (6,3; 5,2 и 10,4 г/л для средней и суммарной длин и пролиферативной активности соответственно).

Сравнение с данными о влиянии NaCl на ветвистоусых ракообразных дает основание заключить, что негативное воздействие растворов соледержащей смеси «Бионорд» в первую очередь связано с входящими в её состав солями хлора и натрия и может определяться по значению электропроводности раствора. По результатам работы дана оценка ситуации, когда всё использованное по нормативу средство вместе со сточными водами попадёт в водоём. В этом случае сток с каждого квадратного метра обработанной по-

верхности приведет к загрязнению 8–13 л пресной воды. Такое загрязнение хлоридами натрия и кальция водных экосистем может оказать негативное влияние на выживаемость пресноводного зоопланктона и привести к значительным экологическим последствиям.

Полученные в настоящей работе критические концентрации растворов противогололёдной соледержащей смеси «Бионорд» можно использовать для грубой оценки потенциальной опасности воздействия этого реагента для водных экосистем. Для более точных оценок возможных негативных последствий требуется проведение натурных измерений, долговременного мониторинга, моделирования распространения и накопления входящих в состав реагента компонентов в различных звеньях природных экосистем в местах его интенсивного применения.

Литература

1. Meter R.J.V., Swan Ch.M., Leips J., Snodgrass J.W. Road salt stress induces novel food web structure and interactions // *Wetlands*. 2011. Vol. 31, № 5. PP. 843–851. doi: [10.1007/s13157-011-0199-y](https://doi.org/10.1007/s13157-011-0199-y)
2. Godwin K.S., Hafner S.D., Buff M.F. Long-term trends in sodium and chloride in the Mohawk River, New York: the effect of fifty years of road-salt application // *Environmental Pollution*. 2003. Vol. 124. PP. 273–281. doi: [10.1016/s0269-7491\(02\)00481-5](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00481-5)
3. Schuler M.S., Hintz W.D., Jones D.K., Lind L.A., Mattes B.M., Stoler A.B., Sudol K.A., Relyea R.A. How common road salts and organic additives alter freshwater food webs: in search of safer alternatives // *Journal of Applied Ecology*. 2017. Vol. 54, № 5. PP. 1353–1361. doi: [10.1111/1365-2664.12877](https://doi.org/10.1111/1365-2664.12877)
4. Hofman J., Trávníčková E., Anděl P. Road salts effects on soil chemical and microbial properties at grassland and forest site in protected natural areas // *Plant, soil and environment*. 2012. Vol. 58, № 6. PP. 282–288. doi: [10.17221/5994-PSE](https://doi.org/10.17221/5994-PSE)
5. Velasco J., Gutie´rrez-Ca´novas C., Botella-Cruz M., Sa´nchez-Ferna´ndez D., Arribas P., Carbonell J.A., Milla´n A., Pallare´s S. Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context // *Philosophical Transaction of the Royal Society B*. 2019. Vol. 374, № 1764. doi: [10.1098/rstb.2018.0011](https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0011)
6. Kefford B., Dunlop J., Nugegoda D., Choy S. Understanding salinity thresholds in freshwater biodiversity: freshwater to saline transition. In: *Salt, Nutrient, Sediment and Interactions: Findings from the National River Contaminants Program*. Land & Water Australia, 2007. PP. 9–28.
7. Fay L., Shi X. Environmental Impacts of Chemicals for Snow and Ice Control: State of the Knowledge // *Water Air and Soil Pollution*. 2012. Vol. 223, № 5. PP. 2751–2770. doi: [10.1007/s11270-011-1064-6](https://doi.org/10.1007/s11270-011-1064-6)
8. Ramakrishna D.M., Viraraghavan T. Environmental impact of chemical deicers – a review // *Water, Air, and Soil Pollution*. 2005. Vol. 166. PP. 49–63. doi: [10.1007/s11270-005-8265-9](https://doi.org/10.1007/s11270-005-8265-9)
9. Dugan H.A., Bartlett S.L., Burke S.M., Doubek J.P., Krivak-Tetley F.E., Skaff N.K., Summers J.C., Farrell K.J., McCullough I.M., Morales-Williams A.M., Roberts D.C., Ouyang Z., Scordo F., Hanson P.C., Weathers K.C. Salting our freshwater lakes // *PNAS*. 2017. Vol. 114, № 17. PP. 4453–4458. doi: [10.1073/pnas.1620211114](https://doi.org/10.1073/pnas.1620211114)
10. Никифорова Е.М., Кошелева Н.Е., Хайбрахманов Т.С. Экологические последствия применения противогололедных реагентов для почв восточного округа Москвы // *Вестник Московского университета. Серия 5: География*. 2016. № 3. С. 40–49.
11. Peredo-Alvarez V.M., Sarma S.S.S., Nandini S. Combined effect of concentrations of

- algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera) // *Revista de Biologia Tropical*. 2003. Vol. 51, № 2. PP. 399–407.
12. Герасимов А.О., Чугунова М.В. Изучение воздействия хлоридных противогололедных реагентов на высшие растения и почвенные микроорганизмы в лабораторном и полевом экспериментах // *Инженерная геология*. 2016. № 6. С. 48–53.
 13. Шишова Т.К., Матвеева Т.Б., Казанцев И.В. Влияние противогололедного материала «Бионорд» на развитие растений // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2017. Т. 26, № 1. С. 78–84.
 14. Зотина Т.А., Трофимова Е.А., Александрова Ю.В., Анищенко О.В. Оценка качества донных отложений среднего участка р. Енисей с помощью *Allium* теста // *Сибирский экологический журнал*. 2019. № 3. С. 327–340. doi: [10.15372/SEJ20190309](https://doi.org/10.15372/SEJ20190309)
 15. Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. 1985. Vol. 102. PP. 99–112. doi: [10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x)
 16. Leme D.M., Marin-Morales M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // *Mutation Research*. 2009. Vol. 682. PP. 71–81. doi: [10.1016/j.mrrev.2009.06.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002)
 17. Junior H.M., Silva J.D., Arenson A., Portela C.S., Ferreira I.C.F.d.S., Henriques J.A.P. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries // *Chemosphere*. 2007. Vol. 67. PP. 1211–1217. doi: [10.1016/j.chemosphere.2006.10.048](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.048)
 18. Oskina N., Lopatina T., Anishchenko O., Zadereev E. High resistance of resting eggs of cladoceran *Moina macrocopa* to the effect of heavy metals // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2019. Vol. 102, № 3. PP. 335–340. doi: [10.1007/s00128-018-2473-7](https://doi.org/10.1007/s00128-018-2473-7)
 19. Лопатина Т.С., Бобровская Н.П., Оськина Н.А., Задереев Е.С. Сравнительное исследование токсического воздействия никеля и кадмия на активные и покоящиеся стадии ветвистогого рачка *Moina macrocopa* // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2017. Т. 10, № 3. С. 358–372. doi: [10.17516/1997-1389-0031](https://doi.org/10.17516/1997-1389-0031)
 20. Стандарт организации СТО 001–80119761–2010. Противогололедные материалы «Бионорд». Технические условия. ООО «Уральский завод противогололедных материалов». Пермь, 2010. 22 с. URL: <http://www.sakhsnabservice.ru/data/uploads/cert/7def7457b14db93343382fe698d12e99.pdf> (дата обращения: 06.04.2020).
 21. Инструкция по использованию противогололедного материала «БИОНОРД» (ТУ 2149–009–93988694–2007) на дорогах с твердым покрытием, пешеходных тротуарах, в том числе плиточных, пассажирских платформах, грузовых площадках, привокзальных территориях, пешеходных и автомобильных мостах. 5 с. URL: http://vdknl.ru/file/0007/7072/%D0%9F%D0%91_bionord.pdf (дата обращения: 06.04.2020).
 22. Sarma S.S.S., Nandini S., Morales-Ventura J., Delgado-Martí nez I., Gonza'lez-Valverde L. Effects of NaCl salinity on the population dynamics of freshwater zooplankton (rotifers and cladocerans) // *Aquatic Ecology*. 2006. Vol. 40. PP. 349–360. doi: [10.1007/s10452-006-9039-1](https://doi.org/10.1007/s10452-006-9039-1)
 23. Schuytema G.S., Nebeker A.V., Stutzman T.W. Salinity tolerance of *Daphnia magna* and potential use for estuarine sediment toxicity test // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1997. Vol. 33, № 2. PP. 194–198. doi: [10.1007/s002449900242](https://doi.org/10.1007/s002449900242)
 24. Ritz Ch., Streibig J.C. Bioassay analysis using R // *Journal of Statistical Software*. 2005. Vol. 12, № 5. doi: [10.18637/jss.v012.i05](https://doi.org/10.18637/jss.v012.i05)
 25. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. Л. : Наука, 1974. 235 с.
 26. Rasdi N.W., Suhaimi H., Hagiwara A., Ikhwanuddin M., Ghaffar M.A., Yuslan A., Najuwu S. Effect of different salinities gradient on fatty acid composition, growth, survival

- and reproductive performance of *Moina macroscopa* (Straus 1820) (Crustacea, Cladocera) // Preprints. 2019. 2019060205. doi: [10.20944/preprints201906.0205.v1](https://doi.org/10.20944/preprints201906.0205.v1)
27. Martínez-Jerónimo F., Martínez-Jerónimo L. Chronic effect of NaCl salinity on a freshwater strain of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera): a demographic study // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2007. Vol. 67, № 3. PP. 411–6. doi: [10.1016/j.ecoenv.2006.08.009](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.08.009)
28. Howard K.W.F., Maier H. Road de-icing salt as a potential constraint on urban growth in the Greater Toronto Area, Canada // Journal of Contaminant Hydrology. 2007. Vol. 91, № 1–2. PP. 146–170. doi: [10.1016/j.jconhyd.2006.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2006.10.005)
29. Thunqvist E.L. Regional increase of mean chloride concentration in water due to the application of deicing salt // Science of the Total Environment. 2004. Vol. 325, № 1–3. PP. 29–37. doi: [10.1016/j.scitotenv.2003.11.020](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.020)
30. Corsi S.R., Graczyk D.J., Geis S.W., Booth N.L., Richards K.D. Fresh look at road salt: aquatic toxicity and water-quality impacts on local, regional, and national scale // Environmental Science and Technology. 2010. Vol. 44, № 19. PP. 7376–7382. doi: [10.1021/es101333u](https://doi.org/10.1021/es101333u)

Поступила в редакцию 12.05.2020 г.; повторно 17.07.2020 г.; 05.08.2020 г.
принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Лопатина Татьяна Станиславовна – канд. биол. наук, н.с. лаборатории биофизики экосистем, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/50).

E-mail: lopatinats@mail.ru

Александрова Юлия Владимировна – м.н.с. лаборатории биоломинесцентных и экологических технологий, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/50).

E-mail: Yuliyana_aleksandrova@mail.ru

Анищенко Олеся Валерьевна – канд. биол. наук, зав. аналитической лабораторией, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/50).

Грибовская Илиада Владимировна – канд. биол. наук, с.н.с. аналитической лаборатории, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/50).

E-mail: gribov@ibp.ru

Оськина Наталья Александровна – м.н.с. лаборатории биоломинесцентных и экологических технологий, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/50).

E-mail: oskina_nata@mail.ru

Зотина Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, доцент, с.н.с. лаборатории радиоэкологии, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок 50/50); доцент базовой кафедры медико-биологических систем и комплексов, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет (Россия, 660049, г. Красноярск, пр. Свободный, 79).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4792-1582>

E-mail: t_zotina@ibp.ru

Заdereев Егор Сергеевич – канд. биол. наук, доцент, в.н.с. лаборатории биофизики экосистем, Институт биофизики СО РАН, Красноярский научный центр СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок 50/50); доцент кафедры биофизики, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет (Россия, 660049, г. Красноярск, пр. Свободный, 79).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2366-8604>

E-mail: egzadereev@gmail.com

Для цитирования: Лопатина Т.С., Александрова Ю.В., Анищенко О.В., Грибовская И.В., Оськина Н.А., Зотина Т.А., Заdereев Е.С. Влияние растворов противогололёдной смеси на *Moina macrocopa* и *Allium cepa* в биотестовом эксперименте // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 162–178. doi: 10.17223/19988591/51/9

For citation: Lopatina TS, Aleksandrova YV, Anishchenko OV, Gribovskaya IV, Oskina NA, Zotina TA, Zadereev ES. The effect of deicing salt solutes on *Moina macrocopa* and *Allium cepa* in a toxicity test experiment. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:162-178. doi: 10.17223/19988591/51/9 In Russian, English Summary

**Tatiana S Lopatina¹, Yuliyana V. Aleksandrova¹, Olesya V. Anishchenko¹,
Liada V. Gribovskaya¹, Nataliya A. Oskina¹, Tatiana A Zotina^{1,2}, Egor S. Zadereev^{1,2}**

¹*Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

²*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

The effect of deicing salt solutes on *Moina macrocopa* and *Allium cepa* in a toxicity test experiment

Chloride salts are the most commonly used deicing materials for winter maintenance of roads. Numerous studies indicate a significant increase in the salinity of aquatic ecosystems associated with the long-term use of deicing materials in countries located in cold climates. The functioning of ecosystems largely depends on salinity, since salinity is one of the key factors determining the species composition, the structure of food webs and the productivity of aquatic communities. Given the growing threat of salinization of groundwater and surface waters, it is extremely important to study the effect of deicing materials on the biota and functioning of aquatic ecosystems. The aim of this research is to determine the threshold concentrations of solutions of the deicing salt mixture “Bionord” containing sodium and calcium chlorides, at which negative effects on the development of animal and plant test objects are observed.

In this study, we used the salt-containing mixture “Bionord” as a model deicer. Similarly, with the most commonly used ice melting chemicals, the «Bionord» salt mixture contains a large amount of sodium and calcium chlorides (about 85% of the total weight). To evaluate the toxicity of the deicer solutions, we used acute and chronic toxicity tests with cladoceran *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Cladocera: Moinidae) and standard onion-based test with *Allium cepa* L. (Liliopsida: Amaryllidaceae) (*Allium*-test). In acute and chronic toxicity tests with Cladocera, the females on the first day of their life (body size 0.5-0.6 mm) were placed individually in jars with aged (not less than for 72 h) tap water with a volume of 20 ml with the addition of a deicer at a certain concentration. A group of animals that was placed in the medium without the deicer was used as a control. In the acute toxicity tests, we used the following concentration of the deicer: 1.3; 2.5; 4.0; 5.0; 6.0; 8.0; 10.0 g/l. The mortality of animals was recorded 24 and 48 hours after the start of the experiment. The concentration of the deicer (LC₅₀) at which 50% of animals was observed to die, compared to the control, was determined in the acute toxicity test. In a chronic toxicity test, animals were tested in the following range of concentrations of the deicer: 0.3; 0.6; 1.3; 2.5; 5.0; 6.0 and 8.0 g/l. The chronic toxicity test was conducted until the death of all test animals. Based on the data obtained in the chronic toxicity test, the specific growth rate of juvenile females, average fecundity, and average life span of *M. macrocopa* were calculated for each concentration of the deicer. Bulbs of onions of the Stuttgarterisen variety with a diameter of 1.8 ± 0.1 cm and a weight of 2.27 ± 0.17 g were used in the onion test.

Bulbs with their bottoms were placed in test tubes containing 20 ml of a solute of the deicer or tap water for 48 hours. Three bulbs were tested for each concentration and for the control. The following concentrations of the deicer were used in the onion test: 1.0; 2.5; 5.0; 7.0; 10.0; 15.0; 20.0; 50.0 g/l. The general toxic and cytotoxic effects were evaluated in the onion test. The average root length and the total root length on each bulb were used as indicators of the total toxicity of the solutions of deicer. To evaluate proliferative activity, we calculated the mitotic index as the fraction of dividing cells in the apical root meristem to the total number of cells. Based on the results of the experiments, we determined median effective mixture concentrations (EC_{50}) at which there is a 50% decrease, compared to the control, in the values of root growth indicators: average root length, sum of root lengths on each bulb and mitotic index.

Median lethal concentration (LC_{50}) of the deicing salt determined in the 48-hour acute toxicity test with females of *M. macrocopa* was equal to 5.1 g/l. In the chronic test, we showed that the exposure to the solutions of the deicing salt in the range of concentrations from 0.3 to 5.0 g/l does not affect the life span, specific growth rate of juveniles and fecundity of females of *M. macrocopa*. The median effective concentration (EC_{50}) of the deicing salt determined in the *Allium*-tests were 6.3, 5.2 and 10.4 g/l for the sum of root lengths, average root length on each bulb and proliferative activity at the tips of roots (mitotic index), respectively (See Table 1 and 2). Complete inhibition of onion root growth was observed at the concentration of the deicer equal to 20 g/l, while the death of all test animals in the acute toxicity test occurred at the concentration of the deicer equal to 8,0 g/l (See Fig. 1).

Thus, we demonstrated that similar concentrations of the deicer induced 50% inhibition of the growth of onion roots and 50% mortality of cladocerans. These values, in general, corresponded to a critical salinity of 5-8 ‰ above which qualitative changes occur both in the external and internal condition of aquatic animals. The electrical conductivity of the deicer solutions, which had a negative effect on the selected test species, coincides with the previously obtained values of the electrical conductivity of sodium chloride solutions harmful to cladocerans. We can assume that the main mechanism of the effect of the deicing material that we study is associated with the biological effect of its chlorine and sodium salts. Taking this into account, the value of electrical conductivity measured for solutions of deicing salt can be used to assess its negative potential effects. We estimated that in the absence of timely cleaning, regulated by the rules for using the material, the runoff from each square meter of the treated surface can lead to the pollution of 8-13 liters of fresh water. Thus, the basic requirement for the use of deicing salts on roads is the need to comply with the cleaning regime of the treated surfaces. Otherwise, the gradual accumulation of sodium and calcium chlorides in water bodies can cause an increase in salinity which will affect the survival of freshwater aquatic organisms and lead to serious disturbances in the functioning of aquatic ecosystems.

The paper contains 1 Figure, 2 Tables and 30 References.

Key words: salinity; toxicity test; Cladocera, *Allium*-test; aquatic ecosystems.

Funding: This work was supported by the joint grant from the Russian Foundation for Basic Research, the Government of Krasnoyarsk Krai, and the Krasnoyarsk Krai Fund for Supporting Scientific and Scientific-Technical Activities (Grant No 19-44-240014).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Meter RJV, Swan ChM, Leips J, Snodgrass JW. Road salt stress induces novel food web structure and interactions. *Wetlands*. 2011;31(5):843-851. doi: 10.1007/s13157-011-0199-y

2. Godwin KS, Hafner SD, Buff MF. Long-term trends in sodium and chloride in the Mohawk River, New York: The effect of fifty years of road-salt application. *Environmental Pollution*. 2003;124:273-281. doi: [10.1016/s0269-7491\(02\)00481-5](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00481-5)
3. Schuler MS, Hintz WD, Jones DK, Lind LA, Mattes BM, Stoler AB, Sudol KA, Relyea RA. How common road salts and organic additives alter freshwater food webs: In search of safer alternatives. *J Applied Ecology*. 2017;54(5):1353-1361. doi: [10.1111/1365-2664.12877](https://doi.org/10.1111/1365-2664.12877)
4. Hofman J, Trávníčková E, Anděl P. Road salts effects on soil chemical and microbial properties at grassland and forest site in protected natural areas. *Plant, soil and environment*. 2012;58(6):282-288. doi: [10.17221/5994-PSE](https://doi.org/10.17221/5994-PSE)
5. Velasco J, Gutiérrez-Ca'novas C, Botella-Cruz M, Sa'ñchez-Ferna'ndez D, Arribas P, Carbonell JA, Millá'n A, Pallare's S. Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*. 2019;374(1764):20180011. doi: [10.1098/rstb.2018.0011](https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0011)
6. Kefford B, Dunlop J, Nuggeoda D, Choy S. Understanding salinity thresholds in freshwater biodiversity: freshwater to saline transition. In: *Salt, Nutrient, Sediment and Interactions: Findings from the National River Contaminants Program*. Lovett S, Price P and Edgar B, editors. Publisher: Land & Water Australia Publ.; 2007. pp. 9-28.
7. Fay L, Shi X. Environmental impacts of chemicals for snow and ice control: State of the knowledge. *Water Air and Soil Pollution*. 2012;223(5):2751-2770. doi: [10.1007/s11270-011-1064-6](https://doi.org/10.1007/s11270-011-1064-6)
8. Ramakrishna DM, Viraraghavan T. Environmental impact of chemical deicers – A review. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2005;166:49-63. doi: [10.1007/s11270-005-8265-9](https://doi.org/10.1007/s11270-005-8265-9)
9. Dugan HA, Bartlett SL, Burke SM, Doubek JP, Krivak-Tetley FE, Skaff NK, Summers JC, Farrell KJ, McCullough IM, Morales-Williams AM, Roberts DC, Ouyang Z, Scordo F, Hanson PC, Weathers KC. Salting our freshwater lakes. *PNAS*. 2017;114(17):4453-4458. doi: [10.1073/pnas.1620211114](https://doi.org/10.1073/pnas.1620211114)
10. Nikiforova EM, Kosheleva NE, Khaibrakhmanov TS. Ecological impact of antiglaze treatment on soils of the eastern district of Moscow. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 5, Geografia = Moscow University Bulletin. Series 5, Geography*. 2016;3:40-49. In Russian, English Summary
11. Peredo-Alvarez VM, Sarma SSS, Nandini S. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*. 2003;51(2):399-407.
12. Gerasimov AO, Chugunova MV. Izuchenie vozdeystviya khloridnykh protivogolodnykh reagentov na vysshie rasteniya i pochvennye mikroorganizmy v laboratornom i polevom eksperimentakh [The study of anti-ice materials effect on the high plants and soil microorganisms in the laboratory and field experiments]. *Inzhenernaya geologiya*. 2016;6:48-53. In Russian
13. Shishova TK, Matveeva TB, Kazantsev IV. Vliyanie protivogolodnogo materiala «Bionord» na razvitie rasteniy [Influence of de-icing material “Bionord” on the development of plants]. *Samarskaya Luka: Problemy regional'noy i global'noy ekologii*. 2017;26(1):78-84. In Russian
14. Zotina TA, Trofimova EA, Alexandrova YuV, Anishchenko OV. Assessment of the quality of bottom sediments in the middle reaches of the Yenisei river by Allium test. *Contemporary Problems of Ecology*. 2019;12(3):265-274. doi: doi.org/10.1134/S1995425519030120.
15. Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102:99-112. doi: [10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x)
16. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*. 2009;682:71-81. doi: [10.1016/j.mrrev.2009.06.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002)

