

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВЕСТНИК ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

Tomsk State University Journal of Biology

Научный журнал

2021

№ 55

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 завершённых 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, учитывая 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. Внесён 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, Пущино, Россия)

Громохов Т.И. – отв. редактор (Московский политехнический университет, Москва, Россия)

Данилец М.Г. – отв. редактор (НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, Томск, 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)

Тамбовцева Р.В. – отв. редактор (Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодёжи и туризма, Москва, 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); **Минеева 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 Вл.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); **Лупашинов В.В.** (Университет Арканзаса медицинских наук, Арканзас, США); **Максимов Т.Х.** (Институт биологических проблем криоликтозоны СО РАН, Якутск, Россия); **Носов А.М.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия); **Олеников Д.Н.** (Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия); **Пердисес А.** (Национальный Музей естественных наук, Мадрид, Испания); **Смирнова О.В.** (Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов РАН, Москва, Россия); **Соколова Ю.Я.** (Университет Луизианы, Батон Руж, Луизиана, США); **Степанов В.А.** (НИИ медицинской генетики Томского НЦ СО РАМН, Томск, Россия); **Шарахов И.В.** (Политехнический университет Вирджинии, Вирджиния, США).

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

Подписано в печать 26.09.2021 г. Формат 70х108^{1/16}. Усл. печ. л. 14,3. Тираж 50 экз. Заказ № 4792. Цена свободная.

Дата выхода в свет 29.09.2021 г.

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

**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

biojournals@tsu.ru, 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, Pyschchino, Russia

Gromovyykh TI - Editor, Moscow Polytechnic University, Moscow, Russia

Danilets MG - Editor, ED Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

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

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

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

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

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

Tambovtseva RV - Editor, Russian State University of Physical Education, Sport, Youth and Tourism, Moscow, 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]

Alexandroviy 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); **Olennikov DN**, Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Ulan-Ude, Russia); **Perdices A**, National Museum of Natural Sciences (Madrid, Spain); **Smirnova OV**, Center of Ecology and Productivity of Forests RAS (Moscow, Russia); **Sokolova YY**, Louisiana State University (Baton Rouge, Louisiana, USA); **Stepanov VA**, Research Institute of Medical Genetics SB RAMS (Tomsk, Russia); **Sharakhov IV**, Virginia Polytechnic Institute and State University (Blacksburg, Virginia, USA)

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

Passed for printing 26.09.2021. Format 70x108¹/₁₆. Conventional printed sheets 14,3. Circulation is 50 copies. Orders No 4792. Open price. Date of publication 29.09.2021.

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

СОДЕРЖАНИЕ

БОТАНИКА

- Артемов И.А.** Использование краевых местонахождений видов для уточнения западной границы Алтае-Енисейской флористической провинции.....6
Климов А.В., Прошкин Б.В. Морфология *Populus suaveolens* Fisch. в популяциях Северо-Востока России19

КЛЕТочная Биология и Генетика

- Беседина Е.Н., Киль В.И.** ДНК-полиморфизм и генетическое разнообразие популяции дубовой кружевницы (*Corythucha arcuata* Say) в Краснодарском крае42
Снегин Э.А., Бархатов А.С., Киселев В.В., Юсупов С.Р., Снегина Е.А. Оценка степени повреждения геномной ДНК популяций озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) Белгородской агломерации методом ДНК-комет58

Физиология

- Варламова Н.Г., Бойко Е.Р.** Объемные характеристики функции внешнего дыхания у лыжников-гонщиков в годовом цикле.....77
Касатова А.И., Каныгин В.В., Завьялов Е.Л., Разумов И.А., Кичигин А.И., Цыганкова А.Р., Соловьева О.И., Касатов Д.А., Чернов В.И. Накопление и токсические эффекты борсодержащих препаратов в моделях SW-62097

Физиология и Биохимия Растений

- Кадырбаев М.К., Головацкая И.Ф., Сатканов М.Ж.** Особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *in vitro*, полученных из разных фрагментов побега картофеля.....114
Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Поляков А.К., Дмитриев А.П. Салициловая кислота и формирование адаптивных реакций растений на абиотические стрессоры: роль компонентов сигнальной сети.....135

ЭКОЛОГИЯ

- Chelyadina N.S., Popov M.A.** Mortality of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) depending on sex.....166

TABLE OF CONTENTS

BOTANY

Artemov IA. Using marginal species localities for the revision of the western boundary of the Altai-Yenisei floristic Province.....	6
Klimov AVI, Proshkin BVI. <i>Populus suaveolens</i> Fisch. morphology in the populations of the North-East of Russia.....	19

CELL BIOLOGY & GENETICS

Besedina EN, Kil VI. DNA polymorphism and genetic diversity of the oak lace bug (<i>Corythucha arcuata</i> Say) population in Krasnodar Krai.....	42
Snegin EA, Barkhatov AS, Kiselev VV, Yusupov SR, Snegina EA. Estimation of genomic DNA damage in populations of the marsh frog (<i>Pelophylax ridibundus</i> Pallas, 1771) of the Belgorod agglomeration by DNA comet assay	58

PHYSIOLOGY

Varlamova NG, Boiko EP. Volumetric characteristics of the external respiration function in ski racers in the annual cycle.....	77
Kasatova AI, Kanygin VV, Zav'yalov EL, Razumov IA, Kichigin AI, Tsygankova AR, Solov'eva OI, Kasatov DA, Chernov VI. Accumulation and toxic effects of boron-containing drugs in SW-620 models	97

PLANT PHYSIOLOGY & BIOCHEMISTRY

Kadyrbaev MK, Golovatskaya IF, Satkanov MZh. Features of regenerants morphogenesis and metabolism <i>in vitro</i> , obtained from different fragments of potato shoots.....	114
Kolupaev YE, Yastreb TO, Polyakov AK, Dmitriev AP. Salicylic acid and formation of plant adaptive responses to abiotic stressors: role of signaling network components.....	135

ECOLOGY

Chelyadina NS, Popov MA. Mortality of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamark, 1819) depending on sex.....	166
---	-----

БОТАНИКА

УДК 581.9(571.1/.5)

doi: 10.17223/19988591/55/1

И.А. Артемов

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Использование краевых местонахождений видов для уточнения западной границы Алтае-Енисейской флористической провинции

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН на 2021 г. по проекту «Биологическое разнообразие криптогамных организмов и сосудистых растений Северной Азии и сопредельных территорий, их эколого-географическая характеристика и мониторинг» (AAAA-A21-121011290024-5)

Разработан и апробирован метод флористического районирования, в основе которого лежит использование краевых местонахождений точечных ареалов. Сформулированы предложения по уточнению западной границы Алтае-Енисейской флористической провинции, разделяющей равнинные и горные территории на юге Западной Сибири. Южную часть границы следует провести западнее отрогов Алтайских гор, северную часть – по р. Енисей.

Ключевые слова: флористическое районирование; точечные ареалы; геокодирование; Сибирь; Азиатская Россия

Для цитирования: Артемов И.А. Использование краевых местонахождений видов для уточнения западной границы Алтае-Енисейской флористической провинции // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 6–18. doi: 10.17223/19988591/55/1

Введение

Флористическое районирование представляет собой необходимый этап в упорядочивании знаний о географическом распределении таксонов растений. Итогом районирования выступает схема географических выделов (фитохорий), отличающихся друг от друга по составу и структуре флоры.

Существует несколько подходов к выделению фитохорий и созданию схем фитохорий, используемых во флористических работах: по основным общегеографическим подразделениям, установленным с учетом крупных речных бассейнов или горных стран [1]; по характеру растительности с учетом геологического строения и рельефа изучаемой территории [2, 3]; по на-

личию эндемичных таксонов [4, 5]; на основании сравнения флор ключевых территорий – рабочих флористических районов, административных единиц, конкретных флор [6–10]; по полосам сгущений границ ареалов [11, 12] или линиям совпадения границ ареалов [13].

Следует отметить, что сравнение флор ключевых территорий позволяет группировать более сходные и разделять менее сходные флоры физико-географических выделов или административных единиц, но не отвечает на вопрос о границах фитохорий. Чаще всего они проводятся условно, перпендикулярно линиям наименьшего сходства флор [14]. А.С. Ревушкин [15] указывает, что для проведения границ между округами и районами целесообразно использовать в качестве вспомогательных признаков особенности рельефа, ландшафта и климата. Л.И. Малышев с соавторами [7] в качестве границ между фитохориями Азиатской России рассматривают рубежи рабочих флористических районов, а поскольку во многих случаях в качестве таких районов принимаются административные единицы (например, Новосибирская и Томская области, Республики Алтай и Хакасия), то в качестве флористических границ между ними принимаются административные границы между субъектами Российской Федерации. В результате границы фитохорий, выделяемые разными авторами на основании аналогичных подходов, могут существенно отличаться. Так, на схеме А.С. Ревушкина [15] горные территории Южной Сибири от Салаира и Западного Алтая до Восточного Саяна входят в состав Алтае-Саянской флористической провинции, тогда как на карте флористического деления Азиатской России Л.И. Малышева с соавторами [7, 16] граница между Западносибирской гемибореальной и Алтае-Енисейской горно-гемибореальной флористическими провинциями отделяет Западный Алтай и Салаир от других, расположенных восточнее, горных систем Южной Сибири.

Более очевидным представляется очерчивание фитохорий по полосам сгущений границ ареалов либо линиям совпадения их границ. Однако это предполагает проведение границ ареалов на основании известных местонахождений видов и существенно зависит от количества фактических данных и степени изученности территории [17]. Также на форму ареала влияет выбранная методика оконтуривания краевых местонахождений [18]. Кроме того, выявление линий совпадения границ ареалов возможно по видам, удовлетворяющим ряду условий и в силу этого составляющим меньшую часть флоры. Это, в первую очередь, хорошо изученные виды, входящие в состав обычных для данной территории сообществ [13].

В настоящей работе предложено использовать для определения границ фитохорий не ареалы и сгущения их границ, а лишь наиболее западные и восточные местонахождения видов и скопления этих краевых точек. Цель работы – применение нового метода для уточнения западной границы Алтае-Енисейской флористической провинции (WbAYP).

Материалы и методики исследования

Для определения крайних западных и восточных местонахождений использованы точечные карты ареалов 2 569 видов и подвидов сосудистых растений, опубликованные в коллективной монографии «Флора Сибири» [19].

Местонахождения на точечных картах геокодированы средствами настольной геоинформационной системы (ГИС) ArcView GIS 3.2a и модуля ArcView Spatial Analyst 2.0a (регистрационные номера лицензий 843181116338 и 849601104159). Методика и результаты геокодирования опубликованы в Global Biodiversity Information Facility (GBIF) [20]. Геокодированные координаты местонахождений и дополнительные данные (название таксона, номер тома и карты) помещены в таблицы базы данных местонахождений (DBLoc) в MS Access.

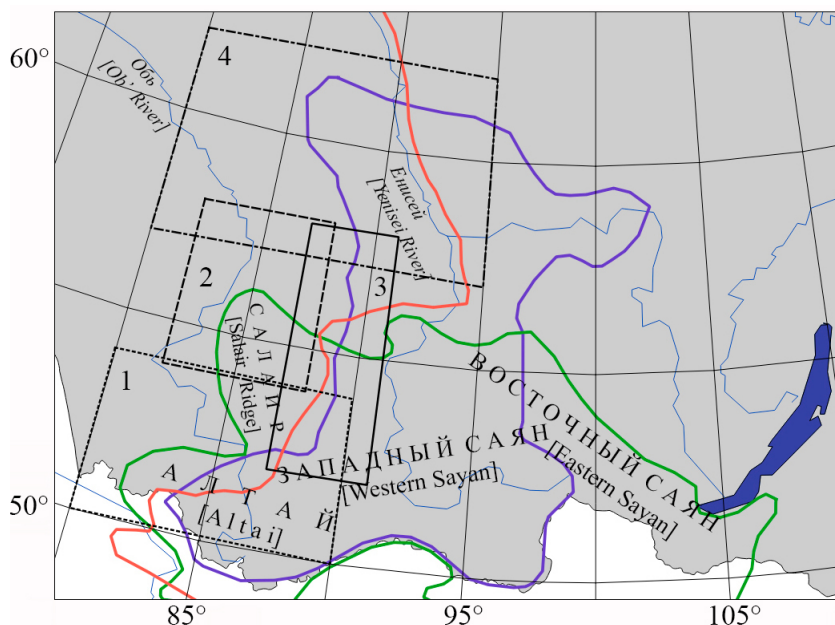


Рис. 1. Границы фитохорий [Fig. 1. Phytchoria boundaries]:

- граница между Западной Сибирью и Восточной Сибирью во «Флоре СССР» [Boundary between Western Siberia and Eastern Siberia in the Flora of the USSR] [1];
- Алтай-Саянская флористическая провинция [Altai-Sayan floristic Province] [15];
- Алтай-Енисейская флористическая провинция [Altai-Yenisei floristic Province] [16]

Общее число строк в таблицах DBLoc, соответствующих местонахождениям на точечных картах ареалов во «Флоре Сибири» [19], составило 169854. Поскольку цель работы заключалась в коррекции WbAYP, из DBLoc для каждого вида или подвида, представленного более чем двумя точками, отобраны крайние западные и восточные местонахождения, попадающие в

контур 49°–62°N и 80°–100°E. Меридиональная протяженность контура соответствует меридиональной протяженности WbAYP, а широтная протяженность – расстоянию приблизительно в 10° к западу и востоку от нее. Отбор крайних точек из DBLoc выполнялся с помощью программ в Visual Basic for Applications [21, 22], написанных автором. На данном этапе была сформирована база данных краевых местонахождений (DBMarLoc), включающая данные о 1654 точках.

Для более детального рассмотрения WbAYP в ее южной, центральной и северной частях из DBMarLoc выбраны частные массивы точек, попадающие в перекрывающиеся контуры меньшего размера. Последние покрывают отдельные участки WbAYP либо находятся вблизи нее:

- контур 1 – южный участок WbAYP (50°–54°N, 80°–90°E);
- контуры 2, 3 – центральный участок WbAYP (54°–58°N, 82°–88°E; 52°–58°N, 87°–91°E);
- контур 4 – северный участок WbAYP (57°–62°N, 80°–95°E) (рис. 1)

Для визуализации границ фитохорий использована ГИС NextGIS QGIS.

Для визуализации краевых местонахождений, попадающих в контуры, а также для проверки гипотезы о полной пространственной случайности процесса, порождающего точечный образ распределения краевых местонахождений, использован пакет spatstat среды статистического программирования R [23]. Для визуализации местонахождений применена функция plot.ppp, для проверки гипотезы о полной пространственной случайности использован критерий χ^2 на основе квадратов, реализованный в функции quadrat.test [23, 24].

Результаты исследования и обсуждение

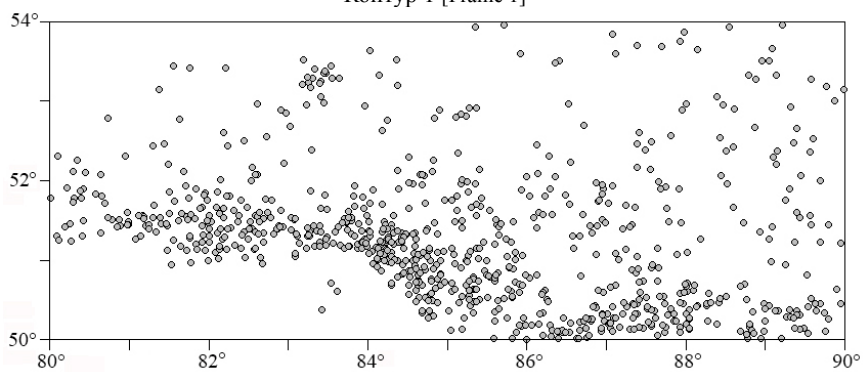
Анализ количества и распределения краевых местонахождений видов в контурах, соответствующих южному, центральному и северному участкам WbAYP, потребовал их отдельного рассмотрения и обсуждения.

Южный участок WbAYP

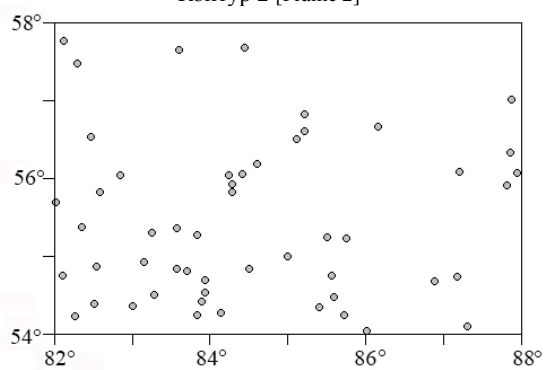
Число крайних западных и восточных местонахождений сосудистых растений в контуре 1 (рис. 2) составило 827 точек. Проверка гипотезы о случайном распределении точек в контуре 1 для сетки 10×4 квадратов со стороной в 1° дает уровень значимости меньше 2,2e–16, что меньше 0,001 и позволяет отклонить нулевую гипотезу о полной пространственной случайности.

Отклонение от случайного распределения точек проявляется в их скоплении в юго-западной части контура, соответствующей горам Алтая вдоль государственной границы РФ. Скопление точек выходит за 84°E – крайнюю западную точку Алтае-Енисейской провинции. Следует отметить, что западная часть скопления совпадает с горной частью Алтайского края и выходит за границу Алтае-Енисейской провинции по Л.И. Малышеву с соавторами [16], больше соответствуя границе Алтае-Саянской провинции, очерченной А.С. Ревушкиным [15] (см. рис. 1).

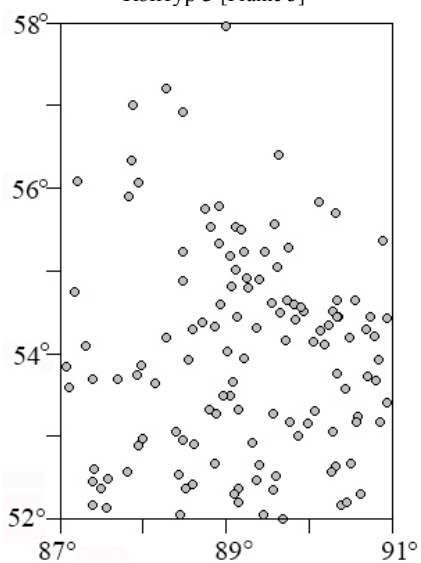
Контур 1 [Frame 1]



Контур 2 [Frame 2]



Контур 3 [Frame 3]



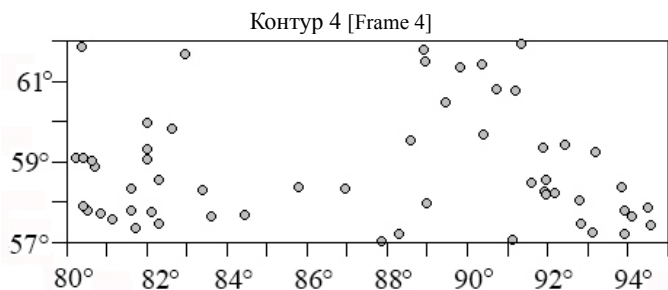


Рис. 2. Контур, покрывающий отдельные участки WbAYP и участок к западу от нее (с указанием краевых местонахождений видов/подвидов):

[Fig. 2. Frames covering parts of the WbAYP and a frame to the west of it (with marginal localities of species/subspecies)]:

Контур 1 – 50°–54° с.ш., 80°–90° в.д. [Frame 1 – 50°–54°N, 80°–90°E];

Контур 2 – 54°–58° с.ш., 80°–88° в.д. [Frame 2 – 54°–58°N, 80°–88°E];

Контур 3 – 52°–58° с.ш., 87°–91° в.д. [Frame 3 – 52°–58°N, 87°–91°E];

Контур 4 – 56°–62° с.ш., 80°–96° в.д. [Frame 4 – 56°–62°N, 80°–96°E];

○ – краевые западные/восточные местонахождения [Marginal western/eastern localities]

Так, в пределах Алтайского края на Тигерекском хребте находятся крайние западные сибирские местонахождения *Schulzia crinita* (Pall.) Spreng., *Lloydia serotina* (L.) Rchb., *Salix vestita* Pursh, *Minuartia biflora* (L.) Schinz et Thell., *Smelowskia calycina* (Stephan) C.A. Mey., *Saxifraga terekensis* Bunge, *Sibbaldia procumbens* L., *Hedysarum theinum* Krasnob., *Doronicum altaicum* Pall. [25].

Очевидно, что Алтай-Енисейская флористическая провинция должна включать западные отроги Алтайских гор, а WbAYP, по Л.И. Малышеву с соавторами [16], в своей южной части должна совпадать с границей Алтай-Саянской провинции, по А.С. Ревушкину [15].

Центральный участок WbAYP

Существуют разные точки зрения на флористическую границу севернее Алтая. А.С. Ревушкин [15] проводит границу Алтай-Саянской провинции таким образом, что в ее состав входит Салаирский кряж. Л.И. Малышев с соавторами [16] центральную часть WbAYP проводят восточнее, по границе Хакасии и Кемеровской области, что в определенной мере соответствует меридиональному горному поднятию, состоящему из Абаканского хребта и хребта Кузнецкий Алатау (см. рис. 1). Для проверки этих точек зрения рассмотрены два контура, из которых западный (контур 2) включает Салаирский кряж, а восточный (контур 3) – фрагменты Абаканского хребта и хребта Кузнецкий Алатау.

Число краевых местонахождений в контуре 2 составило 52 точки (рис. 2, контур 2). Проверка гипотезы о полной пространственной случайности в распределении краевых местонахождений в контуре 2 для сетки 6×4 квадратов со стороной в 1° дает уровень значимости 0,045, что меньше 0,05 и не позволяет принять гипотезу о полной пространственной случайности в распределении краевых точек в данном контуре. Однако обращает на себя внимание

близость уровня значимости к пороговому значению, превышение которого позволяет допустить случайное распределение местонахождений в контуре 2.

Число краевых местонахождений в контуре 3 составило 128 точек (см. рис. 2, контур 3). Проверка гипотезы о случайном распределении точек в контуре 3 для сетки 4×6 квадратов со стороной в 1° дает уровень значимости 6,237e-10, что меньше 0,001 и позволяет отклонить нулевую гипотезу о полной пространственной случайности.

Скопление краевых местонахождений в пределах координат 52–53°N и 89–90°E соответствует залеганию Абаканского хребта и хребтов меньшего масштаба на стыке Абаканского хребта и хребта Западный Саян в южной части Республики Хакасия, сравнительно недалеко от границы с Кемеровской областью. Крайние западные точки здесь имеют *Aconitum biflorum* Fisch. ex DC., *Oxytropis kusnetzovii* Krylov et Steinb., *Conioselinum longifolium* Turcz.

Скопление точек в пределах координат 54–56°N и 89–91°E соответствует северной оконечности Республики Хакасия, с западной границей, проходящей примерно вдоль меридиана 89°E по отрогам хребта Кузнецкий Алатау. Крайние западные местонахождения здесь имеют *Salix saxatilis* Turcz. ex Ledeb., *Betula divaricata* Ledeb., *Veronica alpina* L. s. str.

Принимая во внимание существенное преобладание краевых местонахождений в контуре 3 по сравнению с контуром 2, а также большую разницу в значениях уровней значимости при проверке гипотезы о соответствии точечных образов местонахождений в контурах 2 и 3 полной пространственной случайности, по-видимому, следует принять точку зрения В.Л. Комарова [1] и Л.И. Малышева с соавторами [16] и провести флористическую границу в контуре 3: в интервале 52–56°N, примерно вдоль меридиана 89°E. Следует отметить, что, кроме упомянутых, существуют разные точки зрения на рассмотрение Салаирского кряжа в составе той или иной фитохории. Так, П.Н. Крылов [26] и А.Л. Тахтаджян [4] включают Салаирский кряж в состав Алтае-Саянской провинции. Однако Н.Н. Лашинский [27], отмечая, что Салаир находится на северо-западе Алтае-Саянской горной системы, на основании географического анализа характеризует его флору как наиболее восточный умеренно-континентальный низкогорный вариант атлантических флор.

Северный участок WbAYP

Данный участок границы Л.И. Малышев с соавторами [16] проводят по административной границе между Томской областью и Красноярским краем, которая проходит в междуречье Оби и Енисея, по заболоченной Кетско-Тымской равнине.

Число краевых местонахождений в контуре 4 составляет 56 точек. Проверка гипотезы о случайном распределении краевых местонахождений в контуре 4 для сетки 15×5 квадратов со стороной в 1° дает уровень значимости 0,11, что больше 0,05 и позволяет принять нулевую гипотезу о полной пространственной случайности.

Сравнительно небольшое число краевых местонахождений и их случайное распределение не позволяет наметить флористическую границу по

краевым точкам. Тем не менее обращает на себя внимание почти полное отсутствие краевых местонахождений в месте прохождения северной части WbAYP на участке в пределах 58°–62°N и 84°–88°E (см. рис. 2, контур 4). В то же время определенное число краевых местонахождений тяготеет к рекам Обь, Енисей и их притокам. Такое распределение краевых местонахождений, по-видимому, обусловлено тем, что коллекторы путешествовали наиболее удобным летом речным транспортом.

По всей видимости, северный участок западной границы провинции при имеющемся количестве данных следует проводить вслед за В.Л. Комаровым [1] по географическому принципу по р. Енисей, которая отделяет расположенные к западу от нее Енисейскую и Кетско-Тымскую равнины от расположенных восточнее Енисейского кряжа и Заангарского плато. Восточнее Енисея в этом широтном интервале лежат крайние западные местонахождения *Lilium pensylvanicum* Ker-Gawl., *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. и *Chrysanthemum zawadskii* Herbrich subsp. *peleiolepis* (Trautv.) Zuev.

Заключение

На основании предложенного метода, в основе которого лежит использование краевых местонахождений видов, принимаемых в качестве маркеров границ ареалов, следует скорректировать западную границу Алтае-Енисейской провинции, разделяющую равнинные и горные территории на юге Западной Сибири. В южной части граница должна проходить западнее своего настоящего положения, чтобы в состав провинции вошли западные отроги Алтайских гор. Северная часть границы, по-видимому, должна проходить по р. Енисей.

Автор благодарен старшему инженеру ЦСБС СО РАН А.В. Егоровой за помощь при работе с ГИС, а также ведущим научным сотрудникам ЦСБС СО РАН д-ру биол. наук Н.И. Макуниной и д-ру биол. наук О.Ю. Писаренко за обсуждение рукописи.

Литература

1. Комаров В.Л. Предисловие // Флора СССР. Т. 1 / под ред. М.М. Ильина. Л. : Изд-во АН СССР, 1934. С. 1–12.
2. Горчаковский П.Л., Никонова Н.Н., Фамелис Т.В. Растительность и ботанико-географическое деление территории // Определитель сосудистых растений Среднего Урала / под ред. П.Л. Горчаковского. М. : Наука, 1994. С. 6–12.
3. Определитель растений Республики Тывы / И.М. Красноборов и др. ; под ред. Д.Н. Шауло. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2007. 706 с.
4. Takhtajan A. Floristic Regions of the World. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, 1986. 522 p.
5. Liu Z.-W., Peng H. Notes on the key role of stenochoric endemic plants in the floristic regionalization of Yunnan // Plant Diversity. 2016. № 38 (6). PP. 289–294. doi: [10.1016/j.pld.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.11.011)
6. Ревушкин А.С. Высокогорная флора Алтая. Томск : Изд-во Том. ун-та, 1988. 320 с.
7. Малышев Л.И., Байков К.С., Доронькин В.М. Флористическое деление Азиатской России на основе количественных признаков // Krylovia. 2000. Т. 2, № 1. С. 3–16.

8. Born J., Linder H.P., Desmet P. The Greater Cape Floristic Region // *Journal of Biogeography*. 2007. № 34 (1). PP. 147–162. doi: [10.1111/j.1365-2699.2006.01595.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01595.x)
9. Bannister J.R., Vidal O.J., Teneb E., Sandoval V. Latitudinal patterns and regionalization of plant diversity along a 4270-km gradient in continental Chile // *Austral Ecology*. 2012. № 37. PP. 500–509. doi: [10.1111/j.1442-9993.2011.02312.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2011.02312.x)
10. Jung S., Cho Y-C. Redefining floristic zones in the Korean Peninsula using high-resolution georeferenced specimen data and self-organizing maps // *Ecology and Evolution*. 2020. № 10 (20). PP. 11549–11564. doi: [10.1002/ece3.6790](https://doi.org/10.1002/ece3.6790)
11. Бубырева В.А. Флористическое районирование северного макросклона Русской равнины на основе сгущений границ ареалов // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Биология*. 2004. Серия 3. Вып. 1. С. 35–68.
12. Баранова О.Г. Предварительное флористическое районирование Удмуртской Республики // *Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о земле*. 2016. Т. 26, вып. 2. С. 27–34.
13. Разумовский С.М. О границах ареалов и флористических линиях // *Бюллетень Главного ботанического сада*. 1969. Вып. 72. С. 20–28.
14. Разумовский С.М. Флористическое районирование по ключевым местностям // Разумовский С.М. Труды по экологии и биогеографии (полное собрание сочинений). М. : Товарищество научных изданий КМК, 2011. С. 482–483.
15. Ревушкин А.С. Материалы к флористическому районированию Алтае-Саянской провинции // *Флора, растительность и растительные ресурсы Сибири*. Томск : Изд-во Том. ун-та, 1987. С. 32–46.
16. Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения / Л.И. Малышев [и др.]; под ред. К.С. Байкова. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2012. 640 с.
17. Толмачев А.И. Основы учения об ареалах (Введение в хорологию растений). Л. : Изд-во ЛГУ, 1962. 100 с.
18. Burgman M.A., Fox J.C. Bias in species range estimates from minimum convex polygons: implications for conservation and options for improved planning // *Animal Conservation*. 2003. № 6. PP. 19–28. doi: [10.1017/S1367943003003044](https://doi.org/10.1017/S1367943003003044)
19. Флора Сибири. Новосибирск, 1987–1997. Т. 1–13.
20. Artemov I., Egorova A. Locations of plants on dot distribution maps in the Flora of Siberia (Flora Sibiraea, 1987–1997). Version 1.2. Central Siberian Botanical Garden SB RAS. Occurrence dataset. 2021. doi: [10.15468/jb84wg](https://doi.org/10.15468/jb84wg)
21. Харитонов И., Вольман Н. Программирование в Access 2002 : учебный курс. СПб. : Питер, 2003. 480 с.
22. Gunderloy M., Harkins S.S. Automating Microsoft Access with VBA. Indianapolis : Que, 2004. 384 p.
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2020. URL: <https://www.R-project.org/> (дата обращения: 12.01.2021).
24. Савельев А.А., Мухарамова С.С., Чижилова Н.А., Пилюгин А.Г. Теория пространственных точечных процессов в задачах экологии и природопользования (с применением пакета R) : учеб. пособие. Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2014. 146 с.
25. Определитель растений Алтайского края / под ред. И.М. Красноборова. Новосибирск : Изд-во СО РАН, филиал «Гео», 2003. 634 с.
26. Крылов П.Н. Очерк растительности Сибири. Томск, 1919. 24 с.
27. Лашинский Н.Н., Лашинская Н.В. Высшие сосудистые растения // *Флора Салаирского края* / отв. ред. Н.Н. Лашинский. Новосибирск : Академическое изд-во «Гео», 2007. С. 155–251.

*Поступила в редакцию 19.03.2021 г.; повторно 06.07.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.*

Авторский коллектив:

Артемов Игорь Анатольевич, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории Гербарий, Центральный сибирский ботанический сад СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6700-1118>

E-mail: Artemov_I@mail.ru

For citation: Artemov IA. Using marginal species localities for the revision of the western boundary of the Altai-Yenisei floristic Province. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:6-18. doi: 10.17223/19988591/55/1 In Russian, English Summary

Igor' A. Artemov

Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Using marginal species localities for the revision of the western boundary of the Altai-Yenisei floristic Province

Floristic regionalization is a necessary stage of the investigation of plant taxa distribution. The result of floristic regionalization is a scheme of geographic units (phytochoria), which differ by composition and structure of their floras. There are several approaches to distinguish phytochoria and their boundaries: by geographical features of the investigated territory; by vegetation and taking into account the relief of the territory; by endemic taxa; by comparing the floras of the key territories; by concentration of range boundaries and by lines of the range boundaries coincidence. For drawing phytochoria boundaries, this paper proposes to use the westernmost and the easternmost species localities on dot distribution maps and clusters of these localities rather than ranges and concentrations of range boundaries. The research specifies the western boundary of the Altai-Yenisei floristic Province (WbAYP).

Published dot distribution maps of 2569 vascular plant species and subspecies of Siberian flora were used to reveal marginal western and eastern localities. They were geocoded by means of Geographic Information System ArcView GIS 3.2a (registration number is 843181116338) and the module ArcView Spatial Analyst 2.0a (registration number is 849601104159). The coordinates of geocoded localities and supplementary data (taxon name, numbers of map and locality) were entered into the Localities Database tables in MS Access (DBLoc). The total number of entries in the database tables was 169854. The marginal western and eastern localities in the limits of 49°-62°N and 80°-100°E were selected for each species/subspecies from the DBLoc. The latitudinal extent of the frame corresponds to the latitudinal length of the WbAYP, and the longitudinal extent corresponds to the distance of approximately 10° to the west and to the east from the border. Selection of the marginal localities was made by means of computer programmes written by the author in the Visual Basic for Applications. At this stage, the Marginal Localities Database was made (DBMarLoc), which comprised data on 1654 dots. Then, for more detailed consideration of the southern, central and northern parts of the boundary, data corresponding to the localities from smaller overlapping frames along the boundary were selected (See Fig. 1). GIS NextGIS QGIS was used to visualize some floristic boundaries in Asiatic Russia. The R free software environment for statistical computing and graphics was used to visualize marginal localities inside the selected frames, as well as to test their patterns against Complete Spatial Randomness (CSR) hypothesis. CSR hypothesis was tested by χ^2 test (quadrat.test function in spatstat package in R).

Southern part of WbAYP. Testing CSR hypothesis for marginal localities in frame 1 (827 dots, a grid of 10×4 squares with side of 1°) (See Fig. 2) gives the p -value less than $2.2e-16$, that is less than 0.001 and allows us to reject the null hypothesis of complete spatial randomness of the distribution of dots in the frame. The deviation from the random distribution of marginal localities is manifested in their accumulation in the southwestern part of the frame, corresponding to the Altai Mountains. The dot cluster extends beyond the westernmost point of the Altai-Yenisei Province at 84°E. There, at the Tigerekskiy Ridge, there are the westernmost Siberian localities of *Schulzia crinita* (Pall.) Spreng., *Lloydia serotina* (L.) Rchb., *Salix vestita* Pursh, *Minuartia biflora* (L.) Schinz et Thell., *Smelowskia calycina* (Stephan) C.A. Mey., *Saxifraga terekensis* Bunge, *Sibbaldia procumbens* L., *Hedysarum theinum* Krasnob., and *Doronicum altaicum* Pall. Obviously, the Altai-Yenisei floristic Province should include the Western Altai Mountains of Altai Krai and the province boundary should be located more to the west than that drawn earlier.

Central part of WbAYP. Testing CSR hypothesis for marginal localities in frame 2 (52 dots, a grid of 6×4 squares with side of 1°) gives the p -value 0.045, that is less than 0.05 and does not allow us to accept the null hypothesis of complete spatial randomness of the distribution of dots in the frame. However, attention is drawn to the closeness of the p -value to the threshold level, the excess of which would allow accepting the random distribution of dots in the frame. Testing CSR hypothesis for marginal localities in frame 3 (128 dots, a grid of 4×6 squares with side of 1°) gives the p -value of $6.237e-10$, that is less than 0.001 and allows us to reject the null hypothesis of complete spatial randomness. The cluster of marginal localities in coordinates 52°-53°N and 89°-90°E corresponds to the Abakan Ridge and ridges of smaller scale at the junction of the Abakan Ridge and the Western Sayan Ridge at the southern part of the Republic of Khakassia. There, the marginal localities of *Aconitum biflorum* Fisch. ex DC., *Oxytropis kusnetzovii* Krylov et Steinb., and *Conioselinum longifolium* Turcz are found. The cluster of dots in coordinates 54°-56°N and 89°-91°E corresponds to the northern part of the Republic of Khakassia with its western boundary approximately along the meridian 89°E by the slopes of the Kuznetsk Alatau Ridge. The marginal western localities are found there of *Salix saxatilis* Turcz. ex Ledeb., *Betula divaricata* Ledeb., *Veronica alpina* L. s. str. Apparently, WbAYP in its central part should be delineated approximately along the 89°E meridian.

Northern part of WbAYPE. Testing CSR hypothesis for marginal localities in frame 4 (56 dots, a grid of 15×5 squares with side of 1°) gives the p -value of 0.11, that is more than 0.05 and allows us to accept the null hypothesis of complete dot spatial randomness in the frame. Comparatively small number of marginal dots and their random distribution does not allow us to outline floristic boundary by marginal localities in this region. Nevertheless it is noteworthy that some marginal localities tend to the Ob' and Yenisei Rivers and their tributaries. Apparently, the northern part of the WbAYPE should be drawn according to the geographical principle by the Yenisei River, which flow among plain and mountain territories: the Yenisei and Ketsko-Tumskaya plains to the west of the river, the Yenisei Ridge and Zaangar Plateau to the east of it. For example, the marginal western localities of *Lilium pensylvanicum* Ker-Gawl., *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. and *Chrysanthemum zawadskii* Herbrich subsp. *peleiopsis* (Trautv.) Zuev. are marked for specified meridional interval to the east of the Yenisei River.

The paper contains 2 Figure and 27 References

Key words: floristic regionalization; dot distribution maps; geocoding; Siberia; Asiatic Russia

Funding: The research was carried out within the framework of the state task for the project "Biological diversity of cryptogamous organisms and vascular plants of

Northern Asia and adjacent territories, their ecological and geographical features and monitoring" (AAAA-A21-121011290024-5).

Acknowledgments: The author is grateful to Aleksandra Egorova, Senior Engineer of the Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, for helping with using GIS and to Natalia Makunina, Dr. Sci. (Biol.) and Olga Pisarenko, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researchers of the Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, for the discussion of the paper.

The Author declares no conflict of interest.

References

1. Komarov VL. Predislovie [Preface]. In: *Flora SSSR* [Flora of the USSR]. Vol. 1. II'in MM, editor of the volume. Leningrad: Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR Publ.; 1934. pp. 1-12. In Russian
2. Gorchakovskiy PL, Nikonova NN, Famelis TV. Rastitel'nost' i botaniko-geograficheskoe delenie territorii [Vegetation and botanical and geographical division of the territory] In: *Opredelitel' sosudistykh rasteniy Srednego Urala* [Plant identification guide of the Middle Urals]. Gorchakovskiy PL, editor. Moscow: Nauka Publ.; 1994. pp. 6-12. In Russian
3. *Opredelitel' rasteniy Respubliki Tyvy* [Plant identification guide of the Tyva Republic]. Shaulo DN, editor. Novosibirsk: SO RAN Publ.; 2007. 706 p. In Russian
4. Takhtajan A. Floristic Regions of the World. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press; 1986. 522 p.
5. Liu Z-W, Peng H. Notes on the key role of stenochoric endemic plants in the floristic regionalization of Yunnan. *Plant Diversity*. 2016;38(6):289-294. doi: [10.1016/j.pld.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.11.011)
6. Revushkin AS. Vysokogornaya flora Altaya [High mountain flora of the Altai]. Tomsk: Tomsk State University Publ.; 1988. 320 p. In Russian
7. Malyshev LI, Baikov KS, Doronkin VM. Floristic division of Asiatic Russia on the basis of quantitative data. *Krylovia*. 2000;2(1):3-16. In Russian, English Summary
8. Born J, Linder HP, Desmet P. The Greater Cape Floristic Region. *Journal of Biogeography*. 2007;34(1):147-162. doi: [10.1111/j.1365-2699.2006.01595.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01595.x)
9. Bannister JR, Vidal OJ, Teneb E, Sandoval V. Latitudinal patterns and regionalization of plant diversity along a 4270-km gradient in continental Chile. *Austral Ecology*. 2012;37(4):500-509. doi: [10.1111/j.1442-9993.2011.02312.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2011.02312.x)
10. Jung S, Cho Y-C. Redefining floristic zones in the Korean Peninsula using high-resolution georeferenced specimen data and self-organizing maps. *Ecology and Evolution*. 2020;10(20):11549-11564. doi: [10.1002/ece3.6790](https://doi.org/10.1002/ece3.6790)
11. Bubyreva VA. Floristic regions in the northern slope of the Russian plain as established by area borders' concentration. *Vestnik of Saint-Petersburg University. Biology*. 2004;3(1):35-68. In Russian
12. Baranova OG. Preliminary floristic zoning of the Udmurt Republic. *Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences*. 2016;(26)2:27-34. In Russian, English Summary
13. Razumovskiy SM. O granitsakh arealov i floristicheskikh liniyakh [On the boundaries of ranges and floristic lines]. *Byulleten' Glavnogo botanicheskogo sada = Bulletin Main Botanical Garden*. 1969;72:20-28. In Russian
14. Razumovskiy SM. Floristicheskoe rayonirovanie po klyuchevym mestnostyam [Floristic regionalization by key territories]. In: *Razumovskiy SM. Trudy po ekologii i biogeografii (polnoe sobranie sochineniy)* [Works on ecology and biogeography (the complete works)]. Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 2011. pp. 482-483. In Russian
15. Revushkin AS. Materialy k floristicheskomu rayonirovaniyu Altae-Sayanskoy provintsii [Materials on floristic regionalization of the Altai-Sayan Floristic Province]. In: *Flora*,

- rastitel'nost' i rastitel'nye resursy Sibiri* [Flora, vegetation and plant resources of Siberia]. Tomsk: Tomsk State University Publ.; 1987. pp. 32-46. In Russian
16. *Conspectus florum Rossiae Asiaticae: plantae vasculares*. Baikov KS, editor. Novosibirsk: SB RAS Publ. House; 2012. 640 p. In Russian
 17. Tolmachev AI. Osnovy ucheniya ob arealakh (Vvedenie v khorologiyu rasteniy) [Basics of knowledge on ranges (foreword to plant chorology)]. Leningrad: Leningrad State University Publ.; 1962. 100 p. In Russian
 18. Burgman MA, Fox JC. Bias in species range estimates from minimum convex polygons: implications for conservation and options for improved planning. *Animal Conservation*. 2003;6:19-28. doi: [10.1017/S1367943003003044](https://doi.org/10.1017/S1367943003003044)
 19. *Flora Sibiriae*. Vol. 1-13. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 1987-1997. In Russian
 20. Artemov I, Egorova A. Locations of plants on dot distribution maps in the Flora of Siberia (Flora Sibiraea, 1987-1997). Version 1.2. Central Siberian Botanical Garden SB RAS. Occurrence dataset; 2021. doi: [10.15468/jb84wg](https://doi.org/10.15468/jb84wg)
 21. Kharitonova I, Vol'man N. Programmirovaniye v Access 2002: uchebnyy kurs [Programming in Access 2002: study course]. Saint-Petersburg: Piter Publ.; 2003. 480 p. In Russian
 22. Gunderloy M, Harkins SS. Automating Microsoft Access with VBA. Indianapolis: Que Publ.; 2004. 384 p.
 23. *R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2020*. Available at: <https://www.R-project.org/> (accessed: 12.01.2021)
 24. Savel'ev AA, Mukharamova SS, Chizhikova NA, Pilyugin AG. Teoriya prostranstvennykh tochechnykh protsessov v zadachakh ekologii i prirodopol'zovaniya (s primeneniem paketa R): uchebnoe posobie [The theory of spatial point processes in questions of ecology and environmental management (using the R package): textbook]. Kazan: Kazan University Publ.; 2014. 146 p. In Russian
 25. *Opredelitel' rasteniy Altayskogo kraya* [Plant identification guide of Altai Krai]. Krasnoborov IM, editor. Novosibirsk: SO RAN Publ., Branch Office "Geo"; 2003. 634 p. In Russian
 26. Krylov PN. Ocherk rastitel'nosti Sibiri [Essay on vegetation in Siberia]. Tomsk; 1919. 24 p. In Russian
 27. Lashchinskiy NN, Lashchinskaya NV. Vysshie sosudistye rasteniya [Higher vascular plants]. In: *Flora Salairskogo kryazha* [Flora of the Salair Ridge]. Lashchinskiy NN, editor. Novosibirsk: "Geo" Publ.; 2007. pp. 155-251.

Received 19 March, 2021; Revised 06 July, 2021;

Accepted 27 July 2021; Published 29 September, 2021.

Author info:

Artemov Igor' A, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Herbarium Laboratory, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya Str., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6700-1118>

E-mail: Artemov_I@mail.ru

УДК 582.623.2+575.222.72 (571.17)

doi: 10.17223/19988591/55/2

А.В. Климов^{1,2}, Б.В. Прошкин³

¹ООО ИнЭКА-консалтинг, г. Новокузнецк, Россия

²Западно-Сибирское отделение Института леса им. В.Н. Сукачева

СО РАН – филиал Федерального исследовательского центра

«Красноярский научный центр СО РАН», г. Новосибирск, Россия

³ФКОУ ВО Кузбасский институт ФСИН России, г. Новокузнецк, Россия

Морфология *Populus suaveolens* Fisch. в популяциях Северо-Востока России

Исследования проведены в рамках базовых проектов ФИЦ КНЦ СО РАН
(№ АААА-А17-117101820003-0) и Новосибирского ГАУ (№ АААА-А17-117112470021-9).

Представлены результаты изучения изменчивости морфологических признаков вегетативных органов *P. suaveolens* в популяциях Чукотского автономного округа. Для исключения возрастной изменчивости сбор гербарного материала проведен только с укороченных побегов южной стороны средней части кроны репродуктивно зрелых деревьев с учетом клоновой структуры насаждений. При этом изучен комплекс признаков: форма листовой пластинки, ее верхушки и основания, наличие базальных желёзок, опушение черешка. Установлено, что для листьев *P. suaveolens* характерна преимущественно обратнояйцевидная форма пластинки, реже эллиптическая. Преобладают пластинки с резко заостренной верхушкой, но встречаются и с постепенно заостренной. Основание обычно округло-клиновидное или клиновидное с выемкой в месте перехода черешка в листовую пластинку. Все указанные признаки являются характерными для данного таксона. Однако они не так изменчивы, в частности, на эндогенном уровне (в пределах особи) не варьирует форма основания и верхушки листовой пластинки. На одном растении можно наблюдать листья и с разной формой пластинки, но одна из них всегда преобладает. В изученных популяциях все особи имели опушенные черешки и характер развития трихом не варьировал на эндогенном уровне. Признак «наличие базальных желёзок» варьировал как на эндогенном, так и на индивидуальном (внутрипопуляционном) уровнях. Его появление в популяциях Северо-Востока России, на наш взгляд, обусловлено древней интрогрессивной гибридизацией *P. suaveolens* с *P. balsamifera* на территории Берингии. Наличие базальных желёзок в современных популяциях *P. suaveolens* Северо-Востока России можно рассматривать как свидетельство существования единого сингамеона (*syngameon*) *Populus* на отдельных этапах эволюции рода. Слабая дифференциация изученных популяций указывает на то, что современные тополники на исследованной территории – результат постледниковой реколонизации.

Ключевые слова: *Populus suaveolens*; изменчивость; морфологические признаки; популяция; базальные желёзки; интрогрессивная гибридизация

Для цитирования: Климов А.В., Прошкин Б.В. Морфология *Populus suaveolens* Fisch. в популяциях Северо-Востока России // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 19–41. doi: 10.17223/19988591/55/2

Введение

Тополь душистый (*Populus suaveolens* Fisch., секция *Tacamahaca* Mill.) – горно-долинный вид, заселяющий прирусловые аллювиальные отложения и приуроченный к пойменной и первой надпойменной террасам рек [1]. Это один из наиболее широко распространенных пойменных видов рода *Populus* L. в Евразии. Его ареал простирается от верховий р. Енисей до севера Японии, Кореи, Монголии и Китая на юге, до Чукотского полуострова на севере.

Несмотря на обширное распространение и ценные хозяйственные свойства, *P. suaveolens* остается мало изученным [1]. В литературе описания таксона, как правило, ограничиваются флористическими сводками и определителями [2–7], за исключением монографии В.Т. Бакулина [1], в которой автор постарался максимально широко обобщить имеющиеся материалы по морфологии, анатомии, экологии, особенностям роста и применению в селекции. Однако многие вопросы, несмотря на исследования, предпринятые в последние годы, остаются по-прежнему открытыми, в частности, это касается изменчивости *P. suaveolens* [1, 8–11], его гибридизации с *P. laurifolia* Ledeb. [9, 11], объема самого таксона и систематической самостоятельности *P. maximowiczii* A. Henry и *P. koreana* Rehd. [8, 12]. Ответить на эти вопросы можно только имея четкие представления о вариабельности признаков, которые считаются видоспецифическими для *P. suaveolens* и, в первую очередь, вегетативных органов, поскольку отличия побегов и особенно листьев у *Populus* положены в основу ключей определителей и сводок.

Обладая обширным экологически гетерогенным ареалом, *P. suaveolens* должен отличаться значительной изменчивостью и, в частности, морфологических признаков вегетативных органов. И это неоднократно подчёркивают авторы, касавшиеся этого вопроса, причем, оперируя, как правило, гербарными сборами с различных территорий ареала, они пытались выявить какие-либо географические закономерности в ее проявлениях. Конечно, отрицать наличие географической изменчивости при таком обширном ареале абсолютно неверно, и реализуемое направление исследований имеет свою ценность. Однако, как мы уже отмечали [13], при изучении рода *Populus* L. первостепенное значение имеет правильный сбор гербария. Только при условии, что он ведется со взрослых деревьев, с укороченных побегов средней части кроны, полученные материалы можно использовать для сравнительного анализа. Как показывает наш опыт работы с гербарными материалами разных коллекций, большая часть из них этим требованиям не соответствует. Еще А.К. Скворцов и Н.Б. Беянина [8] отмечали, что у *P. suaveolens* изменчивость двоякая: генотипическая (межиндивидуальная) и возрастная, причем последняя связана не только с возрастом дерева, но и его частей. Они же указывали, что «изменчивость проявлялась в значительной мере парал-

тельно, в разных частях ареала». Последнее, безусловно, отражает большую роль внутрипопуляционного разнообразия у *P. suaveolens*. Значительная доля внутрипопуляционной изменчивости отмечена рядом авторов у *P. nigra* L. [14–17], *P. laurifolia* [18, 19] и в целом у видов *Populus* [20]. Поэтому только после изучения варьирования признаков на уровне популяций можно рассматривать специфику межпопуляционной изменчивости. И здесь, к сожалению, мы столкнулись практически с полным отсутствием данных по этому вопросу у *P. suaveolens*. Только в работе М.В. Костиной с соавт. [9] приведена сравнительная характеристика листьев трех популяций из Иркутской области и Бурятии, но без морфометрического анализа.

Какие же морфологические признаки вегетативных органов позволяют идентифицировать *P. suaveolens* как таксон? Большинство авторов отмечают в качестве основных признаков листовой пластинки: 1) наибольшую ее ширину обычно посередине ее длины или немного выше; 2) резко стянутую верхушку в короткое заострение; 3) сердцевидность основания; 4) наличие выемки в месте перехода черешка в листовую пластинку [1, 8, 11]. Следовательно, при идентификации *P. suaveolens* важны форма листовой пластинки, ее основания и верхушки. Однако Ю.А. Насимович с соавт. [11] указывают, что листья на укороченных побегах взрослого дерева могут быть трех типов: 1) крупные и круглые с почти продавленной верхушкой; 2) типичные, т.е. овальные или обратнояйцевидные с внезапно заостренной короткой верхушкой; 3) яйцевидные с постепенно суживающейся верхушкой. То есть важные для выявления вида признаки отличаются довольно высокой эндотенной изменчивостью.