17. Junior HM, Silva Jd, Arenson A, Portela CS, Ferreira ICFdS, Henriques JAP. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere*. 2007;67:1211-1217. doi: [10.1016/j.chemosphere.2006.10.048](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.048)
18. Oskina N, Lopatina T, Anishchenko O, Zadereev E. High resistance of resting eggs of cladoceran *Moina macrocopa* to the effect of heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2019;102(3):335-340. doi: [10.1007/s00128-018-2473-7](https://doi.org/10.1007/s00128-018-2473-7)
19. Lopatina TS, Bobrovskaya NP, Oskina NA, Zadereev ES. Comparative study of the toxic effect of cadmium and nickel on the active and resting stages of Cladoceran *Moina macrocopa*. *Zhurnal Sibirskogo Federal'nogo Universiteta. Biologiya = J Siberian Federal University. Biology* 2017;10(3):358-372. doi: [10.17516/1997-1389-0031](https://doi.org/10.17516/1997-1389-0031) In Russian, English Summary
20. *Standart organizatsii STO 001-80119761-2010*. Protivogolodnyye materialy «Bionord». Tekhnicheskie usloviya. OOO «Ural'skiy zavod protivogolodnykh materialov» [Organisation standard STO 001-80119761-2010. Deicing materials Bionord. Technical conditions. Ural Plant of Deicing Materials LLC]. Perm; 2010. 22 p. [Electronic resource]. Available at: <http://www.sakhsnabservice.ru/data/uploads/cert/7def7457b14db93343382fe698d12e99.pdf> (accessed 06.04.2020). In Russian
21. *Instruktsiya po ispol'zovaniyu protivogolodnogo materiala «BIONORD» (TU 2149-009-93988694-2007) na dorogakh s tverdyim pokrytiem, peshekhodnykh trotuarakh, v tom chisle plitochnykh, passazhirskikh platformakh, gruzovykh ploshchadkakh, privokzal'nykh territoriyakh, peshekhodnykh i avtomobil'nykh mostakh* [Instructions for using deicing material Bionord (TU 2149-009-93988694-2007) on paved roads, sidewalks including tile ones, passenger platforms, cargo platforms, station areas, as well as pedestrian and road bridges]. 5 p. [Electronic resource]. Available at: http://vdkn.ru/file/0007/7072/%D0%9F%D0%91_bionord.pdf (accessed 06.04.2020). In Russian
22. Sarma SSS, Nandini S, Morales-Ventura J, Delgado-Martínez I, Gonza'lez-Valverde L. Effects of NaCl salinity on the population dynamics of freshwater zooplankton (rotifers and cladocerans). *Aquatic Ecology*. 2006;40:349-360. doi: [10.1007/s10452-006-9039-1](https://doi.org/10.1007/s10452-006-9039-1)
23. Schuytema GS, Nebeker AV, Stutzman TW. Salinity tolerance of *Daphnia magna* and potential use for estuarine sediment toxicity test. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1997;33(2):194-198. doi: [10.1007/s002449900242](https://doi.org/10.1007/s002449900242)
24. Ritz Ch, Streibig JC. Bioassay analysis using R. *J Statistical Software*. 2005;12(5). doi: [10.18637/jss.v012.i05](https://doi.org/10.18637/jss.v012.i05)
25. Khlebovich VV. Kriticheskaya solenost' biologicheskikh protsessov [Critical salinity of biological processes]. Leningrad: Nauka Publ.; 1974. 235 p. In Russian
26. Rasdi NW, Suhaimi H, Hagiwara A, Ikhwanuddin M, Ghaffar MA, Yuslan A, Najuwat S. Effect of different salinities gradient on fatty acid composition, growth, survival and reproductive performance of *Moina macrocopa* (Straus 1820) (Crustacea, Cladocera). *Preprints*. 2019;2019060205. doi: [10.20944/preprints201906.0205.v1](https://doi.org/10.20944/preprints201906.0205.v1)
27. Martínez-Jerónimo F, Martínez-Jerónimo L. Chronic effect of NaCl salinity on a freshwater strain of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera): A demographic study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007;67(3):411-416. doi: [10.1016/j.ecoenv.2006.08.009](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.08.009)
28. Howard KWF, Maier H. Road de-icing salt as a potential constraint on urban growth in the Greater Toronto Area, Canada. *J Contaminant Hydrology*. 2007;91(1-2):146-170. doi: [10.1016/j.jconhyd.2006.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2006.10.005)
29. Thunqvist EL. Regional increase of mean chloride concentration in water due to the application of deicing salt. *Science of the Total Environment*. 2004;325(1-3):29-37. doi: [10.1016/j.scitotenv.2003.11.020](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.020)

30. Corsi SR, Graczyk DJ, Geis SW, Booth NL, Richards KD. Fresh look at road salt: Aquatic toxicity and water-quality impacts on local, regional, and national scale. *Environmental Science and Technology*. 2010;44(19):7376-7382. doi: [10.1021/es101333u](https://doi.org/10.1021/es101333u)

Received 12 May 2020; Revised 17 July 2020;
Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:

Lopatina Tatiana S, Cand. Sci. (Biol.) Researcher, Laboratory of Ecosystem Biophysics, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: lopatinats@mail.ru

Aleksandrova Yuliyana V, Junior Researcher, Laboratory of Bioluminescent and Environmental Technologies, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: Yuliyana_aleksandrova@mail.ru

Anishchenko Olesya V, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory, Analytical Laboratory, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: hydrakr@rambler.ru

Gribovskaya Iliada V, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Analytical Laboratory, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: gribov@ibp.ru

Oskina Nataliya A, Junior Researcher, Laboratory of Bioluminescent and Environmental Technologies, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: oskina_nata@mail.ru

Zotina Tatiana A, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Senior Researcher, Analytical Laboratory, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation; Assoc. Prof., Department of Biophysics, School of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, 79 Svobodny Ave, Krasnoyarsk 660041, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4792-1582>

E-mail: t_zotina@ibp.ru

Zadereev Egor S, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Leading Researcher, Laboratory of Ecosystem Biophysics, Institute of Biophysics, Federal Research Centre Krasnoyarsk Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation; Assoc. Prof., Department of Biophysics, School of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, 79 Svobodny Ave, Krasnoyarsk 660041, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2366-8604>

E-mail: egzadereev@gmail.com

УДК 550.8; 550.73; 581.43
doi: 10.17223/19988591/51/10

П.А. Рязанцев¹, А.В. Кабонен², А.И. Родионов¹

¹ Карельский научный центр РАН, г. Петрозаводск, Россия

² Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск, Россия

Определение архитектоники корневой системы деревьев методом георадиолокации

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания
Отдел комплексных научных исследований КарНЦ РАН

*Методом георадиолокации проведено изучение корневой системы двух образцов яблони домашней (*Malus domestica*) и обобщены данные о методике наблюдений и обработки данных при изучении архитектоники корней. Показана возможность выделения погребенных объектов размерами от 1,5 до 5 см при использовании георадаров с зондирующей частотой 1–2 ГГц, что сопоставимо с ожидаемым размером скелетных корней. Выполнены полевые наблюдения георадаром ОКО-2 с антенным блоком частотой 1 700 Гц по исследованию архитектоники двух образцов яблонь, без применения способа раскопки, с целью определения влияния почвенно-гидрологических условий на процессы корнеобразования. По гиперболам дифрагированной волны на радарограммах определены местоположения скелетных корней исследуемых образцов, совокупность которых отражает распределение корневых систем в пространстве. При помощи трехмерных моделей проанализировано взаимоотношение морфологии кровли корненепроницаемых грунтов и корневой архитектуры образцов. Установлена трансформация корневой системы и наземной части деревьев в зависимости от положения подстилающих кристаллических пород. Обнаружено, что неглубокое залегание скальных грунтов приводит к изменению формы корневой системы от усеченного конуса к поверхностной.*

Ключевые слова: *Malus domestica; георадиолокация; корневая архитектоника; радарограммы; корненепроницаемый горизонт.*

Введение

Корневая система является критически важной составляющей любого дерева, отвечая за функции питания, запасаания полезных веществ и физического закрепления в грунте. Под архитектурой корневой системы подразумевается конфигурация корней в пространстве, а её формирование зависит от множества факторов, таких как вид растения, тип вмещающих грунтов, получаемое питание и т.д. [1]. Несмотря на важность изучения этого органа в контексте процессов развития и жизнедеятельности дерева, представление о структуре корневого аппарата зачастую неполное, в том числе и

вследствие ограничений доступных методов исследований. Основой экспериментального изучения корневых систем растений служит способ их раскопки [2, 3]. Однако это наносит значительный ущерб подземному пространству, а также самим растениям и в большинстве случаев приводит к их гибели. В некоторых случаях в черте города или на особо охраняемых природных территориях выполнение подобных работ невозможно или запрещено. Кроме того, данный способ требует значительных временных и физических затрат.

Изучение корневых систем деревьев на сегодняшний день является актуальной задачей, и для ее решения систематически привлекаются новые дистанционные методы, как лабораторные, так и полевые [4]. Например, получен ряд значимых результатов по использованию пространственных моделей для оценки влияния наклона поверхности грунта на процессы формирования корневой системы в рамках борьбы с процессами эрозии [5, 6]. К неразрушающим способам анализа корневой архитектуры относится и применение геофизических методов, в частности, георадиолокации, которая базируется на изучении закономерностей распространения высокочастотных электромагнитных волн в почвенно-грунтовом массиве [7–9]. Георадиолокацию в качестве средства описания корневых систем древесных растений начали применять с конца 90-х гг., когда была показана принципиальная возможность локализации положения отдельных корней георадаром [10]. Дальнейшие исследования в этом направлении продемонстрировали достаточно убедительные примеры определения по данным георадиолокации диаметра скелетных корней и как следствие возможность оценки их биомассы [11–13]. При этом значительная часть работ касается вопросов физических ограничений и разрешающей способности георадиолокации [14, 15].

Корневая система растений развивается по наследственно закреплённой схеме, но имеет тенденцию к адаптации под влиянием окружающей среды, в том числе вследствие взаимодействия с вмещающими грунтами, что проявляется, например, в процессах гидротропизма и хемотропизма [16]. Одним из природных факторов, оказывающих влияние на рост, является уровень залегания корненепроницаемых горизонтов, вследствие чего изменяется как структура корневой системы, так и надземная часть растений.

Изучение развития корневой системы в почвенно-грунтовом массиве относится к области научных и практических интересов для плодовых растений, среди которых одно из доминирующих мест занимает яблоня домашняя (*Malus domestica* Borkh.) [17]. Цель данной работы – продемонстрировать возможность исследования корневой архитектуры взрослых деревьев методом георадиолокации без применения способа раскопки. Кроме того, поставлена задача по определению пространственной конфигурации корневой системы в зависимости от глубины залегания кристаллических пород и оценке влияния подобных изменений на развитие надземной части деревьев.

Материалы и методики исследования

Метод георадиолокации основывается на излучении наносекундных электромагнитных импульсов определенной частоты в зондируемую среду с последующей регистрацией и анализом сигнала, отраженного от внутренних границ и локальных неоднородностей [18, 19]. К основным характеристикам, отвечающим за скорость распространения и затухания электромагнитной волны в грунтах, относятся относительная диэлектрическая проницаемость и электрическая проводимость, которые в свою очередь зависят от ряда физических свойств зондируемого грунта: минерального и гранулометрического состава, влажности, плотности, содержания органического вещества и т.д. Вариации таких параметров определяют, насколько глубоко и как точно можно выявить отражающие границы в грунтовом массиве. Важным параметром в георадиолокации служит частота излучаемого сигнала, с которой связаны глубинность и разрешающая способность зондирования. Существует оптимальный диапазон частот, так называемое «георадарное плато», в интервале частот от 10 до 2 000 МГц [20]. В методе георадиолокации используются сверхширокополосные импульсы, частотный спектр которых в приёмнике представляет собой произведение исходного зондирующего сигнала на частотные характеристики среды. Таким образом, существует принципиальная возможность спектрального анализа регистрируемого сигнала для определения параметров зондируемой среды [19]. Например, повышение электрической проводимости грунта за счёт увлажнения приводит к увеличению низкочастотной составляющей сигнала вследствие затухания высокочастотных гармоник.

Для выполнения полевой съёмки используется георадар – прибор, который состоит из передающей и принимающей антенны с фиксированной центральной частотой, блока регистрации и обработки. Наземные георадиолокационные (георадарные) измерения проводятся вдоль профильной линии или по системе профилей. Конфигурация сети наблюдений зависит от характера, размеров и глубины исследуемых границ и объектов. Принимаемый сигнал регистрируется как функция изменения амплитуды отражённого электромагнитного импульса во времени – георадарная трасса, совокупность таких трасс формирует радарограмму. Прослеживая на радарограмме ряд одинаковых импульсов на соседних трассах, так называемую ось синфазности, можно проследить отражающую границу (рефлектор). Кроме отраженных, существуют и другие типы регистрируемых волн, например дифрагированная. Её отличие в том, что электромагнитный импульс, отражённый от точки дифракции к поверхности, не подчиняется закону отражения, требующего равенства углов падения и отражения. Точками дифракции выступают локальные объекты: валуны, корни, подземные коммуникации, размеры которых сравнимы или меньше длины волны зондирующего сигнала [19]. На радарограммах дифрагированные волны выделяются по своему

годографу (зависимость времени прихода отражённой волны от пройденной дистанции) в форме гипербол, поиск и локализация которых является важной составляющей интерпретации (рис. 1). Вершина гиперболы указывает на положение искомого локального объекта, а по наклону «крыльев» гиперболы определяется скорость электромагнитной волны во вмещающей среде, что важно в случаях отсутствия информации о строении и электрофизических параметрах изучаемого разреза.

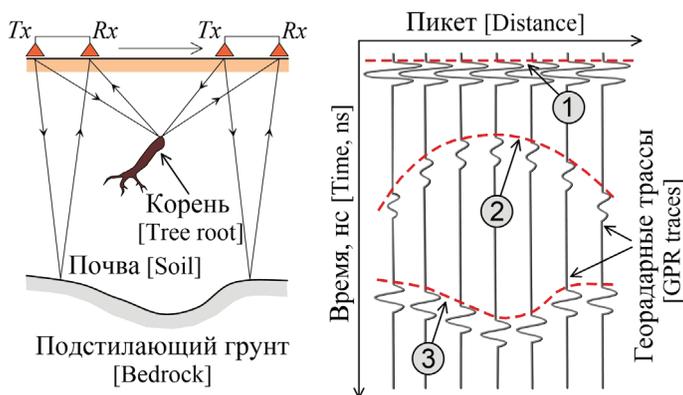


Рис. 1. Схема выполнения георадарной съемки (Tx – источник, Rx – приемник) и регистрируемая радарограмма, где: 1 – прямая волна в грунте; 2 – гипербола дифрагированной волны на локальном объекте; 3 – рефlector от подстилающих пород [Fig. 1. Schematic illustration of GPR reflection profiling (Tx - Transmitter, Rx - Receiver) and recorded radargram, where: 1 - Direct ground wave; 2 - Hyperbola of the diffracted wave; 3 - Bedrock reflections]

Глубина залегания отражающих границ (Z) рассчитана следующим образом:

$$Z = \frac{V \times t}{2}, \quad (1)$$

где V – скорость электромагнитной волны; t – время прихода импульса.

Скорость распространения электромагнитной волны в геологической среде определяется на основе параметров среды:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\frac{\mu \epsilon}{2} \left(\sqrt{1 + \left(\frac{\sigma}{\omega \epsilon} \right)^2} + 1 \right)}}, \quad (2)$$

где ϵ – относительная диэлектрическая проницаемость; μ – магнитная проницаемость; σ – электропроводность; ω – угловая частота ($\omega = 2\pi f$, f – центральная частота сигнала).

Так как большинство грунтов – диэлектрики ($\mu = 1$) и имеют относительно невысокую проводимость ($\sigma \ll \omega \epsilon$), необходимо применять сокращенную формулу:

$$V = \frac{c}{\sqrt{\epsilon}}, \quad (3)$$

где ϵ – относительная диэлектрическая проницаемость; c – скорость света в вакууме.

Условием образования отраженного сигнала является существование контраста электрофизических свойств грунтов, а параметром, определяющим его интенсивность, служит коэффициент отражения ($K_{\text{отр}}$):

$$K_{\text{отр}} = \frac{\sqrt{\epsilon_1} - \sqrt{\epsilon_2}}{\sqrt{\epsilon_1} + \sqrt{\epsilon_2}}, \quad (4)$$

где ϵ_1 – относительная диэлектрическая проницаемость верхнего слоя; ϵ_2 – относительная диэлектрическая проницаемость нижнего слоя.

Чем ближе значение коэффициента к единице, тем ярче проявляется рефлектор на радарограмме.

Одним из показателей применимости метода для поиска локальных объектов служит разрешающая способность, определить которую можно через длину волны (λ):

$$\lambda = \frac{V}{f_c}, \quad (5)$$

где V – скорость электромагнитной волны; f_c – центральная частота сигнала.

Вертикальная (Δr) и горизонтальная (Δl) разрешающие способности определены следующими соотношениями:

$$\Delta r \geq \frac{\lambda}{4} \quad \Delta l \geq \sqrt{2\lambda h}, \quad (6)$$

где h – глубина залегания отражающего объекта.

Для относительно низких георадарных частот разрешающая способность составляет десятки сантиметров, тогда как для самых высоких разрешение – первые сантиметры. Например, заявленная характеристика для антенного блока с центральной частотой 150 МГц составляет 35 см, а для антенны с частотой 1 500 МГц равна 5 см. Точность определения положения отражающего объекта также зависит от шага измерения по профилю и дискретизации сигнала.

Георадиолокация при исследовании корневых систем деревьев. С точки зрения георадиолокации древесные корни выступают в качестве локальных линейных объектов, т.е. их поисковый признак, как уже отмечалось выше, – гипербола дифрагированной волны. Относительная диэлектрическая проницаемость древесины зависит от ряда факторов, основные из которых водонасыщенность и плотность, при этом существует зависимость от температуры, частоты импульса, содержания целлюлозы и т.д. Как показывают лабораторные исследования, нормальное значение для сухой (влажность менее 30%) древесины $\epsilon < 10$, тогда как древесина с влажностью порядка 80–90% может достигать значений $\epsilon = 50$ и более [21]. Для сравнения: нор-

мальные значения песка составляют 4–7 единиц в сухом состоянии и 5–15 во влажном [19]. Следовательно, существующий контраст свойств обеспечивает формирование рефлекторов. Особенно ярко это проявляется в засушливых регионах, где корневые системы растений более мощные и занимают большую территорию, а также активней депонируют воду на фоне сухих почв [22]. Известно, что отчётливо гиперболы на радарограмме проявляются, когда влажность корней на 35% (и более) выше относительно фоновых значений, при разности менее 20% корни не выявляются [23, 24].

Лабораторное моделирование позволило определить, как изменяется волновое поле георадиолокации в зависимости от диаметра и глубины залегания корня, а также выявить возможные подходы для оценки диаметра корней в естественном залегании исходя из параметров георадарного сигнала [15, 24–26]. При этом широкая вариация диаметра и протяжённости корней у деревьев затрудняет получение однозначных критериев для их идентификации. В табл. 1 представлены обобщённые данные по изучению корневых систем методом георадиолокации. Сопоставление результатов исследований показало существование вариативности как по выявленному диаметру, так и максимальной глубине, что обусловлено видом деревьев и типом вмещающего почвенно-грунтового массива. Отмечается, что минимальный диаметр корней, однозначно фиксируемый высокочастотными антенными блоками, составляет 0,5 см [12, 15, 25]. Дополнительно к факторам, определяющим волновую картину, относится угол пересечения георадарным профилем направления горизонтального роста корня, при углах $<45^\circ$ и $>135^\circ$ регистрируемая гипербола искажается, а амплитуда отраженного сигнала снижается [27]. Следовательно, при исследованиях необходимо подбирать геометрию профилей наблюдений в зависимости от конфигурации корневой системы [28], например, использовать прямоугольную [29] или радиальную [30] сеть профилей.

Выявлено влияние сезона на детальность георадарных исследований, в тёплый (летний) период выделяется большее число корней на глубинах до 0,5 м, тогда как в холодный (зимний) период возрастает в 2 раза и более количество корней, локализованных ниже 0,5 м от поверхности [31]. Это явление объяснено повышенным содержанием воды в корнях летом и как следствие ростом их контраста в сравнении с вмещающими почвами. В свою очередь зимой происходит возрастание скорости электромагнитной волны в совокупности с уменьшением затухания в почвах из-за промерзания (т.е. происходит увеличение эффективной глубины метода). Также точность идентификации корней зависит от мощности и состава лесной подстилки [32]. По существующим оценкам, при помощи георадара можно выявить расположение порядка половины корней из общей структуры корневой системы дерева – 48% [33] и 58% [34]. При этом в верхнем интервале <50 см выявленных корней больше в сравнении с нижележащими горизонтами – 49 к 35% [33] и 60 к 35% [34].

Экспериментальная площадка и образцы деревьев. Исследования проведены в августе 2019 г. на территории Ботанического сада Петрозаводского

государственного университета, расположенного в г. Петрозаводске (рис. 2). В геологическом плане эта территория представляет собой ось антиклинальной складки, проявленной в виде мощного крутосклонного кряжа субширотного простирания с изрезанным рельефом. Для рассматриваемого участка характерно близкое залегание кристаллических пород, которые представлены порфиритами и метатугафами. Крутой рельеф не способствовал аккумуляции рыхлых отложений, при этом в самом почвенном покрове содержатся обломки скальных горных пород. В четвертичных отложениях территории преобладает супесчаная и песчаная морена с мощностью не более 2 м, а значительные площади вообще лишены четвертичного покрова [35]. Структура почвенного покрова Ботанического сада неоднородна и усложняется с запада на восток, основная масса почв представлена буроземами грубогумусовыми супесчаными. Отличительными чертами этих почв являются: наличие гумус-продуктивного горизонта с содержанием углерода 7–12%, далее углерод убывает с глубиной до значений менее 1%, средний гранулометрический состав – 87% песка и 13% глины, весь профиль ожелезнён и обогащён дериватами из подстилающих пород [36].

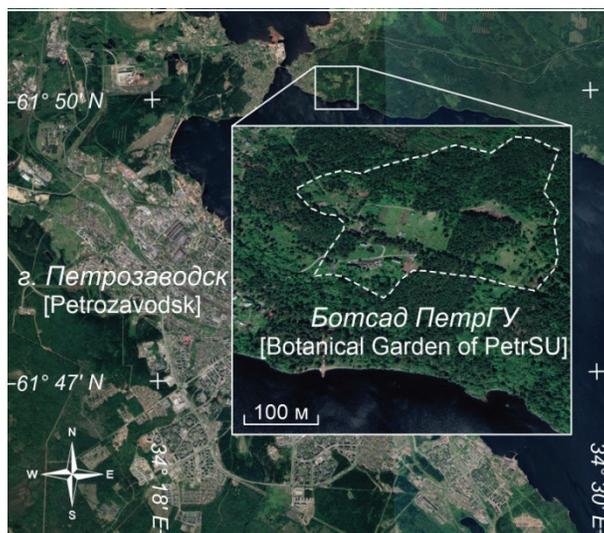


Рис. 2. Расположение участка работ
[Fig. 2. Location of the site research area]

Для эксперимента выбраны две площадки на расстоянии около 500 м, на каждой из которых росли одновозрастные деревья – яблони домашние *Malus domestica* Borkh. Условия произрастания яблонь, такие как почвенный состав, количество осадков, температура, освещенность и уровень ветра, равноценны. На каждой площадке эксперимента выбрано отдельно стоящее дерево со средними значениями биометрических показателей (табл. 2).

Таблица 1 [Table 1]

Эффективные диаметр и глубина обнаружения корней методом георадиолокации
[Effective diameter and depth of root detection by GPR]

Объект исследования [Object of the research]	Тип грунта [Soil type]	Частота антенны, МГц [GPR frequency, MHz]	Диаметр корней, см [Root diameter, cm]		Глубина корней, см [Root depth, cm]	
			Min	Max	Min	Max
Сосна кедровидная <i>Pinus cembroides</i> Zucc. [8]	Горные щебнисто-органогенные почвы с содержанием орг. до 60% [Shallow rocky soils with organic matter up to 60%]	800	0,6	4,0	1	40
Криптометрия <i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D. Don [15]	Песчаные почвы [Sandy soils]	900	1,9	7,8	30	80
Персик <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch [37]	Супесь с содержанием песка 85% и глины 15% [Faceville fine sandy loam with 85% of sand and 15% of clay]	900	1,7	3,2	н/д	40
Дуб Дугласа <i>Quercus douglasii</i> Hook. & Arn. Сосна Сабина <i>Pinus sabiniana</i> Douglas ex D. Don [38]	Каштановые почвы, суглинистые [Auburn-Exchequer soils]	1 000	1,3	10,0	8	35
Тополь дельтовидный <i>Populus deltoids</i> W. Bartram ex Marshall [11]	Песчаные почвы с содержанием песка 90% и глины 10% [Lakeland soils containing 90% of sand and 10% of clay]	1 500	0,6	1,7	н/д	27
Сосна ладанная <i>Pinus taeda</i> L. [11]	Песчаные почвы с содержанием песка 85–92% и глины 5–15% [Wakulla soils containing 85-92% of sand and 8-15% of clay]	1 500	0,5	6,5	н/д	50
Вяз приземистый <i>Ulmus pumila</i> L. [25]	Песчаная дюна с содержанием песка 95% и глины 5% [Silver sand containing 95% of sand and 5% of clay]	2 000	0,5	3,5	10	80
Дуб миртолистный <i>Quercus myrtifolia</i> Willd. [12]	Подзол с содержанием песка 90% и глины 10% [Spodosol containing 90% of sand and 10% of clay]	2 000	0,5	3,5	н/д	60

При этом плотность и шаг посадок на этих площадках исключали срастание корневых систем у рядом стоящих деревьев. Выбор этих двух конкрет-

ных объектов обусловлен внешними отличиями. Одно из растений имеет выраженную сложную кривизну ствола и меньшую высоту по сравнению со вторым, условно-нормальным (рис. 3).

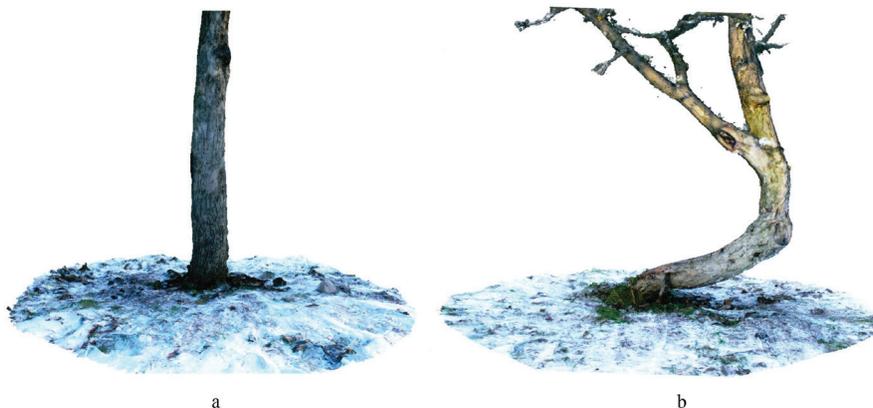


Рис. 3. Образцы обследуемых яблонь: *a* – № 1 с первой площадки; *b* – № 2 со второй площадки (фотографии А.В. Кабонена)

[Fig. 3. Test samples of apple trees: *a* - from Plot 1, *b* - from Plot 2 (Photos by Alexey Kabonena)]

Таблица 2 [Table 2]

Биометрические показатели исследуемых деревьев
[Biometric indicators of the test trees]

Биометрические показатели [Biometric indicators]	Образец № 1 [Sample 1]	Образец № 2 [Sample 2]
Высота дерева, см [Tree height, cm]	500	350
Диаметр кроны, см [Crown diameter, cm]	400	500
Диаметр ствола у основания, см [Diameter of the trunk base, cm]	49	48
Диаметр ствола на высоте 1,3 м [Trunk diameter at a height of 1.3 m]	36	38

Среднегодовые фенологические фазы у исследуемых образцов проходили параллельно, возраст деревьев – 29 лет, значительной разницы в количестве ежегодно вызревающих плодов у исследуемых растений не выявлено. На базе существующих отличий выдвинута гипотеза о влиянии глубины залегания скальных пород на формирование корневой системы и как следствие на процессы развития ствола и кроны дерева. Известен эффект специфического протекания процессов корнеобразования в зависимости от почвенно-гидрологических условий. В случае почвенного покрова малой мощности и наличия корненепроницаемого горизонта происходит прекращение развития стержневого корня с интенсификацией роста корней горизонтальной ориентации, структура корневой системы принимает выраженный поверхностный характер, зачастую имея форму усеченного конуса [1]. Кроме того, считается, что невозможность проникновения вертикальных корней вглубь

не только меняет структуру корневой системы, но может повлечь за собой изменения и слабый рост надземной части, а также раннее отмирание плодовых деревьев [39].

По литературным данным, условно-нормальная корневая система яблони домашней имеет вид, как показано на рис. 4. Отмечается преобладание скелетных корней горизонтального направления и расположение их основной массы на глубинах до 1 м от уровня поверхности. Горизонтальные скелетные корни характеризуются диаметром около 1–2 см, а вертикальные – порядка 4–5 см. Представленная схема описывает общий случай, тогда как для северных территорий (к которым относится и Республика Карелия) характерно распределение основной массы корней в интервале 25–50 см от поверхности [Там же]. Имеющиеся предпосылки позволяют сделать вывод о применимости георадара для сбора данных, так как глубина залегания корневой системы у яблони домашней соотносится с глубиной зондирования высокочастотного антенного блока (см. табл. 1), а также предположить высокую информативность метода из-за большого количества субгоризонтальных корней, которые проще выявлять на радарограммах.

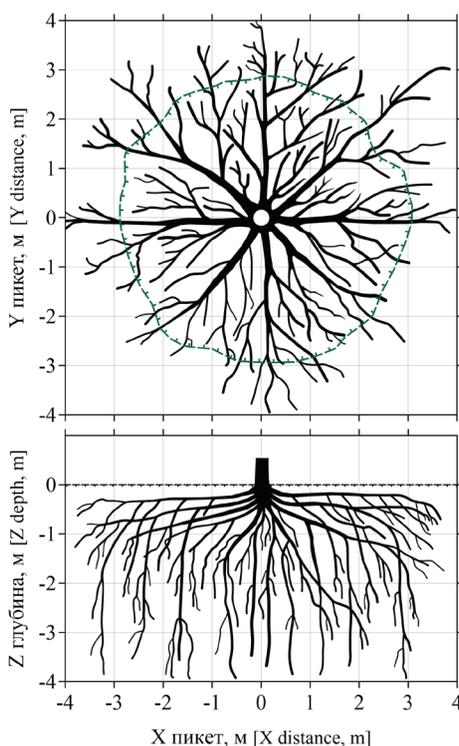


Рис. 4. Горизонтальная и вертикальная проекции корневой системы яблони домашней возрастом 20 лет, по данным В.А. Колесникова (1974)
 [Fig. 4. Horizontal and vertical plane of the apple tree root system aged 20 years, according to Venedikt Kolesnikov (1974)]

Методика эксперимента. Полевые наблюдения проведены исходя из имеющихся данных о строении корневой системы яблони домашней. Для этого вида характерно наличие в горизонтальной проекции четырех перпендикулярных и четырех диагональных скелетных корней, а также распределение корней в вертикальной проекции на глубине от 20 до 60 см (см. рис. 4). Вследствие этого измерения выполнены по регулярной прямоугольной сети с расстоянием между профилями 50 см (рис. 5). Каждый профиль начинается с отметки 0 см и увеличивался до пикета 600 см. Основная масса корней у яблони домашней залегает в пределах кроны, поэтому размер каждого участка съемки составил 600×600 см. Сбор данных выполнен георадаром ОКО-2 «Логис-Геотех» (Россия) с антенным блоком, имеющим центральную частоту 1 700 МГц. Указанный антенный блок имеет фиксированную базу, шаг сканирования по профилю составил 2 см, а временная разверстка 32 нс, что обеспечило глубину исследований до 1 м. В результате для каждого образца получен набор из 26 профилей: 13 горизонтальных (направление X) и 13 вертикальных (направление Y).

Обработка полученных радарограмм выполнена стандартно [22]: частотная фильтрация и вычитание средней составляющей сигнала для чистки записи; выделение областей расположения полезного сигнала; поиск гипербола дифрагированной волны; выполнение процедур синтеза апертуры и преобразования Гильберта (рис. 6). Операция синтеза апертуры повышает разрешающую способность записи и уменьшает интенсивность «крыльев» гипербола, что обеспечивает лучшую локализацию местоположения отдельных корней. Преобразование Гильберта позволяет представить георадарную трассу как аналитический сигнал (огibaющую), который характеризует мгновенные амплитуды и позволяет оценить энергию (интенсивность) отражений в конкретной области. Участки высоких энергий соответствуют контрастным изменениям электрофизических свойств. Из практики известно, что достаточно крупные корни могут отображаться в волновом поле георадиолокации набором отражений, например от верхней и нижней части, поэтому их положение корректно определять по наибольшим амплитудам [15, 23].

Для перехода от временной формы георадарной записи к разрезу глубин необходимо присвоить относительную диэлектрическую проницаемость ϵ для каждого отдельного слоя среды, в которой распространялся сигнал. Используя формулу (3), определить скорость V , а по формуле (1) рассчитать глубину зондирования. Величина ϵ (или V) определяется по табличным значениям с использованием маркерных рефлекторов с известной глубиной залегания или рассчитывается по наклону «крыльев» гипербола дифрагированной волны [18–20]. Последний способ рассматривается как наиболее удобный, так как не требует дополнительных работ и обеспечивает достаточную точность определения искомых значений. Условием его применимости является наличие на записи чётких гипербола. В рамках исследований

корней использована программа сбора и обработки данных георадиолокации GeoScan32 «Логис-Геотех» (Россия), где реализована функция анализа гипербол. По результатам работ для вмещающих почв ϵ составила 9 единиц, а для подстилающих метатufов $\epsilon = 6$ единиц. Это позволило определить скорость $V_{\text{почв}} \approx 10$ см/нс и глубину зондирования $Z = 70\text{--}90$ см. Значение $K_{\text{отр}}$ (4) для границы почва – скальный грунт составляет 0,1, что свидетельствует о существовании рефлектора средней интенсивности. Длина зондирующей электромагнитной волны в исследуемых почвах составляет ~ 5 см (5), это позволяет сделать вывод о возможности локализации объектов размерами от 1,2 до 5,0 см (6). Указанный диапазон сопоставим с ожидаемым размером скелетных корней яблони домашней.

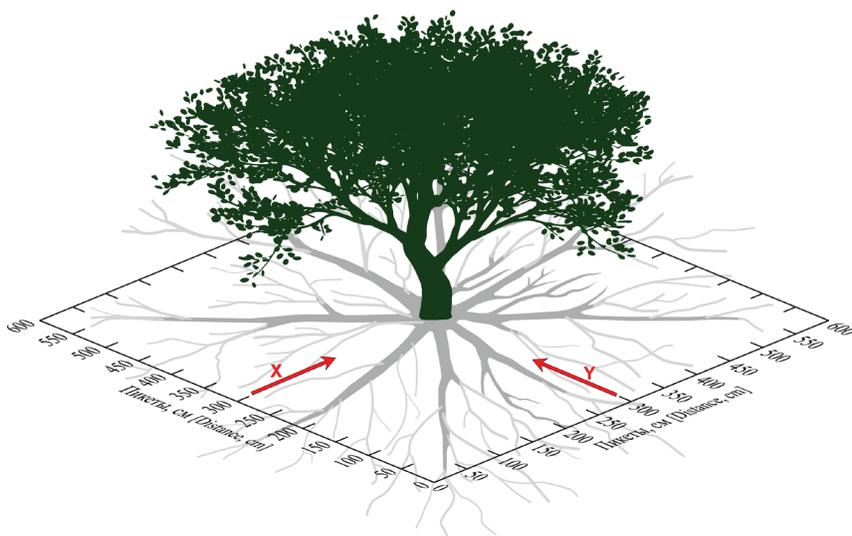


Рис. 5. Схема расположения профилей наблюдения в обследуемой области
[Fig. 5. Setup of GPR profiles in the study area]

После обработки на каждом профиле по гиперболам определены местоположения корней с координатами X , Y , Z . Так как нет однозначных параметров, чтобы отличить отражение от корня и, например, валуна, пикировались все гиперболы. Предполагается, что из-за протяженности корни имеют подавляющее количество отражений на радарограммах, а отражения от иных объектов статистически не значимы. В силу различных факторов существует неопределенность для параметров сигнала, поэтому нет возможности достоверно проследить единственный корень. Вследствие чего выполнен анализ конфигурации некоторого облака точек, которое в первом приближении пространственно соответствует объёму среды, занимаемому корневой системой. Кроме местоположений корней определена поверхность скальных грунтов, контрастно выделяющаяся от вышележащих рыхлых грунтов по протяженной оси синфазности.

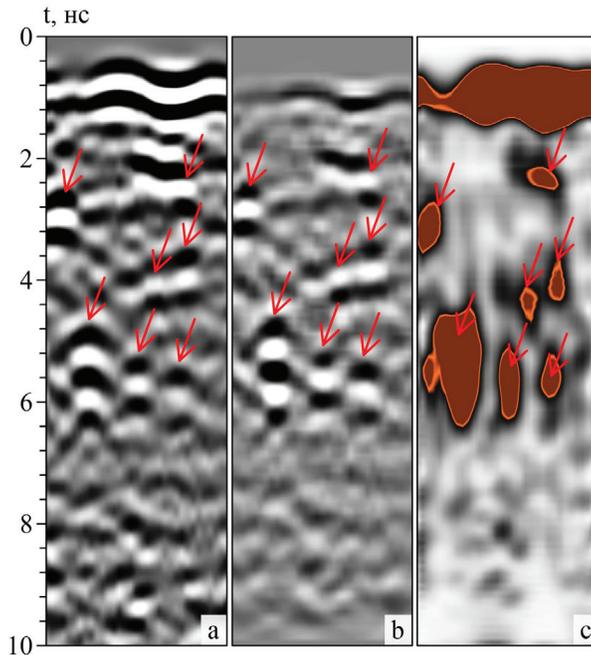


Рис. 6. Пример процедур обработки радарограммы: *a* – поиск гипербол; *b* – синтез апертур; *c* – расчет энергограммы (стрелками указано предполагаемое местоположение корней)

[Fig. 6. An example of GPR transect processing procedures: *a* - Search of hyperbolas; *b* - Aperture synthesis; *c* - Calculation of signal amplitudes (arrows indicate the location of the roots)]

Результаты исследования и обсуждение

Выполненные работы обеспечили получение набора радарограмм, по которым локализованы гиперболы дифрагированной волны, а также прослежена граница кристаллических пород. Рассмотрим результаты на примере двух перпендикулярных профилей, расположенных в центре участка для каждого из образцов (рис. 7). Радарограммы для образца № 1 характеризуются хаотичным волновым полем со временами регистрации полезного сигнала до 15 нс. Граница скальных пород идентифицируется по невыдержанной оси синфазности и изменению характера волнового поля – отсутствие интенсивных отражений и повышение затухания сигнала. Для профиля по направлению X (рис. 7, *a*) глубина залегания скальных пород составляет 50–72 см, гиперболы фиксируются на пикетах от 25 до 454 см и в интервале глубин (*Z*) 2,5–61,7 см. Профиль по направлению Y (рис. 7, *b*) характеризуется сходной глубиной залегания скальных пород 54–70 см, гиперболы выявлены на пикетах 22–544 см и в интервале $Z = 2,7–61,7$ см. Далее обратимся к результатам исследования образца № 2. Радарограммы на этом участке имеют меньший временной период полезного сигнала порядка 12 нс. Грани-

ца скальных пород для профиля по направлению X установлена в интервале глубин 32–53 см, гиперболы выявлены в диапазоне пикетов 30–450 см и $Z = 2,3–46,0$ см (рис. 7, *c*). Перпендикулярный профиль Y (рис. 7, *d*) обладает схожими параметрами: скальные породы прослежены на глубине 40–52 см, гиперболы на пикетах 76–518 см и $Z = 3,0–42,7$ см.

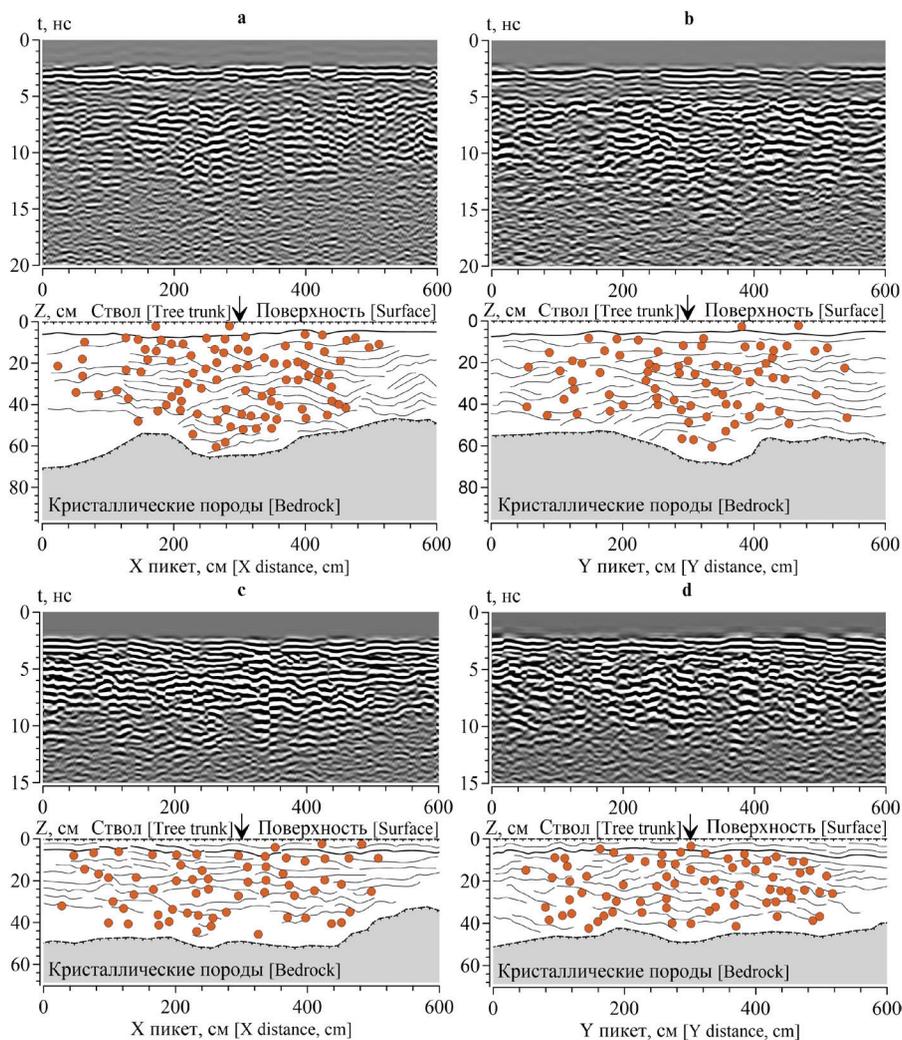


Рис. 7. Центральные радарограммы для образца № 1 по направлению X (*a*), Y (*b*) и образца № 2 по направлению X (*c*), Y (*d*)

[Fig. 7. Central GPR profiles for sample 1 in the direction X (*a*), Y (*b*) and sample 2 in the direction X (*c*), Y (*d*)]

В общем виде можно заключить, что почвенно-грунтовые условия объекта № 1 и объекта № 2 кардинально отличаются. В первом случае средняя

глубина залегания кристаллических пород составляет 60 см и наблюдается конусообразное уменьшение количества выявленных гипербола с глубиной. Во втором случае средняя глубина равна 45 см, а основная масса гипербола расположена в первых 30 см. Отметим, что на участке образца № 1 обнаружено 366 гипербола, а на участке образца № 2 – 520 гипербола. Так как скелетные корни из-за своей протяженности формируют подавляющее количество гипербола во всех проекциях, гиперболы приняты в качестве признаков их местоположения. Как отмечалось выше, в среднем регистрируется 40–50% корней от общего количества, поэтому пространственная структура корневых систем обследуемых яблонь описывается достаточно полно.