Относительно «новым» признаком, характеризующим *P. suaveolens*, является наличие желёзок в основании листовой пластинки [9]. В более ранних работах данных о развитии у *P. suaveolens* базальных желёзок (желёзки сверху на стыке черешка и листовой пластинки) не приводилось, более того, в сводке «Сосудистых растений советского Дальнего Востока» В.А. Недолужко [6] в ключе для определения видов рода *Populus* указывает отсутствие желёзок как характерный признак всех «душистых» тополей региона. Исследования М.В. Костиной с соавт. [9] популяций в Иркутской области и Бурятии показали, что 1/3 гербарных листьев сборов имеют хотя бы по одному листу с желёзками на побеге. Чаше желёзки небольшие, но встречаются гербарные образцы, у которых практически на всех листьях присутствуют довольно крупные желёзки.

Поскольку некоторые трудности в изучении внутривидовой изменчивости у видов рода *Populus* может вносить межвидовая гибридизация [11], то исследование вариабельности в популяциях, удаленных от ее современных зон, представляет теоретический и практический интерес. Одним из таких регионов ареала *P. suaveolens* является Северо-Восток России. На территории Чукотского автономного округа *P. suaveolens* распространен в поймах рек на периодически затопляемых участках, образуя с *Chosenia arbutifolia* (Pall.)

А.К. Skvortsov тополево-чозениевые леса. На север он проникает по р. Пегтымель за 69° с. ш., самые восточные тополево-чозениевые рощицы наблюдаются в бассейне р. Экетыки (приток р. Амгуэма), верховьях рек Канчалан, Бол. Осиновая. Топольники этого региона остаются практически не изученными [1].

Цель данного исследования – охарактеризовать изменчивость морфологических признаков вегетативных органов *P. suaveolens* в популяциях Чукотского автономного округа.

Материалы и методики исследования

Исследования популяций *P. suaveolens* проведены в 2020 г. в Билибинском районе Чукотского автономного округа. Район исследований характеризуется низкогорным рельефом: с увеличением высоты местности прослеживается смена поясов растительности. Лесные сообщества занимают речные долины и нижние части склонов сопок. Наиболее широко распространены лиственничные редколесья с несомкнутым древостоем из *Larix cajanderi* Mayr. С увеличением высоты пояс лиственничных редколесий сменяется подгольцовым поясом – крупнотланиковыми сообществами с доминированием *Pinus pumila* (Pall.) Regel. На вершинах сопок формируется растительность гольцового пояса: кустарничково-лишайниковые и зеленомошно-лишайниковые тундры. В долинах рек значительные площади занимают кустарниковые осоково-пушицевые тундроболота. По поймам рек на песчано-галечных субстратах неширокими полосами вдоль русла произрастают тополево-чозениевые леса. Как показали наши наблюдения, *P. suaveolens* широко используется в озеленении населенных пунктов Чукотского автономного округа и Магаданской области. Растения местных популяций отличаются высокой зимостойкостью, быстрым ростом в суровых условиях региона и часто компактной колоновидной кроной.

Три из исследованных популяций: «Баимка», «Таллаг» и «Песчанка» – расположены на широте Северного полярного круга в поймах одноименных рек в бассейне р. Большой Анюй. Все они изолированы друг от друга горными массивами. Самая северная популяция «Билибино» приурочена к правому берегу р. Большой Кепервеем (бассейн р. Малый Анюй) на границе г. Билибино, она удалена от остальных на 200 км. Все популяции выбраны в тополево-чозениевых пойменных лесах (табл. 1).

Для исключения возрастной изменчивости сбор гербарного материала проведен только с укороченных побегов южной стороны средней части кроны репродуктивно зрелых деревьев. При этом учитывали склонность балластных тополей к образованию клонов, повторных сборов внутри клона тщательно избегали. С каждой особи отбирали по 15 полностью развитых, неповрежденных листьев [21]. На каждом листе измерены основные морфометрические признаки и рассчитаны производные (индексы). Всего для морфологического исследования привлечено 1 800 листьев.

Таблица 1 [Table 1]

Места сбора полевого материала
[Places of field material collection]

Название популяции [The name of the population]	Географические координаты [Geographic coordinates]	Количество деревьев/листьев, шт. [The number of trees / leaves, psc.]	Тип леса [Forest type]
Билибино [Bilibino]	68°03'44"N 166°27'57"E	30/450	Тополёво-чозениевый кустарничково-злаково-разнотравный [Poplar-chosenia subshrub-cereal-forb]
Баимка [Baimka]	66°32'39"N 164°15'50"E	30/450	Тополёво-чозениевые кустарничково-разнотравный [Poplar-chosenia dwarf shrub-herb]
Таллаг [Tallag]	66°30'46"N 164°28'22"E	30/450	Тополёво-чозениевые кустарничково-разнотравный [Poplar-chosenia dwarf shrub-herb]
Песчанка [Peschanka]	66°38'56"N 164°22'42"E	30/450	Тополёво-чозениевые кустарничково-разнотравный [Poplar-chosenia dwarf shrub-herb]

Морфологические признаки *P. suaveolens* исследовали с использованием сравнительно-морфологического метода. Описание морфологии проведено по Ал.А. Федорову с соавт. [22]. При этом изучен комплекс признаков: форма листовой пластинки, ее верхушки и основания, наличие базальных желёзок, опушения черешка. Определение формы проведено по индексу A/L [23], где A – расстояние между самой широкой частью листовой пластинки и её основанием (мм), L – длина листовой пластинки (мм), используя следующие диапазоны: < 0,25 – треугольная; 0,25–0,35 – яйцевидно-треугольная; 0,35–0,45 – яйцевидная; 0,45–0,55 – эллиптическая; 0,55–0,65 – обратнойцевидная; 0,65–0,75 – высоко обратнойцевидная; >0,75 – обратно-треугольная.

Опушение черешка листа исследовано с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (ЛЗОС, Россия) (×16,3). Степень развития трихом оценивали по шкале: 1 – черешок голый, трихом нет; 2 – редко опушен, волоски рассеяны по поверхности; 3 – густо опушен, волоски покрывают 50% поверхности [24].

Для каждой популяции рассчитаны частоты морф и показатели, характеризующие фенотипическую изменчивость, используя обобщенные показатели, предложенные Л.А. Животовским [25], В.П. Путенихиным с соавт. [26], С.В. Боронниковой с соавт. [27].

Частоты морф определены по формуле [25]

$$p = \frac{n}{N}, \quad (1)$$

где n – количество случаев обнаружения исследуемых морф в выборке; N – общий объем выборки.

Ошибки частот определяли по формуле

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}. \quad (2)$$

Для оценки уровней изменчивости и сравнения популяций по полиморфным фенотипическим признакам использован показатель (индекс) внутри-популяционного разнообразия Животовского (μ) [25]

$$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2, \quad (3)$$

где $p_1, \dots, p_m$ – частоты морф в популяции.

Ошибка (S_μ) определена по формуле [25]

$$S_\mu = \sqrt{\frac{\mu(m-\mu)}{N}}, \quad (4)$$

где m – количество морф в популяции; N – общий объем выборки в популяции.

Оценку разнообразия признаков на каждом дереве, внутри- и межпопуляционном уровнях осуществляли с помощью информационной меры Шеннона (H) [26]

$$H = - \sum_{i=1}^N p_i \ln p_i, \quad (5)$$

где H – индекс Шеннона, p_i – доля i -го варианта признака в выборке; N – общее количество вариантов, выявленных в выборке. При этом рассчитаны следующие показатели.

Индекс разнообразия в популяции (H_0) [27]

$$H_0 = (H_1 + \dots H_n)/N, \quad (6)$$

где $H_1, \dots, H_n$ – индекс разнообразия для особи; N – общий объем выборки в популяции.

Индекс разнообразия для суммарной выборки ($H_{\text{см}}$) [27]

$$H_{\text{см}} = (H_1 + \dots H_n)/N, \quad (7)$$

где $H_1, \dots, H_n$ – индекс разнообразия для особи; N – общий объем суммарной выборки.

Среднее значение индекса разнообразия выборки (H_{Π}) для популяций [27]

$$H_{\Pi} = (H_0^1 + \dots H_0^n)/n, \quad (8)$$

где n – количество исследованных популяций.

Индекс разнообразия выборки внутри популяций (F_{Π}) [27]

$$F_{\Pi} = H_{\Pi} / H_{\text{см}} \quad (9)$$

Индекс межпопуляционного разнообразия ($F_{\text{мп}}$) [27]

$$F_{\text{мп}} = (H_{\text{см}} - H_{\Pi}) / H_{\text{см}} \quad (10)$$

Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью программ Excel и SPSS 23.0 [28].

Результаты исследования и обсуждение

Тополево-чозениевые леса в исследованном районе произрастают узкой полосой на аллювиальных песчано-галечных отложениях в поймах рек (рис. 1). Древостой образован тополем душистым (*P. suaveolens*) и чозенией толочнянколистной (*Ch. arbutifolia*), высотой 12–14 м, диаметром тополя 16–20 см, чозении 26–30 см. Стволы тополя малосбежистые, прямые. Кора в нижней части продолговато-трещиноватая на высоту 1–1,5 м, выше гладкая беловато-серая. Крона обычно компактная, у старых деревьев раскидистая, ветви средней толщины. Очищенность от сухих ветвей хорошая. Кустарниковый ярус имеет среднюю высоту 110 см, густой и насыщенный, обычны *Ribes triste* Pall., *Lonicera caerulea* L., *Duschekia fruticosa* (Rupr.) Pouzar, *Salix krylovii* E.L. Wolf, *S. pulchra* Cham., *S. schwerinii* E.L. Wolf и др. В травяно-кустарничком ярусе резко доминируют княженика обыкновенная, малина арктическая (*Rubus arcticus* L.) или вейник Лангсдорфа (*Calamagrostis langsdorffii* (Link) Trin.). Мохово-лишайниковый ярус не развит. Флористический состав этих сообществ насчитывает 25–35 таксонов высших сосудистых растений на пробную площадь (20 × 20 м). Тополево-чозениевые леса – недолговечные сообщества, в них быстро развивается мощный подрост *Larix cajanderi*. Топольники по мере того, как они выходят из зоны затопления, в возрасте около 40–50 лет начинают погибать (см. рис. 1). Сначала у дерева засыхает и затем обламывается вершина кроны, опадают крупные ветви, и постепенно оно все отмирает. Единичные крупные деревья *P. suaveolens* высотой 25 м и диаметром 50–60 см отмечались только на островах р. Баимка.

Поймы исследованного региона характеризуются большой скоростью аллювиальных процессов, а их растительность приспособляется к условиям периодического подтопления и оледенения. Русло часто неустойчивое и свободно «гуляет» по долине. В этих экстремальных условиях прирусловые галечно-песчаные наносы ближе к урезу воды заселяет чозения, на более высоких участках селится тополь. Сеянцы обоих видов быстро растут и подвергаются жесткому воздействию половодья. Большая часть побегов тополя при этом ежегодно «срезается» льдом, в ответ отрастают новые, и растение приобретает кустовидную форму. На этом этапе можно нередко наблюдать, когда крупные стволы длиной до 3–4 м погребаются аллювием

в течение одного сезона и от них в течение нескольких последующих лет отрастают вертикальные побеги, в результате формируется линейный клон [29]. Во всех исследованных насаждениях *P. suaveolens* клоновая структура была хорошо выражена, и это учитывалось при сборе материалов для изучения изменчивости.



Рис. 1. Тополево-чозениевые леса р. Баимка (фото А.В. Климова)
[Fig. 1. Poplar-chosenia forests of the Baimka river. Photo by Andrei Klimov]

Поскольку сроки наших исследований совпали с периодом плодоношения и созревания семян (с 10.07 по 20.07.2020 г.), это позволило изучить половую структуру исследованных популяций. В них резко преобладали мужские особи (70–85%), как и в исследованных нами ранее насаждениях *P. laurifolia* [30].

Рассмотрим особенности морфологии вегетативных органов *P. suaveolens*. Для него, как и для других представителей секции бальзамические тополя (*Tacamahaca*), характерна дифференциация укороченных побегов кроны на лептобласты и дискобласты. Удлиненные побеги у всех особей в изученных популяциях цилиндрические по всей длине.

Во всех исследованных насаждениях наблюдалась общая картина – листовые пластинки на укороченных побегах обычно загнуты по краям вверх и сложены в виде «лодочки». Это, вероятно, обусловлено отсутствием устьиц на верхней стороне пластинки [1, 31], и такое «сложение» облегчает транспирацию. Возможно, это является важной адаптацией в субарктических условиях региона. Для *P. suaveolens* во всех популяциях характерны две формы листовой пластинки: обратнойцевидная и эллиптическая

(табл. 2). Как и у исследованных нами других видов *Populus*, на эндогенном уровне можно наблюдать сразу несколько форм, но преобладает одна [23] – обратнойцевидная, с максимальной шириной выше середины ее длины (57–70%). В каждой из изученных популяций наблюдались отдельные растения с узкими листьями, преимущественно продолговато обратнойцевидными (3,5–10%). На фоне соседних деревьев они резко контрастировали, поскольку при сложенной пластинке их крона просматривалась, почти как в безлистном состоянии.

Таблица 2 [Table 2]

Встречаемость признаков в популяциях по несмещенной оценке частот
[The frequency of occurrence of traits in populations by unbiased frequency estimate] ($p \pm Sp$)

Признак [Trait]	Вариации [Variations]	Популяции [Populations]			
		Билибино [Bilibino]	Баймка [Baimka]	Таллаг [Tallag]	Песчанка [Peschanka]
Форма листово- вой пластинки [Leaf blade shape]	Эллиптическая [Elliptical]	194/0,431 $\pm 0,023$	193/0,428 $\pm 0,023$	169/0,366 $\pm 0,021$	139/0,309 $\pm 0,021$
	Обратной- цевидная [Obovate]	256/0,568 $\pm 0,023$	257/0,572 $\pm 0,023$	281/0,625 $\pm 0,023$	311/0,691 $\pm 0,022$
Форма верхуш- ки пластинки [Blade top shape]	Коротко заостренная [Short pointed]	25/0,834 $\pm 0,067$	26/0,866 $\pm 0,062$	24/0,800 $\pm 0,073$	24/0,800 $\pm 0,073$
	Заостренная [Pointed]	5/0,166 $\pm 0,067$	4/0,134 $\pm 0,062$	6/0,200 $\pm 0,073$	6/0,200 $\pm 0,073$
Форма основа- ния пластинки [Blade base shape]	Клиновидная [Wedge-shaped]	13/0,433 $\pm 0,090$	18/0,600 $\pm 0,089$	10/0,333 $\pm 0,086$	14/0,466 $\pm 0,091$
	Округло-кли- новидная [Rounded-wedge]	17/0,567 $\pm 0,090$	12/0,400 $\pm 0,089$	20/0,667 $\pm 0,086$	16/0,534 $\pm 0,091$
Опушение черешка [Petiole pubescence]	1	–	–	–	–
	2	11/0,366 $\pm 0,087$	28/0,933 $\pm 0,045$	10/0,333 $\pm 0,086$	12/0,400 $\pm 0,089$
	3	19/0,634 $\pm 0,087$	2/0,067 $\pm 0,045$	20/0,667 $\pm 0,086$	18/0,600 $\pm 0,089$
Листья с желёзками [Leaves with glands]	0	235/ 0,522	153/0,340	84/0,186	95/0,211
	1	70/0,155	78/0,173	64/0,142	40/0,088
	2	145/0,322	212/0,471	297/0,660	305/0,677
	3	–	7/0,015	4/0,008	10/0,022
	4	–	–	1/0,002	–
Желёзки [Glands]	Более чем у 50% [More than 50%]	16/0,534	20/0,667	25/0,833 $\pm 0,067$	30/1,000 $\pm 0,000$
	Менее чем у 50% [Less than 50%]	11/0,366	7/0,233	5/0,167 $\pm 0,067$	–
	Не выражены [Not expressed]	3/0,10	3/0,10	–	–

Примечание. p – частота морф, Sp – ошибка частоты морф.

[Note. p - Morph frequency, Sp - Morph frequency error].

На укороченных побегах в средней части кроны у всех листьев одного дерева всегда выражена только одна форма верхушки и основания листовой пластинки. Во всех изученных популяциях *P. suaveolens* преобладали особи с коротко заостренной (резко заостренной) верхушкой, но у 4–6 деревьев в насаждении листья имели постепенно заостренную форму. Только в популяции «Баимка» преобладали растения с клиновидным основанием листовой пластинки, в остальных – с округло-клиновидным (см. табл. 2).

Как уже отмечалось, морфологическими признаками листа, характерными для *P. suaveolens*, являются в разной мере выраженная сердцевидность основания листовой пластинки и наличие небольшой выемки [1, 8]. Выемка в основании листьев укороченных побегов выражена довольно часто, особенно у листьев с округленно-клиновидным основанием, нередко она перекрывается закругленными лопастями [8]. Наличие ее, на наш взгляд, обусловлено характером перехода черешка в листовую пластинку. Дело в том, что черешок у *P. suaveolens* располагается в разных плоскостях с пластинкой и входит в нее под углом снизу на некотором расстоянии от края основания (рис. 2). Желобок, выраженный на верхней стороне черешка, продолжает просматриваться на некотором расстоянии на главной жилке, постепенно конически сужаясь. Здесь же, в месте вхождения желобка, ответвляются первые боковые жилки.



Рис. 2. Листья укороченных побегов *Populus suaveolens* (фото А.В. Климова)
[Fig. 2. Leaves of *Populus suaveolens* shortened shoots. Photo by Andrei Klimov]

Относительно опушения черешка у *P. suaveolens* в популяции «Баимка» резко преобладают особи с редким опушением (93,3%), в остальных – с густым (60–66%). На эндогенном уровне характер опушения не варьирует. Листья с голыми черешками в исследованных популяциях не обнаружены. Трихомы одноклеточные, и, как правило, прижаты к черешку. Они обычны на нижней поверхности вдоль жилок, реже встречаются и на верхней стороне листовой пластинки. Последняя у всех особей мелкоморщинистая, «шагреневая».

Уровни изменчивости рассмотренных морфологических признаков в исследованных популяциях отличаются по развитию базальных желёзок (табл. 3, 4). На эндогенном уровне этот признак сильно варьирует от полного отсутствия до 1–4 желёзок в основании пластинки. Однако только в популяциях «Билибино» и «Баимка» отмечены по 3 особи (10%), листья которых их не имели и, напротив, в «Песчанке» на всех растениях преобладали листья с развитыми желёзками (см. табл. 2). В первых двух насаждениях отмечено и наибольшее количество деревьев, у которых желёзки были развиты менее чем на 50% листьев. Обычны листовые пластинки с 2 желёзками (от 32,2 до 67,7% в популяции) и одной (от 8,8 до 17,3%) (см. рис. 3). Доля листьев без них в популяциях колебалась от 18,6 до 52,2%. Листья с тремя и четырьмя желёзками отмечены единично во всех популяциях, кроме «Билибино».

Таблица 3 [Table 3]

**Уровни изменчивости признаков в популяциях *Populus suaveolens*
по индексу Животовского**

[Variation levels of traits in *Populus suaveolens* populations according to Zhivotovsky index] ($\mu \pm S\mu$)

Популяции [Populations]	Признак [Trait]				
	Форма листовой пластинки [Leaf blade shape]	Форма основания пластинки [Blade base shape]	Форма верхушки пластинки [Blade top shape]	Опушение черешка [Petiole pubescence]	Базальные желёзки [Basal glands]
Билибино [Bilibino]	1,985 $\pm$ 0,008	1,988 $\pm$ 0,028	1,742 $\pm$ 0,122	1,960 $\pm$ 0,051	2,722 $\pm$ 0,158
Баимка [Baimka]	1,988 $\pm$ 0,007	1,976 $\pm$ 0,039	1,679 $\pm$ 0,134	1,495 $\pm$ 0,158	2,604 $\pm$ 0,185
Таллаг [Tallag]	1,943 $\pm$ 0,007	1,940 $\pm$ 0,062	1,798 $\pm$ 0,110	1,940 $\pm$ 0,062	1,742 $\pm$ 0,122
Песчанка [Peschanka]	1,920 $\pm$ 0,008	1,993 $\pm$ 0,021	1,798 $\pm$ 0,110	1,976 $\pm$ 0,039	1,000 $\pm$ 0,000

Примечание. μ – показатель внутрипопуляционного разнообразия Животовского; $S\mu$ – ошибка показателя Животовского.

[Note. μ - Indicator of the intrapopulation diversity of Zhivotovsky; $S\mu$ - Error of Zhivotovsky's exponent].

Наблюдаемая вариабельность развития базальных желёзок, на наш взгляд, указывает, что это не видоспецифический признак *P. suaveolens*, и его появление в популяциях северо-востока России требует пояснения. И.А. Ильинская [32] отмечает, что у ряда миоценовых таксонов секции *Tacamahaca*, в частности, *P. baikovskajae* Ваганова ex Fot., произраставшего в Приморье, в основании листа всегда имела пара относительно крупных желёзок. Однако современный *P. suaveolens* не родственен этому таксону, и поэтому трудно рассматривать наличие базальных желёзок в популяциях региона как атавизм.

Среди современных таксонов секции *Tacamahaca* базальные желёзки характерны для американских *P. trichocarpa* Torrey & A. Gray и *P. balsamifera* L. [33], а также гималайского *P. ciliata* Wallich ex Royle.

Таблица 4 [Table 4]

Фенотипическое разнообразие внутри и между популяциями *Populus suaveolens*
по индексу Шеннона

[Phenotypic diversity within and between *Populus suaveolens*
populations according to the Shannon's index]

Признак [Trait]	H_{cm}	H_n	F_n	F_{mi}
Форма листовой пластинки [Leaf blade shape]	0,958	0,954	0,995	0,005
Форма основания пластинки [Blade base shape]	0,994	0,967	0,972	0,028
Форма верхушки пластинки [Blade top shape]	0,669	0,664	0,992	0,008
Опушение черешка [Petiole pubescence]	0,999	0,797	0,797	0,203
Базальные желёзки [Basal glands]	0,975	0,802	0,822	0,178
Среднее [Mean]	0,919	0,836	0,909	0,091

Примечание. H_{cm} – индекс разнообразия для суммарной выборки; H_n – среднее значение индекса разнообразия выборки для популяций; F_n – индекс разнообразия выборки внутри популяций; F_{mi} – индекс межпопуляционного разнообразия.

[Note. H_{cm} - Diversity Index for the total sample; H_n - Mean value of the Diversity Index of the sample for populations; F_n - Diversity Index of the sample within the populations; F_{mi} - Index of Interpopulation Diversity].



Рис. 3. Основание листовых пластинок *Populus suaveolens*
с двумя базальными желёзками (фото Б.В. Прошкина)

[Fig. 3. Base of *Populus suaveolens* leaf blades with two basal glands. Photo by Boris Proshkin]

Однако принадлежность последнего к секции бальзамических тополей сомнительна [34]. Популяции *P. balsamifera* в настоящее время сохранились в восточной части Чукотского полуострова [35, 36]. В них тополь представлен в виде низкого прямостоячего кустарника, фертильные способности которого ограничены в силу ежегодного отмирания верхушек побегов. По мнению А.Е. Катенина [35], *P. balsamifera* проник на Чукотский полуостров путем поэтапного переселения с Аляски через Берингийский мост

суши и сохранился в вегетативном состоянии со времени гибели его плодоносящих деревьев. Это подтверждается наличием ископаемых листьев и побегов *P. balsamifera* на территории Берингии во время последнего ледникового периода [37, 38]. Самые ранние ископаемые остатки листьев и побегов *P. balsamifera*, по радиоуглеродным данным, относятся к периоду 50 000–35 000 л. н. В это время Берингия была изолирована от остальной части Северной Америки континентальными ледяными щитами [37, 39]. Разделение популяций *P. balsamifera* в Северной Америке в результате развития покровного оледенения началось в среднем плейстоцене, а заселение им Берингии произошло, вероятно, еще до оледенения [38]. Во время последнего ледникового максимума на территории Берингии доминировали травянистые и травянисто-кустарничковые тундры [40], в это время популяции *P. balsamifera* здесь могли существовать в виде небольших изолированных насаждений, как, например, в современной арктической Аляске [41]. С 18 000 л. н. он вновь постоянно фиксируется в отложениях. Резкое потепление климата 12,5 тыс. л. н. вызвало значительную перестройку растительного покрова Берингии. Первые послеледниковые леса появляются 11 тыс. л. н. В интервале 11–9 тыс. л. н. распространяются листопадные леса, основной лесобразующей породой являлся тополь [40]. По данным L.B. Brubaker et al. [42], морфология пыльцы указывает, что преобладающим видом тополя был *P. balsamifera*.

Относительно истории *P. suaveolens* существует несколько мнений. А.Н. Криштофович [43] считал тополь душистый реликтом третичного времени. По данным И.А. Ильинской [44], история предковых видов *P. suaveolens* прослеживается с раннего миоцена и ограничивается территорией Дальнего Востока. Современный *P. suaveolens* достоверно известен по результатам палеокарпологических исследований ископаемой флоры на территории Верхнеколымского бассейна, относящейся к переходному периоду от плейстоцена к голоцену. По радиоуглеродным данным, ее формирование происходило в интервале 11 140–10 460 л.н. [45].

На наш взгляд, появление базальных желёзок в популяциях *P. suaveolens* Северо-Востока России обусловлено древней интрогрессивной гибридизацией (возможно, неоднократной) указанного таксона с *P. balsamifera* в плиоцен-плейстоцене на территории Берингии. В результате исчезновения Берингийского моста суши прекратили существовать зона гибридизации и контакт ареалов данных видов. Наличие базальных желёзок – признак, полученный в результате интрогрессии тополем душистым от *P. balsamifera*, постепенно распространился в результате внутривидового скрещивания с востока вглубь континента. Следовательно, наличие базальных желёзок как признака в современных популяциях *P. suaveolens* Северо-Востока России можно рассматривать как свидетельство существования Евразийско-Американского сингамеона (syngameon) [11, 46] на отдельных этапах эволюции рода.

Как и у других исследованных видов тополя, у *P. suaveolens* уровень внутрипопуляционного разнообразия значительно выше межпопуляционного.

Доля последнего, несмотря на изолированность и удаленность изученных популяций, составила 9,1% (см. табл. 4). Столь незначительная дифференцировка популяций, на наш взгляд, свидетельствует о том, что современные топольники на территории Северо-Востока России – это результат постледниковой реколонизации из более южных регионов, куда *P. suaveolens* был вынужден отступать в периоды похолодания. Подобная же картина наблюдается на Аляске среди популяций *P. balsamifera* [38] и характерна для окраин ареала видов *Populus* [17, 47]. В эпохи оледенения исходное генетическое разнообразие значительно снижается в силу резкого сокращения эффективных размеров популяций. Небольшие популяции имеют низкое генетическое разнообразие в результате таких процессов, как генетический дрейф, бутылочные горлышки и инбридинг. При последующем расселении, в случае отсутствия фрагментации и локальной адаптации, дифференциация популяций остается слабой вследствие сильного действия эффекта основателя.

Выводы

1. Для листьев *P. suaveolens* характерна преимущественно обратной-цевидная форма пластинки, реже эллиптическая. Преобладают пластинки с коротко (резко) заостренной верхушкой, но встречаются и с постепенно заостренной. Основание обычно округло-клиновидное или клиновидное с выемкой в месте перехода черешка в листовую пластинку.

2. На эндогенном уровне не варьирует форма основания и верхушки листовой пластинки. На одном растении можно наблюдать листья и с обратной-цевидной, и с эллиптической формами пластинок, но одна из них всегда преобладает.

3. В изученных популяциях все особи характеризовались наличием опушения черешка, и его характер не изменялся на эндогенном уровне.

4. Признак «наличие базальных желёзок» в основании листовой пластинки варьировал и на эндогенном, и на индивидуальном уровнях. Его появление в популяциях Северо-Востока России, на наш взгляд, обусловлено древней интрогрессивной гибридизацией *P. suaveolens* с *P. balsamifera* на территории Берингии.

5. Слабая дифференциация изученных популяций, несмотря на их значительную удаленность, указывает на то, что современные топольники на территории Северо-Востока России – результат постледниковой реколонизации.

Литература

1. Бакулин В.Т. Тополь душистый в Сибири. Новосибирск : Гео, 2010. 110 с.
2. Флора СССР // Род тополь – *Populus* L. / под ред. В.Л. Комарова. М. : Изд-во АН СССР, 1936. Т. 5. С. 216–242.
3. Воробьев Д.П. Дикорастущие деревья и кустарники Дальнего Востока. Л. : Наука, 1968. 277 с.

4. Флора Центральной Сибири // Salicaceae – Ивовые / под ред. Ю.П. Петроченко. Новосибирск : Наука, 1979. Т. 1. С. 245–262.
5. Флора Сибири // Salicaceae – Ивовые / под ред. Н.М. Большакова. Новосибирск : Наука, 1992. Т. 5. С. 8–11.
6. Сосудистые растения советского Дальнего Востока // Salicaceae – Ивовые Mirb. / под ред. В.А. Недолужко. СПб. : Наука, 1995. Т. 7. С. 145–155.
7. Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск : Гео, 2012. 707 с.
8. Скворцов А.К., Белянина Н.Б. О бальзамических тополях (*Populus* section *Tacamahaca*, Salicaceae) на востоке Азиатской России // Ботанический журнал. 2006. Т. 91, № 8. С. 1244–1252.
9. Костина М.В., Васильева Н.В., Насимович Ю.А. Природные и культивируемые тополя Иркутской области и Бурятии // Социально-экологические технологии. 2018. № 3. С. 9–21.
10. Насимович Ю.А., Васильева Н.В. Сравнение по морфологическим признакам разных видов тополей (*Populus*, Salicaceae) на примере российских и среднеазиатских представителей подрода *Tacamahaca* (Spach) Penjkovsky // Социально-экологические технологии. 2019. № 3. С. 285–301.
11. Насимович Ю.А., Костина М.В., Васильева Н.В. Концепция вида у тополей (genus *Populus* L., Salicaceae) на примере представителей подрода *Tacamahaca* (Spach) Penjkovsky, произрастающих в России и сопредельных странах // Социально-экологические технологии. 2019. № 4. С. 426–466.
12. Скворцов А.К. Систематический конспект рода *Populus* в Восточной Европе, Северной и Средней Азии // Бюллетень Главного ботанического сада. 2010. № 196. С. 62–73.
13. Прошкин Б.В., Климов А.В. *Populus × jrtyschensis* Chang Y. в Алтае-Саянской горной стране // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. 2017. № 115. С. 28–35.
14. Никоношина Н.А., Мартыненко Н.А., Нечаева Ю.С., Пришнивская Я.В., Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ популяций *Populus nigra* L. на среднем и южном Урале на основании полиморфизма *issr*-маркеров // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 3. С. 1–8.
15. Čortan D., Tubić B., Šijačić-Nikolić M., Borota D. Variability of black poplar (*Populus nigra* L.) leaf morphology in vojvodina, Serbia. Izvorni znanstveni članci. 2015. Vol. 5, Iss. 6. PP. 245–252.
16. Čortan D., Schroeder H., Šijacic-Nikolic M., Wehenkel C., Fladung M. Genetic structure of remnant black poplar (*Populus nigra* L.) populations along biggest rivers in Serbia assessed by SSR markers // Silvae Genetica. 2017. Vol. 65. PP. 12–19.
17. Jiang D., Wu G., Mao K., Feng J. Structure of genetic diversity in marginal populations of black poplar (*Populus nigra* L.). Biochemical Systematics and Ecology. 2015. Vol. 61. PP. 297–302.
18. Климов А.В., Прошкин Б.В. Популяционно-фенетическая структура тополя лавролистного *Populus laurifolia* Ledeb. в бассейне реки Томи // Сибирский лесной журнал. 2018. № 5. С. 62–75.
19. Zheng S., Zhang J., He C., Bao E., Duan A., Zeng Y., Sai L. Genetic diversity of *Populus laurifolia* and *Populus nigra* along Erquis River // Forrest of Research. 2014. Vol. 27. PP. 295–301.
20. Joshi C.P., Difazio S.P., Kole Ch. Genetics, Genomics and Breeding of Poplar. CRC Press Publ., 2011. 352 p.
21. Прошкин Б.В., Климов А.В. Изменчивость признаков листа у форм *Populus laurifolia* Ledeb., отличающихся по окрасу коры в бассейне реки Томи // Вестник НГАУ. 2017. № 1. С. 93–106.

22. Федоров Ал.А., Кирпичников М.Э., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. Лист. М. : Изд-во АН СССР, 1956. 304 с.
23. Климов А.В., Прошкин Б.В. Фенотипическое разнообразие качественных признаков *Populus nigra* L., *P. laurifolia* Ledeb. и *P. ×jrtyschensis* Ch. Y. Yang. в зоне естественной гибридизации // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. № 4. С. 468–475.
24. Банаев Е.В., Шемберг М.А. Ольха в Сибири и на Дальнем Востоке России (изменчивость, таксономия, гибридизация). Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2000. 99 с.
25. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М. : Наука, 1991. 270 с.
26. Путенихин В.П., Фарушкина Г.Г., Шиганов З.Х. Лиственница Сукачева на Урале: изменчивость и популяционно-генетическая структура. М. : Наука, 2004. 276 с.
27. Боронникова С.В., Тихомирова Н.Н., Кравченко О.А. Характеристика генофондов редкого лекарственного вида *Adonis vernalis* L. с использованием ISSR-маркеров // Аграрный вестник Урала. 2009. № 59. С. 67–70.
28. IBM SPSS Statistics 23. URL: <http://www-01.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg24038592> (дата обращения: 12.03.2021).
29. Прошкин Б.В., Климов А.В. Стратегии размножения видов *Populus* в зоне интрогрессивной гибридизации бассейна реки Томи // Сибирский лесной журнал. 2020. № 4. С. 77–86. doi: 10.15372/SJFS20200409
30. Прошкин Б.В., Климов А.В. Семенная продуктивность и развитие семян *Populus ×jrtyschensis* Ch. Y. Yang // Вестник НГАУ. 2019. № 2. С. 51–57.
31. Климов А.В., Прошкин Б.В. Использование анатомо-топографической структуры листовых черешков и расположения устьиц для идентификации видов секции *Tacamahaca* рода *Populus* // Растительный мир Азиатской России. 2018. № 4. С. 30–36.
32. Ильинская И.А. Геологическая история рода *Populus* (Salicaceae) на территории бывшего СССР // Ботанический журнал. 2003. Т. 88, № 5. С. 23–37.
33. Климов А.В., Прошкин Б.В., Андреева З.В. Гибридизация видов рода *Populus* L. секций *Aigeiros* Lunell и *Tacamahaca* Mill. в природе и культуре // Вестник НГАУ. 2018. № 1. С. 16–34.
34. Прошкин Б.В., Климов А.В. Систематическое положение *Populus ciliata* Wall. ex Royle по результатам изучения морфологии побегов и петиолярной анатомии // Социально-экологические технологии. 2020. Т. 10, № 1. С. 9–23.
35. Катенин А.Е. Американские виды *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) и *Viburnum edule* (Michx.) Rafin. (Caprifoliaceae) на юго-востоке Чукотского полуострова // Ботанический журнал. 1980. Т. 65, № 3. С. 414–421.
36. Катенин А.Е. Вторая находка *Populus balsamifera* (Salicaceae) на востоке Чукотского полуострова // Ботанический журнал. 1993. Т. 78, № 4. С. 104–112.
37. Mann D.H., Groves P., Reanier R.E., Kunz M.X. Floodplains, permafrost, cottonwood trees, and peat: what happened the last time it warmed suddenly in arctic Alaska? // Quaternary Science Reviews. 2010. Vol. 29. PP. 3812–3830.
38. Breen A.L., Murray D.F., Olson M.S. Genetic consequences of glacial survival the late Quaternary history of balsam poplar (*Populus balsamifera* L.) in North America // Journal of Biogeography. 2012. Vol. 39. PP. 918–928.
39. Hopkins D.M., Smith P.A., Matthews J.V. Dated wood from Alaska and the Yukon: implications for forest refugia in Beringia // Quaternary Research. 1981. Vol. 15. PP. 217–249.
40. Ложкин А.В., Андерсон П.М., Минюк П.С., Корзун Ю.А., Недорубова Е.Ю. Эволюция природной среды Берингии в Четвертинный период: палеогеография, палеоклиматология, палеоэкология // Форум «Наука Северо-Востока России: фундаментальные и прикладные исследования в северной Пацифике и Арктике» : материалы докладов юбилейной конференции, посвященной 60-летию СВКНИИ им. Н.А. Шило. Владивосток, 2020. С. 48–50.

41. Bockheim J.G., O'Brien J.D., Munroe J.S., Hinkel K.M. Factors Affecting the Distribution of *Populus balsamifera* on the North Slope of Alaska, U.S.A // Arctic, Antarctic and Alpine Research. 2003. Vol. 35, Iss. 3. PP. 331–340.
42. Brubaker L.B., Garfinkel H.L., Edwards M.E. A late Wisconsin and Holocene vegetation history from the central Brooks Range: implications for Alaskan palaeoecology // Quaternary Research. 1983. Vol. 20. PP. 194–214.
43. Криштофович А.Н. Третичная флора залива Корфа на Камчатке: описание растительных остатков, собранных в 1928 г. И.А. Преображенским. Новосибирск : Гос. науч.-техн. горно-геолого-нефтяное изд-во, 1934. 32 с.
44. Ильинская И.А. Обзор ископаемых видов подрода *Tacamahaca* рода *Populus* (Salicaceae) и новые меловые платаны (Platanaceae) // Ботанический журнал. 2000. Т. 85, № 6. С. 119–127.
45. Важенина Л.Н. Растительность и климат Верхнеколымского бассейна в конце неоплейстоцена и в голоцене // Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН. 2009. № 2. С. 44–48.
46. Cronk Q.C. Suarez-Gonzalez A. The role of interspecific hybridization in adaptive potential at range margins // Molecular Ecology. 2018. Vol. 27, Iss. 23. PP. 4653–4656.
47. Macaya-Sanz D., Heuertz M., Lopez-De-Heredia U., De-Lucas A.I., Hidalgo E., Maestro C., Prada A., Alia R., Gonzalez-Martinez S.C. The Atlantic–Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars // Molecular Ecology. 2012. Vol. 21, Iss. 14. PP. 3593–3609.

Поступила в редакцию 11.05.2021 г.; повторно 11.07.2021 г.;
принята 27.08.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.

Авторский указатель:

Климов Андрей Владимирович, канд. биол. наук, заместитель директора по научной работе ООО ИнЭКА-консалтинг. г. Новокузнецк, с.н.с. Западно-Сибирского отделения Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – филиал Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр СО РАН» (Россия, 654027, г. Новокузнецк, ул. Лазо, 4).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6750-4807>

E-mail: populus0709@mail.ru

Прошкин Борис Владимирович, канд. биол. наук, с.н.с. организационно-научного и редакционно-издательского отделения, ФКОУ ВО Кузбасский институт ФСИН России (Россия, 654066, г. Новокузнецк, пр. Октябрьский, 49).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2351-9879>

E-mail: boris.vladimirovich.93@mail.ru

For citation: Klimov AV, Proshkin BV. *Populus suaveolens* Fisch. morphology in the populations of the North-East of Russia. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:19-41. doi: 10.17223/19988591/55/2 In Russian, English Summary

Andrei V. Klimov^{1,2}, Boris V. Proshkin³

¹InEca-Consulting LLC, Novokuznetsk, Russian Federation

²West Siberian Branch of VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”, Novosibirsk, Russian Federation

³Kuzbass Institute of the Federal Penitentiary Service of Russia, Novokuznetsk, Russian Federation

***Populus suaveolens* Fisch. morphology in the populations of the North-East of Russia**

The fragrant poplar (*Populus suaveolens* Fisch, section *Tacamahaca* Mill.) is a mountain-valley species inhabiting riverine alluvial deposits and confined to floodplain and first floodplain terraces of rivers from the upper Yenisei to northern Japan, Korea,

Mongolia and China in the south to the Chukchi Peninsula in the north. Despite its wide distribution, it remains the least studied and almost unused to “green building” even within its range. Data on intraspecific variability of *P. suaveolens* are fragmentary, and studies of the variability of species-specific traits at the population level are insufficient. Such trait as basal glands (glands from above at the junction of petiole and blade) has been recorded recently and only in one part of the range. As a consequence, there is no clear understanding of the scope of the taxon, the boundaries of its range and natural hybridization with neighboring species of the *Tacamahaca* section. Since hybridization introduces some difficulties in studying intraspecific variability in species of the genus *Populus*, it is of theoretical and practical interest to study variability in populations remote from its current zones. One of such regions of *P. suaveolens* range is Chukotka Autonomous Okrug, where it grows in the floodplains of rivers in periodically flooded areas, forming with *Chosenia arbutifolia* (Pall.) A.K. Skvortsov poplar-chosenia forests. The aim of this study is to characterize the variability of morphological traits of vegetative organs of *P. suaveolens* in populations of Chukotka Autonomous Okrug.

We studied *P. suaveolens* populations in 2020 in Bilibinsk district of Chukotka Autonomous Okrug. The study area is characterized by a low-mountain relief: with increasing altitude of the terrain a change in vegetation belts is traced. Forest communities occupy river valleys and the lower parts of the slopes of hills. Poplar-chosenia forests grow on sandy-pebble substrates along the river floodplains in small strips. As our observations have shown, *P. suaveolens* is widely used in landscaping of settlements of Chukotka Autonomous Okrug and Magadan Region. Three of the studied populations: “Baimka”, “Tallag” and “Peschanka” are located at the latitude of the Arctic Circle in the floodplains of the eponymous rivers in the river basin Bolshoi Anyui. All of them are isolated from each other by mountains. The northernmost population “Bilibino” is confined to the right bank of the Bolshoi Keperveem River (Maly Anyuy River basin) on the border of Bilibino, it is 200 km distant from the others. All populations were sampled in poplar-chosenia floodplain forests with varying degrees of anthropogenic transformation of the territory (Table 1).

To exclude age variability, we collected herbarium material only from shortened shoots of the southern side of the middle part of the crown of reproductively mature trees. The tendency of balsamic poplars to form clones was taken into account, and repeated collections within a clone were carefully avoided. From each individual, fifteen fully developed, undamaged leaves were taken. The main morphometric traits, as well as the derivatives (indices) were measured on each leaf. A total of 1800 leaves were used for morphological study. We studied a complex of traits: blade shape, its apex and base, presence of basal glands, and petiole pubescence.

Poplar-chosenia forests in the studied area grow in a narrow strip on alluvial sandy-pebble deposits in the floodplains of rivers (See Fig. 1). The stand formed by *P. suaveolens* is 12-14 m high, 16-20 cm in diameter; trunks are straight and with low taper. Bark in a lower part is oblong-cracked at the height of 1-1.5 m, above it is smooth and whitish-gray. The crown is usually compact, spreading in older trees; branches are of medium thickness. Clearance from dry branches is good. Leaf blades on shortened shoots are bent upwards at the edges and folded in the form of a “boat” in all the studied plantings. This is probably due to the absence of stomata on the upper side of the blades and this “folding” facilitates transpiration. Perhaps it is an important adaptation in the subarctic conditions of the region. *P. suaveolens* in all four populations is characterized by two blade forms: obovate and elliptic (See Table 2). As in other *Populus* species investigated, several forms can be observed at the endogenous level (within the individual), but one - obovate, with the maximum width above the middle of its length (57-70%) prevails. On shortened shoots in the middle part of the crown, all leaves of

one tree always have only one shape of the apex and base of the leaf blade. In all studied populations of *P. suaveolens*, individuals with a shortly pointed (sharply pointed) apex dominated, but in 4-6 trees in the plantation the leaves had a gradually pointed shape. Only in Baimka population, plants with a wedge-shaped base of the leaf blade prevailed, in the rest these were roundly wedge-shaped ones (See Table 2). As noted above, one of the morphological traits of leaves characteristic of *P. suaveolens* is a differently expressed cordate base of the blade and the presence of a small notch. The notch at the base of leaves of shortened shoots is a quite frequent trait, especially in leaves with a rounded wedge-shaped base; it often overlaps with rounded lobes. In our opinion, it is caused by the character of petiole-to-leafplate transition. The fact is that the petiole of *P. suaveolens* is located in different planes with the blade and enters it at an angle from below, at some distance from the base edge (See Fig. 2). The groove, expressed on the upper side of the petiole, continues to be seen at some distance on the main vein, gradually tapering conically. Here, the first lateral veins branch off at the place where the groove enters. The levels of variability of the considered morphological traits in the populations studied differ in the development of basal glands (See Tables 3 and 4). At the endogenous level, this trait varies greatly from complete absence to 1-4 glands at the base of the blade. However, only in populations "Bilibino" and "Baimka", 3 individuals (10%) with leaves without glands were noted, and on the contrary, in "Peschanka" leaves with developed glands prevailed on all plants (See Table 2). In the first two plantations, the greatest number of trees with developed glands on less than 50% of leaves was noted. Leaf blades with two glands (32.2% to 67.7% in the population) and one (8.8% to 17.3%) were typical (See Fig. 3). The proportion of leaves without them in the populations ranged from 18.6% to 52.2%. Leaves with three and four glands were noted singularly in all populations except "Bilibino". Consequently, the sign of the presence of basal glands varies both at the endogenous and individual levels. In our opinion, its occurrence in the populations of North-East Russia is caused by ancient introgressive hybridization (possibly repeated) of this taxon with *P. balsamifera* in the Pliocene-Pleistocene on the territory of Beringia. Obtained as a result of introgression by the fragrant poplar, this trait gradually spread as a result of intraspecific interbreeding from the east deep into the continent. Consequently, the presence of basal glands as a trait in modern populations of *P. suaveolens* of North-East Russia can be considered as evidence of the existence of Eurasian-American syngameon at certain stages of evolution of the genus. Weak differentiation of the studied populations, despite their considerable remoteness, indicates that modern poplars in the territory of North-East Russia are the result of postglacial recolonization.

The paper contains 3 Figures, 4 Tables and 47 References.