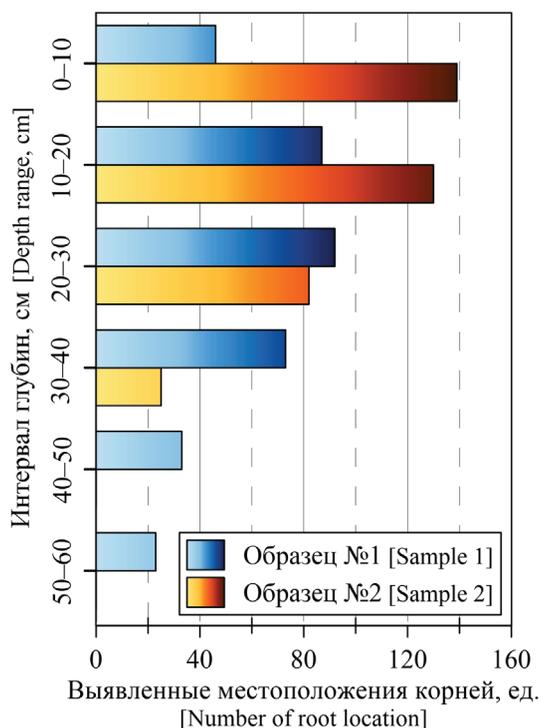


Рис. 8. Распределение выявленных местоположений корней по глубине
 [Fig. 8. Distribution of the identified root locations in depth]

Распределение количества выявленных местоположений корней в зависимости от глубины с интервалом 10 см показано на рис. 8. Видно, что корневые системы исследуемых деревьев имеют ряд существенных отличий. Образец № 1 демонстрирует постепенное уменьшение количества корней с глубиной и согласное уменьшение занимаемой площади, также наблюдается их концентрация относительно штамба. Образец № 2 характеризуется множеством корней в верхней части разреза (0–30 см), занимающих значитель-

ную площадь, тогда как в самой нижней части их количество резко сокращается. Следует отметить, что распределение корневой массы по глубине для образца № 1 сопоставимо с оценкой В.А. Колесникова для яблонь северных территорий. В то же время в обоих случаях выявлена предрасположенность местоположений корней к областям погружения кровли кристаллических пород.

Один из способов оценить пространственную конфигурацию погребенного объекта – использовать проекции (срезы георадарных параметров на фиксированных глубинах. Для получения подобных срезов рассчитываются значения мгновенных амплитуд отраженного сигнала (энергограммы), что позволяет проследить положение электрофизических неоднородностей. Корни за счет своей водонасыщенности контрастны на фоне вмещающих грунтов, и это обеспечивает трассирование их положения за счет высокой интенсивности отражения сигнала. Подобный способ оценки использован для сосны ладанной (*Pinus taeda*), когда выявлялись корни диаметром более 2 см, и по результатам составлены карты их расположения [40]. В рамках выполненных исследований использовался схожий подход. Для обследуемых образцов получены проекции интенсивности амплитуды отражений на разных интервалах глубин (рис. 9). Следует отметить, что полученные результаты, в отличие от литературных данных, не позволяют показать отдельные корни в связи с отсутствием однозначных критериев для прослеживания, однако определенную полезную информацию содержат. Так, например, уровень $Z = 20$ см характеризуется наличием высокоэнергетических отражений, которые располагаются в большей части исследуемой площади, и это соответствует горизонту, наиболее насыщенному корнями. Для обследуемых растений картины схожие, площадь, в пределах которой установлены интенсивные отражения, для образца № 1 составляет $28,7 \text{ м}^2$, а для № 2 – $26,6 \text{ м}^2$. Иная картина наблюдается на глубине $Z = 40$ см: образцы отличаются как по интенсивности наблюдаемых отражений, так и по занимаемой площади. Выявленные изменения обусловлены уменьшением количества и, вероятно, среднего размера корней в этом интервале. Выделяется значительная разность площади, занятой интенсивными отражениями: $25,6 \text{ м}^2$ для образца № 1 и $16,9 \text{ м}^2$ для образца № 2. Данные факты свидетельствуют как о трансформации корневой системы яблони домашней с глубиной, так и об отличии архитектоники корневой системы рассматриваемых образцов из-за влияния почвенно-грунтовых условий.

Взаимоотношение морфологии кровли кристаллических пород и корневой системы исследуемых образцов хорошо наблюдается на трехмерных моделях. В рассматриваемом случае модели выполнены в виде облака точек – набора установленных местоположений корней в координатной системе X, Y, Z , совокупность которых, несмотря на неточность и приближительный характер, в первом приближении позволяет пространственно отобразить корневую архитектуру исследуемых образцов (рис. 10). На текущем эта-

пе исследований проследить направление и размеры отдельного скелетного корня по набору выявленных местоположений не удалось. В перспективе есть предпосылки для определения геометрических параметров корней в естественном залегании. Отдельные примеры показывают такую возможность, но в частном случае изучения якорных корней крупных деревьев с диаметром ствола 1 м и высотой до 20 м [41].

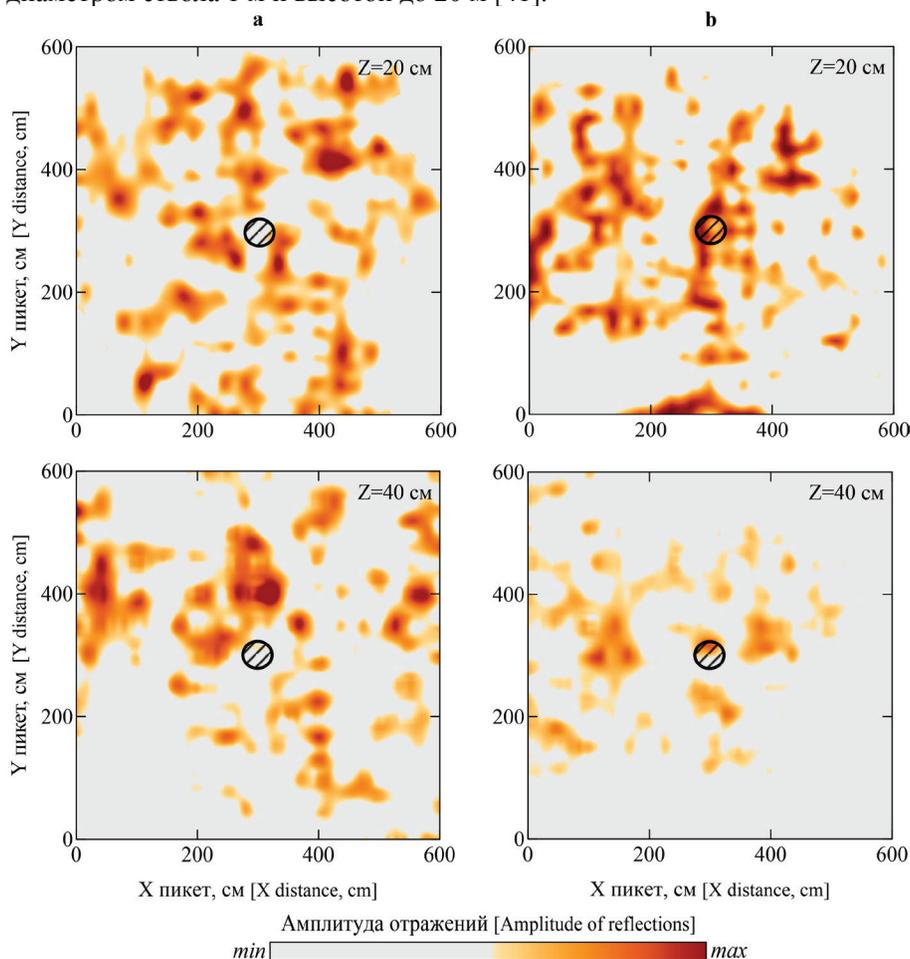


Рис. 9. Проекция амплитуд отражений на глубинах 20 и 40 см:
a – образец № 1; *b* – образец № 2 (кругом обозначено положение ствола)
 [Fig. 9 Projections of the reflection amplitudes at depths 20 and 40 cm: a - Sample 1; b - Sample 2
 (the circle indicates the position of the tree trunk)]

Вместе с тем на основе модельных наблюдений экспериментально доказано наличие значимой корреляции между диаметром корней и характеристиками георадарной трассы: временных интервалов отражений [14],

значений максимальной амплитуды [42], а также взаимоотношений этих параметров, так называемых георадарных индексов [11, 25–29]. Данные исследования показывают размерность коэффициента корреляции георадарных индексов с диаметром и биомассой корней в пределах $r = 0,5–0,8$. Однако на практике использование такого подхода затруднительно, а результаты крайне неоднозначны. Кроме того, обработка большого количества полевых наблюдений из-за трудоёмкости требует привлечения специализированных автоматических процедур обработки радарограмм.

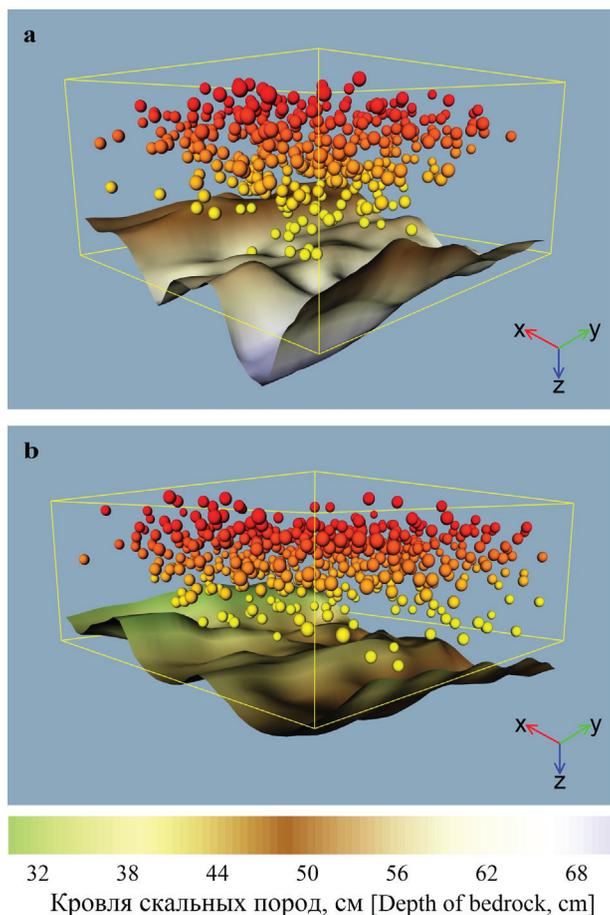


Рис. 10. Трёхмерные модели корневой архитектуры: *a* – образец № 1; *b* – образец № 2
 [Fig. 10. Three-dimensional models of the root architecture: *a* - Sample 1; *b* - Sample 2]

Полученные данные хорошо согласуются с выдвинутой гипотезой – неглубокое залегание скальных пород приводит к деформации конфигурации корневой системы, основная масса корней начинает концентрироваться в поверхностных слоях. Теоретически это может приводить к развитию сложной

кривизны древесного ствола, обусловленной фактором ветровальности или неприспособленности деформированной корневой системы поддерживать формирующуюся по наследственно-закрепленной схеме надземную часть растений, вследствие чего при условно-нормальном росте надземной части деформированная корневая система не в состоянии удерживать рост ствола в вертикальном направлении. Такие внешние условия приводят к наклонности и сложной кривизне, что и наблюдается визуально для образца № 2. Следует отметить, рассмотрение всего комплекса факторов, определяющих формирование древесного ствола, и обсуждение степени их значимости выходит за рамки представленных исследований.

Заключение

Выполненные экспериментальные работы продемонстрировали возможность описания корневой архитектуры дерева с использованием метода георадиолокации. Обобщенные данные показали, что предельный размер отдельных корней, возможных для определения, составляет 0,5 см, этот факт позволил в дальнейшем рассматривать скелетные корни как объект поиска. На примере изучения двух образцов яблони домашней проведено картирование структуры распределения корневой системы в почвенно-грунтовым массиве, также установлено влияние глубины залегания кровли кристаллических пород на онтогенез деревьев. По результатам исследований можно заключить, что георадиолокация является многообещающим методом изучения подземной части деревьев, обеспечивающим выполнение анализа корневой системы без экскавации. В перспективе подобные исследования имеют практическую значимость как для решения агротехнических и лесо-строительных задач, так и при контроле зеленых насаждений на урбанизированных территориях.

Литература

1. Калинин М.И. Корневедение. М. : Экология, 1991. 173 с.
2. Колесников В.А. Методы изучения корневой системы древесных растений. 2-е изд. М. : Лесная промышленность, 1972. 152 с.
3. Böhm W. Methods of studying root systems. Berlin : Springer, 1979. 188 p. doi: [10.1007/978-3-642-67282-8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-67282-8)
4. Measuring Roots. An Updated Approach / Ed. Mancuso S. Berlin : Springer, 2012. 382 p. doi: [10.1007/978-3-642-22067-8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22067-8)
5. Dumroese R.K., Terzaghi M., Chiatante D., Scippa G.S., Lasserre B., Montagnoli A. Functional traits of *Pinus ponderosa* coarse roots in response to slope conditions // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10, № 947. PP. 1–12. doi: [10.3389/fpls.2019.00947](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00947)
6. Montagnoli A., Terzaghi M., Chiatante D., Scippa G.S., Lasserre B., Dumroese R.K. Ongoing modifications to root system architecture of *Pinus ponderosa* growing on a sloped site revealed by tree-ring analysis // *Dendrochronologia*. 2019. Vol. 58. PP. 1–11. doi: [10.1016/j.dendro.2019.125650](https://doi.org/10.1016/j.dendro.2019.125650)

7. Al Hagrey S.A. Geophysical imaging of root-zone, trunk, and moisture heterogeneity // Journal of Experimental Botany. 2007. Vol. 58, № 4. PP. 839–854. doi: [10.1093/jxb/erl237](https://doi.org/10.1093/jxb/erl237)
8. Rodriguez-Robles U., Arredondo T., Huber-Sannwald E., Ramos-Leal J.A., Yopez E.A. Technical note: Application of geophysical tools for tree root studies in forest ecosystems in complex soils // Biogeosciences. 2017. Vol. 14, № 23. PP. 5343–5357. doi: [10.5194/bg-14-5343-2017](https://doi.org/10.5194/bg-14-5343-2017)
9. Alani A.M., Lantini L. Recent advances in tree root mapping and assessment using non-destructive testing methods: a focus on ground penetrating radar // Surveys in Geophysics. 2020. Vol. 41. PP. 1–42. doi: [10.1007/s10712-019-09548-6](https://doi.org/10.1007/s10712-019-09548-6)
10. Hruška J., Čermák J., Sustek S. Mapping tree root systems with ground-penetrating radar // Tree Physiology. 1999. Vol. 19, № 2. PP. 125–130. doi: [10.1093/treephys/19.2.125](https://doi.org/10.1093/treephys/19.2.125)
11. Butnor J.R., Doolittle J.A., Kress L., Cohen S., Johnsen K.H. Use of ground-penetrating radar to study tree roots in the southeastern United States // Tree Physiology. 2001. Vol. 21, № 17. PP. 1269–1278. doi: [10.1093/treephys/21.17.1269](https://doi.org/10.1093/treephys/21.17.1269)
12. Stover D.B., Day F.P., Butnor J.R., Drake B.G. Effect of elevated CO₂ on coarse-root biomass in Florida scrub detected by ground-penetrating radar // Ecology. 2007. Vol. 88, № 5. PP. 1328–1334. doi: [10.1890/06-0989](https://doi.org/10.1890/06-0989)
13. Hirano Y., Yamamoto R., Dannoura M., Aono K., Igarashi T., Ishii M., Yamase K., Makita N., Kanazawa Y. Detection frequency of *Pinus thunbergii* roots by ground-penetrating radar is related to root biomass // Plant and Soil. 2012. Vol. 360. PP. 363–373. doi: [10.1007/s11104-012-1252-1](https://doi.org/10.1007/s11104-012-1252-1)
14. Barton C.V.M., Montagu K.D. Detection of tree roots and determination of root diameters by ground penetrating radar under optimal conditions // Tree Physiology. 2004. Vol. 24, № 12. PP. 1323–1331. doi: [10.1093/treephys/24.12.1323](https://doi.org/10.1093/treephys/24.12.1323)
15. Hirano Y., Dannoura M., Aono K., Igarashi T., Ishii M., Yamase K., Makita N., Kanazawa Y. Limiting factors in the detection of tree roots using ground-penetrating radar // Plant and Soil. 2009. Vol. 319. PP. 15–24. doi: [10.1007/s11104-008-9845-4](https://doi.org/10.1007/s11104-008-9845-4)
16. Фридрих Г., Нойманн Д., Фогль М. Физиология плодовых растений. М. : Колос, 1983. 416 с.
17. Шкура В.Н., Обумахов Д.Л., Лунева Е.Н. Геометрия корневых систем яблони. Новочеркасск : Лик, 2013. 124 с.
18. Ground penetrating radar theory and applications / Ed. Jol H.M. Amsterdam : Elsevier, 2009. 544 p.
19. Владов М.Л., Судакова М.С. Георадиолокация: от физических основ до перспективных направлений : учеб. пособие. М. : ГЕОС, 2017. 240 с.
20. Annan A.P. Ground penetrating radar principles, procedures and applications. Mississauga : Sensors&Software, 2003. 278 p.
21. Torgovnikov G.I. Dielectric properties of wood and wood-based materials. Berlin : Springer, 1993. 196 p.
22. Guo L., Chen J., Cui X.H., Fan B.H., Lin H. Application of ground penetrating radar for coarse root detection and quantification: A review // Plant and Soil. 2013. Vol. 362. PP. 1–23. doi: [10.1007/s11104-012-1455-5](https://doi.org/10.1007/s11104-012-1455-5)
23. Guo L., Lin H., Fan B., Cui X., Chen J. Forward simulation of root's ground penetrating radar signal: simulator development and validation // Plant and Soil. 2013. Vol. 372. PP. 487–505. doi: [10.1007/s11104-013-1751-8](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1751-8)
24. Yeung S.W., Yan W.M., Hau C.H.B. Performance of ground penetrating radar in root detection and its application in root diameter estimation under controlled conditions // Science China Earth Sciences. 2016. Vol. 59. PP. 145–155. doi: [10.1007/s11430-015-5156-9](https://doi.org/10.1007/s11430-015-5156-9)
25. Cui X., Chen J., Shen J.S., Cao X., Chen X.H., Zhu X.L. Modeling tree root diameter and biomass by ground penetrating radar // Science China Earth Sciences. 2011. Vol. 54. PP. 711–719. doi: [10.1007/s11430-010-4103-z](https://doi.org/10.1007/s11430-010-4103-z)

26. Guo L., Lin H., Fan B., Cui X., Chen J. Impact of root water content on root biomass estimation using ground penetrating radar: Evidence from forward simulations and field controlled experiments // *Plant and Soil*. 2013. Vol. 371. PP. 503–520. doi: [10.1007/s11104-013-1710-4](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1710-4)
27. Tanikawa T., Hirano Y., Dannoura M., Yamase K., Aono K., Ishii M., Igarashi T., Ikeno H., Kanazawa Y. Root orientation can affect detection accuracy of ground-penetrating radar // *Plant and Soil*. 2013. Vol. 373. PP. 317–327. doi: [10.1007/s11104-013-1798-6](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1798-6)
28. Guo L., Wu Y., Chen J., Hirano Y., Tanikawa T., Li W., Cui X. Calibrating the impact of root orientation on root quantification using ground-penetrating radar // *Plant and Soil*. 2015. Vol. 395. PP. 289–305. doi: [10.1007/s11104-015-2563-9](https://doi.org/10.1007/s11104-015-2563-9)
29. Borden K., Isaac M., Thevathasan N., Gordon A., Thomas S. Estimating coarse root biomass with ground penetrating radar in a tree-based intercropping system // *Agroforestry Systems*. 2014. Vol. 88. PP. 1–13. doi: [10.1007/s10457-014-9722-5](https://doi.org/10.1007/s10457-014-9722-5)
30. Wu Y., Guo L., Cui X.H., Chen J., Cao X., Lin H. Ground penetrating radar-based automatic reconstruction of three dimensional coarse root system architecture // *Plant and Soil*. 2014. Vol. 383. PP. 155–172. doi: [10.1007/s11104-014-2139-0](https://doi.org/10.1007/s11104-014-2139-0)
31. Cui X., Liu X., Cao X., Fan B., Zhang Z., Chen J., Chen X., Guo L. Pairing dual-frequency GPR in summer and winter enhances the detection and mapping of coarse roots in the semi-arid shrubland in China // *European Journal of Soil Science*. 2019. Vol. 71, № 2. PP. 1–16. doi: [10.1111/ejss.12858](https://doi.org/10.1111/ejss.12858)
32. Tanikawa T., Ikeno H., Dannoura M., Yamase K., Aono K., Hirano Y. Leaf litter thickness, but not plant species, can affect root detection by ground penetrating radar // *Plant and Soil*. 2016. Vol. 408. PP. 271–283. doi: [10.1007/s11104-016-2931-0](https://doi.org/10.1007/s11104-016-2931-0)
33. Yamase K., Tanikawa T., Dannoura M., Ohashi M., Todo C., Ikeno H., Aono K., Hirano Y. Ground-penetrating radar estimates of tree root diameter and distribution under field conditions // *Trees*. 2018. Vol. 32. PP. 1657–1668. doi: [10.1007/s00468-018-1741-9](https://doi.org/10.1007/s00468-018-1741-9)
34. Borden K.A., Thomas S.C., Isaac M.E. Interspecific variation of tree root architecture in a temperate agroforestry system characterized using ground-penetrating radar // *Plant and Soil*. 2017. Vol. 410. PP. 323–334. doi: [10.1007/s11104-016-3015-x](https://doi.org/10.1007/s11104-016-3015-x)
35. Демидов И.Н., Лукашов А.Д. Рельеф и четвертичные отложения ботанического сада Петрозаводского государственного университета как основа его современных ландшафтов // *Hortus Botanicus*. 2001. Т. 1. С. 25–33.
36. Красильников П.В., Платонова Е.А. Почвы заповедной территории Ботанического сада ПетрГУ // *Hortus Botanicus*. 2001. Т. 1. С. 34–41.
37. Cox K.D., Scherm H., Serman N. Ground-penetrating radar to detect and quantify residual root fragments following peach orchard clearing // *HortTechnology*. 2005. Vol. 15. PP. 600–607. doi: [10.21273/HORTTECH.15.3.0600](https://doi.org/10.21273/HORTTECH.15.3.0600)
38. Raz-Yaseef N., Koteen L., Baldocchi D.D. Coarse root distribution of a semi-arid oak savanna estimated with ground penetrating radar // *Journal of geophysical research: Biogeosciences*. 2013. Vol. 118, № 1. PP. 135–147. doi: [10.1029/2012jg002160](https://doi.org/10.1029/2012jg002160)
39. Колесников В.А. Корневая система плодовых и ягодных растений. М. : Колос, 1974. 509 с.
40. Simms J.E., McKay S.K., McComas R.W., Fischenich J.C. *In situ* root volume estimation using ground penetrating radar // *Journal of Environmental and Engineering Geophysics*. 2017. Vol. 22, № 3. PP. 209–221. doi: [10.2113/JEEG22.3.209](https://doi.org/10.2113/JEEG22.3.209)
41. Altdorff D., Botschek J., Honds M., van der Kruk J. *In situ* detection of tree root systems under heterogeneous anthropogenic soil conditions using ground penetrating radar // *Journal of Infrastructure Systems*. 2019. Vol. 25, № 3. PP. 1–8. doi: [10.1061/\(ASCE\)IS.1943-555X.0000501](https://doi.org/10.1061/(ASCE)IS.1943-555X.0000501)
42. Dannoura M., Hirano Y., Igarashi T., Ishii M., Aono K., Yamase K., Kanazawa Y. Detection of *Cryptomeria japonica* roots with ground penetrating radar // *Plant Biosystems*. 2008. Vol. 142, № 2. PP. 375–380. doi: [10.1080/11263500802150951](https://doi.org/10.1080/11263500802150951)

Поступила в редакцию 17.03.2020 г.; повторно 22.06.2020 г.;
принята 25.06.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Рязанцев Павел Александрович – канд. г.-м. наук, с.н.с. Отдела комплексных научных исследований, ФИЦ «Карельский научный центр РАН» (Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1944-9479>

E-mail: chthonian@yandex.ru

Кабонен Алексей Валерьевич – аспирант кафедры технологии и организации лесного комплекса, Институт лесных, горных и строительных наук, Петрозаводский государственный университет (Россия, 185910, г. Петрозаводск, пр-т Ленина, 33).