Key words: *Populus suaveolens*; variability; morphological traits; population; basal glands; introgressive hybridization

Funding: The research was carried out within the framework of the basic projects of the Federal Research Center of the Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (No. AAAA-A17-117101820003-0) and Novosibirsk State Agrarian University (No. AAAA-A17-117112470021-9).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Bakulin VT. Topol' dushistyy v Sibiri [Fragrant poplar in Siberia]. Novosibirsk: Geo Publ.; 2010. 110 p. In Russian
2. Flora SSSR. Rod topol' - *Populus* L. [Flora of the USSR. Genus Poplar - *Populus* L.]. Vol. 5. Komarov VL, editor. Moscow: Academy of Sciences of the USSR Publ.; 1936. pp. 216-242. In Russian

3. Vorobiev DP. Dikorastushchie derev'ya i kustarniki Dal'nego Vostoka [Wild trees and shrubs of the Far East]. Leningrad: Nauka Publ.; 1968. 277 p. In Russian
4. *Flora Tsentral'noy Sibiri*. Salicaceae -Willow [Flora of Central Siberia. Salicaceae - Willow]. Vol. 1. Petrochenko YuP, editor. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 1979. pp. 245-262. In Russian
5. *Flora Sibiri*. Salicaceae - Ivovye [Salicaceae - Willow. Flora of Siberia]. Vol. 5. Bol'shakov NM, editor. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 1992. pp. 8-11. In Russian
6. *Sosudistnye rasteniya sovet'skogo Dal'nego Vostoka*. Salicaceae - Ivovye [Vascular plants of the Soviet Far East. Salicaceae - Willow]. Vol. 7. Nedoluzhko VA, editor. St. Petersburg: Nauka Publ.; 1995. pp. 145-155. In Russian
7. Koropachinskiy IYu, Vstovskaya TN. Drevesnye rasteniya Aziatskoy Rossii [Woody plants of Asian Russia]. Novosibirsk: Geo Publ.; 2012. 707 p. In Russian
8. Skvortsov AK, Belyanina NB. O bal'zamicheskikh topolyah (*Populus* section *Tacamahaca*, Salicaceae) na vostoке Aziatskoy Rossii [On balsamic poplars (*Populus* section *Tacamahaca*, Salicaceae) in the east of Asian Russia]. *Botanical Journal*. 2006;91(8):1244-1252. In Russian
9. Kostina MV, Vasilieva NV. Natural and cultivated poplars of Irkutsk Province and Buryat Republic. *Environment and Human: Ecological Studies*. 2018;3:9-21. doi: [10.31862/2500-2961-2018-3-9-21](https://doi.org/10.31862/2500-2961-2018-3-9-21)
10. Nasimovich YuA, Vasilieva NV. Determination of validity of the biotesting method of environmental factors in experiments with the use of biological preparations on the basis of *Bacillus subtilis* and natural zeolite. *Environment and Human: Ecological Studies*. 2019;3:285-301. doi: [10.31862/2500-2961-2019-9-2-176-200](https://doi.org/10.31862/2500-2961-2019-9-2-176-200)
11. Nasimovich YuA, Kostina MV, Vasilieva NV. The concept of species in poplars (genus *Populus* L., Salicaceae) based on the example of the subgenus *Tacamahaca* (Spach) Penjkovsky representatives growing in Russia and neighbouring countries. *Environment and Human: Ecological Studies*. 2019;4:426-466. doi: [10.31862/2500-2961-2019-9-4-426-466](https://doi.org/10.31862/2500-2961-2019-9-4-426-466)
12. Skvortsov AK. Taxonomical synopsis of the genus *Populus* L. in East Europe, North and Central Asia. *Bulletin of the Main Botanical Garden*. 2010;196:62-73. In Russian
13. Proshkin BV, Klimov AV. *Populus* × *jrtyschensis* Chang Y. in the Altai-Sayan mountainous country. *Systematic notes based on the materials of the Herbarium named after P.N. Krylov of Tomsk State University*. 2017;115:28-35. doi: [10.17223/20764103.115.5](https://doi.org/10.17223/20764103.115.5)
14. Nikonoshina NA, Martynenko NA, Nechaeva YuS, Prishnivskaya YaV, Boronnikova SV. Molecular genetic analysis of populations of *Populus nigra* L. in the middle and southern Urals based on polymorphism ISSR-markers. *Modern Problems of Science and Education*. 2016;3:403. In Russian, English Summary
15. Čortan D, Tubić B, Šijačić-Nikolić M, Borota D. Variability of black poplar (*Populus nigra* L.) leaf morphology in vojvodina, Serbia. *Izvorni znanstveni članci*. 2015;5(6):245-252
16. Čortan D, Schroeder H, Šijacic-Nikolic M, Wehenkel C, Fladung M. Genetic structure of remnant black poplar (*Populus nigra* L.) populations along biggest rivers in Serbia assessed by SSR markers. *Silvae Genetica*. 2017;65:12-19. doi: [10.1515/sg-2016-0002](https://doi.org/10.1515/sg-2016-0002)
17. Jiang D, Wu G, Mao K, Feng J. Structure of genetic diversity in marginal populations of black poplar (*Populus nigra* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2015;61:297-302. doi: [10.1016/j.bse.2015.06.014](https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.06.014)
18. Klimov AV, Proshkin BV. Population and phenetic structure of laurel poplar *Populus laurifolia* Ledeb. in the Tom river basin. *Siberian Journal of Forest Science*. 2018;5:62-75. doi: [10.15372/SJFS20180506](https://doi.org/10.15372/SJFS20180506)
19. Zheng S, Zhang J, He C, Bao E, Duan A, Zeng Y, Sai L. Genetic diversity of *Populus laurifolia* and *Populus nigra* along Erquis River. *Forrest of Research*. 2014;27:295-301

20. *Genetics, genomics and breeding of poplar*. Joshi CP, Difazio SP and Kole Ch, editors. 1st ed. CRC Press. 2011. 352 p.
21. Proshkin BV, Klimov AV. Variations of leaves parameters of *Populus laurifolia* Ledeb. that differ in bark coloration in the basin Tom basin. *Vestnik NGAU (Novosibirsk State Agrarian University)*. 2017;1:93-106. In Russian
22. Fedorov AIA, Kirpichnikov ME, Artyushenko ZT. Atlas po opisatel'noy morfologii vysshih rasteniy. List [Atlas of descriptive morphology of higher plants. Liszt]. Moscow: Academy of Sciences of the USSR Publ.; 1956. 304 p. In Russian
23. Klimov AV, Proshkin BV. Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in natural hybridization zone. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(4):468-475. doi: [10.18699/VJ18.384](https://doi.org/10.18699/VJ18.384)
24. Banaev EV, Shemberg MA. Ol'ha v Sibiri i na Dal'nem Vostoke Rossii (izmenchivost', taksonomiya, gibridizatsiya) [Alder in Siberia and the Far East of Russia (variability, taxonomy, hybridization)]. Novosibirsk: Siberian Branch Publ.; 2000. 99 p. In Russian
25. Zhivotovskiy LA. Populyatsionnaya biometriya [Population biometrics]. Moscow: Nauka Publ.; 1991. 270 p. In Russian
26. Putenihin VP, Farukshina GG, Shiganov ZKh. Listvennitsa Sukacheva na Urale: izmenchivost' i populyatsionno-geneticheskaya struktura [Sukachevs Larch in the Urals: Variability and Population Genetic Structure]. Moscow: Nauka Publ.; 2004. 276 p. In Russian
27. Boronnikova SV, Tikhomirova NN, Kravchenko OA. Eke characteristic of genofunds of rare medicinal kind *Adonis vernalis* L. with use ISSR-markers. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2009;59:67-70. In Russian
28. IBM SPSS Statistics 23. [Electronic resource]. Available at: <http://www-01.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg24038592> (accessed: 12.03.2021)
29. Proshkin BV, Klimov AV. Reproduction strategies of *Populus* species in the area of introgressive hybridization in the basin of Tom River. *Siberian Journal of Forest Science*. 2020;4:77-86. doi: [10.15372/SJFS20200409](https://doi.org/10.15372/SJFS20200409)
30. Proshkin BV, Klimov AV. Seed productivity and development of seedlings *Populus* × *jrtyschensis* Ch. Y. Yang. *Bulletin of NSAU (Novosibirsk State Agrarian University)*. 2019;2:51-57. doi: [10.31677/2072-6724-2019-51-2-51-57](https://doi.org/10.31677/2072-6724-2019-51-2-51-57)
31. Klimov AV, Proshkin BV. Use of the anatomical and topographical structure of leaf petioles and the location of stomata for identifying species of the *Tacamahaca* section of the genus *Populus* (Salicaceae). *Rastitel'nyy Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia*. 2018;4:30-36. doi: [10.21782/RMAR1995-2449-2018-4\(30-36\)](https://doi.org/10.21782/RMAR1995-2449-2018-4(30-36))
32. Ilinskaya IA. Geologicheskaya istoriya roda *Populus* (Salicaceae) na territorii byvshego SSSR [Geological history of the genus *Populus* (Salicaceae) in the territory of the former USSR]. *Botanical Journal*. 2003;88(5):23-37. In Russian
33. Klimov AV, Proshkin BV, Andreeva ZV. Hybridization of *Populus* L. sections *Aigeiros* Lunell and *Tacamahaca* Mill in nature and crop. *Bulletin of the NSAU (Novosibirsk State Agrarian University)*. 2018;1:16-34. In Russian
34. Proshkin BV, Klimov AV. Systematic position of *Populus ciliata* Wall. ex Royle based on the study of shoot morphology and petiolar anatomy. *Environment and Human: Ecological Studies*. 2020;10(1):9-23. doi: [10.31862/2500-2961-2020-10-1-9-23](https://doi.org/10.31862/2500-2961-2020-10-1-9-23)
35. Katenin AE. Amerikanskije vidy *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) i *Viburnum edule* (Michx.) Rafin. (Caprifoliaceae) na yugo-vostoke Chukotskogo poluostrova [American species *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) and *Viburnum edule* (Michx.) Rafin. (Caprifoliaceae) in the south-eastern part of Chukotka peninsula]. *Botanical Journal = Botanical Journal*. 1980;65(3):414-421. In Russian
36. Katenin AE. Vtoraya nakhodka *Populus balsamifera* (Salicaceae) na vostoke Chukotskogo poluostrova [The second record of *Populus balsamifera* (Salicaceae) in the eastern part of

- Chukotka peninsula]. *Botanicheskii zhurnal* = *Botanical Journal*. 1993;78(4):104-112. In Russian
37. Mann DH, Groves P, Reanier RE, Kunz MX. Floodplains, permafrost, cottonwood trees, and peat: what happened the last time it warmed suddenly in arctic Alaska? *Quaternary Science Reviews*. 2010;29:3812-3830. doi: [10.1016/j.quascirev.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2010.09.002)
 38. Breen AL, Murray DF, Olson MS. Genetic consequences of glacial survival the late Quaternary history of balsam poplar (*Populus balsamifera* L.) in North America. *Journal of Biogeography*. 2012;39:918-928.
 39. Hopkins DM, Smith PA, Matthews JV. Dated wood from Alaska and the Yukon: implications for forest refugia in Beringia. *Quaternary Research*. 1981;15:217-249.
 40. Lozhkin AV, Anderson PM, Minyuk PS, Korzun YuA, Nedorubova EYu. Evolyutsiya prirodnoy sredy Beringii v Chetvertinyy period: paleogeografiya, paleoklimatologiya, paleoekologiya [Evolution of the natural environment of Beringia in the Quaternary period: paleogeography, paleoclimatology, paleoecology]. Forum "Nauka Severo-Vostoka Rossii: fundamental'nye i prikladnye issledovaniya v severnoy Patsifike i Arktike" Materialy dokladov yubileynoy konferentsii, posvyashchennoy 60-letiyu SVKNII im. N.A. Shilo DVO RAN [Forum "Science of the North-East Russia: Fundamental and Applied Research in the Northern Pacific and the Arctic "Materials of the reports of the jubilee conference dedicated to the 60th anniversary of the on. N. A. Shilo FEB RAS]. 2020. pp. 48-50. In Russian
 41. Bockheim JG, O'Brien JD, Munroe JS, Hinkel KM. Factors Affecting the Distribution of *Populus balsamifera* on the North Slope of Alaska, U.S.A. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*. 2003;35(3):331-340.
 42. Brubaker LB, Garfinkel HL, Edwards ME. A late Wisconsin and Holocene vegetation history from the central Brooks Range: implications for Alaskan palaeoecology. *Quaternary Research*. 1983;20:194-214.
 43. Krishtofovich AN. Tretichnaya flora zaliva Korfa na Kamchatke: opisanie rastitel'nykh ostatkov, sobrannykh v 1928 g. I. A. Preobrazhenskim [The tertiary flora of the Korf Gulf, Kamchatka: a description of plant remains collected by I.A. Preobrajensky in 1928]. Novosibirsk: State scientific and technical mining-geological-oil Publ.; 1934. 32 p. In Russian
 44. Ilinskaya IA. Obzor iskopaemykh vidov podroda Tacamahaca roda *Populus* (Salicaceae) i novye melovye platany (Platanaceae) [A review of fossil species of the subgenus *Tacamahaca* of the genus *Populus* (Salicaceae) and new Cretaceous plane trees (Platanaceae)]. *Botanicheskii zhurnal* = *Botanical Journal*. 2000;85(6):119-127. In Russian
 45. Vazhenina LN. Vegetation and climat in the Upper Kolyma R. area since the late Neopleistocene through the Holocene. *The Bulletin of the North-East Scientific Center*. 2009;2:44-48. In Russian
 46. Cronk QC, Suarez-Gonzalez A. The role of interspecific hybridization in adaptive potential at range margins. *Molecular Ecology*. 2018;27(23):4653-4656. doi: [10.1111/mec.14927](https://doi.org/10.1111/mec.14927)
 47. Macaya-Sanz D, Heuertz M, Lopez-De-Heredia U, De-Lucas AI, Hidalgo E, Maestro C, Prada A, Alia R, Gonzalez-Martinez SC. The Atlantic-Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars. *Molecular Ecology*. 2012;21(14):3593-3609. doi: [10.1111/j.1365-294X.2012.05619.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05619.x)

Received 11 May, 2021; Revised 11 July, 2021;

Accepted 27 August 2021; Published 29 September, 2021.

Author info:

Klimov Andrei V, Cand. Sci. (Biol.) Deputy Director For Scientific Work of InEkA-consulting LLC, Senior Researcher, West Siberian Branch of V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences - a branch of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS”, Russia, 4 Lazo Pr., Novokuznetsk 654027, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6750-4807>

E-mail: populus0709@mail.ru

Proshkin Boris V, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Organizational, Scientific and Editorial and Publishing Department, Federal State Institution Kuzbass Institute of the Federal Penitentiary Service of Russia, 49 Oktyabrsky Pr., Novokuznetsk 654066, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2351-9879>

E-mail: boris.vladimirovich.93@mail.ru

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 632.754.1:575.174

doi: 10.17223/19988591/55/3

Е.Н. Беседина¹, В.И. Киль²

¹Федеральный научный центр биологической защиты растений, г. Краснодар, Россия

²Кубанский государственный университет, г. Краснодар, Россия

ДНК-полиморфизм и генетическое разнообразие популяции дубовой кружевницы (*Corythucha arcuata* Say) в Краснодарском крае

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Краснодарского края (научный проект № 19-44-233009 р_мол_а) и в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 0686-2019-0012).

Проведен RAPD-ПЦР-анализ географических выборок насекомых Краснодарского края из ареалов дубовой кружевницы (*Corythucha arcuata* Say) в лесопарковых зонах Краснодара, Тихорецка, Крымска, Сочи. Отмечены высокие уровни ДНК-полиморфизма ($P = 100\%$) и генетического разнообразия ($H = 0,26–0,29$, по Nei) в популяции *C. arcuata*. Показано, что большую часть генетической изменчивости составила изменчивость внутри популяционных группировок (93,2%), тогда как на долю изменчивости между ними приходилось 6,8% от общей изменчивости. Выявлены значительный уровень потока генов между внутривнутрипопуляционными группировками насекомых ($N_m = 6,98$) и высокая степень генетического сходства между ними внутри популяции ($GI = 0,942–0,998$). Вероятно, проанализированные выборки насекомых представляют собой внутривнутрипопуляционные группировки из одной популяции дубовой кружевницы.

Ключевые слова: *Corythucha arcuata*; насекомые; ПЦР; RAPD-анализ; генетическая изменчивость; внутривнутрипопуляционные группировки

Сокращения: GI – генетическая идентичность [Genetic Identity]; GD – генетические расстояния [Genetic Distances].

Для цитирования: Беседина Е.Н., Киль В.И. ДНК-полиморфизм и генетическое разнообразие популяции дубовой кружевницы (*Corythucha arcuata* Say) в Краснодарском крае // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 42–XX. doi: 10.17223/19988591/55/3

Введение

Клоп дубовая кружевница *Corythucha arcuata* Say (Heteroptera: Tingidae) – опасный инвазивный вид, родина которого Северная Америка [1]. Отсутствие эффективных средств и методов борьбы с ним привело к

тому, что адвентивный вредитель поставил под угрозу существование древесных экосистем стран Западной, Восточной, Южной Европы и Передней Азии [2–4]. После первого его обнаружения в 2015 г. на территории России в Краснодарском крае клоп значительно расширил свой формирующийся инвазионный ареал, и в течение двух лет его вредоносность приобрела характер пандемии [5–7]. К настоящему времени вредитель стремительно распространился на Северном Кавказе, рассматриваемом в административных границах Краснодарского края, Республики Адыгея, а также прилегающих территорий Ставропольского края, Ростовской области, Республик Карачаево-Черкесия и Абхазия [8–10].

Площадь очагов его массового размножения только в государственных лесах на территории края уже в 2016 г. превысила 372 тыс. га, а площадь инвазии, определяемая по крайним находкам *C. arcuata*, достигла 1 300 тыс. га (при этом общая площадь лесов Краснодарского края составляет 1 683,1 тыс. га), в 2017 г. – 620 тыс. га, в 2018 г. – 742 тыс. га [10–11]. С 1 июля 2017 г. клоп дубовая кружевница внесен в перечень карантинных объектов на территории Российской Федерации [12].

Дубовая кружевница повреждает целый ряд ценнейших древесных и кустарниковых пород [10–11, 13–15]. Огромная вредоносность клопа, определяемая полным поражением всей листовой поверхности, приводит к нарушению фотосинтеза, что прекращает поглощение углекислого газа и выделение кислорода, нормальный рост и развитие растений и влечет нарушение равновесия экосистем [16]. За вегетационный период развиваются 3–4 генерации вредителя [10, 17]. Масштабной инвазии *C. arcuata* на Северном Кавказе способствуют пластичность сезонного цикла, миграционная активность и полифагия имаго, а также развитая транспортная инфраструктура, поддерживающая значительный грузопоток из потенциальных источников завоза чужеродных вредных организмов к естественным лесам [10].

Для успешного осуществления программ по защите растений от вредителей необходимо изучение биологии и генетики популяций вредных насекомых. Знание популяционной генетики поможет усовершенствовать диагностику, определить пути вторжения, миграции вида и разработать механизмы их предотвращения.

В литературе имеются данные о секвенировании полного митохондриального генома платановой кружевницы *Corythucha ciliata* (Say, 1832) [18], а также митохондриального генома и сегмента ядерного рибосомного гена другого представителя этого семейства *Pseudacysta perseae* (Heidemann, 1908) [19]. Филогенетические исследования семейства Tingidae, включая виды *C. ciliata* и *Stephanitis pyri* (F., 1775), проведены авторами на основе сравнительного анализа последовательности нуклеотидов участков ядерных и митохондриальных генов (*COI*, *Leu-tRNA*, *COII*, *16S* и *28S rRNA*) [20]. В другом исследовании с использованием FISH-картирования с маркером 18S рДНК изучены *Stephanitis caucasica* (Kiritshenko, 1939), *S. pyri*,

Physatocheila confinis (Horváth, 1905), *Lasiacantha capucina* (Germar, 1836), *Dictyla rotundata* (Herrich-Schäffer, 1835) и *Dictyla echii* (Schrank, 1782) [21].

Для определения путей миграции и инвазии *C. ciliata* проведено изучение генетической структуры азиатских и европейских популяций платановой кружевницы с помощью анализа митохондриальных последовательностей ДНК и микросателлитов [22]. Проведенный анализ подтвердил широко распространенную вторичную инвазию, происходящую от первичной инвазивной популяции, что наблюдалось при расселении других инвазивных насекомых, включая *Frankliniella occidentalis* (Perg., 1895) [23], *Solenopsis invicta* (Buren, 1972) [24] и *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte, 1858) [25].

Современные геномные подходы могут предоставить возможность для разработки новых стратегий управления численностью насекомых, которые представляют непосредственную угрозу для окружающей среды. Так, у платановой кружевницы изучены уровни экспрессии генов, контролирующие особенности метаморфоза и механизмы половой детерминации. Эти гены, отвечающие за синтез ювенильных гормонов, хемосенсорного и кутикулярного белков, могут служить молекулярными мишенями для новых инсектицидов [26].

Анализ изменчивости генетической структуры популяций, как одного из направлений популяционной генетики насекомых, включает оценку генетического разнообразия, ДНК-полиморфизма и генетического сходства изучаемых объектов. Один из подходов к изучению генетики популяций – использование молекулярных маркеров, представляющих полиморфные последовательности ДНК, которые могут быть обнаружены с помощью различных модификаций метода ПЦР, включая RAPD-PCR (randomly amplified DNA polymerase chain reaction) – случайным образом амплифицированная ДНК [27]. Данный подход относительно прост в сравнении с другими вариантами ПЦР, так как не требует знания первичной последовательности ДНК [28]. Проблемы с относительно низкой воспроизводимостью этого метода могут быть устранены подбором высокоспецифичных к ДНК RAPD-праймеров [29–30]. Подобный подход с успехом применяется при сравнительном анализе ДНК-полиморфизма не только различных видов клопов, но и других отрядов насекомых, что позволяет изучать генетику популяций вредных насекомых наряду с использованием других маркерных систем ПЦР [31–32].

Цель работы – изучение молекулярно-генетической структуры локальных популяций дубовой кружевницы *C. arcuata* в Краснодарском крае по RAPD-маркерам для оценки их генетического сходства.

Материалы и методики исследования

Исследования проведены в 2020 г. на территориях инвазивного распространения клопа дубовая кружевница в Краснодарском крае: города Краснодар, Тихорецк, Крымск и Сочи. Объект исследований – выборки насекомых

($n=20$) из природной популяции дубовой кружевницы выбранных локалитетов. Общее количество исследованных образцов – 240. Сбор клопов *C. arcuata* осуществлен на модельных деревьях дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Выборка деревьев – 10 дубов из каждого локалитета.

Лабораторные исследования выполнены на базе сектора биотехнологии ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (г. Краснодар). Выделение ДНК из целых особей насекомых (имаго), амплификация (RAPD-PCR) и электрофорез проведены по разработанной нами ранее методике [33]. RAPD-амплификация проведена в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl; 3,0 мМ MgCl₂; 50 мкМ каждого dNTP; 0,8 мкМ праймера; 0,5 ед. Taq-полимеразы и 20 нг ДНК. Все компоненты взяты из набора для амплификации («Силекс», Россия).

В RAPD-PCR использованы высокоспецифичные для ДНК клопа дубовой кружевницы праймеры: ОРА07, ОРА09, ОРА18 («Евроген», Россия) [34–36].

Амплификация проведена на приборе «iCycler» («Bio Rad», США), в следующих режимах:

- 1) 3 минуты предварительная денатурация при 94 °C;
- 2) 36 циклов:
 - 20 секунд денатурация при 94 °C;
 - 20 секунд отжиг при 36 °C;
 - 60 секунд элонгация при 72 °C;
- 3) 10 минут конечный синтез при 72 °C.

Амплифицированные фрагменты ДНК разделены электрофорезом в 1,8%-ном агарозном геле в буфере TBE (45 мМ Трис-бората и 1 мМ ЭДТА) с дальнейшим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Продукты амплификации визуализированы с помощью системы гель-документирования GelDoc XR+ («Bio Rad», США). В качестве маркера молекулярного веса ДНК использован Gene Ruler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США).

Оценка ДНК-полиморфизма, генетического разнообразия и генетического сходства проведена по информационным индексам Nei и Shannon с помощью компьютерной программы POPGENE (version 1.31) [37]. Статистическая значимость различий между средними значениями по выборке оценена по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования и обсуждение

Одно из направлений популяционной генетики насекомых – изучение изменчивости генетической структуры популяций, что включает в себя оценку генетического разнообразия, ДНК-полиморфизма и генетического сходства изучаемых объектов. Это позволяет судить о потоке генов, т.е. обмене генетическим материалом внутри популяции или между популяциями, и опре-

делить степень их генетической дифференциации: представляют они собой разные популяции или одну единую популяцию и являются в этом случае внутривидовыми группировками.

С использованием RAPD-PCR-системы маркирования изучена молекулярно-генетическая структура локальных популяций дубовой кружевницы в Краснодарском крае. Проведен RAPD-анализ географических выборок насекомых из городов Краснодар, Тихорецк, Крымск и Сочи. В общей сложности с использованием трех праймеров получено 39 RAPD-локусов (рис. 1, табл. 1).

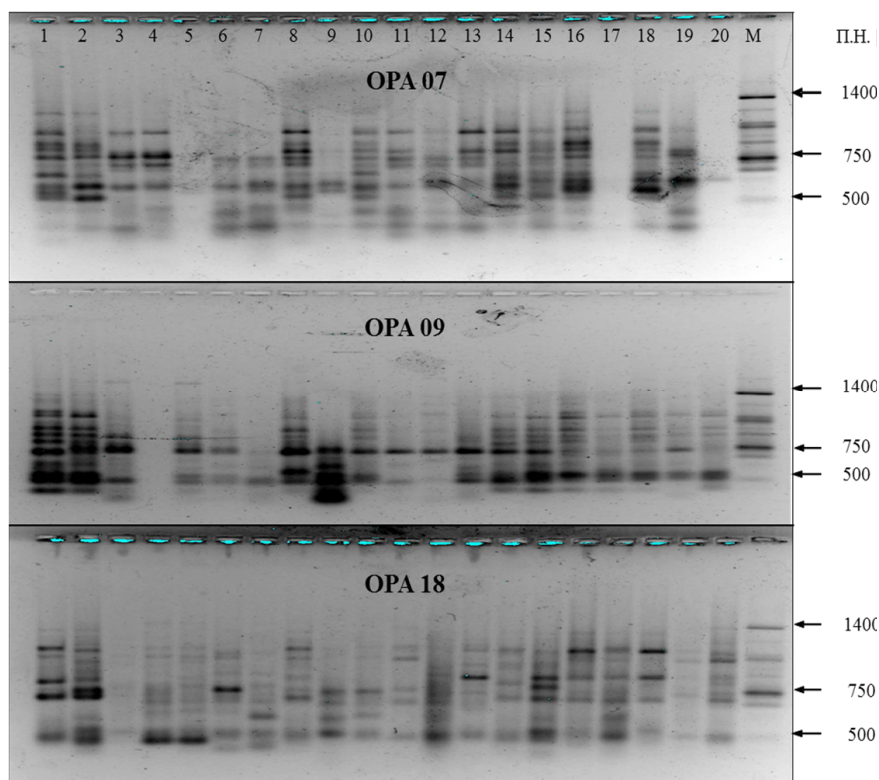


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов RAPD-PCR *Corythucha arcuata* в 1,8% агарозном геле с праймерами OPA07, OPA09 и OPA18. Дорожки – ампликоны ДНК насекомых различных географических выборок: 1–5 – г. Тихорецк; 6–10 – г. Краснодар; 11–15 – г. Крымск; 16–20 – г. Сочи. М – маркеры молекулярных масс, п.н.

[Fig. 1. Electropherograms of RAPD-PCR products of *Corythucha arcuata* in 1.8% agarose gel with primers OPA07, OPA09 and OPA18.

Lanes - DNA amplicons of insects from various geographic samples: 1-5 - Tikhoretsk; 6-10 - Krasnodar; 11-15 - Krymsk; 16-20 - Sochi. M - Molecular weight markers, bp]

Таблица 1 [Table 1]

**Число локусов на праймер и размеры ДНК-фрагментов
в RAPD-анализе *Corythucha arcuata***

[Number of loci per primer and sizes of DNA fragments in RAPD analysis of *Corythucha arcuata*]

RAPD-праймер [RAPD-primer]	Последовательность нуклеотидов 5'-3' [Sequence of nucleotides 5'-3']	Число локусов [Number of loci]	Размеры ДНК-фрагментов, п.н. [Sizes of DNA fragments, bp]
OPA 07	GAAACGGGTG	14	≈1500–200
OPA 09	GGGTAACGCC	12	≈1500–200
OPA 18	AGGTGACCGT	13	≈1400–300

Молекулярно-генетический анализ *C. arcuata* выявил в целом высокие уровни ДНК-полиморфизма ($P = 100\%$) и генетического разнообразия ($H = 0,26–0,29$, по Nei) в популяции дубовой кружевницы и отсутствие различий между выборками по этим показателям (табл. 2–3).

Таблица 2 [Table 2]

Генетическое разнообразие и ДНК-полиморфизм внутривидовых группировок *Corythucha arcuata* по RAPD-локусам (n=39)
[Genetic diversity and DNA polymorphism of *Corythucha arcuata* intra-population groupings at RAPD loci (n=39)]

Внутривидовая группировка [Intra-population grouping]	P (%)	Na±SD*	Ne±SD*	H±SD*	I±SD*
Краснодарская [Krasnodar]	97,4	1,97±0,16	1,47±0,31	0,29±0,15	0,45±0,19
Тихорецкая [Tikhoretsk]	92,3	1,92±0,27	1,44±0,31	0,27±0,16	0,42±0,21
Крымская [Krymsk]	89,7	1,90±0,31	1,42±0,31	0,26±0,16	0,41±0,22
Сочинская [Sochi]	87,2	1,87±0,34	1,47±0,36	0,28±0,18	0,42±0,24

Примечание. * $t_{факт} \leq t_{05}$ – статистически не значимые различия; P – % полиморфных локусов в популяционной группировке; Na – число аллелей на локус; Ne – эффективное число аллелей на локус; H – генетическое разнообразие по Nei; I – генетическое разнообразие по Shannon; ±SD – стандартное отклонение.

[Note. * $t_{факт} \leq t_{05}$ - Differences are not significant; P - Percentage of polymorphic loci in a population grouping; Na - The number of alleles per locus; Ne - Effective number of alleles per locus; H - Genetic diversity by Nei; I - Genetic diversity by Shannon; ±SD - Standard deviation].

В свою очередь, анализ генетических различий между исследуемыми выборками насекомых выявил также высокую степень сходства между ними (генетическая идентичность (GI) = 0,942–0,998; генетическое расстояние (GD) = 0,003–0,060) (табл. 4).

Таблица 3 [Table 3]

**Суммарная генетическая изменчивость популяции
Corythucha arcuata в Краснодарском крае**
[Total genetic variability of the *Corythucha arcuata* population in Krasnodar Krai]

Показатель [Indicator]	P (%)	Na	Ne	Ht	Hs	Gst	Nm
Значение [Value] ($\pm$ SD)	100,0	2,0 $\pm$ 0,0	1,47 $\pm$ 0,30	0,295 $\pm$ 0,020	0,275 $\pm$ 0,017	0,07	6,98

Примечание. P – % полиморфных локусов по всем выборкам; Na – число аллелей на локус; Ne – эффективное число аллелей на локус; Ht – общее генетическое разнообразие в популяции по Nei; Hs – среднее генетическое разнообразие внутри популяционных группировок по Nei; Gst – коэффициент генетической дифференциации по Nei; Nm – показатель потока генов между популяционными группировками.

[Note. P - Percentage of polymorphic loci in all samples; Na - The number of alleles per locus; Ne - Effective number of alleles per locus; Ht - Total genetic diversity in a population by Nei; Hs - Average genetic diversity within population groupings by Nei; Gst - Genetic differentiation coefficient by Nei; Nm - Indicator of gene flow between population groupings].

Таблица 4 [Table 4]

Генетическая идентичность (GI) (над диагональю) и генетические расстояния (GD) (под диагональю) между внутривнутрипопуляционными группировками дубовой кружевницы в Краснодарском крае
[Genetic identity (GI) (above the diagonal) and genetic distances (GD) (below the diagonal) between oak lace bug intra-population groupings in Krasnodar Krai]

Внутрипопуляционная группировка [Intra-population grouping]	Краснодарская [Krasnodar]	Тихорецкая [Tikhoretsk]	Крымская [Krymsk]	Сочинская [Sochi]
Краснодарская [Krasnodar]		0,973	0,962	0,942
Тихорецкая [Tikhoretsk]	0,027		0,998	0,981
Крымская [Krymsk]	0,039	0,003		0,984
Сочинская [Sochi]	0,060	0,019	0,016	

Наиболее близкими в генетическом отношении оказались тихорецкая и крымская внутривнутрипопуляционные группировки (генетическая идентичность (GI) = 0,998; генетическое расстояние (GD) = 0,003). Это также демонстрировал и кластерный анализ данных, где эти две выборки отстояли отдельно от других и образовали один кластер (рис. 2). При этом выборки из Краснодара и Сочи в большей степени отличались от других (GI = 0,942; GD = 0,06). Возможно, это связано с большим географическим расстоянием между ними.

Эти данные позволяют предположить, что исследуемые географические выборки насекомых *C. arcuata* представляют собой внутривнутрипопуляционные группировки одной популяции.

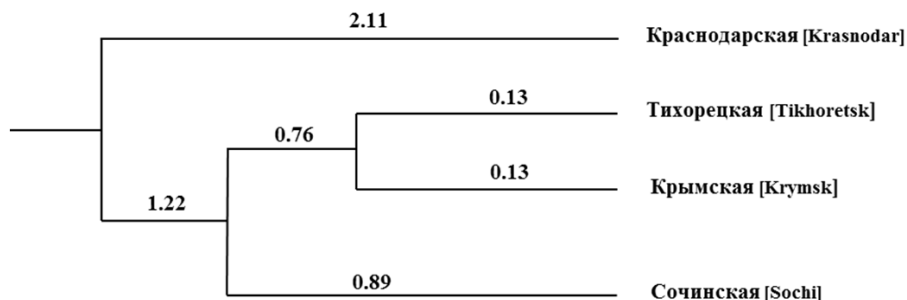


Рис. 2. Дендрограмма генетических расстояний между кластерами внутрипопуляционных группировок *Corythucha arcuata* в Краснодарском крае
[Fig. 2. Dendrogram of genetic distances between clusters of *Corythucha arcuata* intra-population groupings in Krasnodar Krai]

Данный вывод подтверждается также тем, что генетическое разнообразие (по Nei) внутри четырех географических выборок ($H_s = 0,275$) составило 93,2% от общего генетического разнообразия в популяции клопов ($H_t = 0,295$). Это указывает на значительный уровень потока генов между ними, что подтверждают и расчетные данные: уровень генетического потока составил $N_m = 6,98$ (см. табл. 3). Такой уровень потока генов является значительным препятствием для дифференциации внутрипопуляционных группировок и является определяющим фактором, влияющим на генетическую структуру популяции. Относительно низкое значение коэффициента генетической дифференциации ($G_{st} = 0,07$) подтверждает тот факт, что только 6,8% от суммарной генетической изменчивости популяции падает на долю изменчивости между внутрипопуляционными группировками, определяющей дифференциацию между ними [22, 38].

Сходные данные получены нами ранее при анализе другого инвазивного вида клопов из семейства Tingidae – платановой кружевницы *C. ciliata* [39]. Выявлены значительный поток генов между локальными популяциями этого вида в Краснодарском крае ($N_m = 4,56$) и высокая степень генетического сходства между ними ($G_I = 0,909 - 0,948$).

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический анализ географических выборок *C. arcuata* в Краснодарском крае выявил генетическое сходство исследуемых выборок насекомых. Полученные данные свидетельствуют о том, что выборки из локальных популяций дубовой кружевницы Краснодарского края представляют внутрипопуляционные группировки одной популяции *C. arcuata*. В свою очередь, недавняя инвазия дубовой кружевницы требует дальнейшего контроля распространения этого вида на юге России.

Заключение

RAPD-анализ локальных популяций *Corythucha arcuata* в Краснодарском крае выявил высокие уровни ДНК-полиморфизма ($P = 100\%$), генетического

сходства между ними ($GI = 0,942-0,998$) и внутривидового генетического разнообразия ($H = 0,26-0,29$). Показано, что определяющим фактором, влияющим на генетическую структуру популяции, является значительный уровень потока генов между внутривидовыми группировками ($N_m = 6,98$), препятствующий их дифференциации. Большую часть генетической изменчивости составила изменчивость внутри популяционных группировок (93,2%), тогда как на долю изменчивости между ними приходилось 6,8% от общей изменчивости. Установлено, что проанализированные выборки насекомых (краснодарская, тихорецкая, крымская, сочинская) представляют собой внутривидовые группировки из одной популяции кружевницы дубовой.

Литература

1. Froeschner R.C., Miller L.T. *Corythucha melissa*, a new species of lace bug (Heteroptera: Tingidae) from manzanita in California // Entomological News. 2002. Vol. 113, № 2. PP. 94–96.
2. Bernardinelli I., Zandigiacomo P. First record of the oak lace bug *Corythucha arcuata* (Say) (Heteroptera, Tingidae) in Europe // Informatore Fitopatologico. 2000. № 12. PP. 47–49.
3. EPPO, 2019. *Corythucha arcuata* (Crthar). URL: <https://gd.eppo.int/taxon/CRTHAR/distribution> (accessed: 01.06.2021).
4. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза / Утвержден Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 158. URL: <https://legalacts.ru/doc/reshenie-soveta-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-30112016-n-158/> (дата обращения: 1.06.2021).
5. Гниненко Ю.И., Хегай И.В., Васильева У.А. Клоп дубовая кружевница – новый опасный инвадер в лесах России // Карантин растений. Наука и практика. 2017. № 4 (22). С. 9–12.
6. Gninenko Yu.I. Identification of invasive bugs in Russian forests. Pushkino : VNIILM, 2018. 32 p.
7. Гниненко Ю.И., Чернова У.А., Раков А.Г., Гимранов Р.И., Хегай И.В. Методические рекомендации по защите от дубового клопа-кружевницы (для производственной проверки). Пушкино : ВНИИЛМ, 2019. 28 с.
8. Neimorovets V.V., Shchurov V.I., Bondarenko A.S., Skvortsov M.M., Konstantinov F.V. First documented outbreak and new data on the distribution of *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Hemiptera: Tingidae) in Russia // Acta Zoologica Bulgarica. 2017. Suppl. 9. PP. 139–142.
9. Карпун Н.Н., Проценко В.Е., Борисов Б.А., Ширяева Н.В. Обнаружение дубовой кружевницы *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) в субтропической зоне Черноморского побережья Кавказа и прогноз изменения фитосанитарной ситуации в регионе // Евразийский энтомологический журнал. 2018. Т. 17, № 2. С. 113–119. doi: [10.15298/euroasentj.17.2.07](https://doi.org/10.15298/euroasentj.17.2.07)
10. Щуров В.И., Замотайлов А.С., Бондаренко А.С., Щурова А.В., Скворцов М.М., Глушенко Л.С. Кружевница дубовая *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) на Северо-Западном Кавказе: фенология, биология, мониторинг территориальной экспансии и вредоносности // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2019. Вып. 228. С. 58–87. doi: [10.21266/2079-4304.2019.228.58-87](https://doi.org/10.21266/2079-4304.2019.228.58-87)
11. Щуров В.И., Бондаренко А.С., Скворцов М.М., Щурова А.В. Чужеродные насекомые – вредители леса, выявленные на северо-западном Кавказе в 2010–2016 гг., и последствия их неконтролируемого расселения // Известия Санкт-Петербургской

- лесотехнической академии. 2017. Вып. 220. С. 212–228. doi: [10.21266/2079-4304.2017.220.212-228](https://doi.org/10.21266/2079-4304.2017.220.212-228)
12. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Южное межрегиональное управление Россельхознадзора. Перечень карантинных объектов. URL: <http://rsn.krasnodar.ru/otkrytye-dannye/7149/perechen-karantinnyyh-obektov/> (дата обращения: 01.06.2021).
 13. Стрюкова Н.М., Омеляненко Т.З., Голуб В.Б. Дубовая кружевница в Республике Крым // Защита и карантин растений. 2019. № 9. С. 43–44.
 14. Щуров В.И., Замотайлов А.С., Щурова А.В. Особенности сезонного цикла и экологии кружевницы дубовой *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) в природных зонах и высотных поясах Западного Кавказа (Heteroptera: Tingidae) // Материалы международной научной конференции «Биосфера и человек». 24–25 октября 2019 г., г. Майкоп, Республика Адыгея. Майкоп : Электронные издательские технологии, 2019. С. 118–120.
 15. Борисов Б.А., Карпун Н.Н., Бибин А.Р., Грабенко Е.А., Ширяева Н.В., Лянгузов М.Е. Новые данные о трофических связях инвазионного клопа дубовой кружевницы *Corythucha arcuata* (Heteroptera: Tingidae) в Краснодарском крае и Республике Адыгея по результатам исследований в 2018 году // Субтропическое и декоративное садоводство. 2018. № 67. С. 188–203. doi: [10.31360/2225-3068-2018-67-188-203](https://doi.org/10.31360/2225-3068-2018-67-188-203)
 16. Иерусалимов Е.Н. Зоогенная дефолиация и лесное сообщество. М. : Товарищество научных изданий КМК, 2004. 263 с.
 17. Беседина Е.Н., Исмаилов В.Я. Мониторинг развития клопа дубовая кружевница (*Corythucha arcuata* Say) на основе использования теплосодержания атмосферы // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 54. С. 138–157. doi: [10.17223/19988591/54/7](https://doi.org/10.17223/19988591/54/7)
 18. Yang W.Y., Du Y.Z., Yu W.W. The complete mitochondrial genome of the sycamore lace bug *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae) // Gene. 2013. Vol. 27, № 401. PP. 27–40. doi: [10.1016/j.gene.2013.08.087](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.087)
 19. Kocher A., Guilbert É., Lhuillier É., Murienne J. Sequencing of the mitochondrial genome of the avocado lace bug *Pseudacysta perseae* (Heteroptera, Tingidae) using a genome skimming approach // Comptes Rendus Biologies. 2015. Vol. 338, № 3. PP. 149–160. doi: [10.1016/j.crv.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.12.004)
 20. Guilbert E., Damgaard J., D’Haese, C.A. Phylogeny of the lacebugs (Insecta: Heteroptera: Tingidae) using morphological and molecular data // Systematic Entomology. 2014. № 39 (3). PP. 431–441. doi: [10.1111/syen.12045](https://doi.org/10.1111/syen.12045)
 21. Golub N.V., Golub V.B., Kuznetsova V.G.. Further evidence for the variability of the 18S rDNA loci in the family Tingidae (Hemiptera, Heteroptera) // Comparative cytogenetics. 2016. Vol. 10, № 4. PP. 517–528. doi: [10.3897/CompCytogen.v10i4.9631](https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v10i4.9631)
 22. Yang W.Y., Tang X.T., Ju R.T., Zhang Y., Du Y.Z. The population genetic structure of *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) provides insights into its distribution and invasiveness // Scientific Reports. 2017. Vol. 7 (1). PP. 635. doi: [10.1038/s41598-017-00279-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00279-5)
 23. Yang X.M., Sun J.T., Xue X.F., Li J.B., Hong X.Y. Invasion genetics of the western flower thrips in China: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect // PLoS One. 2012. № 7 (4). PP. 34567. doi: [10.1371/journal.pone.0034567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034567)
 24. Asuncion M.S., Yang C.C., Oakey J., Calcaterra L. Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta* // Science. 2011. Vol. 331, № 6020. PP. 1066–1068. doi: [10.1126/science.1198734](https://doi.org/10.1126/science.1198734)
 25. Ciosi M., Miller N.J., Kim K.S., Giordano R., Estoup A., Guillemaud T. Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity // Molecular Ecology. 2008. № 17 (16). PP. 3614–3627. doi: [10.1111/j.1365-294X.2008.03866.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03866.x)

26. Li F., Wang R., Qu C., Fu N., Luo C., Xu Y. Sequencing and characterization of the invasive sycamore lace bug *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae) transcriptome // Plos One. 2016. Vol. 11, № 8. PP. 1–19. doi: [10.1371/journal.pone.0160609](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160609)
27. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acids Research. 1990. Vol. 18. PP. 6531–6535.
28. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucleic Acids Research. 1990. Vol. 18. PP. 7213–7218.
29. Stevens J., Wall R. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in southern England // Bulletin of Entomological Research. 1995. Vol. 85. PP. 549–555. doi: [10.1017/S000748530003305](https://doi.org/10.1017/S000748530003305)
30. Киль В.И. Использование высокоспецифических RAPD-праймеров для ПЦР-анализа популяций вредных и полезных насекомых // Доклады РАХН. 2014. № 6. С. 21–25.
31. Kavar T., Pavlovčič P., Sušnik S., Meglič V., Virant-Doberlet M. Genetic differentiation of geographically separated populations of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) // Bulletin of Entomological Research. 2006. Vol. 96, № 2. PP. 117–128.
32. Kil V.I. Using RAPD PCR method for studying DNA polymorphism of agricultural importance arthropods // Agricultural Research & Technology: Open Access Journal. 2017. Vol. 9 (4). e555769. doi: [10.19080/ARTOAJ.2017.09.555769](https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.09.555769)
33. Киль В.И. Методика оценки ДНК полиморфизма популяций насекомых с помощью ПЦР (RAPD- и ISSR-PCR). Методические рекомендации. Краснодар : Просвещение-Юг, 2009. 16 с.
34. Беседина Е.Н., Киль В.И. Молекулярно-генетический анализ различных видов клопов-кружовниц (Heteroptera: Tingidae) по RAPD-маркерам // Садоводство и виноградарство. 2019. № 6. С. 21–25. doi: [10.31676/0235-2591-2019-6-21-25](https://doi.org/10.31676/0235-2591-2019-6-21-25)
35. Беседина Е.Н., Киль В.И. Высокоспецифические RAPD-праймеры для ПЦР-анализа клопов-кружовниц (Heteroptera: Tingidae) // Материалы международной научной конференции «Биосфера и человек», 24–25 октября 2019 г., г. Майкоп, Республика Адыгея. Майкоп : Электронные издательские технологии, 2019. С. 17–18.
36. Беседина Е.Н., Киль В.И., Карпунин М.Н. Универсальные RAPD- и ISSR-праймеры для ПЦР-анализа клопов-кружовниц (Heteroptera: Tingidae) : Юбилейный сборник научных трудов XIII Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию Донского государственного технического университета (Ростовского-на-Дону института сельхозмашиностроения), в рамках XXIII Агропромышленного форума юга России и выставки «Интерагроماش», «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса», 26–28 февраля 2020 г., г. Ростов-на Дону. Ростов н/Д : ДГТУ-ПРИНТ, 2020. Т. 1. С. 393–396. doi: [10.23947/interagro.2020.1.393-396](https://doi.org/10.23947/interagro.2020.1.393-396)
37. Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H., Mao J.X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. Computer program and documentation. Edmonton : University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999. 29 p.
38. Slatkin M. Gene flow in natural populations // Annual Review of Ecology and Systematics. 1985. Vol. 39. PP. 53–65.
39. Besedina E., Kil V., Ismailov V., Karpunina M. Molecular genetic analysis and phenology of the plane lace bug *Corythucha ciliata* Say (Hemiptera: Tingidae) in different parts of Krasnodar Krai // BIO Web of Conferences 21, 00011 (2020) XI International Scientific and Practical Conference «Biological Plant Protection is the Basis of Agroecosystems Stabilization». doi: [10.1051/bioconf/20202100011](https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100011)

Поступила в редакцию 02.03.2021 г.; повторно 30.06.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.

Авторский коллектив:

Беседина Екатерина Николаевна, канд. биол. наук, с.н.с. сектора биотехнологии, ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (Россия, 350039, г. Краснодар, п/о 39, ВНИИБЗР).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9976-5614>

E-mail: katrina7283@yandex.ru

Киль Владимир Ильич, д-р биол. наук, профессор кафедры геоэкологии и природопользования, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» (Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3762-9019>

E-mail: vlkil@inbox.ru

For citation: Besedina EN, Kil VI. DNA polymorphism and genetic diversity of the oak lace bug (*Corythucha arcuata* Say) population in Krasnodar Krai. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:42-57. doi: 10.17223/19988591/55/3 In Russian, English Summary

Ekaterina N. Besedina¹, Vladimir I. Kil²

¹Federal Scientific Center of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russian Federation

²Kuban State University, Krasnodar, Russian Federation

**DNA polymorphism and genetic diversity of the oak lace bug
(*Corythucha arcuata* Say) population in Krasnodar Krai**

One of the directions of insect population genetics is the study of the variability of the genetic structure of populations, which includes the assessment of genetic diversity, DNA polymorphism and genetic similarity of the studied objects. This makes it possible to judge the flow of genes, i.e. exchange of genetic material within a population or between populations, and determine the degree of their genetic differentiation, i.e. they represent different populations or one population, and in this case, they are intra-population groupings. The aim of this work was to study the molecular genetic structure of local populations of the oak lace bug *C. arcuata* in Krasnodar Krai using RAPD markers to assess their genetic similarity.

We carried out the studies in the territories of the invasive distribution of the oak lace bug in Krasnodar Krai in 2020. The object of the research was a sample of insects (n = 20) from the areas of oak lace bug in the forest park zones of Krasnodar, Tikhoretsk, Krymsk and Sochi. The total number of samples examined was 240. We collected *C. arcuata* bugs on model trees of English oak (*Quercus robur* L.). The selection of trees was 10 oak trees from each locality. Isolation of DNA from whole insects (adults), amplification RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) and electrophoresis were carried out according to the method we had developed earlier (Kil, 2009). Amplification was performed in 25 µl reaction mix containing 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 3.0 mM MgCl₂; 50 µM of each dNTP; 0.8 µM primer; 0.5 U Taq polymerase and 20 ng DNA. We evaluated DNA polymorphism of the studied samples from the population of bugs using three primers highly specific for the DNA of the oak lace bug: OPA07, OPA09, OPA18 (See Fig. 1 and Table 1). We assessed genetic diversity and genetic similarity using the Nei and Shannon information indices with the help of POPGENE computer program (version 1.31) (Yeh et al., 1999). The statistical significance of the differences between the mean values for the sample was determined by the Student's *t*-test (*p* < 0.05).

Molecular genetic analysis of *C. arcuata* revealed high levels of DNA polymorphism and genetic diversity in the oak lace bug population and the absence of significant

differences between the samples for these parameters (See Table 2). The studies have shown that the closest in genetic terms are the samples from Tikhoretsk and Krymsk (genetic identity (GI) = 0.998; genetic distance (GD) = 0.003), and the most genetically distant from others are the Krasnodar and Sochi intra-population groupings (GI = 0.942; GD = 0.06) (See Table 4). This was also demonstrated by the cluster analysis of data (See Fig. 2). Genetic diversity, estimated by Nei index, within four geographic samples ($H_s = 0.275$) was 93.2% of the total genetic diversity in the lace bug population ($H_t = 0.295$) (See Table 3). This indicates a significant level of gene flow between intra-population groupings ($N_m = 6.98$), which prevents their differentiation. The low value of the coefficient of genetic differentiation ($G_{st} = 0.07$) indicates that only 6.8% of the total genetic variability of the population is accounted for by the variability between intra-population groupings. Based on this, we can conclude that the analyzed insect samples represent intra-population groupings from one population of oak lace bugs, *C. arcuata*.

The paper contains 2 Figures, 4 Tables and 39 References.

Key words: *Corythucha arcuata*; insects; PCR; RAPD analysis; genetic variability; intra-population groupings

Abbreviations: GI - Genetic Identity; GD - Genetic Distances.

Funding: The reported study was funded by the Russian Foundation for Basic Research and the Administration of Krasnodar Krai (Scientific Project No. 19-44-233009 r_mol_a) and within the framework of the State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Research Work Topic No. 0686-2019-0012).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Froeschner RC, Miller LT. *Corythucha melissa*, a new species of lace bug (Heteroptera: Tingidae) from manzanita in California. *Entomological News*. 2002;113(2):94-96.
2. Bernardinelli I, Zandigiacomo P. First record of the oak lace bug *Corythucha arcuata* (Say) (Heteroptera, Tingidae) in Europe. *Informatore Fitopatologico*. 2000;12:47-49.
3. EPPO, 2019. *Corythucha arcuata* (Crthar). [Electronic resource]. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/CRTHAR/distribution> (accessed: 01.02.2021).
4. *Edinyy perechen' karantinnykh ob'ektov Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza. Utverzhden Resheniem Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 30 noyabrya 2016. № 158* [Unified list of quarantine facilities of the Eurasian Economic Union] [Electronic resource]. Available at: <https://legalacts.ru/doc/reshenie-soveta-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-30112016-n-158/> (accessed: 01.06.2021). In Russian
5. Gninenko YuI, Khegay IV, Vasil'yeva UA. Klop dubovaya kruzhevitsa - novyy opasnyy invayder v lesakh Rossii [Oak lace bug - new dangerous invader in the forests of Russia]. *Karantin rasteniy. Nauka i praktika*. 2017;4(22):9-12. In Russian
6. Gninenko YuI. Identification of invasive bugs in Russian forests. Pushkino: VNIILM Publ.; 2018. 32 p. [Electronic resource]. Available at: <http://www.vniilm.ru/docs/pdf/izdaniya/posobie-po-klopam.pdf> (accessed: 01.06.2021). In Russian
7. Gninenko YuI, Chernova UA, Rakov AG, Gimranov RI, Khegay IV. Metodicheskie rekomendatsii po zashchite ot dubovogo klopa-kruzhevitsy (dlya proizvodstvennoy proverki) [Guidelines for protection against the oak lace bug (for production check)]. Pushkino: VNIILM Publ.; 2019. 28 p. In Russian
8. Neimorovets VV, Shchurov VI, Bondarenko AS, Skvortsov MM, Konstantinov FV. First documented outbreak and new data on the distribution of *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Hemiptera: Tingidae) in Russia. *Acta Zoologica Bulgarica*. 2017;9:139-142.