E-mail: alexkabonен@mail.ru

Родионов Александр Игоревич – м.н.с. лаборатории геофизики, Институт геологии – обособленное подразделение ФИЦ «Карельский научный центр РАН» (Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11).

E-mail: fabian4695@gmail.com

Для цитирования: Рязанцев П.А., Кабонен А.В., Родионов А.И. Определение архитектуры корневой системы деревьев методом георадиолокации // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 179–204. doi: 10.17223/19988591/51/10

For citation: Ryazantsev PA, Kabonen AV, Rodionov AI. Detection of the tree root system architecture using Ground penetrating radar. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:179-204. doi: 10.17223/19988591/51/10 In Russian, English Summary

Pavel A. Ryazantsev¹, Aleksey V. Kabonen², Aleksandr I. Rodionov¹

¹Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

²Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

Detection of the tree root system architecture using Ground penetrating radar

This paper presents the results of an experiment measuring the tree root system architecture using ground-penetrating radar. Despite the importance of this issue, the knowledge of the root system of trees remains incomprehensive due to various reasons including the limitations of research methods. The basic approach to the exploration of the root system of plants is the root zone excavation method. However, this method inflicts substantial damage to plants and can lead to their destruction. In some cases, excavation is impossible or prohibited, i.g. in cities or protected natural areas. Studying the tree root systems is an urgent issue at the moment and new methods are systematically used to tackle it. The non-invasive approach to study the root architecture includes using the methods of geophysics, ground-penetrating radar (GPR) in particular. The root system of plants tends to adapt to the environment, which includes interaction with the accommodating soil. One of the natural factors influencing the growth is the level of the impenetrable soil horizon, which changes both the structure of the root system and the aerial part of a plant. The aim of this paper is to study the root architecture of mature trees using GPR, rather than root excavation method, to determine its configuration depending on the bedding of bedrocks and to justify how changes in the bedrock depth affects the development of the aerial parts of trees.

The principle of GPR is to examine the propagation of an electromagnetic wave in a medium by emitting a probing signal and receiving a reflected signal. Underground objects such as roots are distinguished by diffracted waves (*See Fig. 1*). The summary

of literature data shows that roots up to 0.5 cm in diameter can be found by a high frequency antenna (See Table 1). We carried out a field experiment on an apple tree (*Malus domestica* Borkh) which grows on the territory of the Botanic Garden of Petrozavodsk State University (See Fig. 2). This territory is characterized by a thin soil cover and underlying moraine soils. Below are metatuff bedrocks. We studied two separate samples. The choice was made due to external differences (See Fig. 3). The trees growing on Plot 2 (Sample 2 of the experiment) have a conspicuous compound curvature of the trunk and a lower height than plants from Plot 1 - sample 1 (See Table 2). The two trees underwent annual average phenological stages simultaneously. They are 29 years old. No significant differences in the annual number of ripening fruits was revealed. Thus, the experiment was carried out on the two samples growing in equal conditions but having differences in appearance and biometrics. Literature data show that an apple tree usually has 4 perpendicular skeletal roots and 4 diagonal skeletal roots 1-2 cm in diameter in horizontal slice. As for vertical slice, tree roots usually lie at a depth of 20-60 cm (See Fig. 4).

The measurements were carried out with OKO-2 GPR by "Logis-Geotech" (Russia) with antenna unit (center frequency of 1700 MHz) on a regular rectangular grid with a space between profile lines of 50 cm. As a result, 26 profiles (13 horizontal and 13 vertical ones) were obtained for each sample (See Fig. 5). We processed the obtained radargrams using signal filtering operations, searching for the diffraction hyperbola, migration procedure to localize the source object and the Hilbert Transform to examine the energy of the reflections (See Fig. 6). The analysis of the hyperbolas has determined the relative permittivity of the studied soil and underlying metatuffs. It is 9 and 6, respectively. The electromagnetic wave length in the soil body is 5 cm, which implies the possibility to distinguish objects sized 1.5-5 cm. This range is consistent with the expected size of the apple tree taproots. After the processing of each profile, the roots were localized using hyperbolas and the surface of bedrocks was determined (See Fig. 7).

We found out that the soil profiles of the two experimental samples were different. In the first case, the average depth of bedrocks bedding is 60 cm, and there is a v-shaped decrease in the identified hyperbolas with depth. In the second case, the average depth is 45 cm and most of hyperbolas are located in the first 30 cm. The examination of the location of the roots in horizontal slices within an interval of 10 cm shows a change in the density of the roots distribution as we go deeper (See Fig. 8). The quantity of roots of Sample 1 gradually decreases with depth as well as the occupied area. In addition, the roots tend to concentrate near the trunk. Sample 2 has many roots in the upper part of the profile (0-30 cm) and they occupy a significant area. However, the quantity of roots in the lower part decreases sharply. In both cases, we detected a predisposition of the root locations to the areas of the immersion of the roof of the bedrocks. In addition, a study was conducted concerning the intensity of the reflection amplitudes of both samples at different depths (See Fig. 9). At the near-surface level (20 cm) there are high-energy reflections. They occupy most of the studied area, and this corresponds to a horizon full of roots. A different picture emerges at a depth of about 40 cm. The samples vary in both the reflection intensity and the occupied area. The revealed changes are due to the decrease in the roots quantity and apparently to the medium size of the roots. We examined the correlation between the morphology of the bedrocks top surface and the spatial root architecture of the samples with three-dimensional models made in the form of a cloud of points as a set of established root locations in the XYZ-coordinate system (See Fig. 10).

Our studies have demonstrated the possibility to describe the tree root architecture by means of GPR. Using the two samples of the apple tree as an example, the structure

of the root system in the soil-ground massif was determined. Also, we established the influence of the bedding roof depth of crystalline rocks on the ontogenesis of a tree. The results obtained prove that GPR is a promising method for studying the underground areas of trees, which provide the possibility to analyze the root system without excavation. Such studies may prove useful in the future for both solving agricultural technology and forest management tasks, as well as for green spaces control in urban areas.

The paper contains 10 Figures, 2 Tables and 42 References.

Key words: *Malus domestica*; ground penetrating radar; root architecture; radargrams; root impenetrable horizon.

Funding: The study has been supported by the current research project of the Department of Multidisciplinary Scientific Research, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Kalinin MI. Kornevedenie [Root study]. Moscow: Ekologiya Publ.; 1991. 173 p. In Russian
2. Kolesnikov VA. Metody izucheniya kornevoy sistemy drevesnykh rasteniy. 2-e izd. [Methods for studying the root system of woody plants. 2nd ed.]. Moscow: Lesnaya promyshlennost' Publ.; 1972. 152 p. In Russian
3. Böhm W. Methods of studying root systems. Berlin: Springer Publ.; 1979. 188 p. doi: [10.1007/978-3-642-67282-8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-67282-8)
4. *Measuring Roots. An Updated Approach*. Mancuso S, editor. Berlin: Springer Publ.; 2012. 382 p. doi: [10.1007/978-3-642-22067-8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22067-8)
5. Dumroesel RK, Terzaghi M, Chiatante D, Scippa GS, Lasserre B, Montagnoli A. Functional traits of *Pinus ponderosa* coarse roots in response to slope conditions. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10(947):1-12. doi: [10.3389/fpls.2019.00947](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00947)
6. Montagnoli A, Terzaghi M, Chiatante D, Scippa GS, Lasserre B, Dumroese RK. Ongoing modifications to root system architecture of *Pinus ponderosa* growing on a sloped site revealed by tree-ring analysis. *Dendrochronologia*. 2019;58:1-11. doi: [10.1016/j.dendro.2019.125650](https://doi.org/10.1016/j.dendro.2019.125650)
7. Al Hagrey SA. Geophysical imaging of root-zone, trunk, and moisture heterogeneity. *Experimental Botany*. 2007;58(4):839-854. doi: [10.1093/jxb/erl237](https://doi.org/10.1093/jxb/erl237)
8. Rodríguez-Robles U, Arredondo T, Huber-Sannwald E, Ramos-Leal JA, Yezpez EA. Technical note: Application of geophysical tools for tree root studies in forest ecosystems in complex soils. *Biogeosciences*. 2017;14(23):5343-5357. doi: [10.5194/bg-14-5343-2017](https://doi.org/10.5194/bg-14-5343-2017)
9. Alani AM, Lantini L. Recent advances in tree root mapping and assessment using non-destructive testing methods: A focus on ground penetrating radar. *Surveys in Geophysics*. 2020;41:1-42. doi: [10.1007/s10712-019-09548-6](https://doi.org/10.1007/s10712-019-09548-6)
10. Hruška J, Čermák J, Sustek S. Mapping tree root systems with ground-penetrating radar. *Tree Physiology*. 1999;19(2):125-130. doi: [10.1093/treephys/19.2.125](https://doi.org/10.1093/treephys/19.2.125)
11. Butnor JR, Doolittle JA, Kress L, Cohen S, Johnsen KH. Use of ground-penetrating radar to study tree roots in the southeastern United States. *Tree Physiology*. 2001;21(17):1269-1278. doi: [10.1093/treephys/21.17.1269](https://doi.org/10.1093/treephys/21.17.1269)
12. Stover DB, Day FP, Butnor JR, Drake BG. Effect of elevated CO₂ on coarse-root biomass in Florida scrub detected by ground-penetrating radar. *Ecology*. 2007;88(5):1328-1334. doi: [10.1890/06-0989](https://doi.org/10.1890/06-0989)
13. Hirano Y, Yamamoto R, Dannoura M, Aono K, Igarashi T, Ishii M, Yamase K, Makita N, Kanazawa Y. Detection frequency of *Pinus thunbergii* roots by ground-penetrating radar is related to root biomass. *Plant and Soil*. 2012;360:363-373. doi: [10.1007/s11104-012-1252-1](https://doi.org/10.1007/s11104-012-1252-1)

14. Barton CVM, Montagu KD. Detection of tree roots and determination of root diameters by ground penetrating radar under optimal conditions. *Tree Physiology*. 2004;24(12):1323-1331. doi: [10.1093/treephys/24.12.1323](https://doi.org/10.1093/treephys/24.12.1323)
15. Hirano Y, Dannoura M, Aono K, Igarashi T, Ishii M, Yamase K, Makita N, Kanazawa Y. Limiting factors in the detection of tree roots using ground-penetrating radar. *Plant and Soil*. 2009;319:15-24. doi: [10.1007/s11104-008-9845-4](https://doi.org/10.1007/s11104-008-9845-4)
16. Fridrikh G, Noymann D, Fogl' M. Fiziologiya plodovykh rasteniy [Physiology of fruit plants]. Moscow: Kolos Publ.; 1983. 416 p. In Russian
17. Shkura VN, Obumakhov DL, Luneva EN. Geometriya kornevykh sistem yabloni [The geometry of the root systems of the apple tree]. Novocherkassk: Lik Publ.; 2013. 124 p. In Russian
18. Ground penetrating radar theory and applications. Jol HM, editor. Amsterdam: Elsevier Publ.; 2009. 544 p.
19. Vladov ML, Sudakova MS. Georadiolokatsiya: ot fizicheskikh osnov do perspektivnykh napravleniy. Uchebnoe posobie [Ground Penetrating Radar: From Theory to future applications]. Moscow: GEOS Publ.; 2017. 240 p. In Russian
20. Annan AP. Ground penetrating radar principles, procedures and applications. Mississauga: Sensors&Software; 2003. 278 p.
21. Torgovnikov GI. Dielectric properties of wood and wood-based materials. Berlin: Springer Publ.; 1993. 196 p.
22. Guo L, Chen J, Cui XH, Fan BH, Lin H. Application of ground penetrating radar for coarse root detection and quantification: A review. *Plant and Soil*. 2013;362:1-23. doi: [10.1007/s11104-012-1455-5](https://doi.org/10.1007/s11104-012-1455-5)
23. Guo L, Lin H, Fan B, Cui X, Chen J. Forward simulation of root's ground penetrating radar signal: Simulator development and validation. *Plant and Soil*. 2013;372:487-505. doi: [10.1007/s11104-013-1751-8](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1751-8)
24. Yeung SW, Yan WM, Hau CHB. Performance of ground penetrating radar in root detection and its application in root diameter estimation under controlled conditions. *Science China Earth Sciences*. 2016;59:145-155. doi: [10.1007/s11430-015-5156-9](https://doi.org/10.1007/s11430-015-5156-9)
25. Cui X, Chen J, Shen JS, Cao X, Chen XH, Zhu XL. Modeling tree root diameter and biomass by ground penetrating radar. *Science China Earth Sciences*. 2011;54:711-719. doi: [10.1007/s11430-010-4103-z](https://doi.org/10.1007/s11430-010-4103-z)
26. Guo L, Lin H, Fan B, Cui X, Chen J. Impact of root water content on root biomass estimation using ground penetrating radar: Evidence from forward simulations and field controlled experiments. *Plant and Soil*. 2013;371:503-520. doi: [10.1007/s11104-013-1710-4](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1710-4)
27. Tanikawa T, Hirano Y, Dannoura M, Yamase K, Aono K, Ishii M, Igarashi T, Ikeno H, Kanazawa Y. Root orientation can affect detection accuracy of ground-penetrating radar. *Plant and Soil*. 2013;373:317-327. doi: [10.1007/s11104-013-1798-6](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1798-6)
28. Guo L, Wu Y, Chen J, Hirano Y, Tanikawa T, Li W, Cui X. Calibrating the impact of root orientation on root quantification using ground-penetrating radar. *Plant and Soil*. 2015;395:289-305. doi: [10.1007/s11104-015-2563-9](https://doi.org/10.1007/s11104-015-2563-9)
29. Borden K, Isaac M, Thevathasan N, Gordon A, Thomas S. Estimating coarse root biomass with ground penetrating radar in a tree-based intercropping system. *Agroforestry Systems*. 2014;88:1-13. doi: [10.1007/s10457-014-9722-5](https://doi.org/10.1007/s10457-014-9722-5)
30. Wu Y, Guo L, Cui XH, Chen J, Cao X, Lin H. Ground penetrating radar-based automatic reconstruction of three dimensional coarse root system architecture. *Plant and Soil*. 2014;383:155-172. doi: [10.1007/s11104-014-2139-0](https://doi.org/10.1007/s11104-014-2139-0)
31. Cui X, Liu X, Cao X, Fan B, Zhang Z, Chen J, Chen X, Guo L. Pairing dual-frequency GPR in summer and winter enhances the detection and mapping of coarse roots in the semi-arid shrubland in China. *European J Soil Science*. 2019;71(2):1-16. doi: [10.1111/ejss.12858](https://doi.org/10.1111/ejss.12858)

32. Tanikawa T, Ikeno H, Dannoura M, Yamase K, Aono K, Hirano Y. Leaf litter thickness, but not plant species, can affect root detection by ground penetrating radar. *Plant and Soil*. 2016;408:271-283. doi: [10.1007/s11104-016-2931-0](https://doi.org/10.1007/s11104-016-2931-0)
33. Yamase K, Tanikawa T, Dannoura M, Ohashi M, Todo C, Ikeno H, Aono K, Hirano Y. Ground-penetrating radar estimates of tree root diameter and distribution under field conditions. *Trees*. 2018;32:1657-1668. doi: [10.1007/s00468-018-1741-9](https://doi.org/10.1007/s00468-018-1741-9)
34. Borden KA, Thomas SC, Isaac ME. Interspecific variation of tree root architecture in a temperate agroforestry system characterized using ground-penetrating radar. *Plant and Soil*. 2017;410:323-334. doi: [10.1007/s11104-016-3015-x](https://doi.org/10.1007/s11104-016-3015-x)
35. Demidov IN, Lukashov AD. Relief i chetvertichnye otlozheniya botanicheskogo sada petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta kak osnova ego sovremennykh landshaftov [Relief and quaternary sediments of the Petrozavodsk State University Botanic Garden as the basis of its present landscapes]. *Hortus Botanicus*. 2001;1:25-33. In Russian
36. Krasil'nikov PV, Platonova EA. Pochvy zapovednoy territorii botanicheskogo sada PetrGU [Soils of the protected territory of the Petrozavodsk State University Botanic Garden]. *Hortus Botanicus*. 2001;1:34-41. In Russian
37. Cox KD, Scherm H, Serman N. Ground-penetrating radar to detect and quantify residual root fragments following peach orchard clearing. *HortTechnology*. 2005;15:600-607. doi: [10.21273/HORTTECH.15.3.0600](https://doi.org/10.21273/HORTTECH.15.3.0600)
38. Raz-Yaseef N, Koteen L, Baldocchi DD. Coarse root distribution of a semi-arid oak savanna estimated with ground penetrating radar. *JGR Biogeosciences*. 2013;118(1):135-147. doi: [10.1029/2012jg002160](https://doi.org/10.1029/2012jg002160)
39. Kolesnikov VA. Kornevaya sistema plodovykh i yagodnykh rasteniy [The root system of fruit and berry plants]. Moscow: Kolos Publ.; 1974. 509 p. In Russian
40. Simms JE, McKay SK, McComas RW, Fischenich JC. *In situ* root volume estimation using ground penetrating radar. *J Environmental and Engineering Geophysics*. 2017;22(3):209-221. doi: [10.2113/JEEG22.3.209](https://doi.org/10.2113/JEEG22.3.209)
41. Altdorff D, Botschek J, Hondt M, van der Kruk J. *In situ* detection of tree root systems under heterogeneous anthropogenic soil conditions using ground penetrating radar. *J Infrastructure Systems*. 2019;25(3):1-8. doi: [10.1061/\(ASCE\)IS.1943-555X.0000501](https://doi.org/10.1061/(ASCE)IS.1943-555X.0000501)
42. Dannoura M, Hirano Y, Igarashi T, Ishii M, Aono K, Yamase K, Kanazawa Y. Detection of *Cryptomeria japonica* roots with ground penetrating radar. *Plant Biosystems*. 2008;142(2):375-380. doi: [10.1080/11263500802150951](https://doi.org/10.1080/11263500802150951)

*Received 17 March 2020; Revised 22 June 2020;
Accepted 25 June 2020; Published 25 September 2020*

Author info:

Ryazantsev Pavel A, Cand. Sci. (Geol.-min.), Senior Researcher, Department of Multidisciplinary Scientific Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 11 Pushkinskay Str., Petrozavodsk 185910, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1944-9479>

E-mail: chthonian@yandex.ru

Kabonen Aleksey V, Postgraduate Student, Department of Technology and Management of Forest Industry Complex, Institute of Forestry, Mining and Construction Sciences, Petrozavodsk State University, 33 Lenina Ave., Petrozavodsk 185910, Russian Federation.

E-mail: alekxabonen@mail.ru

Rodionov Aleksandr I, Junior Researcher, Laboratory of Geophysics, Institute of Geology Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 11 Pushkinskay Str., Petrozavodsk 185910, Russian Federation.

E-mail: fabian4695@gmail.com

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

UDC 574.34

doi: 10.17223/19988591/51/11

Irina V. Andreeva¹, Elena I. Shatalova¹, Margarita V. Shternshis²

¹ Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

² All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Russian Academy of Sciences, Krasnodar, Russian Federation

Environmental and anthropogenic factors influencing key cabbage Lepidopteran pests in the southwestern Siberia

*The lepidopteran pest community composition on cabbage (*Brassica oleracea* L.) as the main vegetable crop in the conditions of southwestern Siberia was presented. In 2015–2019, the dominant cabbage pests were diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) and cabbage moth (*Mamestra brassicae* L.). The continuous application of insecticides against the cabbage pests along with climatic factors led to a change in insect species community composition. This was manifested as an increase in the number of the diamondback moth and a decrease in the abundance of other Lepidoptera species. The mean number of diamondback moths varied from 0.06 (in a year of low numbers) to 1.4 specimens per plant (in years of outbreaks), and for cabbage moth - 0.12 (2015) and 0.43 (2016), respectively. In commercial cabbage field, both egg-laying and caterpillars of *Pieris brassicae* L. and *P. rapae* L. were found as a single individual. During the years of research, we noted earlier diamondback moth and cabbage moth appearance dates in the field. More frequent diamondback moth outbreaks were observed. The period of cabbage damage by the diamondback moth lasted longer than usual during the growing seasons due to an increase in the number of insect generations in the conditions of the southwestern Siberia.*

The paper contains 2 Figures and 15 References.

Key words: diamondback moth; cabbage moth; insect distribution; plant damage; environmental conditions; outbreak.

The Authors declare no conflict of interest.

Introduction

White cabbage (*Brassica oleracea* L.) is the main vegetable crop in the southwestern Siberia. The crop productivity is negatively affected by phytophagous insects, including Lepidoptera pests, among which the most important are the diamondback moth *Plutella xylostella* L. and the cabbage moth *Mamestra brassicae* L. It is known that the structure of the Lepidoptera complex and the number of

individual species can vary significantly depending on diverse environmental factors. With the growing trend of global warming, an increasing research is aimed at studying the impact of climate change on the damage by insect pests [1-3]. Seasonal and long-term climate changes have a direct impact on insect pests of cultivated plants, manifested in changes in survival rates and development, fertility, distribution and the number of generations, which fully applies to cabbage pests [4-9].

Another factor that affects the change in the field situation is the formation of resistant populations to chemical insecticides in different types of pests. Acquired resistance to insecticides is one of the reasons for the increase in the insect number, as well as the habitat expansion of some species of phytophagous insects, including the diamondback moth *P. xylostella*, which was noted in different regions of the world [4, 10-12]. In general, the structure of the insect species community composition in the cabbage field is gradually undergoing significant changes due to the above reasons, as well as changes in the composition and number of the areas occupied by cabbage crops, and breeding new cabbage varieties and hybrids.

The aim of the research was to analyze changes in the structure and the species composition of Lepidoptera insect pests on white cabbage depending on environmental factors in the conditions of southwestern Siberia.

Materials and methods

White cabbage hybrids of different groups of maturity: early Champ F1 (2015), Green Flash F1 (2016), Lemma F1 (2017), and Pushma F1 (2018-2019); middle - Tobia F1; late - Arriviste F1 were studied in this research. Cabbage pests, such as diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), cabbage moth *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae), cabbage white butterfly *Pieris brassicae* L. and imported cabbageworm *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae) were counted on plants.

Observations and records of the number of phytophagous insects were carried out on commercial cabbage crop in the forest-steppe zone of the Ob region (southwestern Siberia, 54°51'12.2"N, 82°48'29.3"E), in 2015-2019. The cultivation technology of cabbage was typical of this region and included the following main operations: growing seedlings by cassette method, planting seedlings in the open ground according to the planting scheme of 60×40 cm for early varieties, 60×70 cm for mid- and late hybrids. Regular watering, a single application of a complex of mineral fertilizers and pesticides were applied. Plant protection included one spraying by Aktara (thiamethoxam) against *Phyllotreta cruciferae*, and from one to three sprayings by one of the following chemicals: Accord (alfacypermethrin), and Gladiator (lambda-cyhalothrin) against Lepidopteran insects depending on their number.

The years of research differed significantly in meteorological parameters. Out of five years, one year (2016) was characterized as dry; two years (2017 and 2018)

- with excessive moisture, meanwhile in 2017, a large amount of precipitation was combined with high air temperatures, and 2018 was characterized by a cold prolonged spring. In 2015, the temperature generally exceeded the average annual value, and in 2019, they slightly differed from the norm, however, in both years there was uneven precipitation during the growing season.

Counting the number of pests on white cabbage was based on regular monitoring throughout the growing season (5 counts per season for the main phases of crop development). Insects were counted on 100 plants of each cabbage hybrid, and counted plants were selected on a staggered basis or along a diagonal line in the plot (20 samples of 5 plants). The stage of development and number of each insect species were taken in account.

The mean number of insects (A) was determined by the formula:

$$A = (\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 + \dots + x_n) \div n,$$

x - mean of insects on each counting date, individuals /one plant, n - the number of counts during the season.

Results and Discussion

During the years of research, the diamondback moth and the cabbage moth were discovered as the dominant insect pests on cabbage plantations, whose abundance varied significantly depending on the conditions of the growing seasons (Fig. 1).

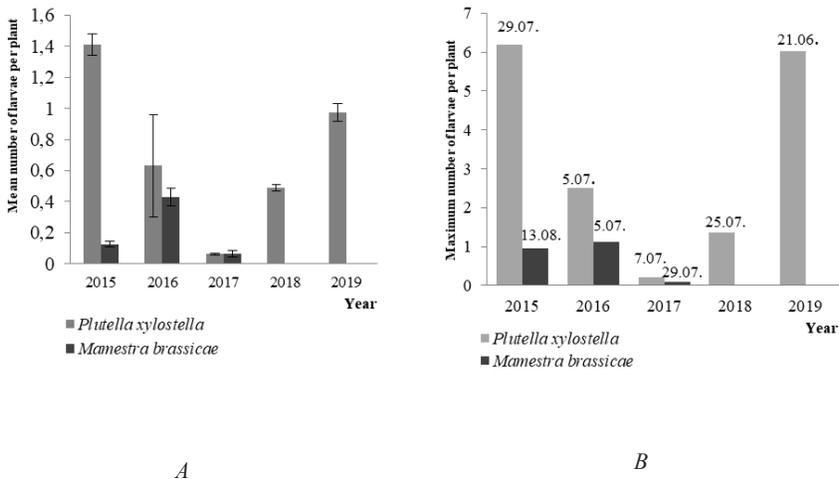


Fig. 1. Number of insect larvae per plant: *A* - Mean (columns) and *B* - Maximum

Outbreak of the diamondback moth was observed in four of the five growing periods, with an abnormal increase in 2015 and 2019, during which the mean number of the pest in all hybrids was 1.4 ± 0.07 ($p < 0.001$) and 0.97 ± 0.056 ($p < 0.001$)

individuals per plant, respectively (Fig. 1A). In these years, the maximum number of caterpillars on individual cabbage hybrids reached 6.2 and 6.0 insect per plant, respectively (Fig. 1B). Therefore, 3 treatments per season were applied that timed to the appearance of younger instar larvae. Larval appearance time depended on the year of research. In the year of the depression (2017), the mean number of the diamondback moth was 0.06 ± 0.007 ($p < 0.001$) individuals / plant, that provided one insecticide treatment only. The results showed that the appearance of phytophagous insects on cabbage plantings had been observed in recent years at an earlier and earlier time. Thus, if in 2015-2018, the first larvae of *P. xylostella* appeared in the middle of June (10.06-18.06.), in 2019, the emerging adults of first generation were recorded at the end of May, and the larvae were found in early June (starting from 5.06.), almost immediately after planting cabbage seedlings in the open ground. According to our previous research, the second generation of the pest in Western Siberia is the most numerous and harmful, the peak of which usually occurred in the end of July [13]. However, in 2019, during the outbreak the largest number of pests was recorded almost one month earlier (in the middle of June). In addition, there was an extension of the period of the diamondback moth damage, which reached 107-109 days in 2015-2016, due to an increase in the number of pest generations. Particularly, in 2015, the insect produced four complete and partially fifth generations [4], which was due to climate change in the region. It is known that temperature conditions are the main regulating factor of the population dynamics of this pest. Therefore, for example, the number of diamondback moth generations varies from 2-3 in the northern regions to 20 in the tropical zone [5, 14]. In 2017 and 2019, the development of *P. xylostella* populations completed in August due to various reasons. Thus, 2017, in general, was characterized by a low insect abundance, and in 2019, there was a mass death of caterpillars in August due to the development of epizootics caused by entomophthoralean fungi in the pest population.

Significant plant damage by *M. brassicae* was noted in 2015 and 2016, in these years the number of larvae per plant was 0.13 ± 0.02 and 0.43 ± 0.056 ($p < 0.001$), respectively; however, in the next three years, this pest had no economic significance. The cabbage moth egg-laying period was characterized by a significant length of time and lasted 1-1.5 months depending on the meteorological conditions of the year. The first caterpillars usually appeared in the late June-early July, with the exception of the 2018-2019 growing seasons. In this period, despite the laying of eggs by females, cabbage moth caterpillars were not found, the reason being the use of chemical insecticides to control the number of diamondback moth. The period of damage by phytophagous insects in 2015-2017 was limited from one and a half to two months (46-62 days). Thus, in comparison with the data of previous studies, when the cabbage moth was considered the most dangerous pest of cabbage in the Siberian region [15], in recent years there was a decrease in the damage by *M. brassicae*; however, there was an earlier appearance of caterpillars on cabbage plants. For example, in 2008, during the outbreak of

this insect, cabbage moth larvae reached peak abundance at 7 weeks after cabbage seedlings had been planted in the ground (early cabbage head formation), which corresponded to the end of July [15]. After 8 years (in 2016) the first egg-laying was detected in mid-June, and the maximum number of caterpillars was observed in the beginning of July (9-12 true cabbage leaves) (Fig. 1B).

It should be noted that in the years of this research on cabbage plants, *M. brassicae* laid unusually small egg clutches consisting of 7-15 eggs, while, for example, in 2008, the pest egg-laying consisted mainly of 50-100 eggs (Fig. 2). Such changes are obviously due to the regular use of chemical insecticides in commercial fields to control the diamondback moth in recent years.



Fig. 2. Egg-laying of *Mamestra brassicae* collected on cabbage plants: *A* - in 2008, *B* - in 2019. Photos by Elena Shatalova

During five years of research, the percentage of *P. brassicae* and *P. rapae* in the pest community structure on commercial cabbage crop has significantly decreased. Thus, only single egg-laying and single plants inhabited by cabbage white butterfly and imported cabbageworm were observed in 2015 and 2017. In 2016, single egg-laying of *P. brassicae* with no caterpillars were found, and in 2018, single egg-laying of *P. rapae* were observed. In 2019, these two pests were not found at all.

Conclusion

The results of this research showed the significant changes in the lepidopteran pest community composition in the commercial cabbage field in the southwestern Siberia. These changes depended on environmental and anthropogenic factors. With the annual use of chemicals on cabbage plants, there was an increase in the abundance of the diamondback moth *Plutella xylostella* L., and a decrease in the number of other Lepidopteran insects that were less resistant to pesticides. Under the changing climatic conditions, the timing of the appearance of the diamondback moth and the cabbage moth *Mamestra brassicae* L. on cabbage plants has also changed, as well as the periods of their plant damage during the growing

seasons. The obtained results show that the trends for this region are similar to those observed in other areas, and this fact should be taken into account for further improvement of pest management on cabbage.

References

1. Jamieson MA, Trowbridge AM, Raffa KF, Lindroth RL. Consequences of climate warming and altered precipitation patterns for plant-insect and multitrophic interactions. *Plant Physiology*. 2012;160:1719-1727. doi: [10.1104/pp.112.206524](https://doi.org/10.1104/pp.112.206524)
2. DeLucia EH, Nabity PD, Zavala JA, Berenbaum MR. Climate change: Resetting plant-insect interactions. *Plant Physiology*. 2012;160:1677-1685. doi: [10.1104/pp.112.204750](https://doi.org/10.1104/pp.112.204750)
3. War FR, Taggar GK, War MY, Hussain B. Impact of climate change on insect pests, plant chemical ecology, tritrophic interactions and food production. *Int J Clinical and Biological Sciences*. 2016;1(2):16-29.
4. Andreeva IV, Shatalova EI. Sezonnoe razvitie kapustnoy moli i ee entomofagov v Zapadnoy Sibiri [Seasonal development of diamondback moth and its entomophagous insects in Western Siberia]. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2017;47(3):42-48. In Russian
5. Marchioro CA, Foerster LA. Development and survival of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) as a function of temperature: Effect on the number of generations in tropical and subtropical regions. *Neotropical Entomology*. 2011;40(5):533-541. doi: [10.1590/S1519-566X2011000500003](https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000500003)
6. Sow G, Diarra K, Arvanitakis L, Bordat D. The relationship between the diamondback moth, climatic factors, cabbage crops and natural enemies in a tropical area. *Folia Horticulturae*. 2013;25(1):3-12. doi: [10.2478/fhort-2013-0001](https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0001)
7. Mohammad Feizal Daud, Fauziah I, Mohd Rasdi Z, Fairuz K, Abu Zarim U, Syed Abdul Rahman SAR, Ismail R, Mohd Hanysyam MN, Norazliza R. Asymmetry effect of intercropping non host crops between cabbage and climatic factor on the population of the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) and yield. *Agriculture, Forestry and Fisheries*. 2014;3(3):171-177. doi: [10.11648/j.aff.20140303.15](https://doi.org/10.11648/j.aff.20140303.15)
8. Pareek A, Meena, BM, Sharma S, Teterwal ML, Kalyan RK, Meena B. Impact of climate change on insect pests and their management strategies. In: *Climate Change and Sustainable Agriculture*. Kulshreshtha SN and Wheaton EE, editors. Switzerland, Basel: MDPI AG; 2017. pp. 253-286.
9. Tanyi CB, Ngosong C, Ntonifor NN. Effects of climate variability on insect pests of cabbage: adapting alternative planting dates and cropping pattern as control measures. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2018;5:25. doi: [10.1186/s40538-018-0140-1](https://doi.org/10.1186/s40538-018-0140-1)
10. Santos VC. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the State of Pernambuco, Brazil. *Neotropical Entomology*. 2011;40(2):264-270. doi: [10.1590/S1519-566X2011000200017](https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000200017)
11. Suckling DM, Conlong DE, Carpenter JE, Bloem KA, Rendon P, Vreysen MJB. Global range expansion of pest Lepidoptera requires socially acceptable solutions. *Biological Invasions*. 2017;19:1107-1119. doi: [10.1007/s10530-016-1325-9](https://doi.org/10.1007/s10530-016-1325-9)
12. Richardson EB, Troczka BJ, Gutbrod O, Emyr Davies TG, Nauen R. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. *J Pest Science*. 2020;93:911-928. doi: [10.1007/s10340-020-01220-y](https://doi.org/10.1007/s10340-020-01220-y)
13. Andreeva IV, Shatalova EI, Shternshis MV, Shulgina OA, Bekhtold VV. Role of food resource in the number of cabbage phytophages and their biocontrol. *Sibirskiy Ekologicheskij Zhurnal = Contemporary Problems of Ecology*. 2013;20(3):439-446. In Russian

14. Uthamasamy S, Kannan M, Senguttuvan K, Jayaprakash SA. Status, damage potential and management of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) in Tamil Nadu, India. In: *Proceedings of the Sixth International Workshop on Management of the Diamondback Moth and Other Crucifer Insect Pests* (Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand, 21-25 March, 2011). Shelton M and Collins HL, editors. *Taiwan: AVRDC – The World Vegetable*; 2011. pp. 270-279.
15. Shternshis MV, Andreeva IV, Shatalova EI. The influence of host plants on herbivore community composition on *Brassica* crops in Western Siberia. *ISRN Botany*. 2012;e682474. doi: [10.5402/2012/682474](https://doi.org/10.5402/2012/682474)

*Received 08 May 2020; Revised 02 June 2020;
Accepted 25 June 2020; Published 25 September 2020*

Author info:

Andreeva Irina V, Cand. Sci. (Agr.), Head of the Laboratory of Biological Control of Phytophages and Phytopathogens, Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk 630501, Novosibirsk Region, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5627-8667>

E-mail: iva2008@ngs.ru

Shatalova Elena I, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Biological Control of Phytophages and Phytopathogens, Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk 630501, Novosibirsk Region, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2536-5084>

E-mail: elenashatalova@mail.ru

Shternshis Margarita V, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher, Laboratory for the Development of Microbiological Crop Protection Products and the Microorganisms Collection, All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Russian Academy of Sciences, Krasnodar 350039, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9660-1606>

E-mail: shternshis@mail.ru

For citation: Andreeva IV, Shatalova EI, Shternshis MV. Environmental and anthropogenic factors influencing key cabbage Lepidopteran pests in the southwestern Siberia. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:205-211. doi: [10.17223/19988591/51/11](https://doi.org/10.17223/19988591/51/11)

Для цитирования: Andreeva I.V., Shatalova E.I., Shternshis M.V. Environmental and anthropogenic factors influencing key cabbage Lepidopteran pests in the southwestern Siberia // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 205–211 doi: [10.17223/19988591/51/11](https://doi.org/10.17223/19988591/51/11)

УДК 581.5; 574.21; 582.675.1
doi: 10.17223/19988591/51/12

А.А. Зверев^{1,2}, Н.В. Щёголева¹, А.С. Ревушкин¹

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

²Центральный сибирский ботанический сад, г. Новосибирск, Россия

Выявление экологических ареалов редких высокогорных видов рода *Ranunculus* методами фитоиндикации

Впервые получены индивидуальные экологические характеристики *Ranunculus akkemensis* Polozhij et Revjakina и *R. lasiocarpus* С.А. Мей. – высокогорных эндемов Алтае-Саянской флористической провинции. Проведена апробация метода фитоиндикационной оценки синэкологических ареалов на примере редких видов, ранее изученных только по качественным параметрам. Составлены и сравнены между собой вероятностные экологические профили флор ингрегаций этих видов по факторам увлажнения и трофности почвы. Определена принадлежность *R. akkemensis* и *R. lasiocarpus* к экологическим группам по данным факторам. Показана работоспособность методики фитоиндикационной коррекции на относительно малых по объему массивах геоботанических данных.

Ключевые слова: *Ranunculaceae*; эндем; экологические факторы; геоботанические описания; база данных; система IBIS; Алтай.

Введение

Знание экологических ареалов (портретов) видов растений открывает широкие возможности использования и зачастую обнаруживает недостающие элементы в решении сложных задач специфики генезиса, биоморфологии, биогеографии видов, родов или их близкородственных групп. Получение данных об экологических параметрах видов прямыми измерениями – трудоемкий и продолжительный процесс, требующий мониторинга объекта исследований в среде его обитания. Вопросами опосредованного определения характеристик средообразующих компонентов или явлений в экосистеме по параметрам фитобиоты занимается индикационная геоботаника [1]. Опосредованное получение квантифицированной информации о напряжении основных абиотических факторов по параметрам растительного покрова открывает возможность для выявления экологического ареала слабоизученных в силу труднодоступности видов, особенно редких, высокогорных растений.

Высокое эколого-географическое разнообразие рода *Ranunculus* L. (лютик) и широкий зональный спектр распространения его видов ярко проявля-

ются в региональной специфике видового состава [2]. Особенно это характерно для горных регионов, где экологическая пластичность рода *Ranunculus* в контрастных условиях высокогорий приобретает свойства адаптивности, что и способствует формированию эндемичных видов [3–6]. Поэтому необходимым аспектом при решении вопросов региональной диверсификации рода *Ranunculus* становится учёт и оценка факторов среды как пусковых механизмов внутривидовой экологической дифференциации рода.

Цель исследования – апробация метода фитоиндикационной оценки син-экологических ареалов видов рода *Ranunculus* – *R. akkemensis* Polozhij et Revjakina и *R. lasiocarpus* С.А. Мей., высокогорных представителей подсекции *Altimontana* Schegol. [7] (секция *Auricomus* Schur.), эндемичных для Алтае-Саянской флористической провинции (АСП).

Материалы и методики исследования

Для получения исходных геоботанических материалов в исследовании задействована компьютерная база описаний растительности Сибири «Database of Siberian Vegetation (DSV)», зарегистрированная в международной метабазе фитоценозов «Global Index of Vegetation-Plot Databases» под индексом AS-RU-002 [8] и реализованная в интегрированной ботанической информационной системе IBIS v.7.2 [9]. В модуле градиентного анализа этой же информационной системы выполнены все фитоиндикационные расчеты и сгенерированы сводные таксономические списки. Вспомогательными инструментами для подготовки данных, проведения статистической обработки и визуализации результатов послужили программы MS Excel 2013 и Past v.3.26.

Всего использовано 8 полных геоботанических описаний с участием *R. akkemensis* и 12 – с *R. lasiocarpus*. Географическая локация данных: Республика Алтай: хребты Семинский, Курайский, Северо-Чуйский; Алтайский край: Тигирекский хребет; Республика Тыва: хребет Сангилен.

Среднее число зарегистрированных в описаниях таксонов составило для первого вида $18,80 \pm 3,54$ (здесь и далее средние значения приведены со стандартной ошибкой среднего), для второго – $24,45 \pm 2,73$. Источником исходной экологической информации послужили объединенные фитоиндикационные шкалы для Сибири И.А. Цаценкина с соавторами [10, 11], наследующие амплитудно-оптимальный формат индикационной школы Л.Г. Раменского [1]. Из четырех доступных экологических факторов выбраны увлажнение (120-балльная шкала, далее Hd) и богатство-засоление (трофность) почв (30-балльная шкала, далее Tr) как наиболее значимые для дифференциации экотопов горных растений. Средняя доля представленности таксонов-индикаторов в описаниях по этим факторам составила: $34,27 \pm 3,30\%$ и $73,50 \pm 3,57\%$ (Hd), $35,01 \pm 3,24\%$ и $73,45 \pm 3,58\%$ (Tr) для *R. akkemensis* и *R. lasiocarpus* соответственно. Для слабоизученных высоко-

горных флор такие показатели следует считать достаточными для проведения пионерного фитоиндикационного анализа.

Экологические характеристики геоботанических описаний рассчитаны в соответствии с ранее представленной методикой [12], проективные покрытия таксонов при этом учитывали в 9-балльной геометрической шкале [9]. Индивидуальные видовые фитоиндикационные оптимумы вычислены по опубликованному нами алгоритму [13], для оценки экологического консенсуса выбран оптимальный вариант этого индекса [1].

В отсутствие устоявшегося термина для обозначения флористической совокупности всех таксонов, встречающихся в ценозах, в которых участвует определенный вид, для характеристики такого пула мы используем конструкцию «*флора ингрегации*», осознавая, что ни *R. akkemensis*, ни *R. lasiocarpus* в геоботаническом понимании не определяют реальных викарирующих слоев в растительных ассоциациях. Для получения таких флор ингрегаций в системе IBIS генерировались сводные описания, весовым параметром таксонов в них выступала абсолютная встречаемость. Количественные параметры флор составили для *R. akkemensis* – 73 таксона, из них 36 таксонов-индикаторов, для *R. lasiocarpus* – 141 и 98 соответственно.