9. Karpun NN, Protsenko VE, Borisov BA, Shiryayeva NV. A new record of the oak lace bug, *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae), in subtropical zone of Black Sea coast of the Caucasus with forecast of phytosanitary situation change in the region. *Evroziatskii Entomologicheskii Zhurnal*. 2018;17(2):113-119. doi: [10.15298/euroasentj.17.2.07](https://doi.org/10.15298/euroasentj.17.2.07) In Russian, English Summary
10. Shchurov VI, Zamotajlov AS, Bondarenko AS, Shchurova AV, Skvortsov MM, Glushchenko LS. The oak lace bug *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) in the Northwestern Caucasus: phenology, biology, monitoring of the territorial expansion and harmfulness. *Izvestia Sankt-Peterburgskoy lesotekhnicheskoy akademii*. 2019;228:58-87. doi: [10.21266/2079-4304.2019.228.58-87](https://doi.org/10.21266/2079-4304.2019.228.58-87) In Russian, English Summary
11. Shchurov VI, Bondarenko AS, Skvortsov MM, Shchurova AV. Alien forest insect pests revealed in the Northwest Caucasus in 2010-2016 and consequences of their uncontrolled dispersal. *Izvestia Sankt-Peterburgskoy lesotekhnicheskoy akademii*. 2017;220:212-228. doi: [10.21266/2079-4304.2017.220.212-228](https://doi.org/10.21266/2079-4304.2017.220.212-228) In Russian, English Summary
12. *Ministerstvo sel'skogo khozyaystva Rossiyskoy Federatsii, Yuzhnoe mezhhregional'noe Upravlenie Rossel'khoz nadzora. Perechen 'karantinnykh ob'ektov* [Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Southern Interregional Directorate of Rossselkhoz nadzor. List of quarantine objects]. [Electronic resource]. Available at: <http://rsn.krasnodar.ru/otkrytye-dannye/7149/perechen-karantinnykh-obektov/> (accessed: 01.06.2021).
13. Stryukova NM, Omelyanenko TZ, Golub VB. *Corythucha arcuata* in the Republic of Crimea. *Plant Protection and Quarantine*. 2019;9:43-44. In Russian, English Summary
14. Shchurov VI, Zamotajlov AS, Shchurova AV. Osobennosti sezonnogo tsikla i ekologii kruzhevniitsy dubovoy *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) v prirodnykh zonakh i vysoznykh poiyasakh Zapadnogo Kavkaza (Heteroptera: Tingidae) [Features of the seasonal cycle and ecology of the oak lace bug *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) in natural zones and high-altitude zones of the Western Caucasus (Heteroptera: Tingidae)]. In: *Biosfera i chelovek. Materialy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii* [Biosphere and Man. Proc. of the Int. Sci. Conf. (Maykop, Adygeya Republic, Russia, 24-25 October 2019)]. Shakhanova AV, editor. Maykop: OOO "Elektronnye izdatel'skie tekhnologii" Publ.; 2019. pp. 118-120. In Russian
15. Borisov BA, Karpun NN, Bibin AR, Grabenko EA, Shiryayeva NV, Lyanguzov ME. New data on trophic relations of the invasive oak lace bug *Corythucha arcuata* (Heteroptera: Tingidae) in the Krasnodar region and in the republic of Adygea based on the research findings for the year 2018. *Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2018;67:188-203. doi: [10.31360/2225-3068-2018-67-188-203](https://doi.org/10.31360/2225-3068-2018-67-188-203) In Russian, English Summary
16. Ierusalimov EN. Zoogennaya defoliatsiya i lesnoe soobshchestvo [Zoogenic defoliation and forest community]. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ.; 2004. 263 p. In Russian
17. Besedina EN, Ismailov VYa. Monitoring the development of the oak lace bug (*Corythucha arcuata* Say) based on the use of atmospheric heat content. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;54:138-157. doi: [10.17223/19988591/54/7](https://doi.org/10.17223/19988591/54/7) In Russian, English Summary
18. Yang WY, Du YZ, Yu WW. The complete mitochondrial genome of the sycamore lace bug *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). *Gene*. 2013;27(401):27-40. doi: [10.1016/j.gene.2013.08.087](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.087)
19. Kocher A, Guilbert É, Lhuillier É, Murienn J. Sequencing of the mitochondrial genome of the avocado lace bug *Pseudocysta perseae* (Heteroptera, Tingidae) using a genome skimming approach. *Comptes Rendus Biologies*. 2015;338(3):149-160. doi: [10.1016/j.crv.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.12.004)
20. Guilbert E, Damgaard J, D'Haese CA. Phylogeny of the lacebugs (Insecta: Heteroptera: Tingidae) using morphological and molecular data. *Systematic Entomology*. 2014;39(3):431-441. doi: [10.1111/syen.12045](https://doi.org/10.1111/syen.12045)

21. Golub NV, Golub VB, Kuznetsova VG. Further evidence for the variability of the 18S rDNA loci in the family Tingidae (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative cytogenetics*. 2016;10(4):517-528. doi: [10.3897/CompCytogen.v10i4.9631](https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v10i4.9631)
22. Yang WY, Tang XT, Ju RT, Zhang Y, Du YZ. The population genetic structure of *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) provides insights into its distribution and invasiveness. *Scientific Reports*. 2017;7(1):635. doi: [10.1038/s41598-017-00279-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00279-5)
23. Yang XM, Sun JT, Xue XF, Li JB, Hong XY. Invasion genetics of the western flower thrips in China: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. *PLoS One*. 2012;7(4):34567. doi: [10.1371/journal.pone.0034567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034567)
24. Ascunce MS, Yang CC, Oakey J, Calcaterra L. Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Science*. 2011;331(6020):1066-1068. doi: [10.1126/science.1198734](https://doi.org/10.1126/science.1198734)
25. Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, Giordano R, Estoup A, Guillemaud T. Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology*. 2008;17(16):3614-3627. doi: [10.1111/j.1365-294X.2008.03866.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03866.x)
26. Li F, Wang R, Qu C, Fu N, Luo C, Xu Y. Sequencing and characterization of the invasive sycamore lace bug *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae) transcriptome. *Plos One*. 2016;11(8):1-19. doi: [10.1371/journal.pone.0160609](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160609)
27. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:6531-6535.
28. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:7213-7218.
29. Stevens J, Wall R. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in southern England. *Bulletin of Entomological Research*. 1995;85:549-555. doi: [10.1017/S000748530003305](https://doi.org/10.1017/S000748530003305)
30. Kil VI. Usage of high specific RAPD primers for PCR analysis of harmful and benefit insect populations. *Doklady Rossiyskoy Akademii Sel'sk Khozyaystvennyh Nauk*. 2014;6:21-25. In Russian
31. Kavar T, Pavlovčič P, Sušnik S, Meglič V, Virant-Doberlet M. Genetic differentiation of geographically separated populations of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research*. 2006;96(2):117-128.
32. Kil VI. Using RAPD PCR method for studying DNA polymorphism of agricultural importance arthropods. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*. 2017;9(4):555769. doi: [10.19080/ARTOAJ.2017.09.555769](https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.09.555769)
33. Kil VI. Metodika otsenki DNK polimorfizma populyatsiy nasekomykh s pomoshch'yu PTsR (RAPD- i ISSR-PCR). Metodicheskie rekomendatsii [Methods for assessing DNA polymorphism of insect populations by PCR (RAPD- and ISSR-PCR). Methodical recommendations]. Krasnodar: OOO «Prosveshchenie-Yug» Publ.; 2009. 16 p. In Russian
34. Besedina EN, Kil VI. Molecular-genetic analysis of different species of lace bugs (Heteroptera: Tingidae) with RAPD markers. *Sadovodstvo i vinogradarstvo = Horticulture and viticulture*. 2019;6:21-25. doi: [10.31676/0235-2591-2019-6-21-25](https://doi.org/10.31676/0235-2591-2019-6-21-25) In Russian, English Summary
35. Besedina EN, Kil VI, Karpunin MN. Vysokospetsificheskie RAPD-praymery dlya PTsR-analiza klopov-kruzhevnits (Heteroptera: Tingidae) [Highly specific RAPD primers for PCR analysis of lace oak bugs (Heteroptera: Tingidae)]. In: *Biosfera i chelovek*. Materialy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii [Biosphere and Man. Proc. of the Int. Sci. Conf. (Maykop, Adygeya Republic, Russia, 24-25 October 2019)]. Shakhanova AV, editor. Maykop: OOO "Elektronnye izdatel'skie tekhnologii" Publ.; 2019. pp. 17-18. In Russian

36. Besedina EN, Kil VI. Universal RAPD and ISSR primers for lace bugs PCR analysis (Heteroptera: Tingidae). In: *Sostoyanie i perspektivy razvitiya agropromyshlennogo kompleksa*. Yubileyny sbornik nauchnykh trudov XIII Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 90-letiyu Donskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta (Rostovskogo-na-Donu instituta sel'khoz mashinostroyeniya), v ramkakh XXIII Agropromyshlennogo foruma yuga Rossii i vystavki "Interagromash" [State and prospects for the development of the agro-industrial complex. Proc. of the Int. Sci. Conf. (Rostov-on-Don, 26-28 February 2020)]. Lachuga YuF, Meskhi BCh, Matishov GG, Chikindas ML, Rudoy DV, Pakhomov VI, Ol'shevskaya AV, Ponomareva YEN and Doroshenko AA, editors. Rostov-on-Don: OOO "DGTU-PRINT" Publ.; 2020. Vol. 1. pp. 393-396. doi: [10.23947/interagro.2020.1.393-396](https://doi.org/10.23947/interagro.2020.1.393-396) In Russian
37. Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. Computer program and documentation. Edmonton: University of Alberta and Centre for International Forestry Research; 1999. 29 p.
38. Slatkin M. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1985;39:53-65.
39. Besedina E, Kil V, Ismailov V, Karpunina M. Molecular genetic analysis and phenology of the plane lace bug *Corythucha ciliata* Say (Hemiptera: Tingidae) in different parts of Krasnodar Krai. *BIO Web of Conferences*. XI International Scientific and Practical Conference "Biological Plant Protection is the Basis of Agroecosystems Stabilization". 2020;21:e00011. doi: [10.1051/bioconf/20202100011](https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100011)

*Received 02 March 2021; Revised 30 June 2021;
Accepted 27 July 2021; Published 29 September 2021.*

Author info:

Besedina Ekaterina N, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Sector of Biotechnology, FSBSI "Federal Scientific Center of Biological Plant Protection", p/o 39, Krasnodar 350039, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9976-5614>

E-mail: katrina7283@yandex.ru

Kil Vladimir I, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Geoecology and Environmental Management, FSBEI HE "Kuban State University", 149 Stavropolskaya Str., Krasnodar 350039, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3762-9019>

E-mail: vlkil@inbox.ru

УДК 574.21

doi: 10.17223/19988591/55/4

Э.А. Снегин¹, А.С. Бархатов¹, В.В. Киселев²,
С.Р. Юсупов¹, Е.А. Снегина¹

¹ Научно-исследовательский центр геномной селекции
Белгородского государственного национального
исследовательского университета, г. Белгород, Россия

² Институт наук о Земле Белгородского государственного национального
исследовательского университета, г. Белгород, Россия

Оценка степени повреждения геномной ДНК популяций озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) Белгородской агломерации методом ДНК-комет

Методом гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) оценен уровень повреждения ДНК в популяциях озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), обитающих в г. Белгороде и его окрестностях в пунктах с различным уровнем антропогенного пресса. Согласно полученным данным, во всех исследуемых популяциях среднее значение индекса ДНК-комет (DDI) не превысило первого порога деградации. Тем не менее рассчитанные значения DDI позволили выстроить градационную шкалу уровня разрушения ДНК в исследуемых группах лягушек, где значения DDI в наиболее загрязненных районах (от $0,416 \pm 0,031$ до $0,521 \pm 0,098$) превосходили относительно чистые территории ($0,057 \pm 0,011$). Отмечено, что в пунктах, в которых обитают особи с высокими значениями DDI, присутствует высокая концентрация нитритов, значительно превышающих предельно допустимые концентрации.

Ключевые слова: *Pelophylax ridibundus*; урбанизированная территория; генотоксичные поллютанты; метод ДНК-комет; биоиндикатор

Сокращения [Abbreviations]: DDI – индекс ДНК-комет [DDI - DNA damage index (comet assay)]; ПДК – предельно допустимая концентрация [Maximum permissible concentration].

Для цитирования: Снегин Э.А., Бархатов А.С., Киселев В.В., Юсупов С.Р., Снегина Е.А. Оценка степени повреждения геномной ДНК популяций озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) Белгородской агломерации методом ДНК-комет // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 58–76. doi: 10.17223/19988591/55/4

Введение

Антропогенное загрязнение водных объектов – серьезная проблема устойчивости водных экосистем [1]. Основные источники загрязнения водных объектов – сточные воды, смывы сельскохозяйственных удобрений,

пестицидов и автомобильных дорог [2]. Загрязнители, внесенные в водные экосистемы, приводят к геохимическим изменениям, что, в свою очередь, снижает качество физико-химических параметров водных объектов [3]. Многие из поллютантов, обладая высокой устойчивостью, представлены опасными мутагенами и канцерогенами. Вызванные ими нарушения в структуре и свойствах ДНК и РНК организмов могут иметь отдаленные последствия и сказываться на жизнедеятельности последующих поколений [4, 5].

Для объективной и качественной оценки воздействия генотоксичных поллютантов используются различные виды-биоиндикаторы. Наиболее информативными среди них являются гидробионты, так как водные объекты в первую очередь подвергаются воздействию широкого спектра загрязнителей окружающей среды [6, 7]. Бесхвостые земноводные, являясь связующим звеном в пищевых цепях, охватывающих водные и наземные сообщества, выступают в качестве важного компонента биоты водно-болотных угодий [8]. Тонкая и проницаемая кожа, а также жаберное дыхание на личиночной стадии позволяют этой группе животных активно накапливать поллютанты в организме [9].

В научной литературе описан ряд методов оценки степени повреждения ДНК: анализ хромосомных aberrаций [10], обмен сестринских хроматид [11], щелочная элюция [12], анализ микроядер [13] и др. Однако в последние годы наиболее востребованным для этих целей является метод ДНК-комет (Comet assay), который позволяет оценивать повреждения генетического материала в результате действия большого спектра мутагенов [14–16]. Преимуществами метода являются его доступность и способность обнаруживать начальные и неспецифические повреждения ДНК в различных тканях. При этом повреждения ядерных нуклеиновых кислот просматриваются на уровне отдельных клеток, что делает его пригодным для большинства типов эукариотических организмов. Кроме того, метод обладает высокой чувствительностью, что позволяет обнаруживать реакции организмов на самых ранних этапах воздействия генотоксикантов [17]. Гель-электрофорез изолированных клеток¹ применяют в различных областях исследований, главным образом, при оценке безопасности химических веществ и лекарственных средств, для выявления степени эффективности репарации ДНК, а также в биомониторинге природных популяций [18]. Данный метод позволяет обнаружить разрывы цепей ДНК, которые при проведении гель-электрофореза образуют так называемые хвосты, или «кометы». При этом размер наблюдаемого хвоста указывает на степень повреждения ДНК [19].

В проведенном нами ранее предварительном исследовании с помощью метода ДНК-комет выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение индекса ДНК-комет в одной популяции озерной лягушки, обитающей в условиях антропогенного загрязнения [20]. В дальнейшем эти исследования продолжены.

¹ Гель-электрофорез изолированных клеток является синонимом метода ДНК-комет. [The Comet Assay also called single cell gel electrophoresis].

Цель данной работы – оценить с помощью метода ДНК-комет уровень повреждения ДНК в популяциях *P. ridibundus*, обитающих в г. Белгороде и его окрестностях.

Материалы и методики исследования

Объект исследования – озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). Данный вид адаптирован к жизни в условиях антропогенного влияния и активно заселяет трансформированные биотопы [8]. Отбор животных проведен в 6 точках г. Белгорода и его окрестностей (рис. 1, табл. 1). При описании биотопов использована классификационная схема, предложенная В.Л. Вершининым [21].

Все работы с подопытными животными в исследовании проведены в соответствии с международными этическими стандартами [22]. Из каждой точки исследования отобрано по 5 половозрелых особей, что составляло небольшую часть популяции. Животных перед вскрытием наркотизировали диэтиловым эфиром. Ввиду высокой чувствительности метода для предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов анализ проводили в день сбора. В качестве материала для исследования использовали печень животного: данный орган обладает высокой чувствительностью к действию генотоксикантов и является основным местом биотрансформации ксенобиотиков [23].

Таблица 1 [Table 1]

Пункты сбора [Collection sites]

No	Название пункта [Collection site]	Описание биотопа [Description of the biotope]	Координаты [Coordinates]
1	Северский Донец [Seversky Donets]	р. Северский Донец, г. Белгород. Промышленная застройка [Seversky Donets river, Belgorod. Industrial buildings]	50°35'31.5"N 36°36'35.6"E
2	Оскочное [Oskochnoe]	Пруд Оскочное, г. Белгород. Малоэтажная застройка [Oskochnoye pond, Belgorod. Low-rise development]	50°38'52.1"N 36°33'29.6"E
3	Ячевский [Yachnevskiy]	Пруд Ячевский, г. Белгород. Малоэтажная застройка [Yachnevskiy pond, Belgorod. Low-rise development]	50°38'23.1"N 36°34'48.2"E
4	Севрюково [Sevrukovo]	р. Разумная, Белгородский район. Окрестность с. Севрюково. Зеленая зона [Razumnaya river, Belgorod municipal district. The vicinity of Sevrukovo village. Green area]	50°36'55.3"N 36°46'21.9"E
5	Разумное [Razumnoe]	Устье р. Разумная, г. Белгород. Малоэтажная застройка [Razumnaya river mouth, Belgorod. Low-rise development]	50°31'51.8"N 36°38'57.5"E
6	Везелка [Vezelka]	р. Везелка, г. Белгород. Многоэтажная застройка [Vezelka river, Belgorod. High-rise development]	50°35'36.8"N 36°34'09.1"E

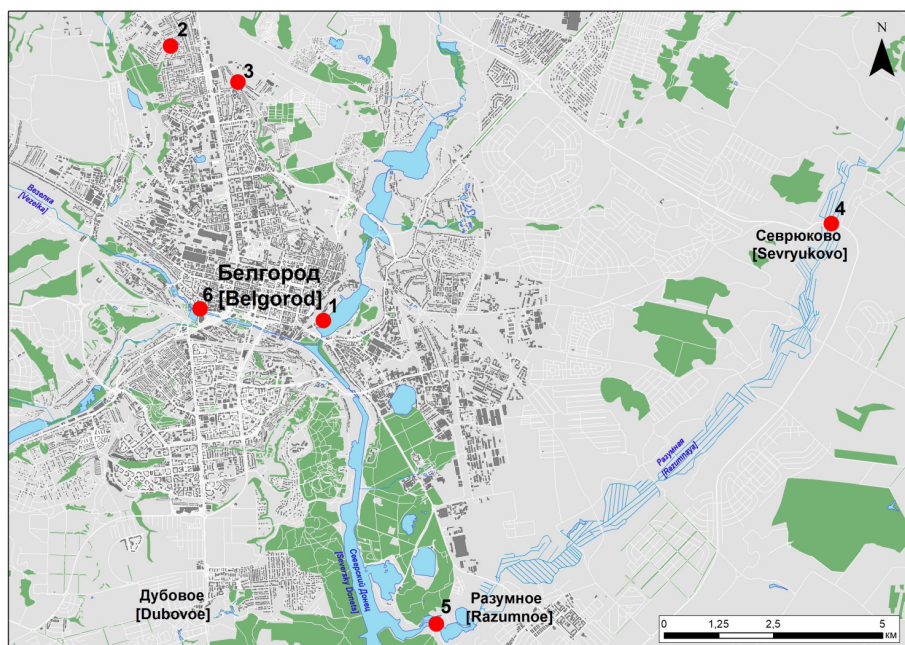


Рис. 1. Пункты сбора *Pelophylax ridibundus*: 1 – Северский Донец; 2 – Оскочное; 3 – Ячевевский; 4 – Севрюково; 5 – Разумное; 6 – Везелка

[Fig. 1. Collection sites *Pelophylax ridibundus*: 1 - Seversky Donets; 2 - Oskochnoe; 3 - Yachnevskiy; 4 - Sevrjukovo; 5 - Razumnoe; 6 - Vezelka]

По завершении эвтаназии животного незамедлительно проводили вскрытие и выделение анализируемого органа. Ткань (150–200 мг) гомогенизировали на льду, затем переносили в пробирки с 2 мл свежеприготовленного охлажденного до +4 °С фосфатно-солевого буфера (pH 7,5), содержащего 20 mM динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA-Na₂) и 10% диметилсульфоксид (ДМСО), дважды отмывали от клеток крови и растирали стеклянной палочкой в свежем буфере. Для осаждения крупных фрагментов ткани пробирки выдерживали 5 мин при комнатной температуре, после чего переносили 1,5 мл верхнего слоя в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали в микроцентрифуге 5415 R («Eppendorf», Германия) при 1000 g в течение 10 мин при +4 °С. Супернатант удаляли, осадок клеток разводили в 1 мл охлажденного до +4 °С фосфатного солевого буфера. Для получения микропрепаратов 60 мкл клеточной суспензии смешивали с 240 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы (T_{пл} < 42 °С) в фосфатно-солевом буфере. Затем в центральную часть предметного стекла с тонким слоем агарозы наносили 60 мкл агарозного геля с клеточной суспензией и накрывали покровным стеклом, не допуская образования пузырей. Предметные стекла охлаждали 10 мин, после чего аккуратно снимали покровные стекла. Последующие операции проводили в затемненном помещении. Стекла зали-

вали охлажденным до +4 °С лизирующим раствором, содержащим 10 мМ трис-HCl (pH 10), 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na₂ и 1% Тритон X-100 с 10% ДМСО, который добавляли непосредственно перед использованием. Лизис проводили не менее 1 ч. По окончании лизиса проводили электрофорез в трис-ЭДТА-боратном электродном буфере (ТБЕ) в течение 20 мин с напряжением из расчета 1 В/см. По окончании электрофореза препараты фиксировали 70% этанолом в течение 15 мин [23, 24].

Для окрашивания препаратов использовали водный раствор красителя SYBR Green I в соотношении 1:10 000. Окрашенные препараты анализировали на люминесцентном тринокулярном микроскопе МИКМЕД-2 АО («Ломо», Россия).

Полученные изображения анализировали в программном обеспечении CometScore V. 2.0. На каждом препарате анализировали не менее 100 клеточных ядер, которые подразделяли на 5 типов в зависимости от степени разрушения ДНК: 0 – без повреждения (<5%); 1 – незначительное повреждение (5–20%), 2 – умеренное повреждение (20–40%); 3 – высокое повреждение (40–80%); 4 – максимальное повреждение (>80%). Отдельно учитывали клетки, находящиеся в состоянии апоптоза. Степень поврежденности ДНК оценивали с использованием критерия Краскела–Уоллиса, который в данной методике называется «индекс ДНК-комет» (DDI), по формуле [24, 25]

$$DDI = \frac{(0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)}{\Sigma},$$

где $n_0 - n_4$ – число «ДНК-комет» каждого типа [The number of “DNA comets” of each type]; Σ – сумма подсчитанных клеток [Total of cells counted].

Для расчета значений DDI, средних показателей DDI и их погрешностей, статистической обработки данных использовали MS Excel 2010. Данные DDI представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок ($M \pm m_M$). Для определения статистической значимости различий изучаемых популяций использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Для оценки состояния естественных сообществ в различных ландшафтах необходимо осуществлять мониторинг населяющих их популяций. Особенно это касается видов биоиндикаторов антропогенного воздействия, которыми себя хорошо зарекомендовали бесхвостые земноводные.

Полученные в результате исследования данные представлены в табл. 2–4. В изучаемых популяциях отмечены ядра с различным уровнем повреждения ДНК (рис. 2, 3). Наибольшее значение DDI отмечено в пункте «Разумное», а наименьшее – в пункте «Севрюково». Стоит отметить, что в пункте «Разумное» наши предыдущие исследования выявили уровень $DDI = 0,141 \pm 0,021$

[20]. Столь низкие значения, вероятно, связаны с методической ошибкой, так как в предыдущей работе в данном пункте проанализированы половозрелые животные (сеголетки). В настоящем исследовании эта ошибка устранена и для анализа использованы только половозрелые особи. Эти данные подтверждают выводы, согласно которым с возрастом в теле животных наблюдается увеличение концентрации токсичных веществ, что сопровождается изменениями в структуре функционирования клеток и разрушением ядерной ДНК [26].

Таблица 2 [Table 2]

Средние значения DDI в исследуемых пунктах
[Mean values of DNA damage index (comet assay) at the studied sites] ($M \pm m_M$)

Пункт [Site]	Северский Донец [Seversky Donets]	Оскочное [Oscho- chnoe]	Ячев- ский [Yach- nevskiy]	Севрю- ково [Sevr- kovo]	Ра-зумное [Razum- noe]	Везелка [Vezel- ka]
DDI	0,454 $\pm 0,049$	0,472 $\pm 0,061$	0,186 $\pm 0,038$	0,057 $\pm 0,011$	0,521 $\pm 0,098$	0,416 $\pm 0,031$
N	512	520	506	585	521	523
Na	7	4	—	—	9	6

Примечание. DDI – индекс ДНК комет, N – количество проанализированных клеток; Na – количество клеток в состоянии апоптоза.

[Note. DDI - DNA damage index (comet assay); N - Number of cells analysed; Na - Number of cells in the state of apoptosis].

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил статистически значимые отличия ($p < 0,05$) изученных групп по индексу ДНК-комет (см. табл. 3).

Таблица 3 [Table 3]

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) значений DDI
[Results of one-way analysis of variance (ANOVA) of DNA damage index values]

Источник вариации [Source of variation]	SS	df	MS	F	p	F-критическое [F-critical]
Между группами [Between groups]	0,865	5	0,173	9,876	< 0,001	2,621
Внутри групп [Within groups]	0,421	24	0,017			

Примечание. SS – сумма квадратов отклонений; df – степень свободы; MS – дисперсия; F – критерий Фишера; p – уровень значимости; F-критическое – стандартное значение критерия Фишера при $p = 0,05$.

[Note. SS - Sum of squares; df - Degrees of freedom; MS - Mean square; F - Fisher criterion; p - significance level; F-critical - Standard value of Fisher's criterion at $p = 0.05$].

В табл. 4 представлены попарные сравнения средних значений DDI исследуемых популяций с помощью критерия Фишера.

Таблица 4 [Table 4]

Попарные сравнения средних значений DDI исследуемых популяций
[Pairwise comparisons of the mean DNA comet assay values of the populations studied]

Название пункта [Site]	Северский Донец [Seversky Donets]	Оскочное [Oskochnoe]	Ячневский [Yachnevskiy]	Севрюково [Sevrukovo]	Разумное [Razumnoe]	Везелка [Vezelka]
Северский Донец [Seversky Donets]						
Оскочное [Oskochnoe]	0,125					
Ячневский [Yachnevskiy]	14,609*	15,884*				
Севрюково [Sevrukovo]	47,332*	45,642*	10,555*			
Разумное [Razumnoe]	0,503	0,198	9,964*	21,688*		
Везелка [Vezelka]	0,147	0,611	21,115*	120,076*	1,011	

*Примечание.** – статистически значимые различия ($p < 0,05$).

[Note. *The differences are significant ($p < 0.05$)].

Согласно полученным данным, во всех исследуемых популяциях средние значения DDI не превышают первого уровня разрушения. Это может свидетельствовать, с одной стороны, об отсутствии здесь больших концентраций генотоксичных поллютантов (что весьма сомнительно), а с другой – об эффективной работе репаративной системы озерных лягушек. Тем не менее рассчитанные значения DDI позволили выстроить градиционную шкалу уровня разрушения ДНК в исследуемых группах лягушек в зависимости от степени загрязнения и близости жилых и промышленных построек. Примечательно, что все исследуемые пункты по среднему значению DDI статистически значимо ($p < 0,05$) превзошли наименее загрязненный участок «Севрюково», который находится в зеленой зоне и на значительном удалении от урбанизированных территорий.

Известно, что генотоксичным воздействием обладают различные химические соединения, которые образуются при промышленном производстве [27]. К ним относят ряд полициклических ароматических углеводородов, тяжелые металлы, а также оксиды серы, углерода и азота [28–30]. Ввиду отсутствия у авторов возможности проведения химического анализа воды для выявления концентрации генотоксичных загрязнителей (в частности, соединений азота), мы проанализировали данные по загрязнению поверхностных вод в некоторых исследуемых пунктах из открытых литературных источников [31–35]. В результате анализа литературных данных гидрохимического мониторинга нами установлена степень азотного загрязнения рек Северский Донец, Везелка и Разумная в пределах Белгородского района.

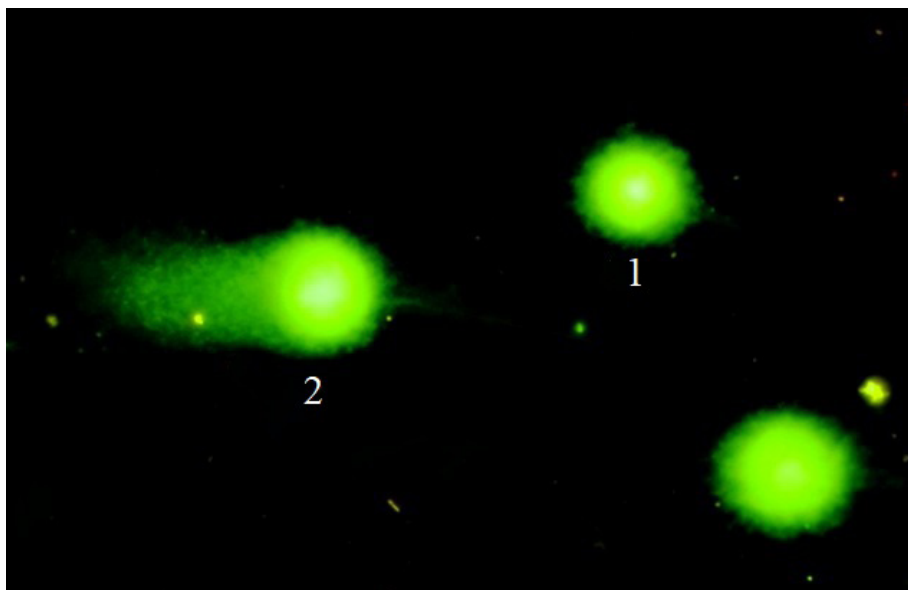


Рис. 2. Клетки с различной степенью повреждения ДНК:

1 – неразрушенное ядро; 2 – вторая стадия разрушения. Автор фото Э.А. Снегин

[Fig. 2. Cells with varying degrees of DNA damage:

1 - Cells with no DNA fragmentation - Undestroyed nucleus.

2 - The second stage of destruction of the nucleus. Photo by Eduard A Snegin]

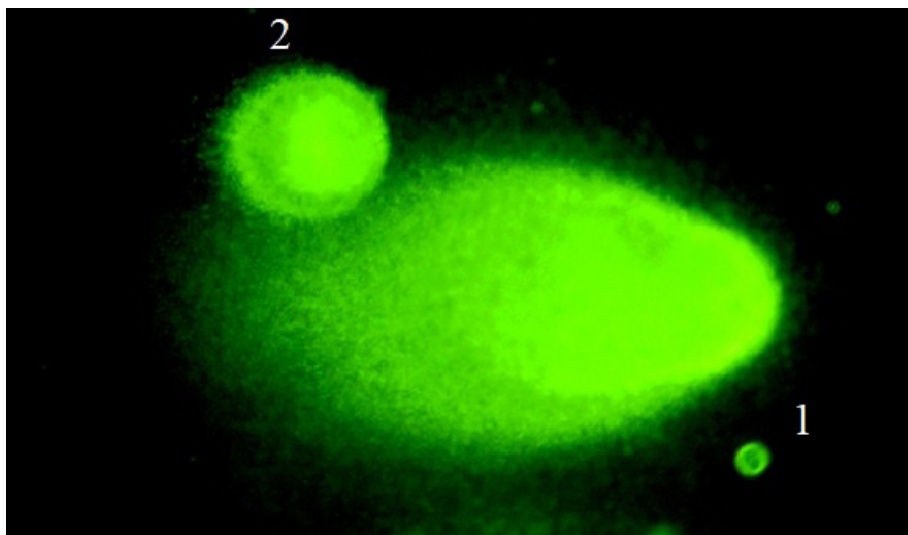


Рис. 3. Ядро клетки в состоянии апоптоза: 1 – ядро клетки

в состоянии апоптоза; 2 – неразрушенное ядро. Автор фото А.С. Бархатов

[Fig. 3. Cell nucleus in a state of apoptosis.

1 - Cell nucleus in the state of apoptosis; 2. Cells with no DNA fragmentation -

Undestroyed nucleus. Photo by Anatoliy S Barkhatov]

Так, например, в промышленном районе города (пункт «Северский Донец») обнаружено высокое значение DDI – 0,454, при этом содержание нитратов (NO_3^-) составляет в среднем 1,61 мг/л, что не превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК – 40 мг/л). Однако содержание нитритов (NO_2^-) колебалось от 0,654 до 0,695 мг/л, что превысило ПДК (0,08 мг/л) в 8 раз. Следует отметить, что в данной реке в северной части Белгородского района за последние 8–10 лет наблюдается рост содержания нитратов (NO_3^-) и суммы общего азота на 50–60%, что связано с активным развитием животноводческой отрасли в верховьях реки.

В пункте «Везелка», где значение DDI одно из самых высоких (0,416), в одноименной реке наблюдалось варьирование концентрации нитритов (NO_2^-) от 0,483 до 1,583 мг/л, что практически в 20 раз превышает значение ПДК. При этом содержание нитратов (NO_3^-) ПДК не превысило (значения варьировали от 1,144 до 6,349 мг/л).

Наибольшее значение DDI зафиксировано в устье р. Разумная (пункт «Разумное») (DDI = 0,521). По данным литературы, в этой точке, также и в реках Северский Донец и Везелка, наблюдаются систематические превышения ПДК по содержанию нитритов в три раза (NO_2^- , от 0,124 до 0,259 мг/л). В достаточно большом количестве наблюдаются здесь и концентрация нитратов (NO_3^- , от 5,021 до 5,743 мг/л), однако превышения ПДК по ним не выявлено.

Подобные значения загрязняющих веществ в р. Разумная напрямую связаны с тем, что преобладающая часть водосборной территории этой реки занята «неканализованной» частной застройкой, а также пашней, куда ежегодно вносятся азотные удобрения, поэтому показатели загрязнения здесь возрастают по мере продвижения от истока реки к устью, где она впадает в р. Северский Донец. В верховье реки (пункт «Севрюково»), где отсутствуют явные загрязнители, наблюдается быстрое течение, что способствует процессу самоочищения реки. В дальнейшем, когда течение реки становится спокойным, она переходит в зону интенсивной городской застройки с высокой долей промышленных предприятий, где городские территории вносят свой вклад в азотное загрязнение водной среды вплоть до устья. Данный факт отчасти объясняет наибольшее количество поврежденных ядер у исследованных особей в пункте «Разумное», несмотря на его удаленность от промышленного района города. Кроме того, в образцах из данного пункта отмечено наибольшее количество клеток в состоянии апоптоза. По ранее опубликованным данным [36], особи, обитающие в указанном локалитете, имеют низкие показатели индекса печени. Это соответствует концепции, получившей развитие в работах С.С. Шварца, согласно которой в условиях загрязненных водоемов наблюдается повышение энергетических затрат («энергетическая плата») для адаптивной реакции организмов в изменяющихся условиях среды обитания [37–39].

Стоит отметить, что полученные нами данные сопоставимы с результатами других исследований комплекса среднеевропейских зеленых лягушек (*P. esculentus* complex), которые зарекомендовали себя как отличные биоиндикаторы ввиду их высокой чувствительности к факторам окружающей среды [40]. Так, исследования в Центральной Анатолии (Турция) показали, что у *P. ridibundus* наблюдается достоверное увеличение уровня повреждения ДНК в изучаемых группах по сравнению с контролем [41]. Аналогичное исследование на примере *P. esculentus* L., 1758 проведено в г. Неаполе (Италия), в котором отбор проб проводили вблизи незаконных свалок и участков с интенсивным земледелием, в качестве контроля использовали животных, содержащихся в лаборатории при оптимальных условиях. В своей работе авторы отмечают, что природные популяции подвержены воздействию генотоксичных загрязнителей, связанному с проблемой отходов, с одной стороны, и интенсивным сельским хозяйством – с другой [42].

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании выявлено повышение степени разрушения ДНК в популяциях озерных лягушек на антропогенно-измененных территориях г. Белгорода и его окрестностей. При этом повышение уровня токсичных веществ может способствовать снижению жизнеспособности особей как анализируемого вида, так и других видов гидробионтов, что негативно скажется в целом на биоразнообразии региона.

Литература

1. McGlashan D.J., Hughies J.M. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range // Journal of Fish Biology. 2001. Vol. 59. PP. 55–67. doi: [10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x)
2. Hariri M., Mirvaghefi A., Farahmand H., Taghavi L., Shahabinia A.R. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (*Salmo trutta fario*) // Environ Toxicol Pharmacol. 2018. Vol. 58. PP. 59–69. doi: [10.1016/j.etap.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.024)
3. Reid A.J., Carlson A.K., Creed I.F., Eliason E.J., Gell P.A., Johnson P.T.J., Kidd K.A., MacCormack T.J., Olden J.D., Ormerod S.J., Smol J.P., Taylor W.W., Tockner K., Vermaire J.C., Dudgeon D., Cooke S.J. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity // Biological Reviews. 2018. Vol. 94. PP. 849–873. doi: [10.1111/brv.12480](https://doi.org/10.1111/brv.12480)
4. Bolognesi C., Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals // Mutagenesis. 2010. Vol. 26. PP. 205–213. doi: [10.1093/mutage/geq073](https://doi.org/10.1093/mutage/geq073)
5. Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D.N., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology // Mutation Research. 2000. Vol. 463, № 1. PP. 33–51. doi: [10.1016/S1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00004-1)
6. Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A., Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two

- natural environments // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004. Vol. 57. PP. 168–174. doi: [10.1016/S0147-6513\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00027-7)
7. Ameur W.B., El Megdiche Y., de Lapuente J., Barhoumi B., Trabelsi S., Ennaceur S., Camps L., Serret J., Ramos-López D., Gonzalez-Linares J., Touil S., Driss M.R., Borrás M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia // *Chemosphere*. 2015. Vol. 135. PP. 67–74. doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.02.050](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050)
 8. Zhelev Z.M., Arnaudova D.N., Popgeorgiev G.S., Tsonev S.V. In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria // *Ecological Indicators*. 2020. Vol. 115. PP. 1–15. doi: [10.1016/j.ecolind.2020.106413](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413)
 9. Burlibasa L., Gavrilă L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity // *Applied Ecology and Environmental Research*. 2011. Vol. 9. PP. 1–15. doi: [10.15666/AEER/0901_001015](https://doi.org/10.15666/AEER/0901_001015)
 10. Natarajan A.T. Chromosome aberrations: past, present and future // *Mutat. Res*. 2002. Vol. 504, Iss. 1–2. PP. 3–16. doi: [10.1016/s0027-5107\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00075-1)
 11. Wilson M., Thompson L.H. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange // *Mutat. Res*. 2007. Vol. 616, Iss. 1–2. PP. 11–23. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017)
 12. Swenberg A. Utilization of the alkaline elution assay as a short-term test for chemical carcinogens // *Short-term Tests for chemical carcinogens. Topics in environmental physiology and medicine*. Springer. 1981. PP. 48–58. doi: [10.1007/978-1-4612-5847-6_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5847-6_5)
 13. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells // *Mutagenesis*. 2011. Vol. 26. PP. 125–132. doi: [10.1093/mutage/geq052](https://doi.org/10.1093/mutage/geq052)
 14. Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models // *Cell Biology and Toxicology*. 2009. Vol. 25. PP. 5–32. doi: [10.1007/s10565-008-9072-z](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z)
 15. Gajski G., Zegura B., Ladeira C., Pourrut B., Del Bo' C., Novak M., Sramkova M., Milic M., Gutzkow K.B., Costa S., Dusinska M., Brunborg G., Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates) // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2019. Vol. 779. PP. 82–113. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003)
 16. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // *Biochemical and Biophysical*. 1984. Vol. 123, № 1. PP. 291–298. doi: [10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
 17. Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments // *Mutation Research*. 2009. Vol. 681. PP. 80–92. doi: [10.1016/j.mrrev.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001)
 18. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // *Онкология*. 2008. Т. 10, № 3. С. 303–309.
 19. Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay // *Radiation Research*. 1990. Vol. 122, № 1. PP. 86–94.
 20. Snegin E.A., Barkhatov A.S., Snegina E.A., Adamova V.V. Estimation of damage in populations of marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) based on DNA comet assay // *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 5, № 6. PP. 6091–6094. doi: [10.5281/zenodo.1304332](https://doi.org/10.5281/zenodo.1304332)
 21. Экология города : учеб. пособие / В.Л. Вершинин. Екатеринбург : Изд-во Уральского университета, 2014. 88 с.

22. Липатов В.А., Северинов Д.А., Крюков А.А., Саакян А.Р. Этические и правовые аспекты проведения экспериментальных биомедицинских исследований *in vivo*. Часть II // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2019. Т. 27, № 2. С. 245–257. doi: [10.23888/PAVLOVJ2019272245-257](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019272245-257)
23. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сиднева Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений : методические рекомендации. М. : Полиграфсервис, 2006. 28 с.
24. Филиппов Э.В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды // Природные ресурсы Арктики и Субарктики (Наука и образование). 2014. № 2 (74). С. 72–78.
25. Struwe M., Greulich K.O., Suter W., Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro // Mutation Research. 2007. Vol. 632. PP. 44–57. doi: [10.1016/j.mrgentox.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.014)
26. Snegin E.A. Analysis of cytogenetic stability in natural populations of terrestrial mollusks (based on DNA comet assay) // Russian Journal of Developmental Biology. 2014. Vol. 45, № 3. PP. 143–148. doi: [10.1134/S1062360414030060](https://doi.org/10.1134/S1062360414030060)
27. Engström W., Darbre P., Eriksson S., Gulliver L., Hultman T., Karamouzis M.V., Klaunig J.E., Mehta R., Moorwood K., Sanderson T., Sone H., Vadgama P., Wagemaker G., Ward A., Singh N., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Amedei A., Colacci A.M., Vaccari M., Mondello C., Scovassi A.I., Raju J., Hamid R.A., Memeo L., Forte S., Roy R., Woodrick J., Salem H.K., Ryan E.P., Brown D.G., Bisson W.H. The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signaling // Carcinogenesis. 2015. Vol. 36. PP. 838–860. doi: [10.1093/carcin/bgv030](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv030)
28. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М. : Медицина, 1998. 328 с.
29. Koedrith P., Kim H., Weon J.I., Seo Y.R. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity // International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2013. Vol. 216. PP. 587–598. doi: [10.1016/j.ijheh.2013.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.02.010)
30. Tamir S., Burney S., Tannenbaum S.R. DNA damage by nitric oxide // Chemical Research in Toxicology. 1996. Vol. 9. PP. 821–827. doi: [10.1021/tx9600311](https://doi.org/10.1021/tx9600311)
31. Киселев В.В., Корнилов А.Г. Геоэкологические аспекты развития современного интенсивного свиноводства на территории Белгородской области // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2019. Т. 43, № 1. С. 98–108. doi: [10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108)
32. Стороженко Е.А., Корнилов А.Г., Марыныч С.Н. Пространственная динамика азотного загрязнения рек города Белгорода // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2018. Т. 42, № 3. С. 427–434. doi: [10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434)
33. Киселев В.В., Курепина В.А., Корнилов А.Г. Динамика гидроэкологических показателей малых рек Белгородской области // Проблемы природопользования и экологическая ситуация в Европейской России и на сопредельных территориях. 2019. С. 348–350.
34. Стороженко Е.А., Марыныч С.Н., Корнилов А.Г. Азотное загрязнение реки Болховец в период половодья (паводка) в 2019 году // Проблемы природопользования и экологическая ситуация в Европейской России и на сопредельных территориях. 2019. С. 378–382.

35. Марыныч С.Н., Стороженко Е.А., Корнилов А.Г. Гидрохимическая ситуация на водных объектах разного типа бассейна реки Северский Донец (в части азотного загрязнения) // Эколого-географические исследования в речных бассейнах. 2018. С. 212–216.
36. Снегин Э.А., Бархатов А.С. Морфогенетическая структура популяций озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) в условиях городской среды // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 1. С. 47–53. doi: [10.25750/1995-4301-2019-1-047-053](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-1-047-053)
37. Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск : Изд-во АН СССР, 1968. 387 с.
38. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М. : Наука, 1980. 277 с.
39. Спирина Е.В. Морфофизиологические адаптации *Rana ridibunda* Pall. под влиянием загрязнения // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2009. № 12(62). С. 64–68.
40. Gajski G., Žegura B., Ladeira C., Novak M., Sramkova M., Pourrut B., Del Bo' C., Milić M., Gutzkow K.B., Costa S., Dusinska M., Brunborg G., Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2019. Vol. 781. PP. 130–164. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.04.002)
41. Erismis U.C., Cigerci I.H., Konuk M. Evaluation of DNA damage in Eurasian marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) by comet assay for determination of possible pollution in the different lakes in central Anatolia, Turkey // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2013. Vol. 90. PP. 660–665. doi: [10.1007/s00128-013-0991-x](https://doi.org/10.1007/s00128-013-0991-x)
42. Maselli V., Polese G., Rippa D., Ligrone R., Rastogi R.K., Fulgione D. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring Provinces // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010. Vol. 73. PP. 1525–1529. doi: [10.1016/j.ecoenv.2010.05.011](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.011)

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.; повторно 21.06.2021 г.;
принята 27.08.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.

Авторский коллектив:

Снегин Эдуард Анатольевич, д-р биол. наук, профессор, директор Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7574-6910>

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Бархатов Анатолий Сергеевич, аспирант, м.н.с. Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9996-7251>

E-mail: barkhatov@bsu.edu.ru

Киселев Владислав Викторович, аспирант, учебный мастер кафедры географии, геоэкологии и безопасности жизнедеятельности Института наук о Земле «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

E-mail: kiselev_v@bsu.edu.ru

Юсупов Сергей Рискулович, аспирант, м.н.с. Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

E-mail: yusupov@bsu.edu.ru

Снегина Елена Андреевна, м.н.с. Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1789-1121>

E-mail: snegina@bsu.edu.ru

For citation: Snegin EA, Barkhatov AS, Kiselev VV, Yusupov SR, Snegina EA. Estimation of genomic DNA damage in populations of the marsh frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) of the Belgorod agglomeration by DNA comet assay. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:58-76. doi: 10.17223/19988591/55/4 In Russian, English Summary

**Eduard A. Snegin¹, Anatoliy S. Barkhatov¹, Vladislav V. Kiselev²,
Sergei R. Yusupov¹, Elena A. Snegina¹**

¹Research Center for Genomic Selection, Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

²Institute of Earth Sciences, Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

**Estimation of genomic DNA damage in populations of the marsh frog
(*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) of the Belgorod agglomeration by DNA comet assay**

Anthropogenic pollution of water bodies is a serious problem for the sustainability of aquatic ecosystems. The main sources of pollution of water bodies are wastewater, washouts from agricultural fertilizers, pesticides and roads. Many of highly persistent pollutants are dangerous mutagens and carcinogens. The disruption they cause to the DNA and RNA structure and properties of organisms can have long-term consequences and can affect the livelihood of future generations. Among existing DNA damage estimation methods, DNA comet assay is the most widespread due to its accuracy and reliability. In our study, the marsh frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) was chosen as an object of study. This species is adapted to life under anthropogenic influence and actively inhabits transformed biotopes. The aim of our work was to estimate the level of DNA damage by DNA comet assay of *P. ridibundus* inhabiting Belgorod city and its suburbs.

We studied a total of 6 marsh frog populations, with collection sites differing in the degree of anthropogenic pressure (See Table 1 and Fig. 1), and we selected 5 individuals of *P. ridibundus* from each locality. The experimental animals were handled in accordance with international ethical standards. Animal liver was used as the material for the study and analysis was performed on the day of collection. Tissue was homogenized in phosphate-salt buffer (pH 7.5) containing 20 mM EDTA-Na₂ and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) at +4 °C. To precipitate large fragments, tubes were incubated for 5 min at room temperature before transferring 1.5 ml of the top layer to microcentrifuge tubes and centrifuged in a 5415 R Eppendorf microcentrifuge (Germany) at 1000 g for 10 min at +4 °C. The supernatant was removed and the cell precipitate was diluted in 1 ml of phosphate salt buffer cooled to +4 °C. To obtain microarrays, 60 µl of cell suspension was mixed with 240 µl of 1% fusible agarose solution (t<42 °C). The lysis was performed for at least one hour at +4 °C (lysis buffer: 10mM Tris-HCl (pH 10) 2.5M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂ and 1% Triton X-100 with 10% DMSO). Electrophoresis was performed in a darkened room in Tris-EDTA-borate electrode buffer (TBE) for 20 min at a voltage of 1V/cm. At the end of electrophoresis, the preparations were fixed with 70% ethanol for 15 min. The preparations were stained with SYBR Green I dye, with subsequent analysis using a luminescent trinocular microscope MIKMED-2 of Lomo (Russia), with at least 100 cells analyzed from each preparation, which were divided into 5 types; cells in the state of apoptosis were counted separately (Durnev, et al., 2006). The degree of DNA damage was estimated using the Kruskal-Wallis criterion ("DNA comet index") (Struwe et al., 2007; Filippov, 2014). To determine the statistical significance of differences between the studied populations we used

one-way analysis of variance (ANOVA); statistically significant differences were considered at $p < 0.05$.

According to the data obtained, in all studied populations, the mean value of the DNA damage index (DDI) did not exceed the first threshold of DNA degradation (See Table 2). This may indicate, on the one hand, the absence of high concentrations of genotoxic pollutants here (which is highly doubtful) and, on the other hand, the efficient operation of the reparative system of marsh frog. Nevertheless, the calculated DDI values made it possible to construct a gradational scale of DNA destruction level in the studied groups of frogs depending on the degree of pollution and proximity of residential and industrial buildings (See Table 2-4). Various chemical compounds from industrial production, particularly nitrogen compounds, are known to have genotoxic effects. Due to the lack of possibility to perform chemical analysis of water to identify concentrations of genotoxic pollutants, we analysed data on surface water pollution in some of the investigated locations from open literature sources. As a result of this analysis, we revealed the dynamics of surface water pollution. All investigated points by the mean value of the statistical DDI surpassed reliably the least polluted site "Sevrukovo", which is located in the green zone and at a considerable distance from urbanized areas (See Table 2-4). High values of DDI were fixed in a zone of industrial and multi-storey buildings, localities "Seversky Donets" (DDI = 0.454) and "Veselka" (DDI = 0.416). Exceeding maximum permissible concentration of nitrogen compounds is observed in the above mentioned rivers. Noteworthy is the fact that the highest value of the DDI (0.521) was recorded in the estuary of the Razumnaya River remote from the industrial part of the city ("Razumnoye"). It should be noted that in this locality there is the greatest number of damaged cells, including apoptosis (See Table 2, Fig. 2 and 3). The highest DDI value is due to the high level of pollutants, since the predominant part of the river is occupied by "non-sewered" private low-rise buildings, as well as arable land. At the same time in the upper part of the river ("Sevryukovo") due to the lack of obvious pollutants and the intensive current contributing to self-purification of the river, we recorded the minimum value of the DDI (0.057) and the absence of cells in the state of apoptosis.

Thus, the present study revealed an increase in the degree of DNA destruction in populations of marsh frogs in the impacted areas of the city of Belgorod and its surroundings. At the same time, increased levels of toxic substances may contribute to a decrease in the viability of individuals of both analyzed species and other hydrobiont species, which will negatively affect the biodiversity of the region as a whole.

The paper contains 3 Figures, 4 Tables and 42 References.

Key words: *Pelophylax ridibundus*; comet assay; urbanized area; genotoxic pollutants; bioindicator

Abbreviations: DDI - DNA damage index (comet assay); MPC - Maximum permissible concentration [ПДК In Russian].

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. McGlashan DJ, Hughies JM. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. *Journal of Fish Biology*. 2001;59:55-67. doi: [10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x)
2. Hariri M, Mirvaghefi A, Farahmand H, Taghavi L, Shahabinia AR. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on

- feral brown trout (*Salmo trutta fario*). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;58:59-69. doi: [10.1016/j.etap.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.024)
3. Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, Eliason EJ, Gell PA, Johnson PTJ, Kidd KA, MacCormack TJ, Olden JD, Ormerod SJ, Smol JP, Taylor WW, Tockner K, Vermaire JC, Dudgeon D, Cooke SJ. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*. 2018;94:849-873. doi: [10.1111/brv.12480](https://doi.org/10.1111/brv.12480)
 4. Bolognesi C, Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. 2010;26:205-213. doi: [10.1093/mutage/geq073](https://doi.org/10.1093/mutage/geq073)
 5. Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L, Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*. 2000;463(1):33-51. doi: [10.1016/s1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00004-1)
 6. Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004;57:168-174. doi: [10.1016/S0147-6513\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00027-7)
 7. Ameer WB, El Megdiche Y, de Lapuente J, Barhoumi B, Trabelsi S, Ennaceur S, Camps L, Serret J, Ramos-López D, Gonzalez-Linares J, Touil S, Driss MR, Borrás M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*. 2015;135:67-74. doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.02.050](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050)
 8. Zhelev ZM, Arnaudova DN, Popgeorgiev GS, Tsonev SV. In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria. *Ecological Indicators*. 2020;115:1-15. doi: [10.1016/j.ecolind.2020.106413](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413)
 9. Burlibasa L, Gavrila L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2011;9:1-15. doi: [10.15666/AEER/0901_001015](https://doi.org/10.15666/AEER/0901_001015)
 10. Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res*. 2002;504(1-2):3-16. doi: [10.1016/s0027-5107\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00075-1)
 11. Wilson M, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res*. 2007;616(1-2):11-23. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017)
 12. Swenberg A. Utilization of the alkaline elution assay as a short-term test for chemical carcinogens. Short-term Tests for chemical carcinogens. Topics in environmental physiology and medicine. Springer. 1981: 48-58. doi: [10.1007/978-1-4612-5847-6_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5847-6_5)
 13. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):125-132. doi: [10.1093/mutage/geq052](https://doi.org/10.1093/mutage/geq052)
 14. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*. 2009;25:5-32. doi: [10.1007/s10565-008-9072-z](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z)
 15. Gajski G, Zegura B, Ladeira C, Pourrut B, Del Bo' C, Novak M, Sramkova M, Milic M, Gutzkow KB, Costa S, Dusinska M, Brunborg G, Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales - (Part 1 Invertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2019;779:82-113. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003)
 16. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical*. 1984;123(1):291-298. doi: [10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
 17. Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*. 2009;681:80-92. doi: [10.1016/j.mrrev.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001)

18. Sorochinska JB, Mikhailenko VM. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Onkologiya = Oncology*. 2008;10(3):303-308. In Russian, English Summary
19. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*. 1990;122(1):86-94
20. Snegin EA, Barkhatov AS, Snegina EA, Adamova VV. Estimation of damage in populations of marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) based on DNA comet assay. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;5(6):6091-6094. doi: [10.5281/zenodo.1304332](https://doi.org/10.5281/zenodo.1304332)
21. Vershinin VL. *Ekologiya goroda: Uchebnoe posobie* [Urban ecology. Textbook]. Yekaterinburg: Urals University Publishers; 2014. 88 p. In Russian
22. Lipatov VA, Kryukov AA, Severinov DA, Saakyan AR. Ethical and legal aspects of in vivo experimental biomedical research of the conduct. Part II. *IP Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2019;27(2):245-257. doi: [10.23888/PAVLOVJ2019272245-257](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019272245-257)
23. Durnev AD, Zhanataev AK, Anisina EA, Sidneva ES, Nikitina VA, Oganesyants LA, Seredenin SB, Bekish VYa, Chernukha IM. *Primenenie metoda shchelochного gel'-elektroforeza izolirovannykh kletok dlya otsenki genotoksicheskikh svoystv prirodnykh i sinteticheskikh soedineniy* [Application of the alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess genotoxic properties of natural and synthetic compounds]. Guidelines. Moscow: Poligrafservis Publ.; 2006. 28 p. In Russian
24. Filippov EV. *Ispol'zovanie metoda «DNK-komet» dlya detektsii i otsenki stepeni povrezhdeniy DNK kletok organizmov rasteniy, zhivotnykh i cheloveka, vyzvannykh faktorami okruzhayushchey sredy* [Using DNA comet assay for detecting and estimating the degree of DNA damage to cells in plant, animal and human organisms caused by environmental factors]. *Prirodnye resursy Arktiki i Subarktiki (Nauka i obrazovanie) = Natural Resources of the Arctic and Subarctic (Science and Education)*. 2014;2(74):72-78. In Russian
25. Struwe M, Greulich KO, Suter W, Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutation Research*. 2007;632:44-57. doi: [10.1016/j.mrgentox.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.014)
26. Snegin E.A. Analysis of cytogenetic stability in natural populations of terrestrial mollusks (based on DNA comet assay). *Russian Journal of Developmental Biology*. 2014. 45(3):143-148. doi: [10.1134/S1062360414030060](https://doi.org/10.1134/S1062360414030060)
27. Engström W, Darbre P, Eriksson S, Gulliver L, Hultman T, Karamouzis MV, Klaunig JE, Mehta R, Moorwood K, Sanderson T, Sone H, Vadgama P, Wagemaker G, Ward A, Singh N, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Colacci AM, Vaccari M, Mondello C, Scovassi AI, Raju J, Hamid RA, Memeo L, Forte S, Roy R, Woodrick J, Salem HK, Ryan EP, Brown DG, Bisson WH. The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signaling. *Carcinogenesis*. 2015;36:838-860. doi: [10.1093/carcin/bgv030](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv030)
28. Durnev AD, Seredenin SB. *Mutageny (skrining i farmakologicheskaya profilaktika vozdeystviy)* [Mutagens (screening and pharmacological prevention of exposure)]. Moscow: Meditsina Publ.; 1998. 328 p. In Russian
29. Koedrith P, Kim H, Weon JI, Seo YR. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013;216:587-598. doi: [10.1016/j.ijheh.2013.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.02.010)
30. Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. *Chemical Research in Toxicology*. 1996;9:821-827. doi: [10.1021/tx9600311](https://doi.org/10.1021/tx9600311)
31. Kiselev VV, Kornilov AG. Geoecological aspects of development of modern intensive pig farming in the Belgorod region. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo*

- universiteta. Serija: Estestvennye nauki = Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences series. 2019;43(1):98-108. doi: [10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108) In Russian, English Summary
32. Storozhenko EA, Kornilov AG, Marynych SN. Spatial dynamics of nitrogen pollution of small rivers of Belgorod. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Estestvennye nauki = Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences series.* 2018;42(3):427-434. doi: [10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434) In Russian, English Summary
33. Kiselev VV, Kurepina VA, Kornilov AG. Dinamika gidroekologicheskikh pokazateley malykh rek Belgorodskoy oblasti [Dynamics of hydroecological parameters of small rivers of Belgorod region]. In: *Problemy prirodopol'zovaniya i ekologicheskaya situatsiya v Evropeyskoy Rossii i na sopredel'nykh territoriyakh.* Materialy nauch. konf. [Problems of nature management and ecological situation in European Russia and adjacent territories. Proceedings of the VIII Int. Sci. Conf. (Belgorod, Russia, 22-25 October, 2019)]. Belgorod: Publishing house "Belgorod"; 2019. pp. 348-350. In Russian
34. Storozhenko EA, Marynych SN, Kornilov AG. Azotnoe zagryaznenie reki Bolkhovets v period polovod'ya (pavodka) v 2019 godu [Nitrogen pollution of the Bolkhovets river during the river flood in 2019]. In: *Problemy prirodopol'zovaniya i ekologicheskaya situatsiya v Evropeyskoy Rossii i na sopredel'nykh territoriyakh.* Materialy nauch. konf. [Problems of nature management and ecological situation in European Russia and adjacent territories. Proceedings of the VIII Int. Sci. Conf. (Belgorod, Russia, 22-25 October, 2019)]. Belgorod: Publishing house "Belgorod"; 2019. pp. 378-382. In Russian
35. Marynych SN, Storozhenko EA, Kornilov AG. Gidrokhimicheskaya situatsiya na vodnykh ob'ektakh raznogo tipa basseyna reki Severskiy Donets (v chasti azotnogo zagryazneniya) [Hydrochemical situation in water bodies of different types in the Seversky Donets river basin (in terms of nitrogen pollution)]. In: *Ekologo-geograficheskie issledovaniya v rechnykh basseynakh.* Materialy nauch. konf. [Ecological and geographical studies in river basins. Proceedings of the Fifth All-Russian Sci. and Pract. Conf. (Voronezh, Russia, 5-7 October, 2018)]. Voronezh: NAUKAUNIPRESS; 2018. pp. 212-216. In Russian
36. Snegin EA, Barkhatov AS. Morphogenetic structure of marsh frog populations of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) under conditions of urban environment. *Theoretical and Applied Ecology.* 2019;1:47-53. doi: [10.25750/1995-4301-2019-1-047-053](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-1-047-053) In Russian, English Summary
37. Shvarts SS, Smirnov VS, Dobrinskiy LN. Metod morfofiziologicheskikh indikatorov v ekologii nazemnykh pozvonochnykh [Method of morphophysiological parameters in the ecology of terrestrial vertebrates]. Sverdlovsk: AN SSSR Publ.; 1968. 387 p. In Russian
38. Shvarts SS. Ekologicheskie zakonomernosti evolyutsii [Ecological patterns of evolution]. Moscow: Nauka Publ.; 1980. 227 p. In Russian
39. Spirina EV Morfofiziologicheskie adaptatsii *Rana ridibunda* Pall. pod vliyaniem zagryazneniya [Morphophysiological adaptations of *Rana ridibunda* Pall. under the influence of pollution]. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University.* 2009;12(62):64-68. In Russian
40. Gajski G, Žegura B, Ladeira C, Novak M, Sramkova M, Pourrut B, Del Bo' C, Milić M, Gutzkow KB, Costa S, Dusinska M, Brunborg G, Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2019;781:130-164. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.04.002)
41. Erismis UC, Cigerci IH, Konuk M. Evaluation of DNA damage in Eurasian marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) by comet assay for determination of possible pollution in the different lakes in central Anatolia, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 2013;90:660-665. doi: [10.1007/s00128-013-0991-x](https://doi.org/10.1007/s00128-013-0991-x)

42. Maselli V, Polese G, Rippa D, Ligrone R, Rastogi RK, Fulgione D. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring Provinces. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010;73:1525-1529. doi: [10.1016/j.ecoenv.2010.05.011](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.011)

*Received 10 March 2021; Revised 21 Juny 2021;
Accepted 27 August 2021; Published 29 September 2021.*

Author info:

Snegin Eduard A, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Director of the Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7574-6910>

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Barkhatov Anatoliy S, Post-Graduate Student, Junior Researcher, Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9996-7251>

E-mail: barkhatov@bsu.edu.ru

Kiselev Vladislav V, Post-Graduate Student, Assistant, Institute of Earth Sciences, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

E-mail: kiselev_v@bsu.edu.ru

Yusupov Sergey R, Post-Graduate Student, Junior Researcher, Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

E-mail: yusupov@bsu.edu.ru

Snegina Elena A, Junior Researcher, Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1789-1121>

E-mail: snegina@bsu.edu.ru

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.12

doi: 10.17223/19988591/55/5

Н.Г. Варламова, Е.Р. Бойко

Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Республика Коми, г. Сыктывкар, Россия

Объёмные характеристики функции внешнего дыхания у лыжников-гонщиков в годовом цикле

Работа выполнена за счет средств субсидии на выполнение Государственного задания № ГР АААА-А17-117012310157-7, № ГР АААА-А17-117012310153-9.

Впервые в годовом цикле у высококвалифицированных лыжников-гонщиков, членов сборных команд региона и России, изучена функция внешнего дыхания (FER): дыхательный и минутный объемы дыхания, жизненная и форсированная жизненная емкости легких, резервные объемы вдоха и выдоха, объемы форсированного выдоха за первые полсекунды и секунду, индекс Тиффно. Проведено 179 обследований 70 спортсменов в возрасте $20,5 \pm 4,4$ г. Результаты исследований обработаны методами параметрической статистики с применением критериев Фишера, Стьюдента и Стьюдента с поправкой Бонферрони. Максимальные значения легочных объемов у лыжников-гонщиков выявлены с ноября по март, минимальные – с июня по октябрь. Диапазоны годового дрейфа показателей FER составляют от 11,5 до 56,3% и наиболее выражены для резервных объемов вдоха и выдоха, дыхательного объема. У лыжников-гонщиков по сравнению с мужчинами, не занимающимися спортом, увеличены дыхательный объем, жизненная и форсированная емкости легких, резервные объемы вдоха и выдоха, объем форсированного выдоха за полсекунды и секунду, индекс Тиффно и уменьшен минутный объем дыхания; адаптация респираторной системы к холодному периоду года начинается раньше на два месяца, а период более комфортного состояния функции длится дольше на один месяц.

Ключевые слова: ремоделирование функции внешнего дыхания; гипервентиляция; легочные объемы

Сокращения [Abbreviations]: FER – функция внешнего дыхания [function of external respiration]; V_t – дыхательный объем [tidal volume]; MV – минутный объем дыхания [minute volume of respiration]; VC – жизненная емкость легких [vital capacity]; FVC – форсированная жизненная емкость легких [forced vital capacity]; IRV – резервный объем вдоха [inspiratory reserve volume]; ERV – резервный объем выдоха [expiratory reserve volume]; FEV0.5 – объем форсированного выдоха за первые полсекунды [forced expiratory volume in 0.5 second]; FEV1 – объем форсированного выдоха за первую секунду [forced expiratory volume in 1 second], FEV1/FVC – индекс Тиффно [Tiffeneau-Pinelli index].

Для цитирования: Варламова Н.Г., Бойко Е.Р. Объемные характеристики функции внешнего дыхания у лыжников-гонщиков в годовом цикле // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 77–96. doi: 10.17223/19988591/55/5

Введение

Респираторная система – первый этап в цепи доставки кислорода организму человека [1]. С одной стороны, она служит неотъемлемой частью комплекса висцеральных систем, обслуживающих обмен веществ, и играет важнейшую роль в поддержании постоянства внутренней среды. С другой стороны, система дыхания – наиболее «открытая»: она непрерывно и тесно взаимодействует с окружающей средой [2] и на Севере испытывает влияние целого комплекса неблагоприятных пульмонотропных факторов [3].

Состояние системы внешнего дыхания является одним из важнейших факторов, обуславливающих функциональные возможности организма спортсменов и эффективность спортивной деятельности [4]. Показатели ее функционирования у северян-спортсменов модулируются не только тренировочным процессом, но и климато-географическими факторами. У спортсменов, тренирующих аэробные возможности в условиях холодного климата, по сравнению с нетренированными людьми увеличены альвеолярная вентиляция и жизненная емкость легких [1], высокая распространенность респираторных симптомов и гиперреактивность дыхательной системы, в биоптатах бронхов у лыжников присутствуют признаки нейтрофильного и лимфоцитарного воспаления с ремоделированием дыхательных путей [5].

Данные литературы по изучению функции внешнего дыхания у лыжников-гонщиков в годовом цикле отсутствуют, имеются работы [1, 3–4, 6], затрагивающие сезоны или часть месяцев года. Статические объемы одинаково важны для оценки обструктивных и рестриктивных вентиляционных нарушений [7].

Цель данной работы – исследование объемных характеристик функции внешнего дыхания в годовом цикле у лыжников-гонщиков, проживающих и тренирующихся на территории Европейского Севера, что важно для понимания механизмов адаптации к условиям среды при спортивной деятельности, а также влияния условий среды на успешность тренировочного и соревновательного процессов.

Материалы и методики исследования

Исследования проведены в соответствии с принципами Хельсинской декларации 1964 г. с изменениями, принятыми на Генеральных Ассамблеях ВМА с 1975 по 2013 г. Методы одобрены Комитетом по биоэтике ИФ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар, Россия). Все спортсмены подписали добровольное информированное согласие на обследование. Функцию внешнего дыха-

ния (FER) определяли на микропроцессорном спирографе СПМ-01-«Р-Д» «Всесоюзный научно-исследовательский институт медицинского приборостроения» (Россия) ежемесячно с 2012 по 2019 г. у одной и той же группы лыжников-гонщиков [ski racers] (70 человек, 179 обследований) в возрасте 16–34 лет ($20,5 \pm 4,4$ года) в положении сидя. Рост и массу тела измеряли медицинским весоростомером (Россия). Мужчины – члены сборных команд Республики Коми и России, проживали на территории Европейского Севера (62° с.ш., 51° в.д.) практически с рождения, имели первый спортивный разряд, звания кандидатов и мастеров спорта. Рост лыжников-гонщиков составил $175,9 \pm 0,6$ см, масса тела $69,4 \pm 0,7$ кг. В годовом цикле изучены: дыхательный (V_t) и минутный объёмы дыхания (MV), жизненная (VC) и форсированная жизненная (FVC) ёмкости лёгких, резервные объёмы вдоха (IRV) и выдоха (ERV), объёмы форсированного выдоха за первые полсекунды (FEV0.5) и секунду (FEV1), индекс Тиффно (FEV1/FVC). Результаты обработаны статистически с применением критериев Фишера, Стьюдента и Стьюдента с поправкой Бонферрони. Данные представлены в виде средней арифметической величины и ошибки средней ($M \pm m_M$).

Результаты исследования и обсуждение

Показатели FER в значительной мере зависят от антропометрических особенностей (массы тела, роста), пола и возраста [7–8], этнической принадлежности и физической активности [7]. У спортсменов-лыжников [3], уроженцев Европейского Севера, при исследовании FER в разные месяцы (сентябре, январе, апреле и июле) в динамике сезонов года происходят функциональные перестройки в системе внешнего дыхания.

Дыхательный объём у лыжников-гонщиков имел статистически значимые различия ($p < 0,05$, F-критерий) в годовом цикле (табл. 1).

Среднегодовой V_t у спортсменов составил $1,011 \pm 0,041$ л, что больше на 13,9% ($p < 0,001$), чем у мужчин аналогичного возраста ($19,0 \pm 0,9$ г.) и сходных антропометрических характеристик (рост $175,5 \pm 0,9$ см, масса тела $69,9 \pm 6,0$ кг) работающих в этом же регионе на открытом воздухе (тяжесть труда 3, напряженность 2), но не занимающихся спортом [9]. Максимальный V_t в ноябре больше на 0,378 л (30,6%), чем минимальный V_t в сентябре ($p < 0,05$). Значения V_t , полученные в нашем исследовании, в большинстве случаев превышают приводимые в литературе [4, 8, 10–11]. Увеличение V_t обычно улучшает эффективность газообмена в лёгких за счет роста альвеолярной вентиляции, величину которой определяет парциальное давление углекислоты в альвеолах, и уменьшения функционального мертвого пространства [11–12]. В зимний период [6] величина V_t регулируется по температуре альвеолярной газовой смеси, которая обусловлена соотношением между V_t и функциональной остаточной ёмкостью лёгких. Нарушение этого соотношения ведет к переохлаждению респираторной ткани и

развитию воспалительного процесса. Механизм ограничения Vt в холодное время года, по-видимому, связан с бронхиальной проходимостью, поскольку зимой появляется выраженная зависимость Vt от FEV1: при уменьшении FEV1 и снижении бронхиальной проходимости Vt значительно уменьшается, а частота дыханий, наоборот, увеличивается [6].

Таблица 1 [Table 1]

**Дыхательный и минутный объемы дыхания, жизненная и форсированная
жизненная емкости легких у лыжников-гонщиков в годовом цикле**
[Tidal (Vt) and minute (MV) volumes of respiration, vital (VC) and forced
vital (FVC) capacity of the lungs of ski racers in the annual cycle] ($M \pm m_M$, n)

Месяцы (номер) [Months (number)]	Vt, L #	MV, L/min #	VC, L ##	FVC, L ###
1	0,963±0,064; 18	13,15±0,82; 17	6,247±0,181; 19	5,388±0,228; 19
2	1,205±0,141; 11	16,24±0,88; 12&&	6,917±0,254; 12*9&&&	6,292±0,278; 11*10
3	0,858±0,068; 17	11,43±0,83; 17	6,372±0,267; 16	5,431±0,257; 17
4	1,001±0,109; 17	12,72±1,12; 17	6,500±0,190; 17	5,939±0,211; 17*10
5	0,948±0,094; 14	12,07±1,40; 14	6,459±0,243; 14	5,639±0,302; 14
6	0,879±0,039; 18	12,67±0,49; 18	6,335±0,161; 19	5,535±0,162; 19
7	0,940±0,109; 10	12,89±1,48; 10	6,007±0,326; 9	5,274±0,221; 10
8	1,058±0,122; 8	11,83±1,25; 7	6,091±0,220; 8	5,420±0,348; 8
9	0,859±0,091; 16&	11,42±1,06; 16&&	5,743±0,186; 16*2&&&	5,209±0,187; 16*12&&&
10	1,047±0,061; 20	14,18±0,87; 19	5,974±0,133; 20	4,954±0,134; 20*2,4,12
11	1,237±0,140; 13&	14,16±1,12; 13	6,257±0,212; 10	5,748±0,234; 13
12	1,131±0,89; 18	14,81±1,00; 18	6,800±0,220; 10	6,430±0,240 10*9,10&&&

Примечание. Месяцы (номер) – нумерация месяцев с января (1) по декабрь (12). ### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$ и # – $p < 0,05$ (F – критерий, статистически значимые изменения показателя в годовом цикле); * – $p < 0,05$ (t – критерий с поправкой Бонферрони, цифрами после звездочек обозначены месяцы обследования, с которыми показатель данного месяца имеет статистически значимые различия), &&& – $p < 0,001$, && – $p < 0,01$, & – $p < 0,05$ (t – критерий, сравнение между максимальным и минимальным значениями показателя). [Note. Months (number) is a month number from January (1) to December (12). ### is $p < 0.001$; ## is $p < 0.01$ and # is $p < 0.05$ (F - criterion, significant changes in the indicator in the annual cycle); * is $p < 0.05$ (t is the Bonferroni correction criterion, the numbers after the stars indicate the months of the survey with which the indicator of a given month has significant differences), &&& is $p < 0.001$, && is $p < 0.01$, & is $p < 0.05$ (t is the criterion, comparison between the maximum and minimum values of the indicator)].

Минутный объем дыхания (MV) наиболее ярко отображает функциональные особенности аппарата внешнего дыхания [10] и как показатель, тесно связанный с изменениями V_t и частотой дыхания наиболее точно определяет степень адаптации и выраженность приспособительных механизмов [3].

У спортсменов MV составил $13,13 \pm 0,45$ л и в годовом цикле различался ($p < 0,05$, F-критерий) (табл. 1, рис. 1). Наибольшие значения MV зарегистрированы в феврале, наименьшие – в сентябре (разница в годовом цикле составила 4,82 л/мин, или 29,7%, $p < 0,01$), что совпадает со сроками в группе мужчин, не занимающихся спортом, но больше по степени выраженности реакции (разница 20,5% у неспортсменов, $p < 0,001$) [9].

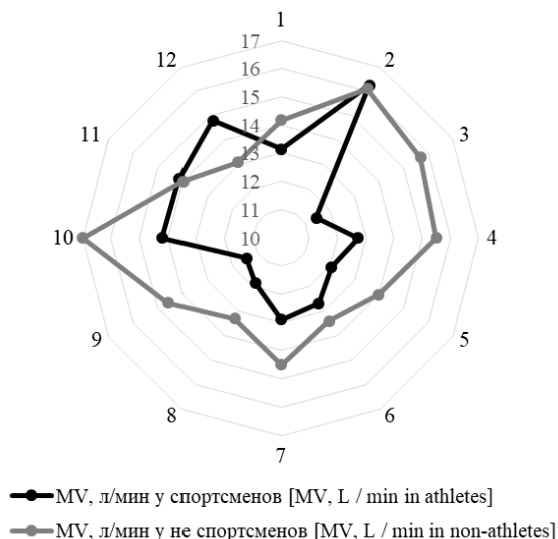


Рис. 1. Минутный объем дыхания у лыжников-гонщиков и мужчин, не занимающихся спортом, в годовом цикле ($p < 0,05$).

1–12 – нумерация месяцев с января (1) по декабрь (12).

Вертикальный столбец цифр (10–17) – л/мин

[Fig. 1. Minute volume of respiration in ski racers and non-athletic men in the annual cycle ($p < 0.05$). Numbers 1-12 indicate month numbers from January (1) to December (12). Vertical bar of numbers (10-17) indicates liters/min]

У спортсменов среднегодовое значение MV меньше на 9,1%, чем у мужчин аналогичного возраста, работающих в этом же регионе на открытом воздухе, но не занимающихся спортом [9]. В феврале, ноябре и декабре выявлена тенденция к увеличению MV у лыжников-гонщиков по сравнению с мужчинами, не занимающимися спортом. В целом у лыжников-гонщиков MV больше на 12,2–25,7%, чем у студентов Архангельска, на 22,3%, чем у лиц 18–23 лет, постоянно проживающих на Европейском Севере [13] и чем у жителей более комфортного климата [11, 14]. Более низкие значения MV у спортсменов, по сравнению с не занимающимися спортом, обусловле-

ны, по-видимому, увеличением аэробной мощности, эффектом лактатных тренировок и более ранней в годовом цикле адаптацией к холодному периоду года. По данным литературы [6], зимой повышается сопротивление воздухоносных путей, и ограничение MV уменьшает охлаждение легких. Исследования MV в годовом цикле позволили уточнить месяцы максимального и минимального значения показателя (соответственно, февраль и сентябрь), тогда как по данным других исследователей сезонных циклов [6] это лето и зима.

Минимальное значение MV в сентябре ($11,42 \pm 4,11$ л/мин) статистически значимо ($p < 0,05$) не отличается от такового у лыжников Новосибирска со сходными антропометрическими параметрами и возрастом [11]. Уменьшение MV в летнее время может быть связано с уменьшением количества функционирующих ацинусов [6].

Увеличение MV связано с развитием гипервентиляционного синдрома у северян [9, 15], который сочетается с повышенным потреблением кислорода, снижением показателей бронхиальной проходимости [15] и определяется компенсаторной перестройкой процессов жизнеобеспечения на биохимическом уровне. Оно свидетельствует об увеличении количества функционирующих альвеол и обусловлено, главным образом, гиперкапническим стимулом, который связывает дыхание с интенсивностью метаболизма. Статистически значимое повышение количества, выделенного CO_2 у жителей Севера, подтверждает, вероятно, смещение кислотно-щелочного равновесия в сторону ацидоза. С FER связан не только газовый состав крови, но и ее кислотно-основной баланс [2]. При метаболическом ацидозе уменьшается отношение $\text{HCO}_3^-/\text{PCO}_2$, что приводит к снижению pH. Концентрация HCO_3^- может снижаться в результате накопления в крови кислот, например при тканевой гипоксии, приводящей к повышенному образованию молочной кислоты. Повышение уровня лактата у северян в холодное время года согласуется с данными литературы [16] и является показателем лактатацидоза в определенные сезоны года. Метаболический ацидоз компенсируется легкими: увеличивается вентиляция, что приводит к снижению PCO_2 и восстановлению соотношения $\text{HCO}_3^-/\text{PCO}_2$. Основным стимулятором дыхания в данном случае служит действие ионов H^+ на периферические хеморецепторы [17]. Гипервентиляция, являясь одним из механизмов ликвидации метаболического ацидоза и энергетически затратным процессом, может указывать на приоритетность компенсаторных реакций организма: в первую очередь, поддержание кислотно-щелочного равновесия, а во вторую – температурного гомеостаза. Более высокие значения V_t и MV у северян могут свидетельствовать о нарушении «принципа экономизации» функции дыхания и косвенно указывать на потерю энергетических резервов организма [17].

Максимальное увеличение MV зимой согласуется с литературными данными [3]. Длительная гипоксемия, усиливающаяся в холодное время года

у северян, повышает свободно-радикальные процессы и снижает содержание антиоксидантов в организме [18], а также при высоких скоростях вентиляции верхних дыхательных путей во время физических упражнений (более 280 л/мин) вероятность потери воды из нижних дыхательных путей является значительной [19]. С помощью теплового картирования при увеличении вентиляции продемонстрировано [19] снижение температуры от верхней части трахеи до субсегментарных бронхов. Охлаждение дыхательных путей может стимулировать рецепторы в них, вызывая рефлекторное сужение бронхов. Кроме того, из-за вазоконстрикции бронхиального кровообращения, вызванного холодным воздухом, может возникнуть вторичная реактивная гиперемия с последующим отеком и сужением дыхательных путей [19]. Некоторые факторы окружающей среды могут еще больше усугубить воздействие интенсивной тренировки на дыхательные пути. Холодный воздух и респираторные инфекции у лыжников оказывают неблагоприятное влияние на состояние дыхательных путей [19] и спортивный результат.

Жизненная емкость легких (VC) определяет максимально возможную глубину дыхания и поэтому является важным показателем функциональных возможностей FER [10]. Различия VC у лыжников-гонщиков в годовом цикле статистически значимы ($p < 0,05$, F-критерий) (табл. 1, рис. 2).

Среднегодовое значение VC у спортсменов $6,309 \pm 0,091$ л, больше на 0,779 л (14,1%) ($p < 0,001$), чем у мужчин, не занимающихся спортом [9]. Максимальная среднемесячная VC выявлена в феврале, минимальная – в сентябре, разница между величинами составила 1,174 л (17,0%) ($p < 0,001$) (см. табл. 1). У лыжников-гонщиков во все месяцы VC больше индивидуально рассчитанной с учетом роста, массы тела и возраста нормы [20]. У мужчин, не занимающихся спортом, VC больше нормы [20] во все месяцы с тенденцией к уменьшению меньше нормы в августе и сентябре. То есть у спортсменов происходят более глубокие адаптивные изменения VC. Значения VC у лыжников-гонщиков (см. рис. 2) превышали таковые, приведенные в литературе [20], в том числе и для лиц, работающих в холодном климате [3, 9], в зимнее время [3, 10] и занимающихся лыжными гонками [4]. У обследованного нами контингента VC в разные месяцы колебалась от 112,9% (сентябрь) до 135,7% (февраль) должных значений [20], но сохраняла большее значение, чем у практически здоровых русских, жителей Надыма [18], мужчин от 21 года до 46 лет Украины [8].

По данным литературы [3], спортсмены-лыжники массовых разрядов, уроженцы Европейского Севера, осенью и летом имеют V_t , равный 17,0% VC, зимой и весной – до 23,5% VC. Наши исследования показали, что в январе использование V_t в VC достигает 15,0%, в июле – 15,6%, а в месяцы с максимальной (февраль) и минимальной (сентябрь) VC – соответственно 17,4 и 15,0%, следовательно, в резерве при спокойном дыхании находится от 82,6 до 85,0% VC.

Диффузионная способность пропорциональна емкости легких, и недостаток кислорода вызывает прирост VC . Нарастание величины VC от теплого к холодному времени года способствует увеличению дыхательной поверхности легких и тем самым создает условия для более эффективного приспособления легочной вентиляции к удовлетворению повышенных метаболических потребностей организма зимой [10], а у спортсменов-северян, по сравнению с жителями более комфортного климата, увеличение VC является адаптивной реакцией, позволяющей улучшить параметры кондиционирования воздуха.

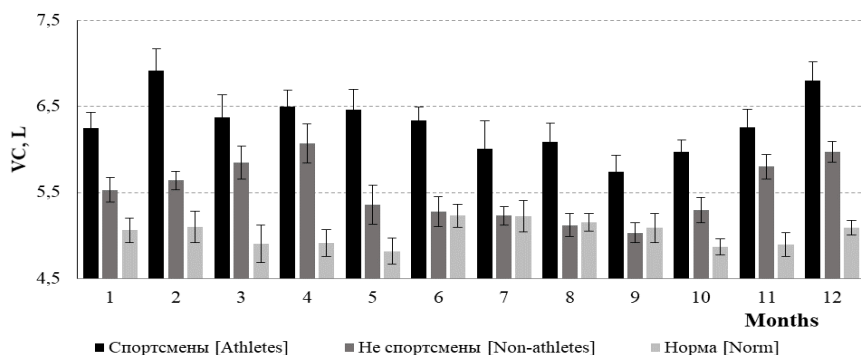


Рис. 2. Жизненная емкость легких (VC) в годовом цикле у лыжников-гонщиков ($p < 0,05$) и мужчин, не занимающихся спортом ($p < 0,001$). Цифрами 1–12 по оси X обозначены месяцы с января по декабрь; по оси Y – жизненная емкость легких (л)
[Fig. 2. Vital lung capacity (VC) in the annual cycle of ski racers ($p < 0.05$) and non-athletes ($p < 0.001$).
 Numbers 1–12 on the X-axis - Months from January to December;
 on the Y-axis - Vital lung capacity (VC)]

Форсированная жизненная емкость легких (FVC) у лыжников-гонщиков больше на 0,945 л (20,3%, $p < 0,001$), чем у молодых мужчин, не занимающихся спортом, в среднем равнялась $5,605 \pm 0,094$ л, в годовом цикле различалась ($p < 0,001$) (см. табл. 1) [9]. Наибольшее среднemesячное значение FVC у мужчин выявлено в декабре, наименьшее – в октябре; разница составила 1,476 л (23,0%). У спортсменов FVC в декабре больше, чем в сентябре и октябре, а в октябре меньше, чем в феврале, апреле и декабре.

Динамика FVC зависит от сезонных изменений внешней среды [4]. У обследованных нами спортсменов значения FVC в годовом цикле колебались от 105,3% (октябрь) до 130,1% (декабрь) должных величин [20], что больше показателей, предлагаемых рядом авторов [4, 8, 21]. У человека FVC меньше VC [20, 22] за счет сужения просвета мелких бронхов на 200–300 мл [22]. У обследованных нами спортсменов при форсированном выдохе эта разница в среднем достигает 704 мл, являясь, по-видимому, признаком обструкции дыхательных путей у северян, не достигающей клинически значимых величин. У лыжников-гонщиков FVC больше должных значений, чем у жителей комфортного климата, и разница между VC и FVC (704 мл против

200–300 мл в норме), вероятно, свидетельствует о наличии бронхоспазма и обструктивных явлений. Спортсмены (лыжные гонки, биатлон), занимающиеся зимними видами спорта, повседневная активность которых связана с повторяющимися интенсивными нагрузками в условиях низких влажности и температуры окружающей среды, составляют группу риска по развитию синдрома бронхообструкции. Ведущим механизмом развития бронхоспазма, вызванного физической нагрузкой, является повышение осмолярности золя, выстилающего реснитчатый эпителий респираторного тракта, с последующей дегрануляцией тучных клеток и сокращением гладкой мускулатуры бронхов. У спортсменов с диагностированным бронхоспазмом определен более низкий исходный уровень NO в выдыхаемом воздухе [23].

Резервный объем вдоха (IRV). Резервные объемы вдоха и выдоха определяют способность дыхательной мускулатуры увеличивать количество вентилируемого воздуха, и северяне обладают большей возможностью для увеличения легочной вентиляции [10, 22]. В годовом цикле у спортсменов IRV статистически значимо различался ($p < 0,05$, F-критерий) и в среднем равнялся $1,914 \pm 0,123$ л (табл. 2).

Таблица 2 [Table 2]

Резервные объемы вдоха (IRV) и выдоха (ERV), объем форсированного выдоха за первые полсекунды (FEV0.5) и секунду (FEV1), индекс Тиффно (FEV1/FVC) у лыжников-гонщиков в годовом цикле
[Inspiratory (IRV) and expiratory (ERV) reserve volumes, forced expiratory volume in the first half second (FEV0.5) and the second (FEV1),
Tiffeneau-Pinelli index (FEV1/FVC) in ski racers in the annual cycle] ($M \pm m_M, n$)

Месяцы (номер) [Months (number)]	IRV, L #	ERV, L ##	FEV0.5, L ##	FEV1, L #	FEV1/ FVC
1	1,794 $\pm$ 0,268; 19	4,136 $\pm$ 0,252; 19	3,548 $\pm$ 0,161; 18	4,853 $\pm$ 0,183; 18	80,5 $\pm$ 2,9; 18
2	1,994 $\pm$ 0,293; 11	4,701 $\pm$ 0,431; 12&	3,737 $\pm$ 0,177; 10	5,455 $\pm$ 0,239; 11*10&&&	79,8 $\pm$ 2,0; 11
3	2,575 $\pm$ 0,312; 16&&	3,010 $\pm$ 0,324; 17	3,290 $\pm$ 0,223; 16	4,734 $\pm$ 0,201; 17	76,1 $\pm$ 2,3; 17
4	2,103 $\pm$ 0,239; 15	4,043 $\pm$ 0,308; 16	3,426 $\pm$ 0,239; 14	4,980 $\pm$ 0,205; 16	77,9 $\pm$ 3,2; 15
5	1,539 $\pm$ 0,336; 14	4,687 $\pm$ 0,398; 14	3,823 $\pm$ 0,130; 13	5,164 $\pm$ 0,255; 14	80,2 $\pm$ 3,3; 14
6	1,756 $\pm$ 0,340; 18	4,396 $\pm$ 0,244; 19	2,766 $\pm$ 0,315; 19	4,638 $\pm$ 0,156; 19	76,5 $\pm$ 2,5; 17
7	2,217 $\pm$ 0,348; 10	3,327 $\pm$ 0,458; 10&	3,557 $\pm$ 0,144; 9	4,688 $\pm$ 0,197; 10	75,5 $\pm$ 3,6; 9
8	1,126 $\pm$ 0,185; 7&&	4,411 $\pm$ 0,240; 8	3,479 $\pm$ 0,286; 8	4,813 $\pm$ 0,291; 8	78,7 $\pm$ 2,6; 8

Окончание табл. 2 [Table 2 (end)]

Месяцы (номер) [Months (number)]	IRV, L #	ERV, L ##	FEV0.5, L ##	FEV1, L #	FEV1/ FVC
9	1,301±0,254; 15	4,013±0,309; 16	3,300±0,141; 15	4,655±0,169; 15	81,3±1,9; 15&
10	2,126±0,117; 19	3,485±0,245; 20	2,928±0,255; 19	4,438±0,145; 19*2&&&	74,8±2,4; 18&
11	2,483±0,355; 13	3,463±0,431; 13	2,879±0,385; 13&	4,926±0,187; 12	77,3±3,3; 12
12	1,955±0,295; 10	4,277±0,474; 10	3,893±0,222; 9&	5,328±0,265; 10	78,5±3,3; 10

Примечание. Месяцы (номер) – нумерация месяцев с января (1) по декабрь (12). ### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$ и # – $p < 0,05$ (F – критерий, статистически значимые изменения показателя в годовом цикле); * – $p < 0,05$ (t – критерий с поправкой Бонферрони, цифрами после звездочек обозначены месяцы обследования, с которыми показатель данного месяца имеет статистически значимые различия), &&& – $p < 0,001$, && – $p < 0,01$, & – $p < 0,05$ (t – критерий, сравнение между максимальным и минимальным значениями показателя). [Note. Months (number) is a month number from January (1) to December (12). ### is $p < 0.001$; ## is $p < 0.01$ and # is $p < 0.05$ (F - criterion, significant changes in the indicator in the annual cycle); * is $p < 0.05$ (t is the Bonferroni correction criterion, the numbers after the stars indicate the months of the survey with which the indicator of a given month has significant differences), &&& is $p < 0.001$, && is $p < 0.01$, & is $p < 0.05$ (t is the criterion, comparison between the maximum and minimum values of the indicator)].

Наибольшее среднemesячное значение IRV характерно для марта, наименьшее – для августа, разница составила 1,449 л (56,3%). У лыжников-гонщиков IRV больше на 0,224 л (13,3%, $p < 0,05$), чем у молодых мужчин-спортсменов [9], и меньше на 0,937 мл, чем у практически здоровых мужчин от 21 года до 46 лет, жителей Украины [8] и лыжников Челябинска, кроме марта–апреля, июля и октября–ноября [4]. Весной (март) IRV больше на 17,7% (см. табл. 2), чем у студентов Архангельска [10], а летом – меньше на 27,9%. Авторы [3, 10], в отличие от нашего исследования, не выявили сезонного изменения показателя. У спортсменов в нашей выборке IRV составил 30,3% VC, что больше, чем в работе R. Selig [14].

Резервный объем выдоха (ERV). В годовом цикле ERV зависел от сезонных изменений внешней среды [4] и значимо различался по F-критерию ($p < 0,01$). У обследованных нами лыжников-гонщиков ERV составил в среднем $3,996 \pm 0,147$ л, что больше на 1,486 л (59,2%, $p < 0,001$), чем у молодых мужчин, не занимающихся спортом [9], больше на 1,196 л, чем у мужчин 18–23 лет, постоянно проживающих на Европейском Севере [13], больше на 2,044 л, чем у мужчин Украины [8]. Максимальное среднemesячное значение показателя характерно для февраля, минимальное – для марта, разница составила 1,691 л (36,0%, $p < 0,05$). Среднemesячная величина ERV у спортсменов 63,3% VC, что превышало приводимые данные в литературе [14, 22]. Зимой (февраль) ERV выше на 34,9% (см. табл. 2), а весной (март) – на 8,0%, чем у студентов Архангельска [10]. Существует представление об

уровне дыхания, рассчитанном по формуле ERV/IRV [22]. Если уровень дыхания ниже единицы (т.е. объем выдоха меньше, чем вдоха), то эффективность вентиляции больше, и наоборот. Уровень дыхания у лыжников-гонщиков 2,1, что, вероятно, свидетельствует о недостаточно эффективной вентиляции у обследованных нами лиц.

Согласно исследованиям В.Ю. Куликова и Л.Б. Ким (1987), адаптивные изменения FER у приезжих на Северо-Востоке протекают в две фазы. В первой фазе в течение первого года происходит перераспределение легочных объемов, при котором часть ERV переходит в остаточный объем. Уменьшение ERV сопровождается уменьшением IRV , в результате чего резервы вентиляции снижаются наполовину. Во второй фазе адаптации IRV и ERV постепенно восстанавливаются. Большой остаточный объем и большая функциональная остаточная емкость легких не только предохраняют легочную ткань от случайного охлаждения, но и позволяют стабильно увеличивать V_t в случае необходимости [15]. У мужчин и спортсменов в условиях Севера объем вдоха в большинстве случаев меньше, а объем выдоха – больше нормы, что может быть связано с адаптивной реакцией на проживание в холодном климате.

Объем форсированного выдоха за первые полсекунды ($FEV_{0.5}$). Интегральным показателем бронхиальной проходимости и усилия, развиваемого дыхательными мышцами, является величина объема форсированного выдоха. У спортсменов $FEV_{0.5}$ в среднем $3,386 \pm 0,095$ л и статистически значимо ($p < 0,01$) различался в годовом цикле (см. табл. 2). Наибольший среднемесячный $FEV_{0.5}$ характерен для декабря, наименьший – для июня, годовые колебания показателя составили 1,127 л (28,9%). Полученные нами величины $FEV_{0.5}$ для лыжников-гонщиков, проживающих на Европейском Севере, больше на 25,9% ($p < 0,001$), чем у мужчин, не занимающихся спортом [9], и у мужчин 18–23 лет Архангельска [13], но соответствовали значению этого показателя для мужчин Магадана [21].

Объем форсированного выдоха за первую секунду (FEV_1). Из всех показателей функции дыхания FEV_1 является наиболее важным [24–25]. Он относительно независим от усилия, приложенного во время маневра выдоха, и отражает свойства легких и дыхательных путей. Это наиболее воспроизводимый, часто используемый и самый информативный показатель спирометрии [24], отражает состояние проходимости бронхов, может снижаться как при обструктивных, так и при рестриктивных вентиляционных нарушениях [25].

У лыжников-гонщиков FEV_1 в среднем $4,889 \pm 0,087$ л и различался в годовом цикле ($p < 0,05$, F-критерий). Максимальный и минимальный его варианты в феврале и октябре также имели статистически значимые ($p < 0,001$, t -критерий) различия друг с другом на 1,017 л (18,6%) (табл. 2, рис. 3) и составляли от 105,6 до 131,3% должных значений [20].

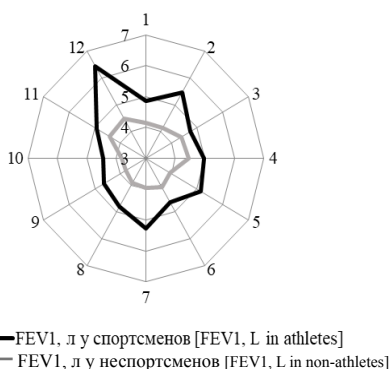


Рис. 3. Объем форсированного выдоха за первую секунду у лыжников-гонщиков ($p < 0,05$) и мужчин, не занимающихся спортом ($p < 0,01$), в годовом цикле. 1–12 – нумерация месяцев с января (1) по декабрь (12).

Вертикальный столбец цифр (3–7) – литры

[Fig. 3. The forced expiratory volume in the first second (FEV1) in ski racers ($p < 0.05$) and non-athletic men ($p < 0.01$) in the annual cycle. Numbers 1-12 indicate month numbers from January (1) to December (12). Vertical bar of numbers (3, 4, 5, 6 and 7) indicates liters]

В качестве объективного подтверждения бронхоспазма рассматривается снижение FEV1 на 10% и более [23]. В наших исследованиях годовой дрейф показателя составил 18,6%, причем кроме апреля–мая и ноября–декабря FEV1 меньше на 11,0–15,0%, чем в феврале, однако в нашем случае это не может рассматриваться как развитие бронхоспазма, а скорее всего это рост тренированности дыхательной системы и адаптации ее к погодным условиям региона. У спортсменов, обследованных нами FEV1 больше на 0,759 мл (18,4%, $p < 0,001$), чем у мужчин аналогичного возраста и роста, не занимающихся спортом [9], и практически здоровых мужчин 21 года – 46 лет Украины [8]. У лыжников-гонщиков FEV1 составил 77,4% VC, что подтверждается и уже опубликованными работами [9, 14, 20].

Показатели FEV0.5 и FEV1 содержат информацию о препятствии для потока воздуха. Они могут быть меньше при процессах, снижающих скорость выдоха, при уменьшении общей емкости легких. У обследованной нами группы мужчин значения FEV1 больше должных величин [20] на 6,9–23,3%. У молодых жителей Магадана (8–28 лет) FEV1 находился в пределах должных значений [21]. При исследовании методом спирометрии 18 элитных лыжников-гонщиков после прохождения 2,5 км показано снижение FEV1 на 10% у 9 испытуемых. По мнению авторов [26], бронхоконстриктивная дисфункция при физической нагрузке отличается от таковой при бронхиальной астме, еще не имеет четкого определения и после длительной физической нагрузки может влиять на работоспособность. Однако [27] распространенность бронхоспазма среди лыжников и биатлонистов, вызванного физической нагрузкой, невысока и составляет менее 6,5%.

Индекс Тиффно (FEV1/FVC) – важный спирометрический показатель, особенно при необходимости дифференцировать обструктивные и ре-

стриктивные нарушения [24]. В годовом цикле индекс Тиффно (в среднем $78,1 \pm 1,2\%$) не имел статистических различий ни по F, ни по t-критериям (см. табл. 2) и соответствовал значениям для здорового человека: 75–85% [24], или 75–83% [18].

Максимальное среднемесячное его значение зарегистрировано в сентябре, минимальное – в октябре, годовые колебания индекса составили 11,5%. У лыжников-гонщиков индекс Тиффно больше на 2,6 единицы (3,4%, $p < 0,05$), чем у спортсменов [9].

Легочная вентиляция зависит от сопротивления дыхательных путей воздушному потоку и растяжимости (комплаентности) легких и грудной клетки [7]. Известно [28], что элитные спортсмены, тренирующиеся на выносливость, испытывают сезонные колебания реактивности дыхательных путей. Конкретные стимулы, которые вызывают это, неизвестны, но предполагается, что это связано с воздействием холодного сухого воздуха и/или вдыхаемых раздражителей [28]. Отмечено повышение бронхиальной реактивности в соревновательный сезон у лыжников-гонщиков в период прохождения ими военной службы по сравнению с обычными призывниками. У лыжников в соревновательный период в бронхах имелись лимфоидные агрегаты и признаки бронхиального ремоделирования [19].

Таким образом, у тренирующихся лыжников-гонщиков FER испытывает влияние как погодно-климатических условий региона, так и тренировочного процесса. В ранней нашей работе [9] у молодых мужчин, не занимающихся спортом, в годовом цикле выявлено влияние месяца как фактора на объёмные характеристики FER. Наибольшее влияние климатические условия месяца оказывали на VC, FVC и MV (соответственно, 15,7; 15,5 и 12,6%; $p < 0,05–0,01$). Индекс Тиффно и EVR не имели статистически значимых влияний месяца обследования. На остальные показатели: Vt, IRV, FEV0.5 и FEV1 – влияние месяца как фактора составляло 7,5–9,9% ($p < 0,05–0,01$). У лыжников-гонщиков тренировочный процесс оказывал наибольшее влияние по сравнению с не занимающимися спортом, вызывая увеличение EVR – 59,2%, FEV0.5 – 25,9%, FVC – 20,3%, а также FEV1 – 18,4%, VC – 14,1%, Vt – 13,9%, IRV – 13,3%, индекс Тиффно – 3,4% и уменьшение MV на 9,1%.

У лыжников-гонщиков 4 из 9 показателей достигли своего пика в феврале, у мужчин, не занимающихся спортом, – в декабре и апреле (по три показателя). Минимальные значения показателей FER у спортсменов характерны для сентября–октября (по 3 показателя), у спортсменов – для сентября (4 показателя из 9). По-видимому, у лыжников-гонщиков, постоянно выполняющих максимальные физические нагрузки на открытом воздухе, адаптация FER к холодному периоду года происходит на два месяца раньше (февраль), чем у мужчин-спортсменов (апрель). Наиболее благоприятные условия для функционирования FER в обеих группах характерны для сентября, а у спортсменов пролонгируются и на октябрь. По мнению Г.С. Шишкина с соавт. [6], функциональную организацию системы внешне-

го дыхания в летнее время года можно считать базовой, поскольку уровень энергетических процессов в организме в это время самый низкий [6]. Мы же на основе изучения годового цикла FER считаем, что это период позднего лета и ранней осени.

Выводы

1. Максимальные значения легочных объемов у лыжников-гонщиков выявлены в холодное время года (с ноября по март), минимальные – в теплое (с июня по октябрь). Диапазоны годового дрейфа показателей составляют от 11,5 до 56,3% и наиболее выражены для резервных объемов вдоха и выдоха, дыхательного объема.

2. Для лыжников-гонщиков, проживающих и тренирующихся в условиях Севера, по сравнению с мужчинами, не занимающимися спортом, характерны увеличенные дыхательный объем, жизненная и форсированная емкости легких, резервные объемы вдоха и выдоха, объем форсированного выдоха за полсекунды и секунду, индекс Тиффно и уменьшенный минутный объем дыхания.

3. У лыжников-гонщиков, по сравнению с мужчинами, не занимающимися спортом, адаптация респираторной системы к холодному периоду года начинается раньше на два месяца, а период более комфортного состояния функции длится дольше на один месяц.

4. У спортсменов в течение годового погодно-климатического цикла происходит более глубокое remodelирование дыхательной системы, обусловленное тренировочным процессом, по сравнению с мужчинами-неспорсменами.