При составлении вероятностных экологических профилей использована унимодальная модель [14], а фитоиндикационные оптимумные статусы таксонов-индикаторов взвешивались суммами процентов их встречаемости в сводных описаниях.

Результаты исследования и обсуждение

Фитоиндикационная оценка синэкологических ареалов проведена для двух близкородственных видов, принадлежащих одной подсекции *Altimontana* рода *Ranunculus* и эндемичных для АСП, но при этом существенно отличающихся некоторыми морфофизиологическими свойствами и приуроченностью к определенным типам местообитаний.

Ranunculus akkemensis Polozhij et Revyakina 1978, Систематика и география растений Сибири : 6. – Лютик аккемский.

Описан с Алтая. Тип: ТК!

Вид распространен в горах Центрального, Юго-Восточного Алтая и Тувы – в аридных районах, с выраженным континентальным климатом. Алтайско-тувинский эндем (рис. 1).

R. akkemensis обитает в альпийском поясе. Характерный представитель криопетрофитона, зачастую выступающего своеобразным рефугиумом для реликтовых и эндемичных элементов высокогорной флоры [15]. Его обычными местообитаниями являются подвижные каменистые субстраты – щебнистые осыпи, каменистые россыпи, каменистые берега ручьев, каменистые тундры, морены ледников. Это единственный облигатный петрофит среди всех видов рода *Ranunculus* АСП.



Рис. 1. Типичное местообитание *Ranunculus akkemensis* Polozhij et Revjakina, гора Сукор, Северо-Чуйский хребет (фото Н. Щёголевой, 02.07.2019)
[**Fig. 1.** Typical habitat of *Ranunculus akkemensis* Polozhij et Revjakina, Mount Sukor, The North-Chuyskiy ridge (photo by Natalia Shchegoleva, 02.07.2019)]

Ranunculus lasiocarpus С.А. Мей. 1830, in Ledeb. Fl. Alt. 2 : 323 – Л. волосистоплодный (рис. 2).

Описан из Западной Сибири (Алтай). Тип: (LE!).

Распространен в Южной Сибири, в восточной части Казахстана и Монголии. *R. lasiocarpus* – обитатель высокогорных лугов и тундр, первую половину вегетационного периода развивающийся в условиях избыточного холодного увлажнения. По отношению к механическому составу субстрата этот вид – факультативный петрофит. Местообитания *R. lasiocarpus* хорошо дренируемые. Встречается обычно в субальпийском поясе, по бортам, берегам и руслам высокогорных ручьев, а также на альпийских луговинах и в мохово-лишайниковой тундре.

Сравнительный анализ полученных значений по шкале увлажнения показал существенные отличия отношения ценотического окружения модельных видов к уровню увлажнения местообитаний (рис. 3, А). Совокупная флора ингрегации *R. akkemensis* имеет значительно более широкую амплитуду и максимум, смещенный относительно *R. lasiocarpus* примерно на 4 градации в сухую сторону градиента. По фактору трофности (рис. 3, В) объединенные амплитуды флор ингрегации обоих видов имеют примерно одинаковый размах, но различную асимметрию, а максимум кривой профиля у *R. akkemensis* больше, чем у *R. lasiocarpus*.



Рис. 2. Типичное местообитание *Ranunculus lasiocarpus* С.А. Мей.
 гора Сукор, Северо-Чуйский хребет (фото Н. Щёголевой, 02.07.2019).
 [Fig. 2. Typical habitat of *Ranunculus lasiocarpus* С.А. Мей.
 Mount Sukor, The North-Chuyskiy ridge (photo by Natalia Shchegoleva, 02.07.2019)]

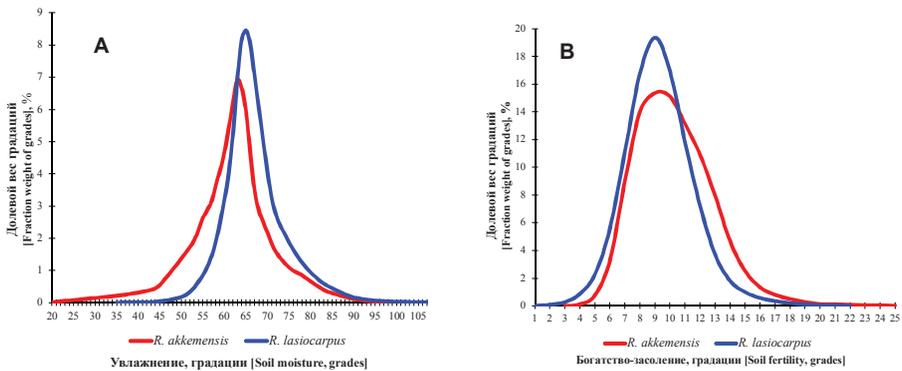


Рис. 3. Вероятностные экологические профили флор ингрегаций *Ranunculus akkemensis* и *R. lasiocarpus* по фактору почвенного увлажнения (А) и богатства-засоления (В)
 [Fig. 3. Probabilistic ecological profiles of *Ranunculus akkemensis* and *R. lasiocarpus* ingregation floras according to the factor of soil moisture (А) and soil fertility (В)]

Одновременное отображение фитоценозов с участием исследуемых видов в осях факторов увлажнения и трофности позволяет оценить и сопоставить их экологические ареалы (рис. 4). Ареалы имеют небольшую зону перекрытия, несмотря на то что оба вида могут произрастать в простран-

ственной близости (в пределах десятков метров), имея при этом достаточно строгие экологические предпочтения (рис. 1, 2). При этом реализованная каждым видом экологическая ниша весьма невелика по отношению к полным градиентам по выбранным факторам (120 и 30 градаций соответственно).

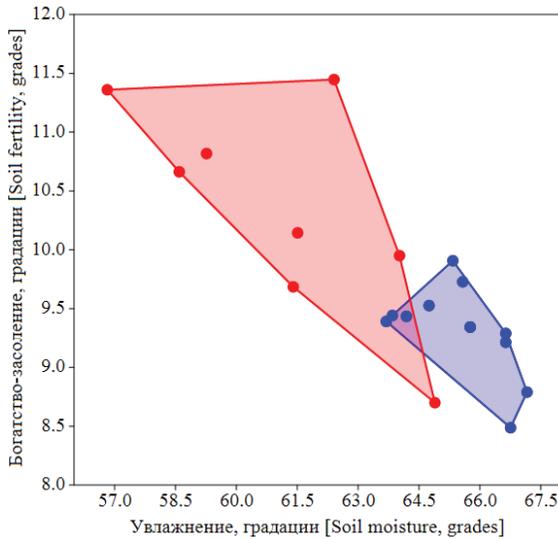


Рис. 4. Экологические ареалы *Ranunculus akkemensis* (выделен красным цветом) и *R. lasiocarpus* (синим цветом) в осях двух экологических факторов. Точки – описания с участием соответствующих таксонов [Fig. 4. Ecological areas of *Ranunculus akkemensis* (in red color) and *R. lasiocarpus* (in blue color) according to two environmental factors. Dots - relevés with corresponding taxa]

После применения методики фитоиндикационной коррекции [13] получены точные значения индивидуальных статусов (минимум, оптимум, максимум) изучаемых видов (таблица). Эти данные ожидаемо согласуются как с результатами анализа флор ингрегаций видов, так и с характеристиками их экологических ареалов.

Индивидуальные фитоиндикационные статусы видов *Ranunculus* [Individual indicator values of *Ranunculus* species]

Таксон [Taxon]	Увлажнение, градации [Soil moisture, grades]			Богатство-засоление, градации [Soil fertility, grades]		
	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max
<i>Ranunculus akkemensis</i>	56,818	60,194	64,891	8,701	10,482	11,448
<i>Ranunculus lasiocarpus</i>	63,692	65,409	67,160	8,488	8,895	9,908

Поскольку массив доступных описаний и, как следствие, охват экотопов сравнительно невелики, можно предположить, что экологические амплитуды *R. akkemensis* и *R. lasiocarpus* при последующем включении нового геоботанического материала будут расширяться, тогда как установленное

значение оптимумного статуса изменится незначительно. Однако уже на данном этапе при сравнении полученных количественных параметров с более ранними результатами проведенного нами экологического анализа рода *Ranunculus* АСП [4], где учитывались приуроченность к определенному типу местообитаний и некоторые морфофизиологические свойства, экологические характеристики этих видов претерпели изменения. Так, в используемой нами системе экологических групп [16] по фактору увлажнения *R. akkemensis* следует считать ксеромезофитом (ранее определялся нами как эумезофит), а *R. lasiocarpus* – эумезофитом (ранее – гидромезофит). По фактору трофности почв *R. akkemensis* следует относить к мезоэутрофитам, а *R. lasiocarpus* – к мезотрофитам.

Заключение

Проведенное исследование позволило впервые квантифицировать экологические характеристики двух редких высокогорных видов рода *Ranunculus* по факторам увлажнения и трофности почв. Это дало возможность обоснованно определить принадлежность *R. akkemensis* и *R. lasiocarpus* к экологическим группам и доказать работоспособность методики фитоиндикационной коррекции на относительно малых по объему массивах геоботанических данных.

Авторы выражают благодарность коллегам, любезно предоставившим для нашего исследования свои геоботанические описания: канд. биол. наук Е.Г. Зибзееву (Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск), д-ру биол. наук А.И. Пяку (Томский государственный университет, г. Томск) и канд. биол. наук И.В. Волкову (Томский государственный педагогический университет, г. Томск).

Литература

1. Zverev A.A. Methodological aspects of indicator values use in biodiversity analysis // Contemporary Problems of Ecology. 2020. Vol. 13, №. 4. PP. 321–332. doi: [10.1134/S1995425520040125](https://doi.org/10.1134/S1995425520040125)
2. Щёголева Н.В. Система рода *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) Сибири, Казахстана и Монголии // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. 2017. № 116. С. 22–28. doi: [10.17223/20764103.116.4](https://doi.org/10.17223/20764103.116.4) 98
3. Ревушкин А.С. Высокогорная флора Алтая. Томск : Изд. Том. ун-та, 1988. 320 с.
4. Щёголева Н.В. Сопряженный экологический анализ рода *Ranunculus* L. Алтае-Саянской флористической провинции // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2008. № 1 (2). С. 31–41.
5. Shchegoleva N.V. New distribution data on Altai endemic *Ranunculus schischkinii* in floras of Russia and Kazakhstan // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2018. № 41. С. 182–189. doi: [10.17223/19988591/41/11](https://doi.org/10.17223/19988591/41/11)
6. Щёголева Н.В., Тургинов О.Т., Жабборов А.М., Кодиров У.Х. Эколого-географические особенности эндема западного Памиро-Алая *Ranunculus botschantzevii* Ovcz. //

- Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 49. С. 175–186. doi: [10.17223/19988591/49/10](https://doi.org/10.17223/19988591/49/10)
7. Щёголева Н.В. Новый таксон рода *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. 2006. № 97. С. 19–20.
 8. Bruelheide H., Dengler J., Jiménez-Alfaro B., Purschke O., Hennekens S.M., Chytrý M., (...) , Zverev A. sPlot – a new tool for global vegetation analyses // Journal of Vegetation Science. 2019. Vol. 30, №. 2. Pp. 161–186. doi: [10.1111/jvs.12710](https://doi.org/10.1111/jvs.12710)
 9. Зверев А.А. Информационные технологии в исследованиях растительного покрова : учеб. пособие. Томск : ТМЛ-Пресс, 2007. 304 с.
 10. Методические указания по экологической оценке кормовых угодий лесостепной и степной зон Сибири по растительному покрову / сост. И.А. Цаценкин [и др.]. М. : ВНИИК им. В.Р. Вильямса, 1974. 246 с.
 11. Методические указания по экологической оценке кормовых угодий тундровой и лесной зон Сибири и Дальнего Востока по растительному покрову / сост. И.А. Цаценкин, И.В. Савченко, С.И. Дмитриева. М. : ВНИИК им. В.Р. Вильямса, 1978. 302 с.
 12. Зверев А.А., Бабешина Л.Г. Оценка условий местообитаний сфагновых мхов Западно-Сибирской равнины по ведущим экологическим факторам: объекты, материалы и методические основы // Вестник Томского государственного университета. 2009. № 325. С. 167–173.
 13. Зверев А.А., Королюк А.Ю. Экологические шкалы растений Сибири: методика коррекции с использованием системы IBIS // Отечественная геоботаника: основные вехи и перспективы : материалы Всерос. науч. конф. Санкт-Петербург : БИН РАН, 2011. Т. 2. С. 357–359.
 14. Зверев А.А. Сравнительный анализ растительности с использованием фитоиндикационных шкал // Актуальные проблемы геоботаники : сборник статей и лекций IV Всерос. школы-конференции. Уфа : МедиаПринт, 2012. С. 25–46.
 15. Пяк А.И. Петрофиты Русского Алтая. Томск : Изд-во Том. ун-та, 2003. 202 с.
 16. Прокопьев А.П. Экология растений (особи, виды, экогруппы, жизненные формы) : учебник для биол. факультетов вузов. Томск : Томский государственный университет, 2001. 340 с.

Поступила в редакцию 15.07.2020 г.; повторно 17.08.2020 г.;
принята 03.09.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:

Зверев Андрей Анатольевич – канд. биол. наук., доцент кафедры ботаники, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634006, г. Томск, пр. Ленина, 36).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4394-4605>

E-mail: ibiss@rambler.ru

Щёголева Наталья Валерьевна – канд. биол. наук., доцент кафедры ботаники, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634006, г. Томск, пр. Ленина, 36).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2710-6131>

E-mail: schegoleva@outlook.com

Ревушкин Александр Сергеевич – д-р биол. наук, проф., зав. каф. ботаники, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634006, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: ppu@mail.tsu.ru

Для цитирования: Зверев А.А., Щёголева Н.В., Ревушкин А.С. Выявление экологических ареалов редких высокогорных видов рода *Ranunculus* методами фитоиндикации // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 212–222. doi: [10.17223/19988591/51/12](https://doi.org/10.17223/19988591/51/12)

For citation: Zverev AA, Shchegoleva NV, Revushkin AS. Determination of the ecological areas of rare high-mountain *Ranunculus* species by indicator values methods. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:212-222. doi: 10.17223/19988591/51/12 In Russian, English Summary

Andrey A. Zverev^{1,2}, Natalia V. Shchegoleva¹, Alexander S. Revushkin¹

¹Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

²Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Determination of the ecological areas of rare high-mountain *Ranunculus* species by indicator values methods

The indirect collecting of quantitative data on the rates of the main abiotic factors by the parameters of the vegetation opens up the possibility of identifying ecological ranges for poorly studied hard-to-reach species, especially rare high-mountain plants. The ecological plasticity of the genus *Ranunculus* L. in contrasting conditions of high mountains acquires the properties of adaptability, which contributes to the formation of endemic species. Therefore, a necessary aspect in addressing the issues of regional diversification of the genus *Ranunculus* is taking into account and assessing environmental factors as triggers of intrageneric ecological differentiation of the genus. The aim of the study is to test an indicator values method to determine the synecological areas of high mountain taxa *Ranunculus akkemensis* Polozhij et Revjakina (See Fig. 1) and *R. lasiocarpus* C.A. Mey. (See Fig. 2) from the section *Auricomus* Schur., subsection *Altimontana* Schegol., endemic to the Altai-Sayan floristic province (ASP).

To obtain the initial geobotanical material, we used the “Database of Siberian Vegetation (DSV)” computer database of relevés of Siberian vegetation, registered in the international metabase “Global Index of Vegetation-Plot Databases” as AS-RU-002 and implemented in the integrated botanical information system IBIS v.7.2. All calculations with indicator values were performed in the gradient analysis module of this information system, alongside with combined taxonomic lists generation. MS Excel 2013 and Past v.3.26 software served as auxiliary tools for data preparation, statistical processing and visualization of results.

Geographic location of the relevés: Altai Republic: Seminsky, Kuraisky, Notrth-Chuisky ridges; Altai Krai: Tigirek ridge; Tuva Republic: Sangilen ridge. The source of the initial ecological information was the combined indicator value scales for Siberia by Ivan Tsatsenkin et al. (1974, 1978). These scales inherit the amplitude-optimum format of the indicator school by Leontiy Ramensky. Of the four available environmental factors, moisture (120-grade scale) and richness-salinity (nutrients availability, or fertility) of soils (30-grade scale) were selected as the most significant for the differentiation of ecotopes of mountain plants.

The ecological characteristics of habitats, where these *Ranunculus* species were recorded, were calculated in accordance with the previously presented methodology: weighted averaging (by cover and environmental tolerance) of all indicator taxa in a relevé; the cover of taxa was expressed in a 9-grade geometric scale. Individual species indicator value optima were calculated according to our published algorithm - as weighted averaging taking into account environmental consensus index, rarity of the scale's grade in total sample, number of indicators per each relevé. When compiling probabilistic ecological profiles for combined floras of coenoses with a selected taxon, an unimodal model was used, and the indicator value optimum statuses of indicator taxa were weighted by the sums of the percentages of their occurrence in such combined floras.

Comparative analysis of the obtained values for the factors of soil moisture and fertility showed significant differences in the reaction of the coenotic environment of the model

species to the level of these factors in habitats (See Fig. 3). Simultaneous mapping of phytocenoses with the participation of the studied species in the axes of soil moisture and fertility factors made it possible to assess and compare their ecological areas (See Fig. 4). The exact values of individual statuses (minimum, optimum, maximum) of the model species were calculated. When comparing the obtained quantitative parameters with earlier results of our ecological analysis of the genus *Ranunculus* in ASP, which took into account the confinement to a certain type of habitat and some morphophysiological properties of the species, the ecological characteristics of these species underwent changes. The results of the study enabled us to reasonably determine the belonging of *R. akkemensis* and *R. lasiocarpus* to particular ecological groups, as well as to prove the efficiency of the indicator value correction method on relatively small samples of geobotanical data. The study for the first time allowed quantifying the ecological parameters of two rare alpine species of the genus *Ranunculus* according to the factors of soil moisture and nutrient availability.

The paper contains 4 Figures, 1 Table and 16 References.

Key words: *Ranunculaceae; endem; environmental factors; relevés; database; IBIS system; Altai.*

Acknowledgments: The authors express their gratitude to colleagues who kindly provided their relevés for our study: Eugeniy G. Zibzeev, Cand. Sci. (Biol.) (Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk), Andrei I. Pyak, Dr. Sci. (Biol.) (Tomsk State University, Tomsk) and Igor V. Volkov, Cand. Sci. (Biol.) (Tomsk State Pedagogical University, Tomsk).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Zverev A.A. Methodological aspects of indicator values use in biodiversity analysis. *Contemporary Problems of Ecology*. 2020; 13(4):321-332. doi: [10.1134/S1995425520040125](https://doi.org/10.1134/S1995425520040125)
2. Shchegoleva NV. Taxonomy of the genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) Siberia, Kazakhstan and Mongolia. *Sistematicheskie zametki po materialam Gerbariya imeni P.N. Krylova Tomskogo gosudarstvennogo universiteta = Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University*. 2017;116:22-28. doi: [10.17223/20764103.116.4](https://doi.org/10.17223/20764103.116.4) In Russian, English Summary
3. Revushkin AS. Vysokogornaya flora Altaya [High-mountain flora of Altai]. Tomsk: Tomsk State University Publ.; 1988. 320 p. In Russian
4. Schegoleva NV. Conjugate ecological analysis of genus *Ranunculus* L. in the Altai-Sayan floristic province. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2008;2(1):31-41. In Russian
5. Shchegoleva NV. New distribution data on Altai endemic *Ranunculus schischkinii* in floras of Russia and Kazakhstan. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2018;41:182-189. doi: [10.17223/19988591/41/11](https://doi.org/10.17223/19988591/41/11)
6. Shchegoleva NV, Turginov OT, Jabborov AM, Kodirov UH. Ecological and geographical features of the Western Pamir-Alai endemic *Ranunculus botschantzevii* Ovcz. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;49:175-186. doi: [10.17223/19988591/49/10](https://doi.org/10.17223/19988591/49/10) In Russian, English Summary
7. Schegoleva NV. New taxon of the genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae). *Sistematicheskie zametki po materialam Gerbariya imeni P.N. Krylova Tomskogo gosudarstvennogo universiteta = Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University*. 2006;97:19-20. In Russian, English Summary
8. Bruehlheide H, Dengler J, Jiménez-Alfaro B, Purschke O, Hennekens SM, Chytrý M, (...), Zverev A. sPlot - a new tool for global vegetation analyses. *J Vegetation Science*. 2019;30(2):161-186. doi: [10.1111/jvs.12710](https://doi.org/10.1111/jvs.12710)

9. Zverev AA. Informatsionnye tekhnologii v issledovaniyakh rastitel'nogo pokrova: Uchebnoe posobie [Information technologies in studies of vegetation. Tutorial]. Tomsk: TML-Press Publ.; 2007. 304 p. In Russian
10. *Metodicheskie ukazaniya po ekologicheskoi otsenke kormovykh ugodii lesostepnoi i stepnoi zon Sibiri po rastitel'nomu pokrovu* [Methodical recommendations on the ecological assessment of fodder resources in the forest-steppe and steppe zones of Siberia by the vegetation]. Tsatsenkin IA et al., compilers. Moscow: VNIIC after V.R. Vil'yams Publ.; 1974. 246 p. In Russian
11. *Metodicheskie ukazaniya po ekologicheskoi otsenke kormovykh ugodii tundrovoi i lesnoi zon Sibiri i Dal'nego Vostoka po rastitel'nomu pokrovu* [Methodical recommendations on the ecological assessment of fodder resources in the tundra and forest zones of Siberia and Far East by the vegetation]. Tsatsenkin IA, Savchenko IV and Dmitrieva SI, compilers. Moscow: VNIIC after V.R. Vil'yams Publ.; 1978. 302 p. In Russian
12. Zverev AA, Babeshina LG. Otsenka usloviy mestoobitaniya sfagnovykh mhov Zapadno-Sibirskoi ravniny po veduschim ekologicheskim faktoram: ob'ekty, materialy i metodicheskie osnovy [Assessment of the habitat conditions of *Sphagnum* mosses in West Siberian Plain by the leading environmental factors: Objects, data and methodological foundations]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta = Tomsk State University Journal*. 2009;325:167-173. In Russian
13. Zverev AA, Korolyuk AYU. Ekologicheskie shkaly rastenii Sibiri: metodika korrektsii s ispol'zovaniem sistemy IBIS [Indicator values of Siberian plants: Correction technique using the IBIS system]. In: *Otechestvennaya geobotanika: osnovnye vehi i perspektivy: Mat. Vseross. nauchn. konf.* [Proc. of All-Russian Sci. Conf. National Geobotany: Main milestones and prospects]. Vol. 2. St.-Petersburg: Botanical Institute RAS Press; 2011. pp. 357-359. In Russian
14. Zverev AA. Sravnitel'nyi analiz rastitel'nosti s ispol'zovaniem fitoindikatsionnykh shkal [Comparative analysis of vegetation using indicator value scales]. In: *Aktual'nye problemy geobotaniki: Sbornik statei i lektsiy IV Vseross. shkoly-konferentsii* [Proc. and lectures of IV All-Russian. Conf.-School. Contemporary Problems of Geobotany]. Ufa: MediaPrint; 2012. pp. 25-46. In Russian, English Summary
15. Pyak AI. Petrofity Russkogo Altaya [Petrophytes of the Russian Altai]. Tomsk: Tomsk State University Publ.; 2003. 202 p.
16. Prokop'ev EP. Ekologiya rasteniy (osobi, vidy, ekogruppy, zhiznennye formy): Uchebnik dlya biol. fakul'tetov vuzov [Plant ecology (individuals, species, eco-groups, life forms). Textbook]. Tomsk: Tomsk State University Publ.; 2001. 340 p.