Литература

1. Попов Д.В., Грушин А.А., Виноградова О.Л. Физиологические основы оценки аэробных возможностей и подбора тренировочных нагрузок в лыжном спорте и биатлоне. М. : Советский спорт, 2014. 78 с.
2. Бреслав И.С., Ноздрачев А.Д. Дыхание. Висцеральный и поведенческий аспекты. М. : Наука, 2005. 309 с.
3. Гудков А.Б., Мануйлов И.В., Торшин В.И., Попова О.Н., Лукманова Н.Б. Сезонные изменения параметров внешнего дыхания у лыжников массовых спортивных разрядов в условиях Европейского Севера // Экология человека. 2016. № 7. С. 31–36.
4. Эберт Л.Я., Сашенков С.Л., Колупаев В.А. Динамика показателей систем внешнего дыхания и кровообращения у спортсменов с анаэробной и аэробной направленностью тренировочного процесса по сезонам года // Медико-биологические проблемы. 2005. № 28. С. 115–120.
5. Sue-Chu M. Winter sports athletes: long-term Effects of cold air exposure // British Journal of Sports Medicine. 2012. № 6. PP. 397–401. doi: [10.1136/bjsports-2011-090-822](https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090-822)
6. Shishkin G.S., Ustyuzhaninova N.V., Gulyaeva V.V. Changes in the functional organization of the respiratory system in residents of Western Siberia in the winter season // Human Physiology. 2014. № 1. PP. 91–96. doi: [10.7868/S0131164614010159](https://doi.org/10.7868/S0131164614010159)
7. Lutfi M.F. The physiological basis and clinical significance of lung volume measurements // Multidisciplinary Respiratory Medicine. 2017. № 9. PP. 1–12. doi: [10.1186/s40248-017-0084-5](https://doi.org/10.1186/s40248-017-0084-5)

8. Норе́йко С.Б. Состояние функции внешнего дыхания здоровых людей молодого возраста // Физическое воспитание студентов. 2012. № 1. С. 84–86.
9. Varlamova N.G., Evdokimov V.G., Boiko E.R., Kochan T.I., Kaneva A.M., Rogachevskaya O.V. External Function of Young Male Residents of Northern Europe during Annual Cycle // Human Physiology. 2008. № 6. PP. 728–734.
10. Ефимова Н.В., Попова О.Н. Адаптивные реакции внешнего дыхания у здоровых студентов в годовом цикле на Европейском Севере // Экология человека. 2012. № 3. С. 23–27.
11. Krivoschekov S.G., Divert V.E., Melnikov V.N., Vodjanitskij S.N., Girenko L.A. Compative analysis of gas exchange and cardiorespiratory system responses of swimmers and skiers to increasing normobaric hypoxia and physical load // Human Physiology. 2013. № 1. PP. 98–105.
12. Уэст Дж. Физиология дыхания / пер. с англ. Н.Н. Алипова ; под ред. А.М. Генина. М. : Мир, 1988. 200 с.
13. Попова О.Н. Влияние локального охлаждения кожи на некоторые показатели внешнего дыхания человека // Экология человека. 2007. № 2. С. 19–21.
14. Селиг Р. Функциональное исследование системы дыхания // Справочник по клиническим функциональным исследованиям / под ред. А. Гиттера, Л. Хейльмейера. М. : Медицина, 1966. С. 125–159.
15. Куликов В.Ю., Ким Л.Б. Кислородный режим при адаптации человека на Крайнем Севере. Новосибирск : Наука, 1987. 158 с.
16. Бойко Е.Р., Логинова Т.П., Варламова Н.Г., Марков А.Л., Солонин Ю.Г., Дерновой Б.Ф., Паршукова О.И., Монгалев Н.П., Людинина А.Ю., Потолицына Н.Н., Есева Т.В., Гарнов И.О., Ветров А.И., Нутрихин А.В., Черных А.А., Прошева В.И., Ватлин А.В., Рубцова Л.Ю., Кучин А.В., Ценке Д. Физиолого-биохимические механизмы обеспечения спортивной деятельности зимних циклических видов спорта. Сыктывкар : Коми республиканская типография, 2019. 256 с.
17. Гудков А.Б., Лабу́тин Н.Ю. Влияние специфических факторов Заполярья на функциональное состояние организма человека // Экология человека. 2000. № 2. С. 18–20.
18. Величковский Б.Т. Причины и механизмы низкого коэффициента использования кислорода в легких человека на Крайнем Севере // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2013. № 2 (90). С. 97–101.
19. Carlsen K.H., Anderson S.D., Bonini S., Brusasco V., Cahonica W., Cummiskey J., Delgado L., Del Giacco S.R., Drobnic F., Haahtela T., Larss K., Palange P., Popov T., Van Cauwenberge P. Exercise-induced asthma, respiratory and allergic disorders in elite athletes: epidemiology, mechanisms and diagnosis: Part 1 of the report from the Join: Task Force of the European Respiratory Society (ERS) and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) in cooperation with GA2LEN // European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2008. № 63. PP. 378–403. doi: [10.1111/j.1398-9995.2008.01662.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01662.x).
20. Старшов А.М., Смирнов И.В. Спирография для профессионалов. Методика и техника исследования функций внешнего дыхания. М. : Познавательная книга ПРЕСС. 2003. 80 с.
21. Bartosh O.P., Sokolov A.Ya. Regional characteristics of external respiration under the environmental conditions of northeastern Russia // Human Physiology. 2006. № 3. PP. 308–315.
22. Дембо А.Г. Легочные объемы. Физиология дыхания. Л. : Наука, 1973. С. 4–18.
23. Никитина Л.Ю., Соодаева С.К., Петровский Ф.И. Модификация респираторного метаболизма оксида азота у лыжников и биатлонистов с бронхоспазмом, вызванным физической нагрузкой // Фундаментальные исследования. 2015. № 1. С. 798–804.
24. Чучалин А.Г., Айсанов З.Р., Чикина С.Ю., Черняк А.В., Калманова Е.Н. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по использованию метода спирометрии // Пульмонология. 2014. № 6. С. 11–24. doi: [10.18093/0869-0189-2014-0-6-11-24](https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-6-11-24)

25. Ковалькова Н.А., Травникова Н.Ю., Рагино Ю.И., Воевода М.И. Распространенность дисфункции внешнего дыхания у молодых людей // Терапевтический архив. 2017. № 3. С. 38–42. doi: [10.17116/terarkh201789338-42](https://doi.org/10.17116/terarkh201789338-42)
26. Rundell K.W., Spiering B.A., Judelson D.A., Wilson M.H. Bronchoconstriction During Cross-Country Skiing. Is There Really a Refractory Period? // Medicine & Science in Sports & Exercise. 2003. № 1. PP. 18–26.
27. Никитина Л.Ю., Соодаева С.К., Петровский Ф.И., Петровская Ю.А., Котлярова В.Н., Шашкова Т.В., Чучалин А.Г. Скрининг бронхообструкции, вызванной физической нагрузкой, у лыжников и биатлонистов в различные периоды годового тренировочного цикла // Пульмонология. 2013. № 2. С. 61–65.
28. Hemingson N.B., Davis B.E., Cockcroft D.W. Seasonal Fluctuation in Airway Responsiveness in Elite Athletes // Canadian Respiratory Journal. 2004. № 11. PP. 399–401.

*Поступила в редакцию 30.09.2020 г.; повторно 17.06.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.*

Авторский коллектив:

Варламова Нина Геннадьевна, канд. биол. наук, доцент, с.н.с. отдела экологической и медицинской физиологии, Институт физиологии Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (Россия, 167982, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, 50).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1444-4684>

E-mail: nivarlam@physiol.komisc.ru

Бойко Евгений Рафаилович, д-р мед. наук, профессор, директор, Институт физиологии Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (Россия, 167982, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, 50).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8027-898X>

E-mail: boiko60@inbox.ru

For citation: Varlamova NG, Boiko ER. Volumetric characteristics of the external respiration function in ski racers in the annual cycle. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:77-96. doi: 10.17223/19988591/55/5 In Russian, English Summary

Nina G. Varlamova, Evgeny R. Boiko

Institute of Physiology of the Federal Research Center “Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation

Volumetric characteristics of the external respiration function in ski racers in the annual cycle

The state of the external respiration system is one of the most important factors determining the functional capabilities of the body of athletes and the effectiveness of sports activities. Indicators of its functioning among northerner athletes are modulated not only by the training process, but also by climatic and geographical factors. Literature data on the study of the function of external respiration in ski racers in the annual cycle are absent, there are only works considering seasons or some months of the year. Therefore, the aim of our work is to study the volumetric characteristics of the function of external respiration in the annual cycle of ski racers living and training

in the European North, which is important for understanding the mechanisms of adaptation to environmental conditions during sports activities, as well as the influence of environmental conditions on the success of training and competitive processes.

Seventy people aged 16-34 years (20.2 ± 0.6 years) participated in the study. Participants were professional athletes living in the territory of the European North (62°N , 51°E) practically since birth. Studies were carried out monthly for 7 years. Every subject's height and body weight were measured during the tests. External respiration function (FEV) was determined using microprocessor spiograph SPM-01-"R-D" of the All-Union Scientific Research Institute of Medical Instruments and Equipment (Russia) in a sitting position. The height of ski racers was 175.9 ± 0.6 cm; their body weight was 69.4 ± 0.7 kg. In the annual cycle, the following was studied: tidal volume of respiration (V_t) and minute volume of respiration (MV), vital (VC) and forced vital (FVC) lung capacity, inspiratory (IRV) and expiratory (ERV) reserve volumes, forced expiratory volume in 0.5 second (FEV_{0.5}) and forced expiratory volume in 1 second (FEV₁), as well as Tiffeneau-Pinelli index (FEV₁/FVC). The obtained data were processed using Fisher's and Student's tests with the Bonferroni correction. Data were presented as arithmetic mean and mean error ($M \pm m_m$). The studies were conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki 1964, as modified by the WMA General Assemblies from 1975 to 2013. The methods were approved by the bioethics committee of the Komi Scientific Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russia).

For ski racers, for the first time, the values of volumetric characteristics of the function of external respiration were determined and the ranges of annual changes in these indicators were identified, which are from 56.3 to 11.5% and are most pronounced for inspiratory and expiratory reserve volumes, as well as the tidal volume. We established that ski racers who live and train in the North, compared to non-athletic men, are characterized by increased tidal volume (12.6%), vital capacity (15.7%) and forced vital capacity (15.5%), inspiratory and expiratory reserve volumes (59.2%), forced expiratory volume in a half-second and a second (0.5-25.9%), Tiffeneau-Pirelli index (3.4%) and reduced minute ventilation (9.1%) (See Tables 1 and 2). The annual dynamics of indicators of the function of external respiration made it possible to determine February as the month with maximum adaptation to the climatic conditions of the cold period of the year against the background of the competitive period and September-October as months favorable for the function of the respiratory system against the background of the preparatory training period (See Fig. 1 and 2). Apparently, for ski racers, the adaptation of the respiratory system to the cold period of the year occurs two months earlier than for non-athletic men, and the period of a more comfortable functional state lasts one month longer. Athletes during the annual weather - climate cycle have a deeper remodeling of the respiratory system, compared to non-athletic men, due to living in a cold climate and the training process. The identified features of the functioning of the respiratory system in ski racers allow more purposeful planning of the training process and measures of health correction in the North.

Key words: external respiration function remodeling; hyperventilation; lung volume

The paper contains 3 Figures, 2 Tables and 28 References.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Popov DV, Grushin AA, Vinogradova OL. Fiziologicheskie osnovy otsenki aerobnykh vozmozhnostey i podbora trenirovochnykh nagruzok v lyzhnom sporte i biatlone [Physiological basis of aerobic capacity assessment and training load selection in skiing and biathlon]. Moscow: Sovetskiy sport Publ.; 2014. 78 p. In Russian

2. Breslav IS, Nozdrachev AD. Dykhanie. Vistseral'nyy i povedencheskiy aspekty [Respiration. Visceral and behavioral aspects]. Moscow: Nauka Publ.; 2005. 309 p. In Russian
3. Gudkov AB, Manuilov IV, Torshin VI, Popova ON, Lukmanova NB. Seasonal changes of external respiratory parameters in skiers of mass categories in the conditions of Russian North. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2016;7:31-36. doi: [10.33396/1728-0869-2016-7-31-36](https://doi.org/10.33396/1728-0869-2016-7-31-36) In Russian
4. Ebert LYa, Sashenkov SL, Kolupaev VA. Dinamika pokazateley sistem vneshnego dykhaniya i krovoobrashcheniya u sportsmenov s anaerobnoy i aerobnoy napravlennost'yu trenirovochnogo protsessa po sezonam goda [Dynamics of external respiration and circulatory system indicators in athletes with anaerobic and aerobic orientation of the training process according to the seasons of the year]. *Mediko-biologicheskie problemy*. 2005;28:115-120.
5. Sue-Chu M. Winter sports athletes: long-term Effects of cold air exposure. *British Journal of Sports Medicine*. 2012;6:397-401. doi: [10.1136/bjsports-2011-090-822](https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090-822)
6. Shishkin GS, Ustyuzhaninova NV, Gulyaeva VV. Changes in the functional organization of the respiratory system in residents of Western Siberia in the winter season. *Human Physiology*. 2014;1:91-96. doi: [10.7868/S0131164614010159](https://doi.org/10.7868/S0131164614010159)
7. Lutfi MF. The physiological basis and clinical significance of lung volume measurements. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*. 2017;9:1-12. doi: [10.1186/s40248-017-0084-5](https://doi.org/10.1186/s40248-017-0084-5)
8. Noreyko SB. State of function of external breathing of healthy people of young age. *Fizicheskoe vospitanie studentov = Physical Education of Students*. 2012;1:84-86. In Russian
9. Varlamova NG, Evdokimov VG, Boiko ER, Kochan TI, Kaneva AM, Rogachevskaya OV. External respiration function of young male residents of Northern Europe during annual cycle. *Human Physiology*. 2008;6:728-734. doi: [10.1134/S0362119708060108](https://doi.org/10.1134/S0362119708060108)
10. Efimova NV, Popova ON. Adaptive responses of external respiration in healthy students annual cycle in European North. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2012;3:23-27. In Russian
11. Krivoschekov SG, Divert VE, Melnikov VN, Vodjanitskiy SN, Girenko LA. Comparative analysis of gas exchange and cardiorespiratory system responses of swimmers and skiers to increasing normobaric hypoxia and physical load. *Human Physiology*. 2013;39:98-105. doi: [10.1134/S0362119712060072](https://doi.org/10.1134/S0362119712060072)
12. West JB. Respiratory physiology – The Essentials. Alipov NN, translated from English; Genin AM, editor. Moscow: Mir Publ.; 1988. 200 p. In Russian
13. Popova ON. Impact of skin local cooling on some indices of human external respiration. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2007;2:19-21. In Russian
14. Selig R. Funktsional'noe issledovanie sistemy dykhaniya [Functional examination of the respiratory system]. In: *Spravochnik po klinicheskim funktsional'nyim issledovaniyam* [Handbook of clinical functional investigations]. Gittera A and Khey'l'meyera L, editors. Moscow: Meditsina Publ.; 1966. pp. 125-159. In Russian
15. Kulikov VYu, Kim LB. Kislorodnyy rezhim pri adaptatsii cheloveka na Kraynem Severe [Oxygen regime during human adaptation in the Far North]. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch Publ.; 1987. 158 p. In Russian
16. Boyko ER, Loginova TP, Varlamova NG, Markov AL, Solonin YuG, Dernovoy BF, Parshukova OI, Mongalev NP, Lyudinina AYU, Potolitsyna NN, Eseva TV, Garnov IO, Vetrov AI, Nutrikhin AV, Chernykh AA, Prosheva VI, Vatlin AV, Rubtsova LYU, Kuchin AV, Tsenke D. Fiziologo-biokhimicheskie mekhanizmy obespecheniya sportivnoy deyatel'nosti zimnikh tsiklicheskiykh vidov sporta [Physiological and biochemical mechanisms of ensuring sports activity of winter cyclic sports]. Syktyvkar: OOO "Komi respublikanskaya tipografiya"; 2019. 256 p. In Russian

17. Gudkov AB, Labutin NYu. Vliyanie spetsificheskikh faktorov Zapolyar'ya na funktsional'noe sostoyanie organizma cheloveka [Influence of specific factors of the Arctic on the functional state of the human body]. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2000;2:18-20. In Russian
18. Velichkovsky BT. Low coefficient causes and mechanisms of using oxygen in human lungs in the Far North. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Tsentra Sibirskogo Otdeleniya Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk = Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. 2013;2(90):97-101. In Russian
19. Carlsen KH, Anderson SD, Bonini S, Brusasco V, Cahonica W, Cummiskey J, Delgado L, Del Giacco SR, Drobnic F, Haahtela T, Larss K, Palange P, Popov T, Van Cauwenberge P. Exercise-induced asthma, respiratory and allergic disorders in elite athletes: epidemiology, mechanisms and diagnosis: Part 1 of the report from the Join: Task Force of the European Respiratory Society (ERS) and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) in cooperation with GA2LEN. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;63:378-403. doi: [10.1111/j.1398-9995.2008.01662.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01662.x)
20. Starshov AM, Smirnov IV. Spirografiya dlya professionalov. Metodika i tekhnika issledovaniya funktsiy vneshnego dykhaniya. [Spirography for professionals. Method and technique for studying the function of external respiration]. Moscow: Poznavatel'naya kniga PRESS; 2003. 80 p. In Russian
21. Bartosh OP, Sokolov AY. Regional characteristics of external respiration under the environmental conditions of northeastern Russia. *Human Physiology*. 2206;32:308-315. doi: [10.1134/S0362119706030108](https://doi.org/10.1134/S0362119706030108)
22. Dembo AG. Legochnye ob'emy. Fiziologiya dykhaniya [Lung volumes. Respiratory physiology]. Leningrad: Nauka Publ.; 1973. pp. 4-18. In Russian
23. Nikitina LYu, Soodaeva SK, Petrovskiy FI. Modification of nitric oxide respiratory metabolism in skiers and biathlons with exercise-induced. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*. 2015;1:798-804. In Russian
24. Chuchalin AG, Aysanov ZR, Chikina SY, Chernyak AV, Kalmanova EN. Federal guidelines of Russian Respiratory Society on spirometry. *Pul'monologiya*. 2014;6:11-24. doi: [10.18093/0869-0189-2014-0-6-11-24](https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-6-11-24) In Russian
25. Koval'kova NA, Travnikova NYu, Ragino YuI, Voevoda MI. Prevalence of external respiratory dysfunction in young people. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017;3:38-42. doi: [10.17116/terarkh201789338-42](https://doi.org/10.17116/terarkh201789338-42) In Russian, English Summary
26. Rundell KW, Spiering BA, Judelson DA, Wilson M.H. Bronchoconstriction During Cross-Country Skiing. Is There Really a Refractory Period? *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2003;1:18-26.
27. Nikitina LYu, Soodaeva SK, Petrovskiy FI, Petrovskaya YuA, Kotlyarova VN, Shashkova TV, Chuchalin AG. Screening of exercise-induced bronchoconstriction in skiers and biathlons at different periods of annual training cycle. *Pul'monologiya*. 2013;2:61-65. doi: [10.18093/0869-0189-2013-0-2-61-65](https://doi.org/10.18093/0869-0189-2013-0-2-61-65)
28. Hemingson NB, Davis BE, Cockcroft DW. Seasonal fluctuation in airway responsiveness in elite athletes. *Canadian Respiratory Journal*. 2004;11:399-401.

*Received 30 September 2020; Revised 17 June 2021;
Accepted 27 July 2021; Published 29 September 2021.*

Author info:

Varlamova Nina G, Candidate of Sci. (Biol.), Assoc. Professor, Senior Researcher, Department of Environmental and Medical Physiology, Institute of Physiology of the Federal Research Center “Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences” (GSP-2, 50 Pervomaiskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1444-4684>

E-mail: nivarlam@physiol.komisc.ru

Boiko Evgeny R, Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Institute of Physiology of the Federal Research Center “Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences” (GSP-2, 50 Pervomaiskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8027-898X>

E-mail: boiko60@inbox.ru

УДК 615.013, 57.085.23, 543.423

doi: 10.17223/19988591/55/6

**А.И. Касатова^{1,2}, В.В. Каныгин¹, Е.Л. Завьялов^{1,3},
И.А. Разумов^{1,3}, А.И. Кичигин¹, А.Р. Цыганкова⁴,
О.И. Соловьева³, Д.А. Касатов^{1,2}, В.И. Чернов^{5,6}**

¹Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет, г. Новосибирск, Россия

²Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁴Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁵Томский национальный исследовательский медицинский
центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

⁶Национальный исследовательский Томский политехнический
университет, г. Томск, Россия

Накопление и токсические эффекты борсодержащих препаратов в моделях SW-620

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-01007 с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015)

Для последующего применения бор-нейтронозахватной терапии проведена предварительная оценка токсичности и накопления борсодержащих препаратов на модели колоректальной аденокарциномы человека SW-620 *in vitro* и *in vivo*. Обнаружено, что инкубация клеток SW-620 с борфенилаланином и боркапнатом в течение 24 и 48 ч в концентрациях ¹⁰B 10–320 мкг/мл не оказывает цитотоксического эффекта. Внутривенное введение борфенилаланина в концентрации 350 мг/кг и боркапната в концентрации 100 мг/кг иммунодефицитным мышам SCID также оказалось безопасным, и в течение периода наблюдения (2 мес) летальности не наблюдалось. По данным патоморфологического исследования макроскопических и структурных изменений в органах не обнаружено. Биораспределение ¹⁰B оценено на иммунодефицитных мышях SCID с гетеротопическими подкожными ксенографтами SW-620. После введения внутривенно препаратов BPA и BSH в безопасных дозировках максимальная концентрация ¹⁰B в опухоли зафиксирована на временной точке 2 ч для BPA и 1 ч для BSH и составила 8,7 и 5,7 мкг/г соответственно. Для достижения лучшего накопления ¹⁰B в опухоли требуется проведение дополнительных исследований для определения оптимальных как концентрации, так и способов введения борсодержащих препаратов.

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия; клетки SW-620; борфенилаланин; боркапнат

Сокращения: БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия; BPA – борфенилаланин; BSH – боркапнат.

Для цитирования: Касатова А.И., Каныгин В.В., Завьялов Е.Л., Разумов И.А., Кичигин А.И., Цыганкова А.Р., Соловьева О.И., Касатов Д.А., Чернов В.И. Накопление и токсические эффекты борсодержащих препаратов в моделях SW-620 // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 97–113. doi: 10.17223/19988591/55/6

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, колоректальный рак входит в тройку лидеров по причинам смерти среди прочих онкологических заболеваний [1]. Данный вид онкопатологии стоит на втором месте по распространенности в США, по данным Американского онкологического сообщества [2], и заболеваемость в других экономически развитых странах продолжает расти. Колоректальный рак сопровождается симптомами на поздних стадиях, поэтому часто врачам приходится бороться с распространенным опухолевым процессом. Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – это форма бинарной лучевой терапии, основанная на высокой способности нерадиоактивного ядра ^{10}B поглощать тепловой нейтрон, в результате чего образуются α -частица и ядро лития-7. Данные продукты реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ имеют высокий темп торможения и малую длину пробега, таким образом, выделенная энергия ограничивается размером одной клетки [3]. БНЗТ ранее активно применялась для лечения пациентов со злокачественными глиомами [4], меланомой [5], раком головы и шеи [6]. Описан также ряд онкологических заболеваний, которые пытались лечить при помощи БНЗТ: метастазы в печень, рецидивирующие опухоли молочных желез, менингиома и меланома вульвы [7–10]. Для определения возможности проведения БНЗТ на ускорительном источнике нейтронов в качестве опции лечения пациентов с диагнозом колоректальный рак необходимо провести предварительные исследования на клетках и лабораторных животных. На первом этапе необходимо провести оценку безопасности применяемых препаратов *in vitro* и *in vivo*, а также изучить биораспределение ^{10}B в организме для определения времени максимальной концентрации его в опухоли и минимального в органах и крови. Такой подход позволяет подобрать оптимальные дозы борсодержащих препаратов и время для облучения, когда наибольшее лучевое воздействие придется на опухолевые клетки, накопившие максимум бора.

В большинстве работ по БНЗТ представлены сертифицированные борсодержащие препараты L-р-борфенилаланин (BPA) и боркаптат натрия (BSH). Командой под руководством А. Soloway в США [11] первым синтезирован BSH, который имеет в своем составе 12 атомов ^{10}B . Особенностью его накопления является то, что содержания бора в опухоли и в крови приблизительно сопоставимы, однако соотношение концентрации в опухолевой и окружающей здоровой тканях составляет 3/1 и является подходящим для проведения БНЗТ. Механизм накопления бора в опухоли – пассивная диффузия через опухоль-ассоциированные капилляры. Исследователи из США

вводили BSH внутривенно и внутрикаротидно крысам с внутримозговой опухолью F98. При применении препарата в концентрации 65 мг/кг массы тела летальных случаев и признаков токсичности не описано [12]. В исследованиях Morris et al. отмечено, что при внутривенном введении BSH в дозе 100 мг/кг летальных случаев также не наблюдалось, однако доза 200 мг/кг оказывалась летальной для крыс [13].

ВРА, который начали применять для лечения пациентов с меланомой в 1987 г. [14], содержит только 1 атом ^{10}B в своей структуре. Идея его использования основана на повышенном захвате предшественников меланина меланомой [15]. Однако отмечено также его накопление в беспигментных опухолях, что позволило использовать его для терапии других злокачественных новообразований [16]. Ученые из США изобрели модель для прогноза фармакокинетики ВРА, вводимого пациентам внутривенно. В своей работе они предлагают использовать препарат в дозировке 350 мг/кг [17]. Финские ученые под руководством L. Kankaanranta использовали ВРА в дозе 290–450 мг/кг в клинических исследованиях, однако при внутривенном введении максимальной дозировки отмечены побочные эффекты [18].

Цель данной работы – определение безопасных концентраций препаратов ВРА и BSH для клеточной линии SW-620 и оценка биораспределения ^{10}B после введения этих препаратов иммунодефицитным мышам SCID с гетеротопическими SW-620 ксенографтами.

Материалы и методики исследования

Препараты. В исследовании использованы ВРА и BSH, обогащенные изотопом ^{10}B (> 99,5%, Katchem Ltd., Чехия). Раствор ВРА готовили на деионизованной воде с добавлением фруктозы (Sigma-Aldrich, США) в молярном избытке [19]. Концентрация ^{10}B в готовом растворе составляла 3 350 мкг/мл. BSH растворяли в растворе натрия хлорида 0,9% (Renewal, Россия), с концентрацией ^{10}B 13 630 мкг/мл. Полученные растворы хранили в холодильнике при температуре +4 °C.

Исследование цитотоксичности ВРА и BSH *in vitro*. Линия клеток колоректальной аденокарциномы человека (SW-620) получена в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦИГ СО РАН (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск). Для определения безопасной концентрации препаратов ВРА и BSH применен МТТ-тест. Клетки высевали в 96-луночный планшет по 2×10^4 клеток/лунку. Через сутки в разные лунки добавлены препараты бора до конечных концентраций ^{10}B в растворе: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1 280 мкг/мл по 5 повторов для каждой экспериментальной точки, клетки инкубировали в двух временных интервалах – 24 и 48 ч. Контроль – клетки, которые инкубировали без препаратов. Затем в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора [3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -5- (3-карбоксиметоксифенил) -2- (4-сульфофенил) -2Н] тетразолия с мета-

сульфатом феназина (Cell Titer 96® AQueous One Solution, Promega, США). Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 2 ч, оптическую плотность растворов определяли на планшетном ридере «BioRad iMark Microplate reader» (США) при длине волны 490 нм. Данные представлены как процент выживаемости относительно контроля.

Токсичность при внутривенном введении препаратов бора мышам SCID в стандартных концентрациях. Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманного отношения к животным в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и соответствуют принципам Руководства по уходу и использованию лабораторных животных, изданного «US NIH» (№ 85-23, пересмотрено в 1985 г.).

Для определения токсичности препаратов ВРА и BSH в стандартных (по данным литературы) дозировках проводили их внутривенное введение (в ретроорбитальный синус) животным, по 3 особи на каждый препарат. Животным из контрольной группы внутривенно вводили натрия хлорид 0,9% (Renewal, Россия). Три раза в неделю регистрировали следующие параметры: состояние кожных покровов, места инъекции, двигательную активность и поведение. Через 2 мес после начала эксперимента мышей подвергали плановой эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным с последующим забором органов: почки, печень, легкие, мозг и сердце, которые фиксировали в растворе формальдегида.

Биораспределение ¹⁰B при внутривенном введении препаратов ВРА и BSH мышам с подкожными ксенографтами SW-620. В работе использована культура опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы человека SW-620, полученная из ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦИГ СО РАН. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) (Биолот, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия).

Исследование выполнено на иммунодефицитных самцах мышей SCID (SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}) SPF-статуса в возрасте 6–7 нед с гетеротопической опухолью, полученной после инъекции суспензии, содержащей 1×10⁷ клеток SW-620 подкожно в область правого бедра. Животных содержали в Центре генетических ресурсов лабораторных животных на базе ЦКП «SPF-виварий» (ИЦИГ СО РАН) однополыми семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы Opti Mice (Animal Care Systems) в контролируемых условиях: световом режиме (свет/темнота 14/10) с рассветом в 01:00, при температуре 22–26 °С, относительной влажности 30–60%. Корм Sniff (Германия) и вода после обратного осмоса, обогащенная минеральной смесью «Северянка», животным предоставлялись *ad libitum*. Всех животных разделили на 5 групп на каждый препарат бора (4 экспериментальные и 1 контрольная), по 3 самца мышей в каждой группе. По достижении ксенографтами объемов 300–500 мм³ или 8–9 мм в диаметре начинали введение мышам изучаемых препаратов. Препараты бора вводили

внутривенно в ретроорбитальный синус: ВРА в концентрации 350 мкг/г и BSH – 100 мкг/кг. Через 1, 2, 3 и 4 ч после инъекции животных подвергали эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным, проводили забор органов (кровь, мозг, опухоль, почки, печень), которые замораживали и хранили при -20°C .

Пробоподготовку части материала (кровь, почки) проводили методом мокрого озоления с применением концентрированной азотной кислоты HNO_3 («ос.ч.» 27-5) и нагревания до 90°C на Dry Block Heater 2 («IKA», Германия), для пробоподготовки образцов с высоким содержанием жиров (мозг, опухоль, печень) использовали микроволновую печь MARS-5 (США) и автоклавы HP-500 и смесь HNO_3 и 30%-ной H_2O_2 (1:0,2).

Для оценки концентрации ^{10}B в образцах применяли метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП) на спектрометре высокого разрешения iCAP-6500 («Thermo», США) в ИНХ СО РАН (Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, г. Новосибирск, Россия).

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и пакета STATISTICA 8 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни при 95% ($p < 0,05$). Значения объемов опухоли приведены как среднее (М) и стандартное отклонение (SD).

Результаты исследования и обсуждение

Исследование цитотоксичности ВРА и BSH *in vitro*. Для проведения БНЗТ необходимо выбрать препарат и оценить его безопасность. Для этого авторы использовали МТТ-тест, который позволяет выявить ранние цитотоксические эффекты препаратов, содержащих бор.

Ранние цитотоксические эффекты препарата BSH отмечены при концентрации ^{10}B 640 мкг/мл после инкубации 24 ($p = 0,009$) и 48 часов ($p = 0,009$), когда выживаемость клеток снизилась до 87 и 80,5% соответственно. Максимально безопасной концентрацией BSH для *in vitro* исследований можно считать дозу 320 мкг/мл ^{10}B , так как выживаемость клеток в опытных группах при этом статистически значимо не отличалась от контрольной и составила 96 и 95,5% для 24 и 48 ч инкубации с препаратом соответственно. Для препарата ВРА первые статистически значимые отличия по выживаемости клеток в опытных и контрольных группах появились при концентрации ^{10}B в растворе 320 мкг/мл как после 24, так и 48 ч инкубации с препаратом. При этом процент выживших клеток – 65 ($p = 0,016$) и 51 ($p = 0,009$) соответственно. Безопасная концентрация на уровне 320 мкг/мл, когда выживаемость статистически значимо не снижалась и уменьшалась не более чем на 9% (рис. 1).

Ранее нами проведены исследования цитотоксичности этих борсодержащих препаратов на других клеточных линиях. В результате показано, что

для линии U87 глиобластомы человека максимальной безопасной концентрацией ^{10}B при инкубации с ВРА в течение 24 ч является доза 160 мкг/мл, а при использовании BSH – 80 мкг/мл [20].

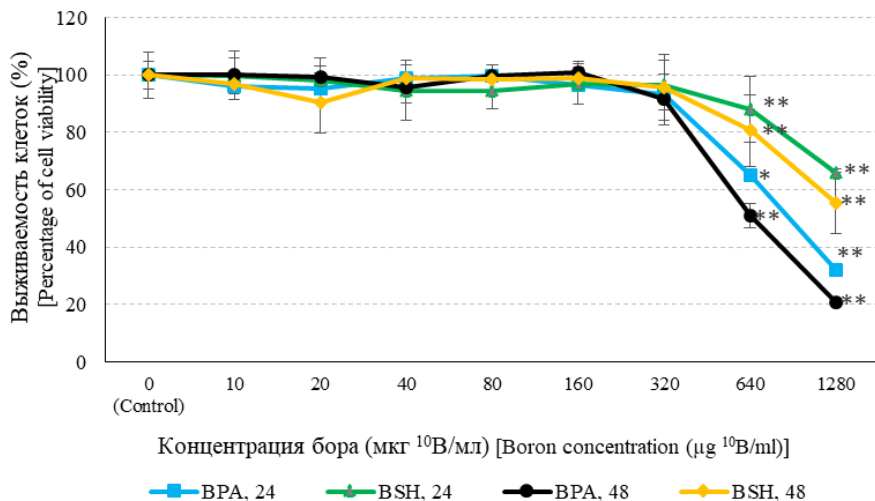


Рис. 1. Определение дозозависимых цитотоксических эффектов препаратов ВРА и BSH при помощи МТТ-теста через 24 и 48 ч с начала инкубации ($M \pm SD$) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

[Fig. 1. Determination of dose-dependent cytotoxic effects of BPA and BSH drugs using MTT test 24 and 48 hours after the start of incubation ($M \pm SD$) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)]

По-видимому, линия U87 более чувствительна к препаратам бора, чем SW-620. Кроме того, изучены также поздние цитотоксические эффекты ВРА и BSH на линию глиобластомы при помощи клоногенного теста. В результате установлено, что максимально безопасна концентрация ^{10}B 40 мкг/мл [20]. Другая группа ученых, используя клоногенный анализ выявила, что инкубация клеток U251, T98G и V-79 с ВРА в концентрации ^{10}B 100 мкг/мл в течение 2 ч не приводила к снижению пролиферации клеток [21].

В исследовании, проведенном U. De Simone et al. на линиях человеческой астроцитомы D384, нейробластомы SH-SY5Y и первичных фибробластах F26, также изучали цитотоксичность ВРА при помощи МТТ-теста, и обнаружено, что инкубация клеток в течение 24 и 48 ч в концентрации ^{10}B 40–100 мкг/мл значительно снижала жизнеспособность опухолевых линий, в то время как жизнеспособность фибробластов снижалась только при концентрации ^{10}B 100 мкг/мл [22].

Определение токсичности препаратов бора при внутривенном введении мышам SCID в стандартных концентрациях. Оценка токсичности препаратов *in vivo* выявила возможность внутривенного введения ВРА в дозировке 350 мг/кг массы тела, BSH – 100 мг/кг массы тела. Через 2 мес после введения препаратов летальности не наблюдалось, активность животных из

опытных групп соответствовала активности в контрольной группе. По данным гистологического исследования, морфологических изменений дистрофического порядка через 2 мес после введения препаратов не обнаружено (рис. 2).

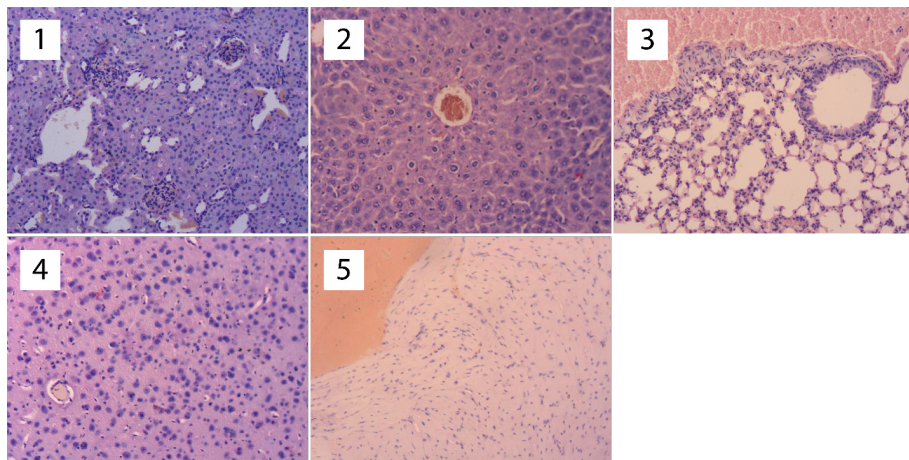


Рис. 2. Тканевые срезы мышей SCID: 1 – почка. Полнокровие сосудов; 2 – печень. Гепатоциты без существенных патологических изменений. Центральные вены расширены, полнокровны; 3 – легкие. Полнокровие сосудов интерстиция и межальвеолярных перегородок; 4 – мозг. Минимальный перичеселлярный отек; 5 – сердце. В камерах кровь. Автор фото О.И. Соловьева

[Fig. 2. Tissue sections of SCID mice: 1 - Kidney. Congestion of blood vessels; 2 - Liver. Hepatocytes without significant pathological changes. Central veins dilated and plethoric; 3 - Lungs. Congestion of the vessels of the interstitium and interalveolar septa; 4 - Brain. Minimal pericellular edema; 5 - Heart. Some blood in the cardiac chambers. Photo by Olga I. Solovieva]

Тестирование биораспределения ^{10}B при внутривенном введении препаратов ВРА и BSH мышам с подкожными ксенографтами SW-620.

В предыдущих исследованиях установлено, что для успешного проведения БНЗТ необходимо получить концентрацию ^{10}B в опухолевой ткани равную 20–35 мкг/г, а соотношение ^{10}B опухоль/окружающая здоровая ткань должно составить 3/1 [23].

Определили динамику накопления ^{10}B в опухоли, крови и органах после введения препаратов в стандартных концентрациях. В нашем эксперименте, используя метод АЭС ИСП, мы определяли динамику накопления ^{10}B в опухоли, крови и органах после внутривенного введения препаратов в стандартных концентрациях. В результате для ВРА максимальное накопление ^{10}B опухолевой тканью зарегистрировано для временных точек 1 и 2 ч и составило 8,0 и 8,7 мкг/г соответственно. При этом соотношение концентраций ^{10}B в образцах опухоли и крови определено как 0,6 для точки 1 ч и 1,7 для точки 2 ч. Также обнаружено, что больше всего ^{10}B накапливается

в почках на всем протяжении эксперимента (рис. 3). Временная точка 2 ч может считаться потенциально наиболее подходящей для проведения БНЗТ, однако концентрация бора в опухолевой ткани недостаточна.

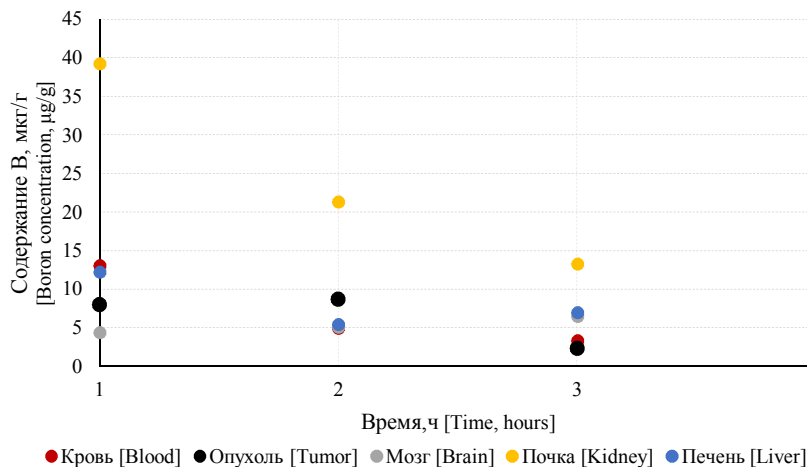


Рис. 3. Биораспределение ^{10}B в органах интереса мышей SCID после внутривенной инъекции ВРА на временных точках 1, 2, 3 и 4
 [Fig. 3. Biodistribution of ^{10}B in organs of interest of SCID mice after intravenous injection of BPA for time points of 1, 2, 3 and 4 hours]

После введения BSH значительного пика накопления опухолью не отмечено. Максимальная концентрация ^{10}B в опухоли составила 5,7 мкг/г. Больше всего ^{10}B накапливали печень, почки и кровь (рис. 4).

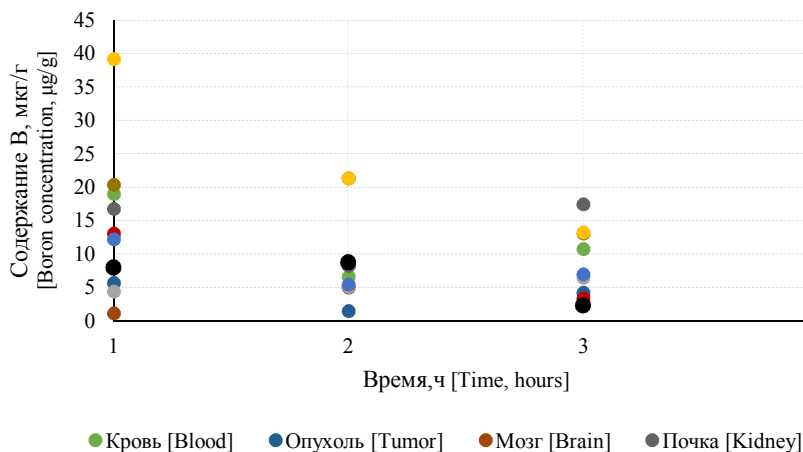


Рис. 4. Биораспределение ^{10}B в органах интереса мышей SCID после внутривенной инъекции BSH на временных точках 1, 2, 3 и 4 ч
 [Fig. 4. Biodistribution of ^{10}B in organs of interest of SCID mice after intravenous injection of BSH for time points of 1, 2, 3 and 4 hours]

По-видимому, дальнейшие исследования по увеличению дозы препарата и выбору иного пути введения могут позволить увеличить накопление ^{10}B опухолью и уменьшить его концентрацию в окружающих тканях.

В работе [24] авторы изучали накопление ^{10}B на модели подкожного ксенографта U87 у мышей SCID после внутривенного введения ВРА и BSH и также выявили большую селективность в накоплении бора опухолью после введения борфенилаланина. Так, для ВРА содержание ^{10}B составило 12 и 11 мкг/г опухоли для временных точек 1 и 2 ч соответственно. Максимальное отношение концентраций ^{10}B в образцах опухоли и крови 1,6 для точки 2 ч. Для BSH максимальное отношение концентраций ^{10}B в опухоли и крови составило 1,1 на временной точке 3 ч, однако абсолютное содержание бора в опухоли при этом составило 3 мкг/г. Возможно, ВРА является более перспективным препаратом для БНЗТ при его внутривенном введении, чем BSH.

Группа ученых из Японии исследовала накопление бора после введения BSH в дозе 100 мг/кг в хвостовую вену крысам с ксенографтом 9L глиомы. Бутионин сульфоксимин (Buthionine sulfoximine) использовали в экспериментальной группе как вещество, потенциально улучшающее накопление бора в опухоли. Выявлено, что концентрация ^{10}B в опухоли для временной точки 3 ч составила 5 мкг/г опухолевой ткани, в то время как в группе BSH + бутионин сульфоксимин накопление бора в опухоли увеличилось и составило 26 мкг/г. Проведенное G. Morris et al. исследование на крысиной модели глиомы C6 выявило значительно более высокое накопление ^{10}B в опухоли после введения ВРА с предварительным внутрибрюшинным введением препарата Леводопа по сравнению с группой животных, которым данный препарат не вводился [13]. Таким образом, по-видимому, дальнейшие исследования по увеличению дозы препарата и выбору иного пути введения могут позволить увеличить накопление ^{10}B опухолью и уменьшить его концентрацию в окружающих тканях. Использование дополнительных препаратов, улучшающих проникновение бора в опухоль, может также быть эффективным и должно приниматься во внимание [25].

Заключение

Определение безопасных концентраций боркаптата и борфенилаланина на клетки SW-620 показало, что инкубация клеток в течение 24 и 48 ч с данными препаратами в концентрациях ^{10}B 10–320 мкг/мл не оказывает значительного цитотоксического эффекта. Внутривенное введение вышеупомянутых препаратов иммунодефицитным мышам SCID в дозах 350 мг ВРА/кг и 100 мг BSH/кг массы тела животного является безопасным, однако не приводит к достаточному накоплению ^{10}B в опухолевой ткани. Авторы предполагают, что изменение пути введения и повышение дозировок и использование комбинаций препаратов может повысить эффективность накопления бора.

Авторы выражают искреннюю признательность В.Р. Касатовой за помощь в подготовке иллюстративного материала.

Литература

1. BO3. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Cancer Facts & Figures 2020. URL: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html>
3. Таскаев С.Ю., Каныгин В.В. Бор-нейтронозахватная терапия. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2016. 216 с.
4. Каныгин В.В., Завьялов Е.Л., Симонович А.Е., Кичигин А.И., Касатова А.И., Мухамадияров Р.А., Сибирцев Р.В., Филин Н.С., Сычева Т.В. Бор-нейтронозахватная терапия глиальных опухолей // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 3. С. 190.
5. Hiratsuka J., Kamitani N., Tanaka R., Tokiya R., Yoden E., Sakurai Y., Suzuki M. Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT) // Journal of Radiation Research. 2020. Vol. 61 (6). PP. 945–951. doi: [10.1093/jrr/rraa068](https://doi.org/10.1093/jrr/rraa068)
6. Koivunoro H., Kankaanranta L., Seppälä T., Haapaniemi A., Mäkitie A., Joensuu H. Boron neutron capture therapy for locally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: An analysis of dose response and survival // Radiotherapy and Oncology. 2019. Vol. 137. PP. 153–158. doi: [10.1016/j.radonc.2019.04.033](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.033)
7. Zonta A., Pinelli T., Prati U., Roveda L., Ferrari C., Clerici A.M., Zonta C., Mazzini G., Dionigi P., Altieri S., Bortolussi S., Bruschi P., Fossati F. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: what was learned and what is still to be learned // Applied Radiation and Isotopes. 2009. Vol. 67, Iss. 7–8. PP. 67–75. doi: [10.1016/j.apradiso.2009.03.087](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.03.087)
8. Horiguchi H., Nakamura T., Kumada H., Yanagie H., Suzuki M., Sagawa H. Investigation of irradiation conditions for recurrent breast cancer in JRR-4 // Applied Radiation and Isotopes. 2011. Vol. 69, № 12. PP. 1882–1884. doi: [10.1016/j.apradiso.2011.03.036](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.03.036)
9. Takeuchi K., Kawabata S., Hiramatsu R., Matsushita Y., Tanaka H., Sakurai Y., Suzuki M., Ono K., Miyatake S., Kuroiwa T. Boron Neutron Capture Therapy for High-Grade Skull-Base Meningioma // Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base. 2018. Vol. 79B, № 4. PP. 322–327. doi: [10.1055/s-0038-1666837](https://doi.org/10.1055/s-0038-1666837)
10. Hiratsuka J., Kamitani N., Tanaka R., Yoden E., Tokiya R., Suzuki M., Barth R.F., Ono K. Boron neutron capture therapy for vulvar melanoma and genital extramammary Paget's disease, with curative responses // Cancer Communications. 2018. Vol. 38, № 1. PP. 38. doi: [10.1186/s40880-018-0297-9](https://doi.org/10.1186/s40880-018-0297-9)
11. Soloway A.H., Tjarks W., Barnum B.A., Rong F.-G., Barth R.F., Codogni I.M., Wilson J.G. The Chemistry of Neutron Capture Therapy // Chemical reviews. 1998. Vol. 4. PP. 1515–1562.
12. Yang W., Barth R.F., Rotaru J.H., Moeschberger M.L., Joel D.D., Nawrocky M.M., Goodman J.H., Soloway A.H. Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of sodium borocaptate with or without blood-brain barrier disruption // International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics. 1997. Vol. 37, № 3. PP. 663–672. doi: [10.1016/s0360-3016\(96\)00082-x](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(96)00082-x)
13. Morris G., Constantine G., Ross G., Yeung T.K., Hopewell J.W. Boron neutron capture therapy: long-term effects on the skin and spinal cord of the rat // Radiation Research. 1993. Vol. 135, № 3. PP. 380–386.

14. Mishima Y., Ichihashi M., Hatta S., Honda C., Sasase A., Yamamura K., Kanda K., Kobayashi T., Fukuda H. Selective thermal neutron capture therapy and diagnosis of malignant melanoma: from basic studies to first clinical treatment // *Basic Life Sciences*. 1989. Vol. 50. PP. 251–260.
15. Coderre J.A., Glass J.D., Fairchild R.G., Micca P.L., Fand I., Joel D.D. Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue p-boronophenylalanine to tumors other than melanoma // *Cancer Research*. 1990. Vol. 50, № 1. PP. 138–141.
16. Barth R.F., Grecula J.C. Boron neutron capture therapy at the crossroads – Where do we go from here? // *Applied Radiation and Isotopes*. 2020. Vol. 160. e109029. doi: [10.1016/j.apradiso.2019.109029](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.109029)
17. Kiger W.S. 3rd, Palmer M.R., Riley K.J., Zamenhof R.G., Busse P.M. A pharmacokinetic model for the concentration of ^{10}B in blood after boronophenylalanine-fructose administration in humans // *Radiation Research*. 2001. Vol. 155, № 4. PP. 611–618. doi: [10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0611:apmfic\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0611:apmfic]2.0.co;2)
18. Kankaanranta L., Seppälä T., Koivunoro H., Välimäki P., Beule A., Collan J., Kortensniemi M., Uusi-Simola J., Kotiluoto P., Auterinen I., Serén T., Paetau A., Saarilahti K., Savolainen S., Joensuu H. L-Boronophenylalanine - mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a phase I study // *International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics*. 2011. Vol. 80. PP. 369–376. doi: [10.1016/j.ijrobp.2010.02.031](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.02.031)
19. Rossini A.E., Dagrosa M.A., Portu A., Saint Martin G., Thorp S. Casal M., Navarro A., Juvenal G.J., Pisarev M.A. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines // *International Journal of Radiation Biology*. 2015. Vol. 91, № 1. PP. 81–89. doi: [10.3109/09553002.2014.942013](https://doi.org/10.3109/09553002.2014.942013)
20. Бывальцев В.А., Завьялов Е.Л., Каныгин В.В., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А., Сычева Т.В., Таскаев С.Ю. Цитопатические эффекты бор-нейтронозахватной терапии на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов для культуры клеток глиобластомы человека // *Сибирский онкологический журнал*. 2019. Т. 18, № 4. С. 34–42. doi: [10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42](https://doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42)
21. Волкова О.Ю., Мечетина Л.В., Таранин А.В., Заборонок А.А., Nakai K., Лежнин С.И., Фролов С.А., Касатов Д.А., Макаров А.Н., Сорокин И.Н., Сычева Т.В., Щудло И.М., Таскаев С.Ю. Влияние нейтронного излучения на жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в присутствии изотопа бора ^{10}B // *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016. Т. 97, № 5. С. 283–288. doi: [10.20862/0042-4676-2016-97-5-283-288](https://doi.org/10.20862/0042-4676-2016-97-5-283-288)
22. De Simone U., Manzo L., Ferrari C., Bakeine J., Locatelli C., Coccini T. Short and long-term exposure of CNS cell lines to BPA-f a radiosensitizer for Boron Neutron Capture Therapy: safety dose evaluation by a battery of cytotoxicity tests // *NeuroToxicology*. 2012. Vol. 35. PP. 84–90.
23. Neutron Capture Therapy: Principles and Applications / Editors: W.A.G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa. Berlin, Germany : Springer-Verlag, 2012, ch. 6. PP. 366–531.
24. Цыганкова А.Р., Каныгин В.В., Касатова А.И., Завьялов Е.Л., Гусельникова Т.Я., Кичигин А.И., Мухамадияров Р.А. Определение бора методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Изучение биораспределения ^{10}B в органах мышей // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2020. № 3. С. 601–607.
25. Yoshida F., Yamamoto T., Nakai K., Zaboronok A., Matsuda M., Akutsu H., Ishikawa E., Shirakawa M., Matsumura A. Pretreatment with buthionine sulfoximine enhanced uptake and retention of BSH in brain tumor // *Applied Radiation and Isotopes*. 2014. Vol. 88. PP. 86–88.

*Поступила в редакцию 29.04.2021 г.; повторно 25.06.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.*

Авторский коллектив:

Касатова Анна Исмагиловна, м.н.с. лаборатории 9-0, Институт ядерной физики СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 11).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6641-9344>

E-mail: yarullinaai@yahoo.com

Каныгин Владимир Владимирович, канд. мед. наук, зав. лабораторией МБП БНЗТ, физический факультет, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9220-8663>

E-mail: kanigin@mail.ru

Завьялов Евгений Леонидович, канд. биол. наук, зав. ЦКП «SPF-виварий» (Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10/2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9412-3874>

E-mail: zavjalov@bionet.nsc.ru

Разумов Иван Алексеевич, д-р биол. наук, проф., с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных, Институт цитологии и генетики СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10/2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6756-1457>

E-mail: razumov@bionet.nsc.ru

Кичигин Александр Иванович, м.н.с. лаборатории МБП БНЗТ, физический факультет, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8763-2905>

E-mail: sam@211.ru

Цыганкова Альфия Рафаэльевна, канд. хим. наук, с.н.с. аналитической лаборатории, Институт неорганической химии СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Академика Лаврентьева, 3).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7126-276X>

E-mail: alphiya@yandex.ru

Соловьева Ольга Игоревна, старший лаборант ЦКП «SPF-виварий», Институт цитологии и генетики СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10/2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8218-2690>

E-mail: solovieva@bionet.nsc.ru

Касатов Дмитрий Александрович, н.с. лаборатории 9-0, Институт ядерной физики СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 11).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5649-524X>

E-mail: kasatovd@gmail.com

Чернов Владимир Иванович, д-р мед. наук, проф., зам. директора по научной работе и инновационной деятельности, заведующий отделением радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН (Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5524-9546>

E-mail: chernov@tnimc.ru

For citation: Kasatova AI, Kanygin VV, Zavjalov EL, Razumov IA, Kichigin AI, Tsygankova AR, Solovieva OI, Kasatov DA, Chernov VI. Accumulation and toxic effects of boron-containing drugs in SW-620 models. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:97-113. doi: 10.17223/19988591/55/6 In Russian, English Summary

Anna I. Kasatova^{1,2}, Vladimir V. Kanygin¹, Evgenii L. Zavjalov^{1,3}, Ivan A. Razumov^{1,3},
Aleksandr I. Kichigin¹, Alphiya R. Tsygankova⁴, Olga I. Solovieva³,
Dmitrii A. Kasatov^{1,2}, Vladimir I. Chernov^{5,6}

¹Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

²Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

³Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

⁴Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

⁵Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

⁶National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

Accumulation and toxic effects of boron-containing drugs in SW-620 models

According to the World Health Organization, colorectal cancer is one of the three leading causes of death among other tumors. Boron neutron capture therapy (BNCT) is a promising method for the treatment of oncological diseases. It is an experimental method of radiation therapy which is based on the capture reaction of a thermal neutron by an isotope ^{10}B and results in the $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ fission reaction. The high linear energy transfer from alpha particle and ^7Li nucleus has a short path length, thus the energy released is limited to the size of one cell. Previously, BNCT was actively used to treat patients with glioblastoma, melanoma, head and neck cancer, and other malignant neoplasms of various localization. The aim of this work is to determine the safe concentrations of boronphenylalanine (BPA) and sodium borocaptate (BSH) drugs for the SW-620 cell line and to assess the ^{10}B biodistribution after administration of these compounds to immunodeficient SCID mice with heterotopic SW-620 xenografts.

To evaluate the possibility of using BNCT as a therapy for patients with colorectal cancer, we carried out preliminary *in vitro* and *in vivo* studies on the model of human colorectal adenocarcinoma SW-620. Firstly, the cytotoxicity of boron compounds BPA and BSH at ^{10}B concentrations of 10-1280 $\mu\text{g/ml}$ was investigated using MTT test. All animal experiments were conducted in accordance with the principles of humane treatment of animals in compliance with the directive of the European Community (86/609 / EEC) and correspond to the principles of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH USA, No 85-23, rev. 1985). To determine the toxicity of BPA and BSH in standard dosages, drugs were intravenously injected into the retroorbital sinus: BPA at a concentration of 350 mg/kg and BSH at 100 mg/kg. The control group of animals were injected intravenously with sodium chloride 0.9%. After 2 months of observation planned euthanasia was done, organs (kidneys, liver, lungs, brain and heart) were sampled for pathomorphological study. Biodistribution of ^{10}B in the tumor and organs of interest was performed on mice with SW-620 heterotopic xenograft. Boron containing drugs were injected at the dosages described earlier intravenously into the retroorbital sinus. Euthanasia was performed 1, 2, 3, and 4 hours after injection, tumor tissue, blood, brain, liver and kidneys were sampled. The boron concentration was analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP AES).

As a result of the MTT test, we revealed that incubation of SW-620 cells with BPA and BSH for 24 and 48 hours at ^{10}B concentrations of 10-320 $\mu\text{g/ml}$ had no cytotoxic effect. When incubated for 48 hours with BPA at a concentration of 320 $\mu\text{g/ml}$, survival rate did not differ significantly from control. The maximum safe concentration for BSH can also be considered 320 $\mu\text{g/ml}$ of ^{10}B , since the cell survival in the experimental groups was 96 and 95.5% for 24 and 48 hours of incubation with the drug, respectively. The first significant cytotoxic effects were noted during incubation with both boron-containing drugs at a ^{10}B concentration of 640 $\mu\text{g/ml}$. For the BPA group, the percentage of survived cells was 65 (incubation for 24 hours)

and 51 (48 hours), BSH had less cytotoxic effect: cell survival decreased to 87% and 80.5% at points 24 and 48 hours, respectively (*See Fig. 1*). Intravenous administration of BPA at a concentration of 350 mg/kg and BSH at a concentration of 100 mg/kg to SCID mice turned out to be safe: no pathological reactions were detected within 2 months of observation, all animals were alive. According to the pathomorphological study, no macroscopic and structural changes in the organs were found (*See Fig. 2*). The biodistribution of ^{10}B was assessed in SCID mice with subcutaneous xenografts SW-620 after intravenous administration of boron drugs at standard concentrations. As a result of the analysis, we found out that after intravenous administration of BPA at a safe dosage, the maximum concentration of ^{10}B in the tumor was recorded at the time points of 1 and 2 hours (8.0 and 8.7 $\mu\text{g/g}$, respectively). In this case, the concentration ratio of ^{10}B in the tumor and blood samples was determined as 0.6 for the 1 hour point and 1.7 for the 2 hour point. We also demonstrated that the kidneys were the organ with the highest boron accumulation throughout the experiment (*See Fig. 3*). Thus, the time point of 2 hours can be considered potentially the most suitable for BNCT, but the concentration of boron in the tumor tissue is not sufficient. For BSH the maximum concentration was recorded at the time point of 1 hour (5.7 $\mu\text{g/g}$). The liver, kidneys and blood contained the highest concentration of ^{10}B (*See Fig. 4*).

Thus, apparently, further investigations on increasing the dose of the drugs and choosing different ways of boron agents administration can increase the accumulation of ^{10}B by the tumor and reduce its concentration in the surrounding tissues and blood. The use of additional drugs that improve the penetration of boron into the tumor may also be effective and should be taken into account.

The paper contains 4 Figures and 25 References.

Key words: boron neutron capture therapy; human colon adenocarcinoma SW-620 cell line; BSH; BPA

Funding: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant No 18-29-01007. The equipment of the “Center for Genetic Resources of Laboratory Animals” Core Facility of the Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences was used and supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project No RFMEFI62117X0015).

Acknowledgments: The authors are grateful to Veronika R. Kasatova for the help in preparation of illustrative material.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 04.04.2021)
2. Cancer Facts & Figures 2020 [Electronic resource]. Available at: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html> (accessed 03.01.2021)
3. Taskaev SYu, Kanygin VV. Boron Neutron Capture Therapy. Novosibirsk: SB RAS Publ.; 2016. 216 p. In Russian
4. Kanygin VV, Zavjalov EL, Simonovich AE, Kichigin AI, Kasatova AI, Mukhamadiyarov RA, Sibirtsev RV, Filin NS, Sycheva TV. Boron neutron capture therapy for glial tumors. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*. 2019;3:190. In Russian, English Summary
5. Hiratsuka J, Kamitani N, Tanaka R, Tokiya R, Yoden E, Sakurai Y, Suzuki M. Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT). *Journal of Radiation Research*. 2020;61(6):945-951. doi: 10.1093/jrr/rraa068

6. Koivunoro H, Kankaanranta L, Seppälä T, Haapaniemi A, Mäkitie A, Joensuu H. Boron neutron capture therapy for locally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: An analysis of dose response and survival. *Radiotherapy and Oncology*. 2019;137:153-158. doi: [10.1016/j.radonc.2019.04.033](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.033)
7. Zonta A, Pinelli T, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Clerici AM, Zonta C, Mazzini G, Dionigi P, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Fossati F. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: what was learned and what is still to be learned. *Applied Radiation and Isotopes*. 2009;67(7-8):67-75. doi: [10.1016/j.apradiso.2009.03.087](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.03.087)
8. Horiguchi H, Nakamura T, Kumada H, Yanagie H, Suzuki M, Sagawa H. Investigation of irradiation conditions for recurrent breast cancer in JRR-4. *Applied Radiation and Isotopes*. 2011;69(12):1882-4. doi: [10.1016/j.apradiso.2011.03.036](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.03.036)
9. Takeuchi K, Kawabata S, Hiramatsu R, Matsushita Y, Tanaka H, Sakurai Y, Suzuki M, Ono K, Miyatake S, Kuroiwa T. Boron Neutron Capture Therapy for High-Grade Skull-Base Meningioma. *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*. 2018;79(4):322-327. doi: [10.1055/s-0038-1666837](https://doi.org/10.1055/s-0038-1666837)
10. Hiratsuka J, Kamitani N, Tanaka R, Yoden E, Tokiya R, Suzuki M, Barth RF, Ono K. Boron neutron capture therapy for vulvar melanoma and genital extramammary Paget's disease, with curative responses. *Cancer Communications*. 2018;38(1):38. doi: [10.1186/s40880-018-0297-9](https://doi.org/10.1186/s40880-018-0297-9)
11. Soloway AH, Tjarks W, Barnum BA, Rong FG, Barth RF, Codogni IM, Wilson JG. The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chemical reviews*. 1998;4:1515-1562.
12. Yang W, Barth RF, Rotaru JH, Moeschberger ML, Joel DD, Nawrocky MM, Goodman JH, Soloway AH. Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of sodium borocaptate with or without blood-brain barrier disruption. *International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics*. 1997;37(3):663-672. doi: [10.1016/s0360-3016\(96\)00082-x](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(96)00082-x)
13. Morris G, Constantine G, Ross G, Yeung TK, Hopewell JW. Boron neutron capture therapy: long-term effects on the skin and spinal cord of the rat. *Radiation Research*. 1993;135(3):380-386.
14. Mishima Y, Ichihashi M, Hatta S, Honda C, Sasase A, Yamamura K, Kanda K, Kobayashi T, Fukuda H. Selective thermal neutron capture therapy and diagnosis of malignant melanoma: from basic studies to first clinical treatment. *Basic Life Sciences*. 1989;50:251-260.
15. Coderre JA, Glass JD, Fairchild RG, Micca PL, Fand I, Joel DD. Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue p-boronophenylalanine to tumors other than melanoma. *Cancer Research*. 1990;50(1):138-141.
16. Barth RF, Grecula JC. Boron neutron capture therapy at the crossroads - Where do we go from here? *Applied Radiation and Isotopes*. 2020;160. doi: [10.1016/j.apradiso.2019.109029](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.109029)
17. Kiger WS 3rd, Palmer MR, Riley KJ, Zamenhof RG, Busse PM. A pharmacokinetic model for the concentration of ^{10}B in blood after boronophenylalanine-fructose administration in humans. *Radiation Research*. 2001;155(4):611-618. doi: [10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0611:apmftc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0611:apmftc]2.0.co;2)
18. Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Välimäki P, Beule A, Collan J, Kortensniemi M, Uusi-Simola J, Kotiluoto P, Auterinen I, Serén T, Paetau A, Saari-Lahti K, Savolainen S, Joensuu H. L-Boronophenylalanine - mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a phase I study. *International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics*. 2011;80:369-376. doi: [10.1016/j.ijrobp.2010.02.031](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.02.031)
19. Rossini AE, Dagrosa MA, Portu A, Saint Martin G, Thorp S, Casal M, Navarro A, Juvenal GJ, Pisarev MA. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines. *International Journal of Radiation Biology*. 2015;91(1):81-89. doi: [10.3109/09553002.2014.942013](https://doi.org/10.3109/09553002.2014.942013)

20. Byvaltsev VA, Zavjalov EL, Kanygin VV, Kasatova AI, Kichigin AI, Razumov IA, Sycheva TV, Taskaev SYu. Cytopathic effects of accelerator-based boron neutron capture therapy on human glioblastoma cells. *Siberian Journal of Oncology*. 2019;18(4):34-42. doi: [10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42](https://doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42) In Russian, English Summary
21. Volkova OYu, Mechetina LV, Taranin AV, Zaboronok AA, Nakai K, Lezhnin SI, Frolov SA, Kasatov DA, Makarov AN, Sorokin IN, Sycheva TV, Shchudlo IM, Taskaev SYu. Impact of neutron radiation on the viability of tumor cells cultured in the presence of boron-10 isotope. *Vestnik Rentgenologii i Radiologii = Russian Journal of Radiology*. 2016;97(5):283-288. doi: [10.20862/0042-4676-2016-97-5-283-288](https://doi.org/10.20862/0042-4676-2016-97-5-283-288) In Russian, English Summary
22. De Simone U, Manzo L, Ferrari C, Bakeine J, Locatelli C, Coccini T. Short and long-term exposure of CNS cell lines to BPA-f a radiosensitizer for Boron Neutron Capture Therapy: safety dose evaluation by a battery of cytotoxicity tests. *NeuroToxicology*. 2012;35:84-90. doi: [10.1016/j.neuro.2012.12.006](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.12.006)
23. *Neutron Capture Therapy: Principles and Applications*. Sauerwein WAG, Wittig A, Moss R and Nakagawa Y, editors. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2012, ch. 6, pp. 366-531.
24. Tsygankova AR, Kanygin VV, Kasatova AI, Zav'yalov EL, Kichigin AI, Gusel'nikova TY, Mukhamadiyarov RA. Determination of boron by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Biodistribution of ^{10}B in tumor-bearing mice. *Russian Chemical Bulletin*. 2020;69(3):601-607. doi: [10.1007/s11172-020-2805-8](https://doi.org/10.1007/s11172-020-2805-8)
25. Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Zaboronok A, Matsuda M, Akutsu H, Ishikawa E, Shirakawa M, Matsumura A. Pretreatment with buthionine sulfoximine enhanced uptake and retention of BSH in brain tumor. *Applied Radiation and Isotopes*. 2014;88:86-88. doi: [10.1016/j.apradiso.2014.02.025](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2014.02.025)

*Received 29 April 2021; Revised 25 June 2021;
Accepted 27 July 2021; Published 29 September 2021.*

Author info:

Kasatova Anna I, Junior Researcher, Laboratory 9-0, Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 11 Acad. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6641-9344>

E-mail: yarullinaai@yahoo.com

Kanygin Vladimir V, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University, 1 Pirogova Str., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9220-8663>

E-mail: kanigin@mail.ru

Zav'yalov Evgeniy L, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Center for Collective Usage "SPF"- vivarium, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10/2 Acad. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9412-3874>

E-mail: zavjalov@bionet.nsc.ru

Razumov Ivan A, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Pathological Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10/2 Acad. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6756-1457>

E-mail: razumov@bionet.nsc.ru

Kichigin Alexander I, Junior Researcher, Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University, 1 Pirogova Str., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8763-2905>

E-mail: sam@211.ru

Tsygankova Alphiya R, Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Analytical Laboratory, Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Acad. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7126-276X>

E-mail: alphiya@yandex.ru

Solovieva Olga I, Laboratory Assistant, Center for Collective Usage “SPF”- vivarium, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10/2 Acad. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8218-2690>

E-mail: solovieva@bionet.nsc.ru

Kasatov Dmitrii A, Researcher, Laboratory 9-0, Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 11 Acad. Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5649-524X>

E-mail: kasatovd@gmail.com

Chernov Vladimir I, Dr. Sci. (Med.), Professor, Deputy Director for Science and Innovation, Head of Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 5 Kooperativny Str., Tomsk 634009, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5524-9546>

E-mail: chernov@tnimc.ru

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

doi: 10.17223/19988591/55/7

М.К. Кадырбаев¹, И.Ф. Головацкая¹, М.Ж. Сатканов²

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, Россия

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан, Казахстан

Особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *in vitro*, полученных из разных фрагментов побега картофеля

Исследованы особенности регенерации эксплантов, полученных с разных участков побега *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской *in vitro*. Определена динамика процессов ризогенеза (появление и рост адвентивных корней) и формирования побега (раскрытие почек, растяжения побега и формирование новых листьев) регенерантов из почек у микроклонов 3-го и 5-го ярусов материнских растений. Изучены ростовые и физиологические параметры регенерантов картофеля. Экспланты культивировали *in vitro* на питательной среде Мурасиге–Скуга, на свету 200–230 мкмоль м⁻²с⁻¹. Экспланты, полученные из средней части побега материнского растения, раньше восстанавливали утраченный побег за счет пробуждения почки. Экспланты, полученные из апикальной части исходного растения, активнее формировали корневую систему. На 39-е сутки регенеранты из почек апикального экспланта (AR) отличались более крупными размерами, чем регенеранты из почек среднего экспланта (MR); увеличивались объём корней, длина и количество ярусов побегов, суммарная площадь листьев. Отношение сухой массы побега к корню у AR выше по сравнению с MR. При этом в средних листьях AR обнаружено снижение интенсивности перекисного окисления липидов, уровней свободного пролина и суммы флавоноидов на 22%, 28% и 2-кратно соответственно по сравнению с MR. Обсуждается механизм регенерации микроклонов и участия в этих процессах эндогенных ауксинов, имеющих градиент в осевой части растения, и отдельных метаболитов. Использование результатов исследований позволяет разработать способы ускорения регенерации микроклонов картофеля и повышения коэффициента размножения растений.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; регенерация; перекисное окисление липидов; антиоксиданты; фотосинтетические пигменты

Сокращения [Abbreviations]: AdR – адвентивные корни [Adventive roots]; AR – регенерант, полученный из апикального фрагмента побега [Regenerant obtained from the apical shoot fragment]; MR – регенерант, полученный из среднего фрагмента побега [Regenerant obtained from the middle shoot fragment]; MS – питательная среда Мурасиге–Скуга [Culture medium Murashige-Skuga]; IAA – индолил-3-уксусная кислота [Indole-3-acetic acid]; Ck – цитокинины [Cytokinins]; LPO – перекисное окисление липидов

[Lipid peroxidation]; MDA – малоновый диальдегид [Malondialdehyde]; ROS – активные формы кислорода [Reactive oxygen species]; Flav – флавоноиды [Flavonoids].

Для цитирования: Кадырбаев М.К., Головацкая И.Ф., Сатканов М.Ж. Особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *in vitro*, полученных из разных фрагментов побега картофеля // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 114–134. doi: 10.17223/19988591/55/7

Введение

Одним из наиболее быстрых способов размножения растений служит биотехнологический способ апикальной меристемы. Микроклональное размножение оздоровленных растений картофеля позволяет получить большое количество клонов, сохраняющих все характеристики сорта, а в последующем на основе их регенерантов получить в условиях гидропоники семенной материал (мини-клубни). Среди важных проблем микроклонального размножения растений картофеля выделяют две: скорость регенерации микроклонов (укоренение микроклонов и развитие регенерантов) *in vitro* и величину коэффициента размножения (количество ярусов). На регенерацию микроклонов растений существенное влияние оказывает фактор травмирования побега. В ответной реакции на действие этого фактора ключевую роль играют растительные гормоны [1]. Наиболее важными регуляторами роста растений служат фитогормоны ауксины и цитокинины (Ск) [2].

Ауксины представляют собой класс незаменимых фитогормонов, участвующих в многочисленных аспектах роста и развития растений. Среди представителей класса наиболее активно действующей является индолил-3-уксусная кислота (IAA) [3]. Ауксины синтезируются не только в побегах (меристема побегов, семядоли, молодые листья, обладающие наибольшей активностью клеточного деления), но и в кончиках корней [4, 5]. Ауксины, образуемые в корнях, необходимы для нормального их развития и играют одну из центральных ролей в организации окончательной архитектуры корня. Эти гормоны влияют на прохождение органогенеза, действуют как локальный индуктивный сигнал, который перепрограммирует клетки, участвующие в закладке примордиев боковых корешков [5, 6]. Наиболее хорошо охарактеризованными эффектами изменения фенотипов корней, связанными с ауксинами, являются дозозависимое увеличение длины корневых волосков эпидермального происхождения, бимодальный эффект концентрации ауксинов на длину первичного корня, дозозависимое увеличение количества зачатков боковых корней и реакция на гравитацию. Динамические изменения концентрации и потока ауксинов воздействуют на формирование апикально-базальной оси растения [7].

Активные Ск представляют собой производные аденина с изопреноидной или ароматической боковой цепью, присоединенной к положению N⁶-аденинового кольца. Ск, обнаруженные в растениях, включают изопентениладенин (iP), *транс*-зеатин (tZ), *цис*-зеатин (cZ) и дигидрозеатин [8]. Состав Ск в разных тканях может различаться. Так, в ксилеме доминируют tZ и ри-

бозид *транс*-зеатина (*tZR*), а во флоэме преобладают производные *iP*-типа [9]. Преимущество тех или иных Ск в проводящих системах растений обусловлено разной экспрессией каталитических трансмембранных белков-рецепторов Ск в органах [10]. Ген рецептора CRE1/АНК4 (Cytokinin Response 1/Arabidopsis Histidine Kinase 4) активно экспрессируется в корнях, АНК2 экспрессируется примерно в одинаковой степени в розеточных листьях и корнях [11], тогда как АНК3 – в основном в побеге и контролирует метаболические процессы в листьях [10]. Рецепторы характеризуются неодинаковым сродством к разным гормонам цитокининового ряда. Рецепторы CRE1/АНК4 и АНК2 имеют более высокое сродство к *tZ* и *iP*, тогда как АНК3 – дигидрозеатину. С помощью обмена разными Ск может осуществляться «направленное» взаимодействие между разными удаленными частями растительного организма. Совместно с ауксином Ск стимулируют деление клеток в апикальной меристеме побега, меристемах пазушных почек и камбии, но подавляют активность меристем в корне растения [9]. Ск стимулируют рост листовой пластины за счет растяжения клеток; усиливают фотосинтез за счет стимуляции дифференциации хлоропластов и открывания устьиц, а также задерживают старение листьев. Они усиливают аттрагирующую способность органов и тканей, активируют образование пигментов в клетках, вызывают формирование побегов в культуре недифференцированных тканей [9]. Ск участвуют в формировании сосудистой системы и реакциях избегания тени, влияют на циркадные (суточные) ритмы, регулируют поглощение важнейших элементов из почвы. Увеличение содержания эндогенных *iP* и *ZR* в листьях и корнях положительно влияет на регулирование осмоса, эффективное использование воды, поддержание интенсивности фотосинтеза и накопление вследствие этого больше питательных веществ [8]. Ск участвуют в защите растений от неблагоприятных абиотических и биотических факторов окружающей среды [9]. Высокие уровни Ск способствуют улавливанию ROS за счет накопления антиоксидантов и активации антиоксидантных ферментов в корнях и побегах [8]. Кроме того, высокая концентрация бензиладенина вызывает накопление осмолита пролина.

Другим фактором, регулирующим скорость регенерации микроклонов, может служить возраст исходного растения или его метамеров [1, 12]. Последовательная закладка метамеров на побеге растений определяет возраст листьев разных ярусов и их гормональный статус, обуславливая специфику их роста и метаболизма. Ранее нами показаны градиенты содержания первичных и вторичных метаболитов в листьях *Lactuca sativa* разных ярусов [12]. Остаётся до конца невыясненной зависимость регенерации фрагментов растения картофеля, полученных с разных ярусов побега, от особенностей их метаболизма.

Цель данного исследования – изучение специфики регенерации микроклонов, морфогенеза и метаболизма их регенерантов в зависимости от положения фрагментов растения *Solanum tuberosum* L. *in vitro*, взятых в качестве

эксплантов. Нами проверена гипотеза о том, что имеющийся гормональный градиент ауксинов вдоль оси стебля картофеля обуславливает изменения регенерации средних и апикальных черенков (микроклонов), а также особенности формирования их регенерантов.

Материалы и методики исследования

Объектом исследования служили растения *Solanum tuberosum* L. средне-спелого сорта Луговской. Многократное клонирование оздоровленных материнских регенерантов *S. tuberosum*, полученных из Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (п. Коренево, Россия), позволило получить экспериментальные микроклоны. В ходе эксперимента вырезали средний и апикальный фрагменты из побега 5-ярусных 21-дневных растений картофеля. Фрагменты (экспланты), взятые с 3-го и 5-го ярусов побега, состояли из междоузлия, почки и листа. В качестве опытных клонов выбраны апикальные черенки, содержащие большее количество эндогенных ауксинов, в связи с пространственным разделением места синтеза и основного действия этих гормонов в растении. В качестве контроля – черенки, вырезанные из середины побега. Микроклоны культивировали на твердой агаризованной 50%-ной безгормональной питательной среде Мурасиге–Скуга (MS) с добавлением 3% сахарозы и витаминов тиамина, никотиновой кислоты и пиридоксина [13] на свету с плотностью потока падающих фотонов ФАР – 200–230 мкмоль м⁻²с⁻¹, при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 20–22 °С. В качестве источника света служили люминесцентные белые лампы TL-D 58W/54-765 G13 («Philips», Польша). Относительную интенсивность света измеряли с помощью спектрометра AvaSpec-102/256/1024/2048, версия 6.2 («Avantes BV», Нидерланды).

В течение 3 недель культивирования микроклонов описывали фенологию их регенерации (формирование корней и развитие побегов из почек). Формирование адвентивных корней (AdR) оценивали по количеству и длине зачатков AdR. Анализировали динамику ростовых параметров (количество и суммарную длину корней, количество ярусов и длину побегов) молодых растений в пробирках. В конце культивирования на 39-е сутки регенеранты извлекали из пробирок и определяли их ростовые (массу органов, объем корней, длину побега и количество ярусов, площадь листьев) и биохимические параметры. Для определения сырой и сухой биомассы регенерантов использовали гравиметрический метод. Измерение площади поверхности листьев проводили с использованием программы «Moticam 2300» (Испания) на фотографиях, сделанных с помощью цифровой камеры через микроскоп «Micros» (Австрия). В листьях средних ярусов, фиксированных жидким азотом, измеряли интенсивность перекисного окисления липидов (LPO) и содержание свободного пролина. В спиртовом экстракте определяли содержание фотосинтетических пигментов. В воздушно-сухом материале определяли суммарное содержание флавоноидов и антоцианов.

Интенсивность LPO определяли по содержанию малонового диальдегида (MDA) с помощью его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и образования розового хромогена [14]. Навеску растительного материала измельчали в присутствии 20%-ной трихлоруксусной кислоты, затем экстракт освобождали от нерастворимых компонентов центрифугированием на центрифуге «Centrifuge 5430R» («Eppendorf», Германия) в течение 15 мин при $g \times 12\,000$ и температуре 4 °С. Отбирали супернатант и с его аликвотой проводили реакцию с ТБК на водяной бане в течение 30 мин при температуре 98 °С. Оптическую плотность полученных окрашенных растворов измеряли на спектрофотометре «Genesys 10S UV-Vis» («Thermo Electron», Германия) при двух длинах волн (532 и 600 нм) и рассчитывали содержание MDA.

Уровень свободного пролина определяли на основе реакции с нингидрином в кислой среде [15]. Растительный материал тщательно измельчали в присутствии дистиллированной воды, центрифугировали в течение 17 мин при $g \times 10\,000$ и температуре 4 °С. Отбирали аликвоту супернатанта, добавляли дистиллированную воду, уксусную кислоту и нингидриновый реактив. Полученную реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 95–100 °С, затем охлаждали в емкости со льдом. Измеряли оптическую плотность при длине волны 520 нм.

Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически в экстрактах, полученных с помощью 96%-ного этилового спирта, по его оптической плотности при длинах волн 470, 644 и 662 нм и соответственно рассчитывали уровень каротиноидов, хлорофилла *b* и хлорофилла *a* по формулам, предложенным Lichtenthaler [16].

Определение содержания суммы флавоноидов (Flav) осуществляли на основе их комплексообразования с хлоридом алюминия и последующего измерения оптической плотности окрашенных растворов [17]. Навеску сухого растительного сырья трижды экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом на кипящей водяной бане, экстракты объединяли. Аликвоту экстракта выдерживали в течение 40 мин в присутствии хлористого алюминия и уксусной кислоты. Раствор сравнения, не содержащий хлористого алюминия, готовили для каждой пробы отдельно. После прохождения реакции определяли оптическую плотность опытного раствора и стандартного раствора рутин при $\lambda = 415$ нм. Вычисляли суммарное содержание Flav в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье.

Для определения содержания антоцианов навеску растительного сырья трижды экстрагировали 1%-ной соляной кислотой при температуре 40–45 °С, объединенный экстракт центрифугировали при $g \times 10\,000$ в течение 10 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре при длине волны 510 нм относительно раствора сравнения – 1%-ный соляной кислоты. Сумму антоцианов вычисляли в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в абсолютно сухом сырье [17].

В эксперименте использовали 100 материнских растений, из которых получали по 100 апикальных и средних микроклонов. Микроклоны помещали на среду MS в пробирках и культивировали в осветительной установке. По мере культивирования отмечали состояние микроклонов и по прошествии 4 суток отбраковывали клоны, не давшие корни (10–20 клонов из разных вариантов). В дальнейшем наблюдения проводили за 40 микроклонами с близкими ростовыми реакциями. У 39-дневных регенерантов измерения ростовых параметров проводили у 20 микроклонов, другие 20 и остальные взяты для определения биохимических параметров, поскольку в эксперименте использовали только листья. Эксперимент проведен в пяти биологических повторностях, состоящих из 3–5 листьев, и в трех аналитических измерениях.

Для сравнения экспериментальных данных, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения *t*-критерия находили для 95%-ного уровня значимости ($p < 0,05$). На рисунках представлены средние арифметические значения (M) с доверительными интервалами ($M \pm 1,96 \text{ SEM}$) для 20–40 и 5 биологических повторностей и 3 аналитических при определении соответственно морфологических и биохимических параметров.

Результаты исследования и обсуждение

В ходе изучения регенеративных способностей микроклонов, полученных с разных ярусов картофеля сорта Луговской, использовали метод микроклонального размножения растений. Этот метод основан на активации уже существующих у растения побеговых меристем путем снятия апикального доминирования и индукции ризогенеза в результате поранения при черенковании. Корни появляются раньше, поскольку имеют важное значение для роста растений, обеспечивая функции поглощения воды и питательных веществ, а также закрепления растения в субстрате. В связи с этим корневая система растения является важным целевым признаком для улучшения урожайности.

При помещении микроклонов разных ярусов картофеля на одинаковую питательную среду (сахарозосодержащую агаризованную 50%-ную среду MS) наблюдали отличия по времени и скорости формирования адвентивных корней (AdR) и побегов (рис. 1, *A–D*). Визуализацию корней у черенков картофеля отмечали на 4–5-е сутки, что согласуется с временной шкалой формирования AdR у томатов (индукция – 0–3 дня, инициация – 3–5 дней, а растяжение AdR и выход из стебля – на 5-й день) [18]. Более активное образование корней и их растяжение происходило после 7 суток культивирования у клонов из апекса, по сравнению с клонами среднего яруса (рис. 1, *A, B*). К 10-м суткам культивирования у апикальных клонов формировалось 7 корней, тогда как у средних – 4 корня, их общая длина составила соответственно $9,04 \pm 0,36$ и $6,56 \pm 0,26$ см. Известно, что AdR формируются после

восприятия травмирующего раздражителя из клеток базального слоя перикарпа у стеблевых черенков томатов, которые сначала формируют неупорядоченный клеточный кластер, в итоге превращающийся в куполообразный примордий AdR [18]. Возможно формирование AdR и из других типов клеток и тканей в зависимости от вида растений [19]. Появление AdR на поверхности стебля сопровождается запрограммированной гибелью эпидермальных клеток [18].

У микроклонов среднего яруса раньше начинались раскрытие почек и рост первого междоузлия побега, чем у апикального микроклона (рис. 1, C, D). Согласно нашим предварительным данным по регенерации микроклонов разных ярусов, показано, что чем дальше находился микроклон от апекса, тем раньше пробуждалась у него почка (данные не приведены). Аналогичные данные получены при сравнении регенерации микроклонов, полученных с 3-го и 5-го ярусов, до 21-х суток.

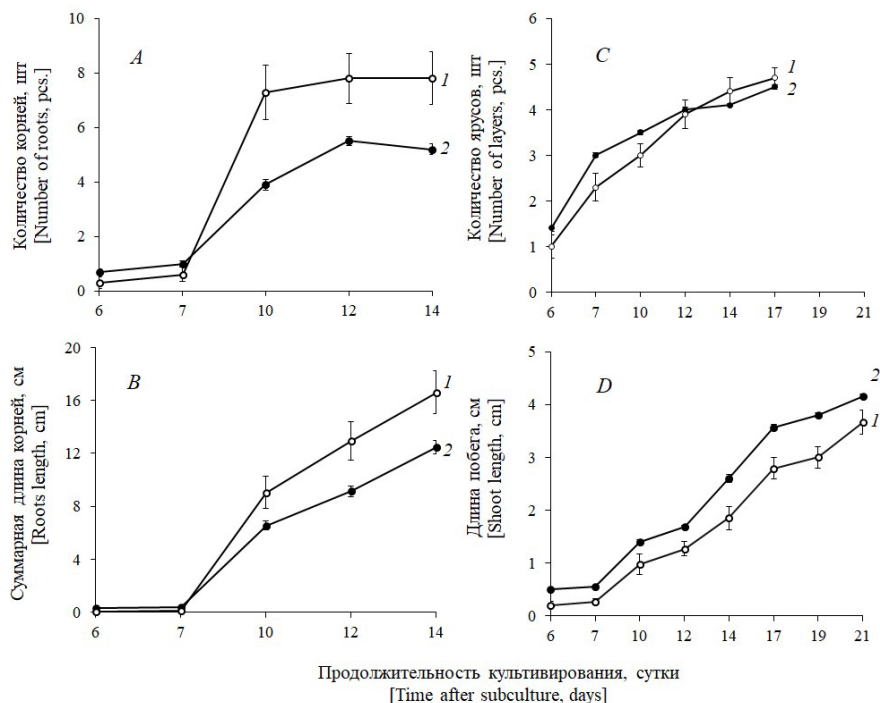


Рис. 1. Динамика ростовых параметров у апикальных (1) и средних (2) регенерантов *Solanum tuberosum* L. на начальных этапах их формирования ($M \pm 1,96 \text{ SEM}$): A – количество корней, B – суммарная длина корней, C – количество ярусов, D – длина побега

[Fig. 1. Dynamics of growth parameters in apical (1) and middle (2) *Solanum tuberosum* L. regenerants at the initial stages of their formation ($M \pm 1,96 \text{ SEM}$):

A - Number of roots, psc.; B - Roots length, cm; C - Number of layers, psc.; D - Shoot length, cm]

Следует отметить проявление донорно-акцепторных связей между органами при формировании регенерантов. Преобладающий рост корневой системы (количество и длина корней) (см. рис. 1, *A, B*) у апикального микроклона вызывал торможение роста и развития побега (длина побега и количество ярусов) (см. рис. 1, *D, C*). В то время как у среднего микроклона происходила противоположная закономерность: преобладал рост побега при торможении роста корня.

В связи с существующим гормональным градиентом ауксинов вдоль оси стебля при клонировании материнских растений образуются метамеры с неоднородным гормональным пулом. Градиенты создаются за счёт базипетального транспорта ауксинов, синтезированных в апексе побега. Эти градиенты контролируют органогенез, поддерживая апикальное доминирование и тормозя развитие боковых почек. Известно, что действие гормонов подчиняется дозовому эффекту, что легко подтверждается эффективностью действия их различных концентраций на рост разных органов у проростков *Arabidopsis thaliana* [20]. С увеличением концентрации экзогенная IAA активировала растяжение элементов побега (гипокотилия и семядолей), но тормозила растяжение корня проростков дикого типа Col. Для определения судьбы клеток помимо концентрации также важен тип ауксина. Например, экзогенная 1-нафталинуксусная кислота (NAA) стимулирует удлинение клеток, а 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота вызывает их деление [21].

Гормональный статус клонов может влиять на их укоренение и пробуждение почки. На основе известных данных мы полагали, что если в апикальном метамере больше IAA, то, следовательно, и ризогенез будет проходить с большей скоростью, тогда как средний клон будет содержать меньше ауксинов, а следовательно, пробуждение почки будет происходить раньше и длина побега будет больше. Однако само поранение дополнительно изменяет гормональный баланс черенка. В соответствии с данными, полученными на черенках томата, гормональный баланс меняется уже через 5 ч, над местом иссечения стебля (0–0,5 см) накапливается IAA по сравнению верхним участком (2–2,5 см). В связи с этим авторы считают, что локальные максимумы ауксина способствуют образованию AdR [18]. Вслед за изменением содержания IAA показаны самые высокие уровни Z при 12 и 120 ч, что соответствовало фазам индукции и удлинения AdR соответственно. Обработка черенков экзогенной 10 мкМ IAA приводила к увеличению содержания Z в максимумах, соответствующих контролю, и наблюдались дополнительные максимумы на 36 и 72 ч, соответствующие фазе инициации AdR. При нарушении полярного транспорта (обработка NPA – 1-N-Naphthylphthalamic acid) в черенках снижен уровень Z. На основе этих данных авторы предположили, что взаимодействие ауксины–цитокинины, а не абсолютные уровни этих гормонов регулируют развитие AdR. Важную роль в образовании AdR может играть и этилен, поскольку над местом разреза у основания иссечен-

ного стебля томата IAA накапливалась аминокicloпропан-1-карбоновая кислота (предшественник этилена) [18].

Кроме того, согласно гипотезе регенерации корней *de novo* на листе [2] само поранение вызывает образование сигнала, который передается в клетки, преобразующие сигналы и активирующие синтез IAA. Этим сигнальным веществом может выступать жасминовая кислота [22]. Транспорт IAA к компетентным клеткам, обеспечивающим регенерацию, обуславливает изменения их программ развития под управлением ауксина.

В нашем случае регенерация корней картофеля происходила на уровне участка стебля, вследствие этого к предполагаемым механизмам, предложенным [2], добавляется синтез Ск и существующий базипетальный поток гормонов из осевой части микроклона и прилегающего листа [18]. Изменение во времени процессов регенерации микроклонов картофеля с разных ярусов растения могло быть связано не только с содержанием ауксинов, но и с разной скоростью транспорта IAA по разным транспортным системам, подключающимся к переносу гормона. При этом распределение ауксина с помощью полярного транспорта имеет много меньшую скорость (10 мм / ч), чем транспорт на большие расстояния с использованием флоэмы (7 см / ч в корне) [5]. За отток ауксина у томатов отвечают переносчики семейства PIN и суперсемейство АТФ-связывающих кассетных переносчиков (ABC) преимущественно В-типа (ABCB) [18]. Ряд авторов отмечают важность ABCB19 для образования AdR [18, 21]. Семейство генов *AUXIN1 / LIKE-AUX1 (AUX / LAX)* кодирует симпортеры притока ауксина. Белки PIN играют важную роль в полярном транспорте ауксина из-за их асимметричной субклеточной локализации. SIPIN3, SIPIN4 и SIPIN7 важны для индукции AdR, тогда как SIPIN2, по-видимому, важен для индукции и возникновения AdR [18]. Кроме транспорта ауксинов, для формирования органов важно высвобождение ауксинов из запасных форм, таких как индол-3-масляная кислота (IBA) или конъюгаты IAA [21].

Перед делением клеток перицикла многие гены, связанные с клеточным циклом, такие как гены циклина и циклин-зависимой киназы, экспрессируются в обработанных ауксином корнях *Arabidopsis*, что позволяет предположить, что ауксин способствует инициации AdR, по аналогии с боковым корнем, путем активации генов, связанных с клеточным циклом [5]. Вслед за изменением уровней IAA и Ск, регулирующих последующее развитие корней, стимулируются гликолиз и пентозофосфатный путь [22].

Следующее звено в механизме регенерации корней у микроклонов картофеля – с большей вероятностью влияние IAA на мобилизацию ассимилятов из верхних частей черенка (участка стебля и листа), что согласуется с данными по укоренению черенков гипокотили *Phaseolus vulgaris* [23]. Авторами установлено, что ускорение укоренения черенков заключалось в увеличении доступности сахара в месте образования корней. Источник ассимилятов – листья *P. vulgaris*, поскольку их удаление уменьшило образование корней в

гипокотиле, в то время как удаление верхушечной почки оказывало менее вредоносное влияние. Проявление эффекта IAA в индуцировании большего количества корней зависело от площади листьев и оказалось лучше, когда присутствовали все листья. ^{14}C -ассимиляты (сахар) медленно накапливались в основании черенков в течение 4 дней после иссечения, однако экзогенный IAA значительно увеличивал это накопление к 24-часовому периоду одновременно с образованием корней [23].

В настоящее время установлено взаимодействие между путями ответа на действие глюкозы и ауксина в регуляции роста корней [24]. Только глюкоза может на уровне транскрипции регулировать 376 (62%) генов из 604 генов, на которые влияет IAA. Глюкоза может влиять на гены, кодирующие ферменты биосинтеза IAA (YUCCA), белки-переносчики ауксина PIN, рецепторы TIR1 и компоненты сигналинга IAA – AUX / IAA, GH3 и SAUR, что позволяет предполагать влияние глюкозы на рост и развитие корней растений не только как трофического вещества, но и как регулятора, взаимодействующего с передачей сигналов и транспортом ауксинов.

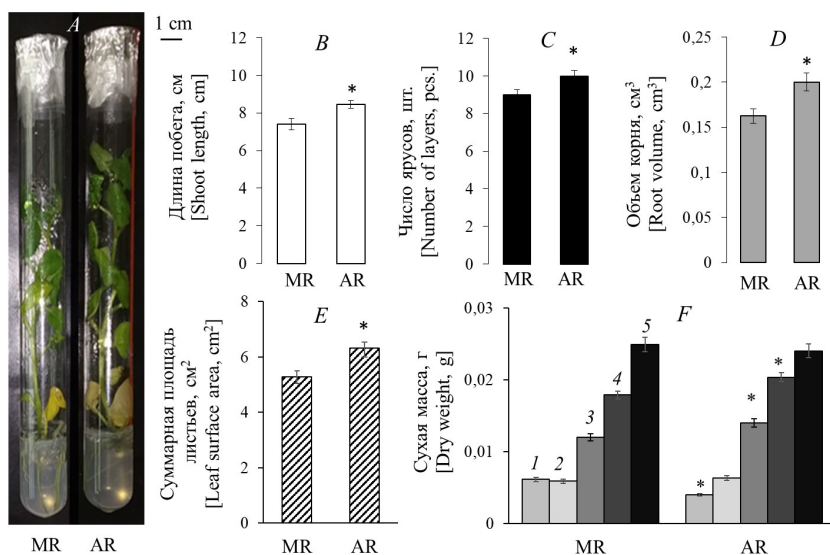


Рис. 2. Внешний вид (A) и морфологические параметры (B–F) 39-дневных средних (MR) и апикальных (AR) регенерантов *Solanum tuberosum* L. *in vitro* ($M \pm 1,96 \text{ SEM}$);

1 – корень, 2 – стебель, 3 – листья, 4 – побег, 5 – растение.

* – статистически значимые отличия от варианта MR ($p < 0,05$)

[Fig. 2. Appearance (A) and morphological parameters (B–F) in 39-day-old middle (MR) and apical (AR) regenerants of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* ($M \pm 1,96 \text{ SEM}$):

1 - Root, 2 - Stem, 3 - Leaf, 4 - Shoot, 5 - Plant. *Statistically significant differences from MR ($p < 0.05$)]

Анализ ростовых параметров у 39-дневных регенерантов картофеля (рис. 2, A), полученных из апикальных (AR) и средних ярусов (MR) мате-

ринских 21-дневных растений картофеля, показал, что AR превосходят MR по размерам. Установлено, что у AR объём корней, длина побега, количество ярусов и суммарная площадь листьев увеличивались соответственно на 25, 14, 11 и 20% по сравнению с MR (рис. 2, B–E).

Этому предшествовало более активное корнеобразование у AR к 10-м суткам культивирования (см. рис. 1, A, B). Увеличение размеров AR связано с изначально повышенным уровнем эндогенных ауксинов, которые в сочетании с другими гормонами играют важную роль в построении тела растения. Полученные нами данные по IAA-зависимому росту так же согласуются с данными о влиянии других эндогенных ауксинов, таких как NAA и IBA, которые также участвуют в регуляции деления и роста клеток, развития корней, формирования листьев и апикального доминирования и дифференциации сосудистых тканей [25].

Сравнительный анализ накопления суммарной сухой массы регенерантами выявил, что при одинаковом углеводном питании (3% сахароза) и доступности CO₂ регенеранты (растения, рис. 2, F) набирали близкую биомассу. Однако неоднозначно происходило перераспределение сухого вещества между органами в растении. В соответствии с данными, представленными на рис. 2, F, показано, что AR имели меньшую сухую массу корня (на 34%) относительно MR, но большую биомассу побега (на 13,4%) за счёт листовой поверхности. В результате отношение сухой массы побега к корню выше у AR по сравнению с MR.

В культуре регенерантов картофеля *in vitro* имеет место преимущественно гетеротрофный рост, поскольку низкий уровень газообмена между внешней средой и растением обеспечивает лишь 5–6% фотосинтетических потребностей пробирочного растения [26]. Подтверждением этому факту служили и наши данные. Более активный рост AR происходил на фоне низкого содержания всех групп фотосинтетических пигментов и отношения хлорофилл *a*/хлорофилл *b* (рис. 3, E). В процессе фотосинтеза регенерантов в пробирке происходит усвоение CO₂, выделяющегося при гетеротрофном росте, равно как выделяемый кислород может способствовать гетеротрофному росту. По мнению Л.Н. Цоглина с соавт., «гетеротрофный и автотрофный способы питания оказываются в значительной степени замкнутыми друг на друга и мощность фотосинтетического роста не может превышать гетеротрофный».

Изучение физиологического состояния средних листьев показало их различие у регенерантов, полученных из микроклонов разных ярусов материнских растений. У листьев AR уменьшилась на 22% интенсивность перекисного окисления липидов (содержание MDA) относительно MR, что свидетельствовало о формировании у MR большего окислительного статуса (рис. 3, A). Причиной увеличения окислительного статуса листьев могла служить интенсивность процессов, производящих активные формы кислорода (ROS). Поскольку известно, что источниками ROS служат процессы фотосинтеза и дыхания [27], то следует ожидать увеличения интенсивности этих процессов у MR.

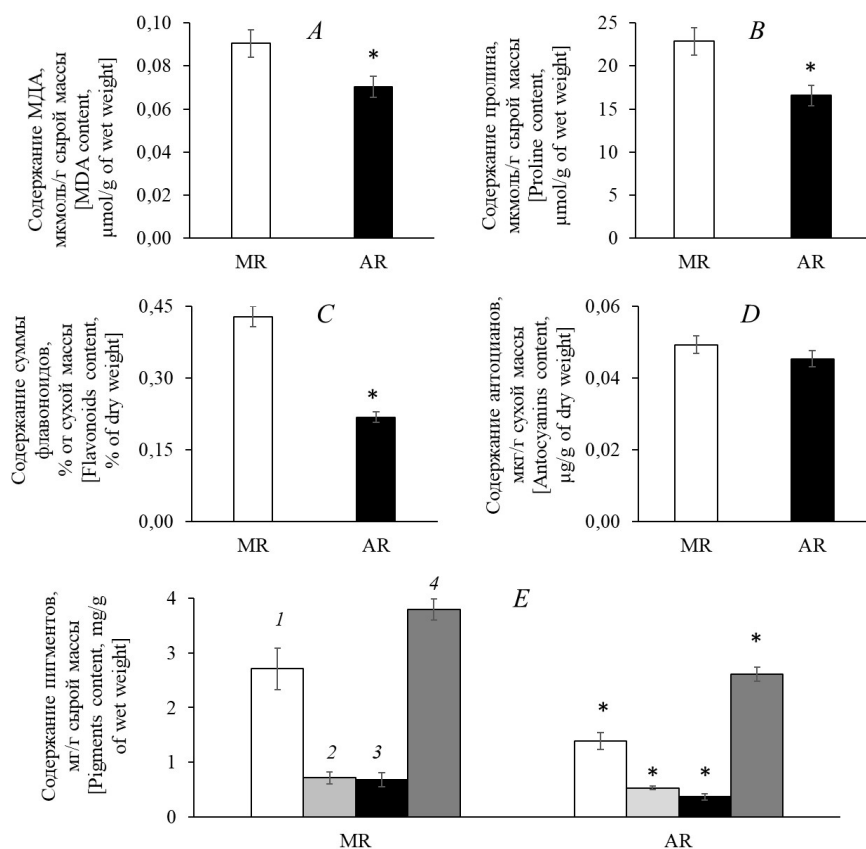


Рис. 3. Содержание метаболитов в средних (MR) и апикальных (AR) 39-дневных регенерантах *Solanum tuberosum* L. *in vitro* ($M \pm 1,96$ SEM): малонового диальдегида (A), свободного пролина (B), суммы флавоноидов (C), антоцианов (D) и фотосинтетических пигментов (E): 1 – хлорофилл a, 2 – хлорофилл b, 3 – каротиноиды, 4 – хлорофилл a / хлорофилл b. * – статистически значимые отличия от варианта MR ($p < 0,05$)

[Fig. 3. The content of metabolites in middle (MR) and apical (AR) 39-day-old regenerants of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* ($M \pm 1,96$ SEM): A - Malondialdehyde; B - Free proline; C - Flavonoids; D - Anthocyanins; E - Photosynthetic pigments; 1 - Chlorophyll a; 2 - Chlorophyll b; 3 - Carotenoids; 4 - Chlorophyll a / Chlorophyll b.

*Statistically significant differences from MR ($p < 0.05$)]

О лучшем формировании фотосинтетического аппарата у MR свидетельствовало не только большее количество фотосинтетических пигментов (хлорофилл a, хлорофилл b, каротиноиды) и отношение хлорофилла a к хлорофиллу b (см. рис. 3, E), но и повышенное производство ROS (см. рис. 3, A). ROS обладают высокой окислительной способностью и в случае чрезмерного образования повреждают компоненты клетки, в том числе и липиды. Однако в норме растительная клетка способна контролировать уровень ROS,

которые могут взаимодействовать с эпигенетическими модификаторами и гормонами в регуляции процессов развития растений [28]. Считается, что ROS выступают как важные и необходимые факторы для пролиферации и дифференцировки клеток [28]. В настоящее время развиваются представления о физиологических и молекулярных взаимодействиях ауксинов и ROS [29]. Прежде всего, показана способность ауксинов регулировать уровни ROS, обусловленная повышением экспрессии множества генов, связанных с абиотическим стрессом (*RAB18*, *RD22*, *RD29A*, *RD29B*, *DREB2A* и *DREB2B*), и положительным влиянием на активность антиоксидантных ферментов [8].

Уменьшение интенсивности LPO у активно растущих AR могло свидетельствовать о повышении ауксинами активности неферментативных и ферментативных антиоксидантов. Это предположение согласуется с результатами исследований А. Piotrowska-Niczyporuk и А. Bajguz, в которых показано влияние экзогенных природных ауксинов на метаболизм зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*, что выражалось в повышении уровней аскорбата, глутатиона, супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и каталазы [25].