*Received 15 July 2020; Revised 18 August 2020;
Accepted 03 September 2020; Published 25 September 2020*

Author info:

Zverev Andrey A, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Botany, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4394-4605>

E-mail: ibiss@rambler.ru

Shchegoleva Natalia V, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Botany, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2710-6131>

E-mail: schegoleva@outlook.com

Revushkin Alexander S, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Department of Botany, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: ppu@mail.tsu.ru

УДК 576.312.35 : 582.3/9
doi: 10.17223/19988591/51/13

Д.С. Чигодайкина, А.С. Ревушкин

Национальный исследовательский Томский государственный
университет, г. Томск, Россия

Хромосомные числа полыней (*Artemisia* L.) Центрального Казахстана

Впервые определены числа хромосом для центрально-казахстанских популяций *Artemisia juncea* Kar. et Kir., *A. turanica* (Krasch.) Poljakov, *A. terrae-albae* Krasch., *A. semiarida* (Krasch. ex Lavrenko) Filatova. Установлен новый таксономический статус эндемичного вида Центрального Казахстана *A. semiarida*, выявлена внутривидовая изменчивость *A. terrae-albae*.

Ключевые слова: числа хромосом; полыни; подрод *Seriphidium* (Besser ex Less.) Fourr.

Введение

Подрод *Seriphidium* (Besser ex Less.) Fourr. один из крупнейших в пределах рода *Artemisia* L. Он насчитывает более 100 видов и включает многочисленные виды, свойственные Центральной Азии и Средиземноморью [1]. Таксономия рода сложна в силу выраженного полиморфизма признаков [2]. Для уточнения систематики видов данного подрода целесообразно изучение хромосомных чисел. Подсчёт чисел хромосом у видов подрода *Seriphidium* может предоставить важную информацию по таксономии и эволюции подрода.

В 2013–2016 гг. представилась уникальная возможность изучить популяции 4 видов полыней из подрода *Seriphidium* в Центральном Казахстане, в том числе, подсчитать и их числа хромосом

Цель работы – изучение чисел хромосом видов полыней подрода *Seriphidium* из популяций Центрального Казахстана для уточнения их систематического положения и дополнения сведений по числу хромосом.

Материалы и методики исследования

Обработка материалов и получение препаратов метафазных пластинок для подсчёта хромосом выполнены на базе лаборатории Гербарий и Центра коллективного пользования Центрального сибирского ботанического сада (ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск) в 2016–2017 гг. Материалом исследования послужили зрелые семена 4 видов полыни: Полынь туранская – *Artemisia turanica* (Krasch.) Poljakov, П. ситниковая – *A. juncea* Kar. et Kir., П. бело-

земельная – *A. terrae-albae* Krasch., П. полусухая – *A. semiarida* (Krasch. et Lavrenko) Filatova. Материал собран на территории Центрального Казахстана в Улытауском районе в 200 км на юг от г. Караганды в полынно-боялычной полупустыне долины реки Сарысу (46°29' N 67°16' E) в сентябре 2013–2016 гг. Полупустынное сообщество долины реки Сарысу занимает пологие склоны юго-западной, северной и северо-восточной экспозиции, микрорельеф представлен неглубокими понижениями по линиям стока. Уникальность сообщества заключается в разнообразии полыней, в том числе и в наличии в нём 4 эндемичных видов подрода *Seriphidium*. Гербарные образцы исследованных видов полыней хранятся в Гербарии им. И.М. Красноборова (NS) Центрального сибирского ботанического сада (ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск).

Для исследования семена собраны с 10 близких по возрасту экземпляров каждого вида. Семена проращивали в прокалённом песке в 2-кратной повторности в климатокамере «Фитотрон» (Биоком, Россия) при дневной температуре 23 °С, ночной – 10 °С и 16-часовом световом суточном режиме при уровне освещённости 250–500 лк. При достижении корешками длины 0,5–2 см их помещали в 0,1%-ный раствор колхицина на 2 ч, затем переводили в модифицированный фиксатор Карнуа (ледяная уксусная кислота / спирт 96% в соотношении 1:3) на 24 ч. Материал после обработки фиксатором промывали в 96% спирте три раза по 30 мин.

Окраску проводили с использованием красителя гематоксилина. Для окраски фиксированные семена помещали в раствор хромокалиевых квасцов (двойная серная соль хрома и щелочного металла) на 60–90 мин. Семена вынимали и промывали в дистиллированной воде, после чего помещали в ёмкость с красителем (ацетогематоксин). Окрашенный корешок располагали на предметном стекле и формировали монослой клеток [3]. Изучение метафазных пластинок проводили при $\times 90$ с помощью микроскопа «Axioscop 40» (Carl Zeiss, Германия).

Результаты исследования и обсуждение

На территории Центральной Азии произрастает 69 видов полыней подрода *Seriphidium* [4, 5]. Нами определены числа хромосом 3 эндемичных видов Центральной Азии (*A. juncea*, *A. turanica*, *A. terrae-albae*) и эндемичного вида Центрального Казахстана (*A. semiarida*).

По данным J. Valles с соавторами, *A. juncea* и *A. turanica* Узбекистана имеют диплоидный набор хромосом ($2n=18$) [6]. Числа хромосом растений казахстанских популяций этих видов в Центральном Казахстане определены впервые: установлено, что они так же имеют диплоидный набор хромосом ($2n = 18$).

И.М. Крашенинников в 1949 г., дополняя и редактируя текст П.Н. Крылова по роду *Artemisia* L. во «Флоре Западной Сибири», описывает в рамках

A. terrae-albae два новых подвида (*A. terrae-albae* subsp. *massagetovii* Krasch., *A. terrae-albae* subsp. *semiarida* Krasch. et Lavrenko) [7]. Диагностические признаки у *A. terrae-albae* subsp. *semiarida* количественные и незначительно отличаются от соответствующих признаков типового образца. Высота плодоносящих побегов у нового подвида 20–35 см, дерновина менее плотная, серовато-зелёная от негустого войлочка. У типового образца высота плодоносящих побегов 15–30 см, дерновина более плотная, растение серовато-зелёное с тонким опушением. П.П. Поляков в 1961 г. во «Флоре СССР» выделяет в качестве разновидности *A. terrae-albae* var. *semiarida* Krasch. et Lavrenko, делая новую комбинацию и изменяя статус с нарушением ботанической номенклатуры без ссылки на описание и первоисточник [4].

Позже Н.С. Филатова во «Флоре Казахстана» (1966) повышает статус таксона [8], рассматривая *A. semiarida* как самостоятельный эндемичный вид Центрального Казахстана, распространённый в Западном и Восточном мелкосопочнике. Она делает новую комбинацию со ссылкой на первоисточник описания таксона, но в описании вида Н.С. Филатова приводит такие же диагностические признаки, что и И.П. Крашенинников при описании подвида. В качестве новых признаков ею приводится характеристика нижних стеблевых листьев: у *A. terrae-albae* нижние стеблевые листья имеют яйцевидную форму, 1–2 см длиной и 1 см шириной, тогда как у *A. semiarida* нижние стеблевые листья в очертании продолговато-яйцевидные, 1–2 (3) см длиной и до 1,5 см шириной [8]. Из вышеприведённых данных следует, что существует три разных мнения по таксономической принадлежности *A. semiarida*. Н.С. Филатова 1975 г. у *A. semiarida* отмечает тетраплоидный набор хромосом, не придавая этому диагностического значения [9]. По данным А.А. Красникова с соавторами, у образцов из Восточного Казахстана выявлен диплоидный набор хромосом ($2n=18$) [10]. Результаты наших исследований позволили обнаружить у *A. semiarida* только диплоидный набор хромосом ($2n = 18$), а у *A. terrae-albae* из Центрального Казахстана нами выявлены тетраплоидные особи ($2n = 36$).

Таким образом, по результатам исследования центрально-казахстанских популяций подтвердился из известных источников диплоидный набор для *A. juncea*, *A. turanica*, но для видов *A. semiarida* и *A. terrae-albae* определены новые хромосомные числа ($2n = 18$, $2n = 36$). Изучение морфологических отличий данных видов позволило выявить, что они отличаются только количественными признаками (высота растения, размер листьев и боковых ветвей). Наблюдение за *A. semiarida* и *A. terrae-albae* в одном и том же местообитании показало, что виды произрастают совместно, но приурочены к разным элементам микрорельефа, немного отличающимся по увлажнению. Во время исследований в течение нескольких летних сезонов, существенно отличающихся по количеству выпадающих летних осадков, удалось установить, что растения, обитающие в условиях семиаридного климата, реагируют на ежегодное изменение погодных условий, в годы с большим коли-

чеством осадков растения достаточно быстро развиваются, достигая более крупных размеров.

Эндемичный вид Центрального Казахстана *A. semiarida* имеет ареал, совпадающий с ареалом *A. terrae-albae*. Нередко популяции данных видов произрастают совместно и отличаются только количественными признаками, на которые могут влиять погодные условия, поэтому целесообразно рассматривать *A. semiarida* в рамках более широко распространённого вида *A. terrae-albae*. Статус внутривидового таксона соответствует разновидности. Данный вид может быть представлен как диплоидными, так и тетраплоидными особями. Среди полыней это не редкость, но в подроде *Seriphidium* большинство видов в основном представлены диплоидами [11]. Ранее такой статус таксона применялся П.П. Поляковым [4], но был опубликован с нарушениями правил ботанической номенклатуры, поэтому приводим соответствующее корректное название

Artemisia terrae-albae Krasch. var. *semiarida* (Krasch. et Lavrenko) Revush. et Czigodajkina stat. et comb. nov. – *A. terrae-albae* subsp. *semiarida* Krasch. et Lavrenko, 1949, Крашенинников, 1949, Фл. Зап. Сибири, 11: 2787.

Заключение

В ходе проведённых кариологических исследований видов подрода *Seriphidium* (*A. juncea*, *A. turanica*, *A. terrae-albae*, *A. semiarida*), произрастающих на территории Казахстана, получены данные по числам хромосом. Впервые у видов центрально-казахстанских популяций *A. juncea*, *A. turanica* выявлено число хромосом, составляющее $2n = 18$. У видов *A. semiarida* ($2n = 18$) и *A. terrae-albae* ($2n = 36$) обнаружен диплоидный и тетраплоидный набор хромосом, популяции *A. semiarida* имеют диплоидный набор хромосом ($2n = 18$). Изучение морфологической, хромосомной изменчивости и географического распространения позволили изменить статус *A. semiarida* до уровня разновидности – *A. terrae-albae* Krasch. var. *semiarida* (Krasch. et Lavrenko) Revush. et Czigodajkina.

Авторы выражают глубокую благодарность и признательность канд. биол. наук, н.с. лаборатории Гербарий Т.В. Аньковой (ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск) за помощь и предоставленную возможность изучения чисел хромосом.

Литература

1. Malik S., Vitales D., Hayat M., Korobkov A. Phylogeny and biogeography of *Artemisia* subgenus *Seriphidium* (Asteraceae: Anthemideae) // Taxon. 2017. Vol. 66, № 4. PP. 934–952. doi: 10.12705/664.8
2. Амельченко В.П. Биосистематика полыней Сибири. Кемерово : Изд-во «Ирбис», 2006. 237 с.
3. Кондратенко Е.И., Нетипанова Н.В., Скворцова А.И., Ломтева Н.А., Кузина Т.В. Цитогенетические и молекулярно-биологические методы анализа : учеб. пособие. Астрахань : Астраханский изд. дом, 2015. 68 с.

4. Поляков П.П. Род *Artemisia* L. // Флора СССР / под ред. Б.К. Шишкина, Е.Г. Боброва. М. : Изд-во Академии наук СССР, 1961. Т. 26. С. 562–631.
5. Филатова Н.С. Подрод *Seriphidium* (Bess.) Peterm. // Растения Центральной Азии / гл. ред. В.И. Грубов. СПб. : Изд-во Санкт-Петербург. гос. хим.-фарм. акад., 2003. Вып. 14а. С. 118–132.
6. Vallès J., Torrel M., Garsia-Jacas N., Kapustina L.A. New or rare chromosome counts in the genera *Artemisia* L. and *Mausolea* Bunge (Asteraceae, Anthemideae) from Uzbekistan // Botanical Journal of the Linnean Society. 2001. Vol. 135, № 4. PP. 391–400. doi: [10.1111/j.1095-8339.2001.tb00789.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2001.tb00789.x).
7. Крашенинников И.М. *Artemisia* L. Полынь // Флора Западной Сибири / гл. ред. П.Н. Крылов. Томск : Изд-во ТГУ, 1949. Вып. 11. С. 2760–2822.
8. Филатова Н.С. Род *Artemisia* L. // Флора Казахстана / гл. ред. Н.В. Павлов. Алма-Ата : Наука, 1966. Т. 9. С. 76–140.
9. Филатова Н.С. Кариосистематика некоторых солончаковых видов полыней подрода *Seriphidium* (Bess.) Roy // Ботанические материалы Гербария института ботаники АН КазССР. Алма-Ата : Наука, 1975. Вып. 9. С. 13–21.
10. Красников А.А., Жирова О.С., Ломоносова М.Н., Смирнов С.В. Числа хромосом представителей семейства Asteraceae из Южной Сибири и Казахстана // Ботанический журнал. 2003. № 9. С. 151–153.
11. Чепинога В.В. Хромосомные числа растений флоры Байкальской Сибири. Новосибирск : Наука, 2014. 419 с.

*Поступила в редакцию 04.18.2020 г.; повторно 11.06.2020 г.; 17.08.2020 г.
принята 03.09.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.*

Авторский коллектив:

Чигодайкина Дарья Сергеевна – аспирант кафедры ботаники, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: dashachigodaykina@mail.ru

Ревушкин Александр Сергеевич – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой ботаники, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: ppu@mail.tsu.ru

Для цитирования: Чигодайкина Д.С., Ревушкин А.С. Хромосомные числа полыней (*Artemisia* L.) Центрального Казахстана // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 223–229. doi: [10.17223/19988591/51/13](https://doi.org/10.17223/19988591/51/13)

For citation: Chigodaykina DS, Revushkin AS. Chromosome numbers of wormwoods (*Artemisia* L.) from Central Kazakhstan. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:223-229. doi: [10.17223/19988591/51/13](https://doi.org/10.17223/19988591/51/13) In Russian, English Summary

Darya S. Chigodaykina, Alexander S. Revushkin

Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Chromosome numbers of wormwoods (*Artemisia* L.) from Central Kazakhstan

The subgenus *Seriphidium* (Besser. ex Less.) Fourr., which includes more than 100 species, is one of the largest subgenera within the genus *Artemisia* L. (Asteraceae Bercht. et J. Presl.). The aim of this work was to study the chromosome numbers of some wormwoods species of the subgenus *Seriphidium* to clarify their systematic position.

The paper presents the chromosome numbers of 4 species (*Artemisia turanica* (Krasch.) Poljakov, *A. juncea* Kar. et Kir., *A. terrae-albae* Krasch., and *A. semiarida* (Krasch. et Lavrenko) Filatova) of the subgenus *Seriphidium*. The material objects of the study was mature seeds collected during field survey (2013–2016) in the territory of Central Kazakhstan (Karaganda Region, Ulytau District, Sarysu River valley, wormwood and hawthorn semi-desert) with 10 specimens of each species close in age. This study compares the literature data with the authors' results of chromosome numbers. During the study, the chromosome numbers were determined for the first time for 2 wormwood species in the Kazakhstan population: *A. juncea* ($2n=18$) and *A. turanica* ($2n=18$). The obtained results show the homogeneity within the population of these species in the territory of Central Asia since for the Uzbekistan population, according to the data of Vallès *et al.*, *A. turanica* and *A. juncea* also have a diploid set of chromosomes. To clarify the systematic position and identify the intraspecific polymorphism of *A. terrae-albae* and *A. semiarida*, the morphological variability, geographical distribution, and chromosome numbers of these species were studied. Diploid and tetraploid sets of chromosomes were found in these species. The *A. semiarida* population has an exclusively diploid set of chromosomes ($2n=18$). According to the literature data for *A. terrae-albae*, a diploid set of chromosomes is given, but along with diploid individuals in the same region, we also found populations with tetraploid individuals ($2n=36$). The study of the morphological differences of these species made it possible to reveal that they differ only in quantitative traits (plant height, size of leaves and lateral branches) which depend on weather conditions. In years with a relatively high amount of precipitation, plants develop rather quickly, reaching larger sizes. The endemic species of Central Kazakhstan *A. semiarida* has an area that coincides with the area of *A. terrae-albae*. Populations of these species often grow together.

Thus, the study of the morphological variability, chromosome numbers, and geographical distribution of these species made it possible to change the status of *A. semiarida* and consider it as a variety of the more widespread species *A. terrae-albae*, which can be represented by both diploid and tetraploid species.

The papers contains 11 References.

Key words: chromosome numbers; wormwoods; subgenus *Seriphidium* (Besser. ex Less.) Fourr.

Acknowledgments: The authors express their deep gratitude and appreciation to Tatyana Ankova, Cand. Sci. (Biol.)ogycandidate of biological sciences, Rresearcher of the Herbarium laboratory (of the Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk) (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences), for help and opportunity to study chromosome numbers.

References

1. Malik S, Vitales D, Hayat M, Korobkov A. Phylogeny and biogeography of *Artemisia* subgenus *Seriphidium* (Asteraceae: Anthemideae). *Taxon*. 2017;66(4):934-952. doi: [10.12705/664.8](https://doi.org/10.12705/664.8)
2. Amel'chenko VP. Biosistematika polyney Sibiri [Biosystematics wormwoods of Siberia]. Kemerovo: Irbis Publ.; 2006. 237 p. In Russian
3. Kondratenko EI, Netipanova NV, Skvortsova AI, Lomteva NA, Kuzina TV. Tsyitogeneticheskie i molekulyarno-biologicheskie metody analiza. Uchebno-metodicheskoe posobie [Cytogenetics and biological molecular methods of analysis]. Astrakhan: Astrakhanskiy izdatel'skii dom Publ.; 2015. 68 p. In Russian
4. Polyakov PP. Rod *Artemisia* L. [*Artemisia* L.]. In: *Flora SSSR* [Flora of USSR]. Shishkin BK and Bobrov EG, editors. Moscow: AS USSR Publ.; 1961. Vol. 26. pp. 562-631. In Russian

5. Filatova NS. *Subgenus Seriphidium* (Bess.) Peterm. *Plants of Central Asian*. Enfield: Sciencs Publishers; 2007. Iss. 14a. pp. 136-152.
6. Vallès J, Torrel M, Garsia-Jacas N, Kapustina LA. New or rare chromosome counts in the genera *Artemisia* L. and *Mausolea* Bunge (Asteraceae, Anthemideae) from Uzbekistan. *Botanical J the Linnean Society*. 2001;135(4):391-400. doi: 10.1111/j.1095-8339.2001.tb00789.x
7. Krashennnikov IM. *Artemisia* L. Polyn [*Artemisia* L. Wormwood]. In: *Flora Zapadnoy Sibiri* [Flora of Western Siberia]. Krylov PN, editor-in-chief. Tomsk: TGU Press; 1949. Iss. 11. pp. 2760-2822. In Russian
8. Filatova NS, Rod *Artemisia* L. [Genus *Artemisia* L.]. In: *Flora Kazakhstan* [Flora of Kazakhstan]. Pavlov NV, editor-in-chief. Alma-Ata: Nauka Publ.; 1966. Vol. 9. pp. 76-140. In Russian
9. Filatova NS. Kariosistematika nekotoryh solonchakovykh vidov polyney podroda *Seriphidium* (Bess.) Roy. [Karyotaxonomy of some solonchak wormwoods species of subgenus *Seriphidium* (Bess.) Roy.]. In: *Botanicheskie materialy Gerbariya instituta botaniki AN KazSSR* [= Botanical materials of the Herbarium of the Institute of Botany at AS of the Kazakh SSR]. Alma-Ata: Nauka Publ.; 1975. Iss. 9. pp. 13-21. In Russian
10. Krasnikov AA, Zhirova OS, Lomonosova MN, Smirnov SV. Chromosome numbers of *Asteraceae* species from the Southern Siberia and Kazakhstan. *Botanicheskiy zhurnal = Botanical J*. 2003;9:151-153. In Russian
11. Chepinoga VV. Khromosomnye chisla rasteniy flory Baykal'skoy Sibiri [Chromosome numbers of plants of the flora of Baikal Siberia]. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 2014. 419 p. In Russian

*Received 18 April 2020; Revised 11 June and 17 August 2020;
Accepted 03 September 2020; Published 25 September 2020*

Author info:

Chigodaykina Darya S, Postgraduate Student, Department of Botany, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: dashachigodaykina@mail.ru

Revushkin Alexander S, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Botany, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: ppu@mail.tsu.ru