Анализ содержания свободного пролина у регенерантов картофеля, полученных из микроклонов разных ярусов, показал, что у AR происходило снижение аккумуляции свободного пролина на 28% относительно MR (см. рис. 3, В). Можно предположить, что истощение уровня свободного пролина происходило в процессе удаления ROS или активации ряда ферментов, связанной с выполнением пролином функции шаперона, который взаимодействовал с белками и поддерживал их функциональную конформацию [30]. В то же время более активный рост AR картофеля мог сопровождаться и большим использованием пролина в качестве источника азота, чем MR. На подобное явление указывают и другие авторы, в исследованиях которых уровень пролина снизился в ответ на дефицит азота в *P. vulgaris* из-за стимуляции пролиндегидрогеназы [31]. Известно, что экзогенный пролин действует как источник азота для различных морфогенетических процессов, таких как эмбриогенез и органогенез, различающихся по потребности в азоте (особенно в форме пролина), который также действует как осморегулятор [31].

Среди вторичных метаболитов, играющих важную роль в защите антиоксидантов, можно назвать флавоноиды (Flav). Сравнительный анализ показал, что по суммарному содержанию Flav MR двукратно превышали AR (см. рис. 3, С). Это могло свидетельствовать о разном возрасте метамеров, взятых для микроклонального размножения, или интенсивности их ростовых процессов. В нашем раннем исследовании установлена возрастная зависимость аккумуляции Flav в листьях *L. sativa* [12]. Содержание Flav выше во взрослых и стареющих листьях по сравнению с молодыми листьями. Эти данные свидетельствовали об усилении вторичного метаболизма с завершением активного роста листа. Показано также, что по мере старения растений регенерационная способность корней постепенно снижается. У молодых растений факторы транскрипции AP2 / ERF (*APETALA2* / *ETHYLENE*

RESPONSE FACTOR), включая ABSCISIC ACID REPRESSOR1 и ERF109, быстро индуцируются раной и служат сигналами, вызывающими биосинтез ауксина [1], в то время как у старых растений SPL2, SPL10 и SPL11 напрямую связываются с промоторами *AP2 / ERF* и ослабляют их индукцию, тем самым подавляя накопление ауксина в ране [1].

По уровню антоцианов листья среднего яруса у MR и AR картофеля не отличались, что можно объяснить одинаковой доступностью сахаров из питательной среды (см. рис. 3, *D*) и одинаковыми условиями освещения. Для сахарозы показана не только субстратная роль в синтезе антоцианов, но и регуляторная, поскольку она активирует ген *PAP1* (*Production of Anthocyanin Pigmentation 1*) через сахарозоспецифический сигнальный путь [31], а также экспрессию кодирующих ферменты синтеза антоцианов генов *DFR* (*Dihydroflavonol-4-Reductase*), *LDOX* (*Leucoanthocyanidin Dioxygenase*) и *UF3GT* (*UDPGlucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase*).

Полученные данные показывают возможность исходного гормонального статуса микроклонов изменять последовательность и интенсивность процессов их регенерации, включая органогенез, интенсивность роста и метаболизма растений. Использование апикальных микроклонов особенно важно при необходимости повышения коэффициента размножения растений.

Предполагается изучение количественного изменения эндогенного гормонального статуса средних и апикальных микроклонов растений картофеля под действием экзогенной IAA.

Заключение

В процессе исследования установлены специфика регенерации микроклонов, полученных из разных фрагментов побега материнского растения, а также особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *S. tuberosum* L., полученных из этих микроклонов. Клоны, полученные из средней части побега материнского растения, раньше восстанавливали утраченный побег за счет пробуждения почки. Клоны, полученные из апикальной части исходного растения, активнее формировали корневую систему, что в последующем отразилось на формировании регенерантов с большими ростовыми параметрами относительно клонов из средних ярусов. Повышенный уровень эндогенной IAA в апикальной части побега активировал ризогенез клонов на начальном этапе их регенерации, а также влиял на снижение интенсивности LPO, уменьшение содержания свободного пролина и флавоноидов на поздних этапах развития регенерантов. Обсуждаются механизмы, лежащие в основе различной скорости регенерации микрочеренков, взятых с разных ярусов побега *S. tuberosum*.

Литература

1. Ye B.-B., Shang G.-D., Pan Y., Xu Z.-G., Zhou C.-M., Mao Y.-B., Bao N., Sun L., Xu T., Wang J.-W. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration // *The Plant Cell*. 2020. Vol. 32. PP. 226–241. doi: [10.1105/tpc.19.00378](https://doi.org/10.1105/tpc.19.00378)
2. Xu L. *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition // *Current Opinion in Plant Biology*. 2018. Vol. 41. PP. 39–45. doi: [10.1016/j.pbi.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.004)
3. Finet C., Jaillais Y. Auxology: when auxin meets plant evo-devo // *Developmental biology*. 2012. Vol. 369, № 1. PP. 19–31. doi: [10.1016/j.ydbio.2012.05.039](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.039)
4. Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth // *Plant Journal*. 2001. Vol. 28, № 4. PP. 465–474. doi: [10.1046/j.1365-3113x.2001.01173.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.01173.x)
5. Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. Auxin control of root development // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010. Vol. 2(6): a001537. doi: [10.1101/cshperspect.a001537](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537)
6. Swarup K., Benkova E., Swarup R., Casimiro I., Peret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D. et al. Bennett the auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence // *Nature Cell Biology*. 2008. Vol. 10. PP. 946–954. doi: [10.1038/ncb1754](https://doi.org/10.1038/ncb1754)
7. Bowman J.L., Floyd S.K. Patterning and polarity in seed plant shoots // *Annual Review of Plant Science*. 2008. Vol. 59. PP. 67–88. doi: [10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356)
8. Bielach A., Hrtyan M., Tognetti V.B. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin // *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, № 7. PP. 1427. doi: [10.3390/ijms18071427](https://doi.org/10.3390/ijms18071427)
9. Ощепков М.С., Калистратова А.В., Савельева Е.М., Романов Г.А., Быстрова Н.А., Кочетков К.А. Природные и синтетические цитокинины и их применение в биотехнологии, агрохимии и медицине // *Успехи химии*. 2020. Т. 89, № 8. С. 787–810. doi: [10.1070/RCR4921](https://doi.org/10.1070/RCR4921)
10. Ломин С.Н., Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю., Осолодкин Д.И., Романов Г.А. Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4, № 3 (14) С. 34–48. doi: [10.32607/20758251-2012-4-3-31-45](https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-31-45)
11. Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. Vol. 101, № 23. PP. 8821–8826. doi: [10.1073/pnas.0402887101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101)
12. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Видершпан А.Н., Лаптев Н.И. Возрастные морфофизиологические и биохимические изменения у растений *Lactuca sativa* L. под влиянием селена и света разной интенсивности // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53, № 5. С. 1025–1036. doi: [10.15389/agrobiol.2018.5.1025rus](https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.5.1025rus)
13. Головацкая И.Ф., Кадырбаев М.К., Сатканов М.Ж., Плюснин И.Н. Специфика действия 24-эпибрассинолида на морфофизиологические реакции регенерантов картофеля с разным уровнем ИУК *in vitro* // *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: сборник научных трудов по материалам XIII Международного симпозиума*. М. : РУДН, 2019. С. 59–61. doi: [10.22363/09509-2019-59-61](https://doi.org/10.22363/09509-2019-59-61)
14. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods in Enzymology*. 1978. Vol. 52. PP. 302–310. doi: [10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
15. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39. PP. 205–212. doi: [10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060)

16. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enzymology*. 1987. Vol. 148. PP. 350–382. doi: [10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
17. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11-е изд. / отв. ред. М.Д. Машковский. М.: Медицина, 1989. 400 с.
18. Guan L., Tayengwa R., Cheng Z. (Max), Peer W.A., Murphy A.S., Zhao M. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings // *BMC Plant Biology*. 2019. Vol. 19(1). PP. 435. doi: [10.1186/s12870-019-2002-9](https://doi.org/10.1186/s12870-019-2002-9)
19. Lakehal A., Bellini C. Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions // *Physiologia Plantarum*. 2019. Vol. 165. PP. 90–100. doi: [10.1111/ppl.12823](https://doi.org/10.1111/ppl.12823)
20. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Карначук Р.А. Роль мелатонина в регуляции ИУК-зависимых реакций растений в разных условиях освещения // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2017. № 37. С. 144–160. doi: [10.17223/19988591/37/8](https://doi.org/10.17223/19988591/37/8)
21. Verstraeten I., Schotte S., Geelen D. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 495. doi: [10.3389/fpls.2014.00495](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00495)
22. Ahkami A.H., Melzer M., Ghaffari M.R., Pollmann S., Javid M.G., Shahinnia F., Hajirezaei M.R., Druge U. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrid* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation // *Planta*. 2013. Vol. 238. PP. 499–517. doi: [10.1007/s00425-013-1907-z](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1907-z)
23. Altman A., Wareing P.F. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings // *Physiologia Plantarum*. 1975. Vol. 33. PP. 32–38. doi: [10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x)
24. Mishra B.S., Singh M., Aggrawal P., Laxm A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, Iss. 2. e4502. doi: [10.1371/journal.pone.0004502](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004502)
25. Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) // *Plant Growth Regulation*. 2014. Vol. 73, № 1. PP. 57–66. doi: [10.1007/s10725-013-9867-7](https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7)
26. Цоглин Л.Н., Мелик-Саркисов О.С., Андреев Т.И., Розанов В.В. Газообмен и фотосинтез растений картофеля в условиях *in vitro* // *Доклады Академии наук*. 1991. Т. 316, № 1. С. 1020–1024.
27. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 48, № 12. PP. 909–930. doi: [10.1016/j.plaphy.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016)
28. Huang H., Ullah F., Zhou D.-X., Yi M., Zhao Yu. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. PP. 800. doi: [10.3389/fpls.2019.00800](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800)
29. Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level // *Journal of Experimental Botany*. 2005. Vol. 56, № 418. PP. 1991–2001. doi: [10.1093/jxb/eri196](https://doi.org/10.1093/jxb/eri196)
30. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review // *Plant Signaling and Behavior*. 2012. Vol. 7, № 11. PP. 1456–1466. doi: [10.4161/psb.21949](https://doi.org/10.4161/psb.21949)
31. Sánchez E., García P.C., López-Lefebvre L.R., Rivero R.M., Ruiz J.M., Romero L. Proline metabolism in response to nitrogen deficiency in French Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike) // *Plant Growth Regulation*. 2002. Vol. 36. PP. 261–265. doi: [10.1023/A:1016583430792](https://doi.org/10.1023/A:1016583430792)

Поступила в редакцию 13.03.2021 г.; повторно 07.07.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.

Авторский коллектив:

Кадырбаев Максат Кадырбаевич, аспирант кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Биологического института, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: Kadyrbaev.maks@mail.ru

Головацкая Ирина Феофистовна, д-р биол. наук, профессор 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/0000-0002-1919-1893>

E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Сатканов Мереке Жайдарбекович, бакалавр кафедры биотехнологии и микробиологии Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева (Казахстан, 010008, г. Нур-Султан, ул. Казымукана, 13, корпус № 3).

E-mail: 19mereke99@mail.ru

For citation: Kadyrbaev MK, Golovatskaya IF, Satkanov MZh. Features of regenerants morphogenesis and metabolism *in vitro*, obtained from different fragments of potato shoots. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:114–134. doi: 10.17223/19988591/55/7 In Russian, English Summary

Maksat K. Kadyrbaev¹, Irina F. Golovatskaya¹, MEREKE Zh. Satkanov²

¹*Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation*

²*L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan*

**Features of regenerants morphogenesis and metabolism *in vitro*,
obtained from different fragments of potato shoots**

Micropropagation is one of the fastest ways of plant propagation. This method allows obtaining a large number of clones that retain all characteristics of the species and varieties of plants. Among the important problems of micropropagation of potato plants, two can be distinguished: the rate of microclones regeneration (rooting of microclones and the development of regenerants) *in vitro* and the value of the propagation factor (number of layers). The plant hormones auxins and cytokinins, whose content changes along the longitudinal axis of the plant, play a key role in the regeneration of cuttings. The aim of this research was to study the specificity of micropropagation, morphogenesis and metabolism of *Solanum tuberosum* L. regenerants *in vitro*, depending on the initial explants position in the plant.

The objects of the study were plants of *S. tuberosum* L. of the mid-season cultivar Lugovskoy. During the experiment, cuttings (explants) taken from layers 3 and 5 of the shoot consisted of internodes, buds and leaves. We chose apical cuttings containing a greater amount of endogenous auxins due to the spatial separation of the site of synthesis and the main action of these hormones in the plant as experienced clones. Cuttings from the middle of the shoot were those of control. We cultured cuttings on hormone-free solid agar 50% nutrient medium Murashige-Skoog (MS) supplemented with 3% sucrose and vitamins. The flux density of incident photons of the PAR was 200–230 $\mu\text{mol} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$, with a 16-hour photoperiod and an air temperature of 20–22°C. Luminescent white lamps TL-D 58W / 54–765 G13 (Philips, Poland) were used as a light source. The relative light intensity was measured using an AvaSpec-102/256/1024/2048 spectrometer version 6.2 (Avantes BV, Netherlands). During 3 weeks of culturing microclones in test tubes, we described the phenology of their regeneration. We assessed the formation of adventive roots (AdR) by the dynamics of changes in the number and length of AdR primordia. The formation of regenerants was assessed by the dynamics of changes in the number of layers and the length of shoots. At the end of cultivation on the 39th

day, we removed the regenerants from the test tubes and determined their growth and biochemical parameters. We used the gravimetric method to determine the wet and dry biomass of the regenerants. We measured the leaf surface area using the Moticam 2300 software (Spain) on photographs taken with a digital camera. The intensity of lipid peroxidation (LPO) and the content of free proline were measured in the leaves of the middle layers fixed with liquid nitrogen. The content of photosynthetic pigments was determined in the alcoholic extract. In the air dry material, the total content of flavonoids and anthocyanins was determined. We carried out the measurements using a Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Electron, Germany). The significance of the differences between the samples was assessed using Student's *t*-test ($p < 0.05$). Figures show data as the mean of the repetitions and their confidence interval ($M \pm 1.96\text{SEM}$). All experiments were performed in 20-40 (growth parameters) and five (physiological parameters) biological and three analytical replicates.

We noted the emergence of roots in potato cuttings on the 4th-5th day. More active root formation and their elongation occurred after seven days of cultivation in apical clones, compared with clones obtained from the middle layer. By the 10th day of cultivation, the apical clones had formed seven roots, while the middle ones had four roots, their total length was 9.04 ± 0.36 and 6.56 ± 0.26 cm, respectively (See Fig. 1, A-B). In the cuttings of the middle layer, bud opening and growth of the first shoot internode started earlier than in the apical microclone (See Fig. 1, C-D). The manifestation of donor-acceptor bonds between organs during the formation of regenerants should be noted. The predominant growth of the root system in the apical microclone caused inhibition of the growth and development of the shoot. In the middle microclone, the opposite pattern took place: shoot growth prevailed when the root growth was inhibited. We studied the growth parameters of 39-day-old potato regenerants obtained from apical (AR) and medium (MR) shoot cuttings of potato mother plants (See Fig. 2, A). In AR, root volume, shoot length, number of layers, and the total leaf area increased by 25, 14, 11 and 20% ($p < 0.05$), respectively compared to MR (See Fig. 2, B-E). The regenerants had the same total dry biomass (See Fig. 2, F). However, the redistribution of dry matter between the organs in the plant was ambiguous. We showed that ARs had a 34% ($p < 0.05$) lower dry root mass relative to MR, but a 13.4% higher shoot biomass due to the leaf surface. As a result, the shoot-to-root dry mass ratio was higher in AR compared to MR. *In vitro* potato regenerants showed predominantly heterotrophic growth since more active AR growth occurred against the background of a low content of all groups of photosynthetic pigments and the chlorophyll *a* / chlorophyll *b* ratio (See Fig. 3, E). We studied the physiological state of the regenerants by the biochemical parameters of the middle leaves. In AR leaves, the intensity of LPO relative to MR decreased by 22% ($p < 0.05$), which indicated the formation of a higher oxidative status in MR. AR has a reduced content of free proline by 28% ($p < 0.05$) compared to MR (See Fig. 3, A-B). The total flavonoids content in MR was twice that in AR (See Fig. 3, C). This could indicate a decrease in the intensity of their growth processes. The level of anthocyanins in the MR and AR did not differ.

The data obtained show the ability of the initial hormonal status of microclones to change the sequence and intensity of their regeneration processes, including organogenesis, growth rate and plant metabolism. The use of apical micro-clones is especially important when it is necessary to increase the reproductive rate of plants. The mechanisms underlying the different rates of regeneration of microscopic cuttings taken from different layers of the *S. tuberosum* shoot are discussed.

The paper contains 3 Figures and 31 References.

Key words: *Solanum tuberosum*; regeneration; lipid peroxidation; antioxidants; photosynthetic pigments

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Ye B-B, Shang G-D, Pan Y, Xu Z-G, Zhou C-M, Mao Y-B, Bao N, Sun L, Xu T, Wang J-W. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration. *The Plant Cell*. 2020;32:226-241. doi: [10.1105/tpc.19.00378](https://doi.org/10.1105/tpc.19.00378)
2. Xu L. *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition. *Current Opinion in Plant Biology*. 2018;41:39-45. doi: [10.1016/j.pbi.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.004)
3. Finet C, Jaillais Y. Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology*. 2012;369(1):19-31. doi: [10.1016/j.ydbio.2012.05.039](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.039)
4. Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant Journal*. 2001;28(4):465-474. doi: [10.1046/j.1365-313x.2001.01173.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01173.x)
5. Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(6):a001537. doi: [10.1101/cshperspect.a001537](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537)
6. Swarup K, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD et al. Bennett the auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*. 2008;10:946-954. doi: [10.1038/ncb1754](https://doi.org/10.1038/ncb1754)
7. Bowman JL, Floyd SK. Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annual Review of Plant Science*. 2008;59:67-88. doi: [10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356)
8. Bielach A, Hrtan M, Tognetti VB. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(7):1427. doi: [10.3390/ijms18071427](https://doi.org/10.3390/ijms18071427)
9. Oshchepkov MS, Kalistratova AV, Savel'yeva YeM, Romanov GA, Bystrova NA, Kochetkov KA. Natural and synthetic cytokinins and their applications in biotechnology, agrochemistry and medicine. *Uspekhi Khimii = Russian Chemical Reviews*. 2020;89(8):787-810. doi: [10.1070/RCR4921](https://doi.org/10.1070/RCR4921) In Russian, English Summary
10. Lomin SN, Krivosheyev DM, Steklov MYu, Osolodkin DI, Romanov GA. Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*. 2012;4(3):34-48. doi: [10.32607/20758251-2012-4-3-31-45](https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-31-45) In Russian, English Summary.
11. Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T. *In planta* functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(23):8821-8826. doi: [10.1073/pnas.0402887101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101)
12. Golovatskaya IF, Boyko EV, Vidershan AN, Laptev NI. Age-dependent morphophysiological changes and biochemical composition of *Lactuca sativa* L. plants influenced by Se and solar radiation of varying intensity. *Agricultural Biology*. 2018;53(5):1025-1036. doi: [10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng](https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng)
13. Golovatskaya IF, Kadyrbaev MK, Satkanov MZh, Plyusnin IN. Specifics of action of 24-epibrassinolide on the morphophysiological reactions of potato regenerants with different IAA levels *in vitro*. In: *Novyye i netraditsionnyye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya: sbornik nauchnykh trudov po materialam XIII Mezhdunarodnogo simpoziuma* [New and unconventional plants and prospects for their use. Proceedings of the XIII International Symposium]. Author's edition. Moscow: RUDN Publ.; 2019. pp. 59-61. doi: [10.22363/09509-2019-59-61](https://doi.org/10.22363/09509-2019-59-61) In Russian
14. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978;52:302-310. doi: [10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
15. Bates LS, Waldran RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-212. doi: [10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060)
16. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 1987;148:350-382. doi: [10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

17. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR: Vyp. 2. Obshchiye metody analiza. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye [State Pharmacopoeia of the USSR: Vol. 2. General methods of analysis. Medicinal plant raw materials]. XI iss. Mashkovskiy MD, editor. Moscow: Meditsina Publ.; 1989. 400 p. In Russian
18. Guan L, Tayengwa R, Cheng Z (Max), Peer WA, Murphy AS, Zhao M. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. *BMC Plant Biology*. 2019;19(1):435. doi: [10.1186/s12870-019-2002-9](https://doi.org/10.1186/s12870-019-2002-9)
19. Lakehal A, Bellini C. Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*. 2019;165:90-100. doi: [10.1111/ppl.12823](https://doi.org/10.1111/ppl.12823)
20. Golovatskaya IF, Boyko EV, Karnachuk RA. Role of melatonin in the regulation of IAA-dependent plant reactions under different lighting conditions. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;37:144-160. doi: [10.17223/19988591/37/8](https://doi.org/10.17223/19988591/37/8) In Russian, English Summary.
21. Verstraeten I, Schotte S, Geelen D. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:495. doi: [10.3389/fpls.2014.00495](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00495)
22. Ahkami AH, Melzer M, Ghaffari MR, Pollmann S, Javid MG, Shahinnia F, Hajirezaei MR, Druege U. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrid* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*. 2013;238:499-517. doi: [10.1007/s00425-013-1907-z](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1907-z)
23. Altman A, Wareing PF. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. *Physiologia Plantarum*. 1975;33:32-38. doi: [10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x)
24. Mishra BS, Singh M, Aggrawal P, Laxm A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4502. doi: [10.1371/journal.pone.0004502](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004502)
25. Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiphyceae). *Plant Growth Regulation*. 2014;73(1):57-66. doi: [10.1007/s10725-013-9867-7](https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7)
26. Tsoglin LN, Melik-Sarkisov OS, Andreyenko TI, Rozanov VV. Gazoobmen i fotosintez rasteniy kartofelya v usloviyakh *in vitro* [Gas exchange and photosynthesis of potato plants *in vitro*. *Doklady Akademii Nauk*. 1991;316(1):1020-1024. In Russian
27. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(12):909-930. doi: [10.1016/j.plaphy.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016)
28. Huang H, Ullah F, Zhou D-X, Yi M, Zhao Yu. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:800. doi: [10.3389/fpls.2019.00800](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800)
29. Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*. 2005;56(418):1991-2001. doi: [10.1093/jxb/eri196](https://doi.org/10.1093/jxb/eri196)
30. Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior*. 2012;7(11):1456-1466. doi: [10.4161/psb.21949](https://doi.org/10.4161/psb.21949)
31. Sánchez E, Garcia PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. Proline metabolism in response to nitrogen deficiency in French Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike). *Plant Growth Regulation*. 2002;36:261-265. doi: [10.1023/A:1016583430792](https://doi.org/10.1023/A:1016583430792)

Author info:

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

E-mail: Kadyrbaev.maks@mail.ru

Golovatskaya Irina F. Dr. Sci. (Biol.), Professor, 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/0000-0002-1919-1893>

E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Satkanov Mereke Z. Bachelor, Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 13/3 Kazhymukan Str., Nur-Sultan 3010008, Republic of Kazakhstan.

E-mail: 19mereke99@mail.ru

УДК 581.1: 577.13

doi: 10.17223/19988591/55/8

Ю.Е. Колупаев^{1,2}, Т.О. Ястреб¹, А.К. Поляков¹, А.П. Дмитриев³

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

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

³Институт клеточной биологии и генетической
инженерии НАН Украины, г. Киев, Украина

Салициловая кислота и формирование адаптивных реакций растений на абиотические стрессоры: роль компонентов сигнальной сети

Салициловая кислота (СК) – ключевой фитогормон, особенно важный для запуска программ адаптации растений к действию стрессоров. В обзоре приведены сведения о белках, которые способны связываться с этим фитогормоном и могут принимать участие в трансдукции его сигналов в генетический аппарат. Особое внимание уделено роли активных форм кислорода, ионов кальция, оксида азота и сероводорода как посредников в реализации физиологических эффектов СК. Охарактеризовано влияние эндогенной и экзогенной СК на функционирование антиоксидантной системы, накопление совместимых осмолитов, синтез стрессовых белков, работу устойчивого аппарата и другие процессы, важные для адаптации растений к неблагоприятным факторам. Рассмотрены возможности практического использования СК и ее комбинаций с донорами сигнальных молекул для повышения устойчивости растений к действию абиотических стрессоров.

Ключевые слова: салициловая кислота; фитогормоны; активные формы кислорода; кальций; оксид азота; сероводород; антиоксидантная система; устойчивость

Сокращения [Abbreviations]: CNGC-каналы – кальциевые каналы, зависимые от циклических нуклеотидов [CNGC channels - Cyclic nucleotide-gated calcium channels]; MAP-киназы – митогенактивируемые протеинкиназы [MAP kinases - Mitogen-activated protein kinases]; NOS – NO-синтаза [NO synthase]; NPR – неэкспрессор генов, связанных с патогенозом [Non expressor of pathogenesis related]; РТЮ – 2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксид-3-оксид [2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide]; АБК – абсцизовая кислота [ABA - Absciscic acid]; АФК – активные формы кислорода [ROS - Reactive oxygen species]; БТШ – белки теплового шока [HSP - Heat shock proteins]; НПН – нитропруссид натрия [SNP - Sodium nitroprusside]; ПЭГ – полиэтиленгликоль [PEG - Polyethylene glycol]; СК – салициловая кислота [SA - Salicylic acid]; СОД – супероксиддисмутаза [SOD - Superoxide dismutase]; ЭГТА – этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусная кислота [EGTA - Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid].

Для цитирования: Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Поляков А.К., Дмитриев А.П. Салициловая кислота и формирование адаптивных реакций растений на абиотические стрессоры: роль компонентов сигнальной сети // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 135–165. doi: 10.17223/19988591/55/8

Введение

В настоящее время салициловую кислоту (СК) считают растительным гормоном [1, 2]. Основанием для этого является ее участие в регуляции многих физиологических программ и процессов, в частности, прорастания семян, цветения, синтеза других гормонов, фотосинтеза, дыхания, транспирации, термогенеза, реакции на инфицирование патогенами и адаптации к действию различных стрессоров [1–3].

В 90-е годы прошлого столетия и в начале нынешнего интенсивно исследовалась роль СК в устойчивости растений к патогенам [1, 2]. Однако за последние десятилетия накоплен большой массив экспериментальных данных, свидетельствующих об участии СК в адаптивных реакциях растений на действие абиотических стрессоров [2, 3]. В настоящее время эндогенная СК рассматривается в качестве участника ответа растений на действие экстремальных температур [3–5], солевого и осмотического стрессов [6, 7], озона [8] и других неблагоприятных факторов.

Пути синтеза СК у растений достаточно хорошо изучены. В настоящее время выделяют две отдельные ветви синтеза СК: изохоризматный и фенилпропаноидный пути [2, 3]. Однако в обеих ветвях используется хоризмат, полученный из шикимовой кислоты. Известно, что синтез СК у растений активируется при действии стрессоров различной природы [2, 3].

Обширная феноменология защитного влияния экзогенной СК на растения, подвергнутые действию абиотических стрессоров различной природы, в последние годы неоднократно обобщалась в обзорных сводках [3, 9, 10]. Однако до сих пор отсутствуют целостные представления о механизмах трансдукции сигналов СК, обуславливающих формирование адаптивных реакций растений на абиотические стрессоры. В последнее время помимо новых данных об участии в адаптивных реакциях растений таких «классических» сигнальных посредников, как ионы кальция и активные формы кислорода (АФК), появляются сведения о важной сигнальной роли в растительных клетках газотрансмиттеров – эндогенных газообразных сигнальных молекул, которые продуцируют живые организмы [11, 12]. К основным газотрансмиттерам относят монооксид азота (NO) [12], монооксид углерода (CO) [13] и сероводород (H_2S) [14, 15]. Их участие в клеточных сигнальных и регуляторных процессах обусловлено способностью свободно проникать через биологические мембраны и взаимодействовать с множественными мишенями – биомакромолекулами [11]. В последние годы появились сведения о вовлечении газотрансмиттеров в трансдукцию сигналов фитогормонов. С другой стороны, изменение концентрации газотрансмиттеров может вызывать сдвиги в содержании соединений с гормональной активностью [16]. Однако сведений о функциональных связях СК с газотрансмиттерами пока мало, они носят в основном эмпирический характер и слабо обобщены.

Основная цель настоящего обзора – анализ новых данных о механизмах

взаимодействия СК с ключевыми компонентами сигнальной сети растительных клеток (ионами кальция, АФК и газотрансммиттерами) при формировании салицилат-зависимых адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров.

Рецепция и трансдукция сигнала СК у растений

Четкие представления о механизмах восприятия СК растительными клетками до сих пор не сформировались [17]. Ключевым транскрипционным регулятором передачи сигналов СК считается белок NPR1 (non expressor of pathogenesis related). Взаимодействие СК с этим белком происходит как минимум двумя способами: путем прямого связывания и через вызываемые СК изменения редокс-гомеостаза клеток, приводящие к переходу NPR1 из состояния олигомера в форму мономера [18, 19].

Мономерная форма NPR1 перемещается в ядро, где взаимодействует с факторами транскрипции TGA. Это приводит к активации экспрессии генов, связанных с патогенезом (pathogenesis-related – PR) [17]. Вопрос о значении процессов, опосредованных NPR1, для реализации протекторных эффектов СК при действии абиотических стрессоров остается пока открытым (см. ниже). Показано, что регуляция транскрипции гена PR с помощью NPR1 включает ацетилирование гистонов с участием гистонацетилтрансферазы семейства CBP/p300 [20].

В настоящее время считается, что NPR1 у растений не единственный белок, специфично связывающий СК. Парологи NPR1 – NPR2, NPR3 и NPR4 – также обладают способностью к связыванию СК [17]. В целом же с использованием молекулярно-биохимического скрининга составлен список из почти 100 кандидатов на роль СК-связывающих белков [21]. В качестве первого СК-связывающего белка в клетках табака была идентифицирована каталаза [22]. Связывание СК с каталазой приводило к ингибированию ее активности по разложению H_2O_2 . СК также подавляла активность аскорбатпероксидазы, еще одного фермента, обезвреживающего H_2O_2 [23]. В связи с этим предполагали, что ингибирование антиоксидантных ферментов под действием СК потенциально может привести к накоплению H_2O_2 , а затем пероксид водорода может активировать экспрессию защитных генов и развитие системной устойчивости к патогенам [24]. Однако эффекты ингибирования СК этих ферментов заметно проявляются в концентрациях, явно превышающих физиологические, что ставит под сомнение вклад такого механизма в реализацию физиологических эффектов СК.

В обзоре Pokotylo et al. [17] обсуждается участие в связывании СК метилэстеразы, карбоангидразы, нескольких изоферментов глутатион S-трансферазы, хлоропластного тиоредоксина-m1 (TRXm1), некоторых ферментов цикла Кребса и ряда других белков, в том числе с неизвестными функциями. Все эти белки имеют различную и в некоторых случаях весьма

высокую аффинность по отношению к СК. Предложена гипотеза многоузлового (децентрализованного) восприятия СК растительной клеткой. Предполагается, что в зависимости от текущей концентрации СК в клетке, она будет взаимодействовать с определенным набором связывающих белков. Таким образом, регулирующий вклад СК будет различаться в зависимости от ее концентрации [17]. Естественно, вклад новых СК-связывающих белков в процессы СК-сигналинга требует экспериментального исследования.

В настоящее время наиболее признанной считается модель связывания СК, включающая в себя набор белков NPR [25]. Согласно этой модели, при низкой концентрации СК в клетках белок NPR1 образует олигомер и остается в цитозоле (рис. 1). При этом белки NPR3 и NPR4 связывают остаточный NPR1 в ядре и ограничивают его функциональную активность. При повышении концентрации СК NPR1 переходит в состояние мономера и проникает в ядро. Мономеризация NPR1 требует разрыва дисульфидной связи. Показано, что связывание СК способствует деолигомеризации NPR1. Тем не менее только СК недостаточно для запуска мономеризации NPR1 [19]. Предполагается, что необходимое для этого превращение дисульфида в сульфгидрильные группы в NPR1 может быть обусловлено предварительными редокс-процессами, управляемыми СК. Однако их природа остается невыясненной. Описан эффект взаимодействия с NPR1 двух цитозольных тиоредоксинов – TRX-h3 и TRX-h5. У мутантов *trx-h3* и *trx-h5* не происходила индукция синтеза белка PR 1 (pathogenesis related 1) экзогенной СК [26]. Возможно, что тиоредоксины активируются под действием СК, однако это пока экспериментально не доказано. В то же время показано, что хлоропластный тиоредоксин-m1 (TRXm1) обладает способностью связывать СК [21]. Так или иначе, считается, что для мономеризации NPR1 в цитозоле должен быть достаточный пул восстановителей (см. рис. 1).

Помимо редокс-зависимой мономеризации NPR1, под действием повышенной концентрации СК блокируется активность NPR3 и NPR4, которые в отсутствие СК выступают в качестве репрессоров активности NPR1. Таким образом, блокировка NPR3 и NPR4 приводит к активации экспрессии СК-индуцируемых генов. Считается, что основные функции NPR3 и NPR4 связаны с созданием градиента концентрации NPR1, непосредственно регулирующего экспрессию СК-чувствительных генов [27]. Среди важных компонентов сигналинга, находящихся ниже NPR1, кроме упомянутых факторов регуляции транскрипции семейства TGA, – транскрипционные факторы WRKY и ряд МАР-киназ (mitogen-activated protein kinase), в том числе МРК3, МРК4 и МРК6 [27, 28].

О регуляторных функциях белка NPR2 пока известно очень мало. Установлено, что он физически взаимодействует с NPR1 *in vitro*, а *in planta* сверхэкспрессия NPR2 может вызывать фенотипические проявления дефицита NPR1 [29]. Однако роль связывания СК во взаимодействии между NPR1 и NPR2 остается неизвестной. В целом предполагается, что большой набор

СК-связывающих белков может либо участвовать в процессах, связанных с обеспечением функций NPR1, либо действовать в сигнальных путях, не связанных с NPR1 [17].

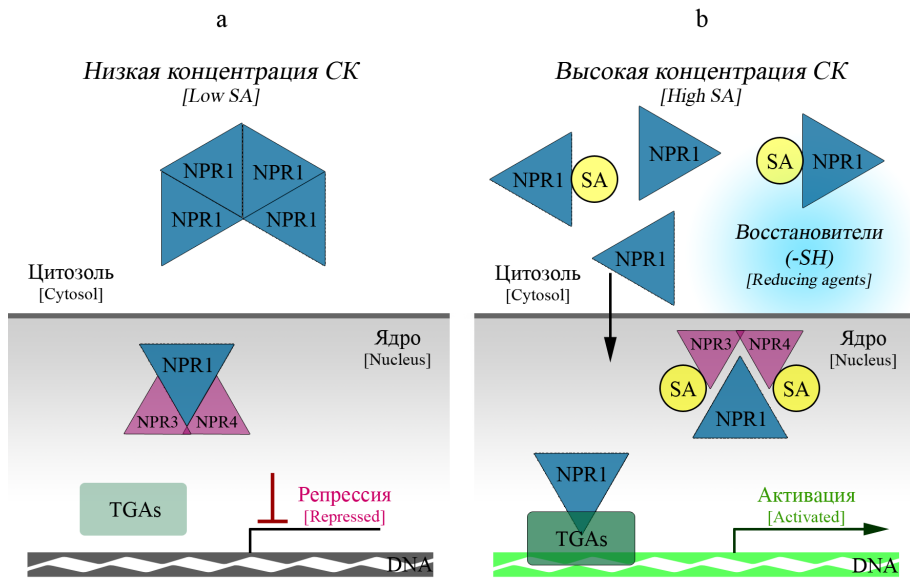


Рис. 1. Модель влияния СК на экспрессию генов с участием белков NPR:
 а – при низкой концентрации СК NPR1 образует олигомер и остается в цитозоле, NPR3 и NPR4 связывают остаточный NPR1 в ядре и предотвращают его активность;
 б – при высокой концентрации СК и наличии восстановителей NPR1 становится мономерным и проникает в ядро. Также СК в ядре связывается с NPR3 и NPR4, чтобы блокировать их активность как репрессоров NPR1. Свободный NPR1 активирует транскрипционные факторы TGA, которые в свою очередь активируют промоторы с TGACG последовательностью нуклеотидов

[Fig. 1. Model of SA influence on expression of genes with NPR proteins participation. (a) at low SA concentration, NPR1 forms an oligomer and remains in the cytosol, NPR3 and NPR4 bind residual NPR1 in the nucleus and prevent its activity. (b) at high SA concentration and presence of reducing agents, NPR1 becomes a monomer and enters the nucleus. Also, SA in the nucleus binds NPR3 and NPR4 to block their activity as NPR1 repressors. Free NPR1 activates TGA transcription factors, which, in turn activate promoters with TGACG nucleotide sequence]

Взаимодействие СК с ключевыми участниками сигнальной сети растительных клеток

Кальций является универсальным посредником в клеточных реакциях растительных и животных организмов [30]. Он выполняет роль связующего звена для многих сигнальных путей и обеспечивает функционирование общей сигнальной сети растительной клетки [31, 32]. Есть основания полагать, что ионы кальция в сигнальных цепях находятся как ниже СК (задей-

ствованы в трансдукции ее сигналов), так и выше (причастны к индукции синтеза СК). Так, при гипертермии наиболее ранней реакцией растительных клеток является открывание кальциевых каналов типа CNGC (cyclic nucleotide-gated calcium channels). Поступление через них кальция в цитозоль приводит к активации кальмодулина, а затем зависимых от кальмодулина и кальция протеинкиназ. Эти белки-сенсоры кальция модулируют активность транскрипционных факторов СВР60g и САМТА3/SR1, которые являются позитивными регуляторами экспрессии гена изохоризматсинтазы – *ICS1* (Isochorismate synthase) и других генов, обеспечивающих процесс синтеза СК [33].

С другой стороны, применение экзогенной СК либо повышение ее содержания в клетках за счет стресс-индуцируемого усиления синтеза приводят к росту концентрации цитозольного кальция [34]. Так, в листьях растений *Vitis vinifera*, обработанных СК, содержание цитозольного Ca^{2+} в клетках мезофилла было выше, чем в контроле. После холодового или теплового стресса у растений, обработанных СК, повышение содержания кальция в цитозоле было более существенным, чем у необработанных. При этом оно было обратимым и не приводило к повреждениям клеточных структур [34]. При высокотемпературных стрессах и действии экзогенной СК на *Ulva prolifera* происходило опосредованное CNGC-каналами изменение кальциевого гомеостаза, следствиями которого были активация MAP-киназного каскада, NO-сигналинга и в конечном итоге таких защитных процессов как экспрессия генов тиоредоксинов, различных форм супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы и белков теплового шока (БТШ) [35]. Таким образом, СК-индуцируемый синтез стрессовых белков у растений является кальций-зависимым процессом.

Одной из реакций, вызываемых СК и важных для устойчивости растений к засухе, является закрывание устьиц. В работе Khokon et al. [36] показано, что при обработке эпидермиса листьев арабидопсиса 500 мкМ СК осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ происходили в 19% замыкающих клеток, а более 80% замыкающих клеток не показали заметного повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Однако в этой же работе обнаружено, что хелатор кальция ЭГТА (этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусная кислота) и блокатор кальциевых каналов различных типов LaCl_3 значительно подавляли СК-индуцированное закрывание устьиц. Авторы заключили, что внеклеточный свободный Ca^{2+} может участвовать в модуляции СК-индуцированного закрывания устьиц. В более поздних работах сообщается, что процесс открывания анионных каналов медленного типа (SLAC1), обуславливающий закрывание устьиц при действии СК, требует участия кальций-зависимых протеинкиназ [37].

Активные формы кислорода. АФК в растительных клетках образуются в реакциях одно-, двух- и трехэлектронного восстановления кислорода в результате спонтанного и ферментативного окисления различных субстратов,

а также в фотоиндуцируемых реакциях [38]. Считается, что из всех АФК наибольший сигнальный потенциал имеет пероксид водорода – молекула с относительно продолжительным временем жизни, способная проникать через клеточные мембраны, в том числе путем облегченной диффузии с помощью аквапоринов [39].

Пероксид водорода и, возможно, другие АФК рассматриваются в качестве важных посредников в реализации физиологических эффектов СК [3]. С другой стороны, СК считается ключевым компонентом в системе трансдукции и амплификации сигналов АФК [4]. При этом образование АФК в пероксисомах и хлоропластах растительных клеток рассматривается как возможный триггер синтеза СК [3, 5]. Таким образом, считается, что один из путей реализации сигнальных эффектов АФК связан с их способностью индуцировать синтез СК. Особенно важным этот механизм считается при формировании системной индуцированной устойчивости растений к патогенам. В этом случае комплексный сигнал АФК/СК индуцирует ряд защитных реакций, в том числе синтез PR-белков [40]. В то же время адаптивные процессы у растений, связанные с устойчивостью к абиотическим стрессорам и индуцируемые пероксидом водорода, по-видимому, могут осуществляться и без участия СК. Так, изучение реакции антиоксидантной системы в ответ на обработку пероксидом водорода и действие солевого стресса у арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и салицилат-дефицитных растений, трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы (*NahG*), показало, что эти трансформанты обладали более высокой базовой солеустойчивостью, а их резистентность при обработке экзогенным H_2O_2 индуцировалась более заметно, чем растений дикого типа. Это проявлялось в сохранении у растений *NahG* при солевом стрессе ростовых показателей и пула хлорофиллов, близких к бесстрессовому контролю, высокой активности антиоксидантных ферментов [41]. Не исключено, что одной из причин выраженной способности салицилатдефицитных растений *NahG* к поддержанию окислительно-восстановительного гомеостаза является высокая конститутивная активность гваяколпероксидазы. В свою очередь, условием для поддержания высокой активности пероксидаз у этих растений может быть повышенное содержание катехола [42], способного выступать в роли восстановителя при обезвреживании H_2O_2 в пероксидазных реакциях.

Как уже отмечалось, наиболее ранняя гипотеза о механизмах реализации эффектов СК базировалась на данных о ее способности ингибировать каталазу и тем самым способствовать накоплению пероксида водорода в клетках. Однако позднее было обнаружено, что такие эффекты проявляются при достаточно высоких концентрациях СК и не у всех исследуемых видов растений [43]. В связи с этим в ряде работ изучали вклад других ферментов в повышение содержания пероксида водорода в растительных клетках при действии СК. Обнаружено, что обработка культуры клеток африканского проса СК вызывала окислительную вспышку, обусловленную в основном

увеличением активности НАДФН-оксидазы [44]. Экзогенная СК вызывала усиление генерации супероксидного радикала и пероксида водорода в клетках листьев рапса [45]. Этот эффект сопровождался повышением активности НАДФН-оксидазы. Усиление генерации супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы, происходящее под влиянием СК, угнеталось ингибиторами НАДФН-оксидазы имидазолом и α -нафтолом [46]. С другой стороны, на этом же объекте показано частичное устранение вызываемого СК эффекта усиления генерации АФК и ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой [47]. Таким образом, есть основания полагать, что в СК-индуцированном усилении образования АФК на поверхности клеток колеоптилей задействованы как минимум два фермента – НАДФН-оксидаза и внеклеточная пероксидаза. Роль СК в регуляции активности внеклеточных форм пероксидаз, генерирующих АФК, показана и в более ранних исследованиях [48, 49].

На замыкающих клетках эпидермиса арабидопсиса показано, что вызываемое СК усиление генерации супероксидного анион-радикала блокировалось ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой, а ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодониум почти не влиял на этот эффект [36]. Усиление генерации супероксидного радикала и пероксида водорода замыкающими клетками с участием пероксидазы является необходимым для проявления эффекта закрывания устьиц при обработке СК [36, 50, 51]. С другой стороны, в работе [52] показано, что вызываемое обработкой СК закрывание устьиц у арабидопсиса устранялось ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодониумом и не проявлялось у мутантов по каталитической субъединице НАДФН-оксидазы *rbohD*, *rbohF* и *rbohDF*. При этом вызываемые СК эффекты усиления генерации АФК и закрывания устьиц нивелировались действием бутанола-1 – ингибитора, зависимого от фосфолипазы D образования фосфатидной кислоты. Авторы предполагают, что вызываемое СК повышение активности фосфолипазы D и накопление фосфатидной кислоты приводят к активации НАДФН-оксидазы и усилению генерации АФК, которые необходимы для регуляторных эффектов, обеспечивающих закрывание устьиц [52]. Таким образом, в работах разных авторов, выполненных на растениях арабидопсиса [36, 50–52], сделано заключение о различных механизмах усиления генерации АФК под действием СК – связанных с активностью пероксидазы либо НАДФН-оксидазы. Причины таких различий объяснить пока сложно. В исследовании [36] эффекты генерации АФК в эпидермисе листка фиксировались гистохимическими методами через 30 мин после начала действия СК, в то время как в работе [52] приводятся данные, полученные хемилюминесцентными методами в течение первых 15 мин воздействия СК. Не исключено, что в вызываемом СК усилении генерации АФК на клеточной поверхности могут быть задействованы как пероксидаза, так и НАДФН-оксидаза, но их вклад может быть различным в зависимости от времени.

Усиление образования пероксида водорода в растительных клетках под действием СК также может быть связано с ингибированием сукцинатдегидрогеназы в митохондриях [53]. Возможно, что разные механизмы СК-индуцированного усиления генерации АФК растительными клетками могут находиться в функциональном взаимодействии между собой, однако этот вопрос остается неисследованным.

Оксид азота (NO) является одним из важнейших компонентов сигнальной сети клеток растений и животных [54]. NO у растений может образовываться по восстановительным или по окислительным путям [55]. Восстановительный путь предполагает использование в качестве субстратов нитрата или нитрита в реакциях, катализируемых нитратредуктазой, связанной с плазматической мембраной нитрит-NO-редуктазой и локализованной в пероксисомах ксантиноксидоредуктазой [56, 57].

У растений механизм образования оксида азота окислительным путем из L-аргинина до сих пор остается предметом дискуссии, поскольку гомологи NO-синтазы (NOS) животных обнаружены только у зеленых водорослей, но не у высших растений [58]. В настоящее время считается, что наземные растения не имеют типичной NOS животных. Однако возможно, что у высших растений в пероксисомах имеются белки, отличные от NOS, но способные генерировать NO, используя L-аргинин в качестве субстрата. Эта реакция, как и катализируемая NO-синтазой животных, может происходить при наличии НАДФН, ФМН, ФАД, кальмодулина и ионов кальция [55, 58].

Между оксидом азота и СК как сигнальными молекулами существуют сложные связи, характер которых остается во многом невыясненным. С одной стороны, оксид азота, наряду с АФК, рассматривается в качестве посредника в реализации физиологических эффектов СК [54]. В то же время отдельные эффекты оксида азота как сигнальной молекулы также могут проявляться при посредничестве СК. Достаточно давно известен эффект повышения содержания СК в клетках табака под влиянием экзогенного NO [59]. Показано, что у растений табака, трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы (*NahG*), под влиянием донора NO не развивалась устойчивость к вирусу табачной мозаики [60]. Трансформация растений табака дикого типа геном нейрональной NO-синтазы (*nNOS*) млекопитающих вызывала развитие резистентности к *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [61]. Однако двойные трансформанты табака *nNOS/NahG* не проявляли устойчивости к этому патогену. У трансформантов арабидопсиса *NahG*, в отличие от растений дикого типа (Col-0), под влиянием экзогенного оксида азота не активировалась экспрессия генов, кодирующих PR-белки [62]. С другой стороны, у салицилатдефицитных растений отмечалась зависимость от цАДФ-рибозы индукция фенилаланинаммонийлиазы под влиянием доноров оксида азота, что свидетельствует о наличии путей трансдукции сигнала NO, не связанных с СК [63].

Для выяснения возможного участия СК в передаче сигнала NO, индуцирующего развитие солеустойчивости растений, мы сравнивали реакцию рас-

тений арабидопсиса дикого типа и трансформантов *NahG* на обработку донором оксида азота нитропруссидом натрия (НПН) и действие солевого стресса [64]. Оказалось, что обработка донором NO индуцировала солеустойчивость растений обоих генотипов, что выражалось в снижении ингибирования их роста, уменьшении окислительных повреждений и сохранении пула хлорофиллов в листьях. Проявление такого эффекта донора NO у салицилат-дефицитных растений *NahG* дает основания полагать, что индуцирование протекторных систем, задействованных в реакции на солевой стресс, происходит в основном через салицилатнезависимые сигнальные пути. Заметим, что в работе Grun et al. [65] с использованием трансформантов арабидопсиса *NahG* было показано не зависящее от салициловой кислоты индуцирование оксидом азота гена альтернативной оксидазы, участвующей в обеспечении защиты растений от окислительного стресса.

Оксид азота, по-видимому, является важным участником трансдукции сигналов СК. Показано повышение количества NO в ответ на действие СК у растений сои [66] и женьшеня [67]. В то же время при обработке СК в корнях томатов, подвергнутых солевому стрессу, отмечалось снижение содержания оксида азота [68]. Показано, что обработка проростков пшеницы СК вызывала транзиторное (в течение первых двух часов) повышение в них содержания NO [69]. По всей вероятности, пероксид водорода в сигнальной цепи, функционировавшей в данных экспериментальных условиях, расположен выше NO, поскольку салицилатиндуцированное повышение содержания NO в корнях устранялось обработкой скавенджером H_2O_2 диметилтиомочевинной [69]. Известно, что под влиянием пероксида водорода может активироваться по крайней мере один из основных ферментативных источников NO – нитратредуктаза [70]. По-видимому, пероксид водорода и оксид азота выступают в роли посредников в индуцировании СК реакций, необходимых для развития теплоустойчивости проростков пшеницы. Их обработка антиоксидантом, диметилтиомочевинной и скавенджером NO РТЮ (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) устраняла эффект повышения выживания проростков пшеницы после теплового стресса, вызываемый экзогенной СК [69].

Похожие результаты были получены и при индуцировании СК устойчивости проростков кукурузы к осмотическому стрессу, вызываемому ПЭГ 6000. Под влиянием СК отмечалось значительное повышение в них содержания оксида азота [71, 72]. При этом обработка СК усиливала накопление пролина и сахаров в проростках, повышала активность H^+ -АТФазы, а скавенджер NO РТЮ устранял эти эффекты СК [71]. Также воздействие СК способствовало сохранению в условиях осмотического стресса экспрессии генов и активности РУБИСКО и одной из форм карбоангидразы, а в присутствии скавенджера оксида азота эти эффекты не проявлялись [72].

Об участии NO в реализации физиологических эффектов СК свидетельствуют результаты, полученные при изучении влияния стрессовых концен-

траций CO_2 на растения *Camellia sinensis* L. Установлено, что этот стрессовый фактор вызывал повышение содержания в растениях СК, оксида азота и флавоноидов [73]. Экзогенные СК и донор NO НПН также вызывали накопление флавоноидов. Антагонист синтеза СК паклобутразол и скарвенджер NO РТЮ препятствовали накоплению флавоноидов в ответ на действие повышенных концентраций углекислоты. При этом обработка растений паклобутразолом снимала эффект повышения содержания NO, в то время как связывание NO с помощью РТЮ не влияло на содержание СК. Таким образом, NO является посредником в СК-зависимом накоплении флавоноидов растениями *C. sinensis* [73].

Оксид азота, наряду с пероксидом водорода и ионами кальция, может принимать участие в вызываемом СК закрывании устьиц. Известно, что NO, как и СК, быстро накапливается в растениях при инфицировании или обработке элиситорами, активируя защитные гены, а в некоторых случаях вызывая реакцию сверхчувствительности [74]. Участие NO в салицилат-индуцированном закрывании устьиц у *Vicia faba* показано ингибиторным методом. Позднее прямыми методами было установлено, что СК вызывала увеличение количества NO в замыкающих клетках арабидопсиса [75]. Этот эффект полностью устранялся скарвенджером оксида азота РТЮ и частично ингибиторами NO-синтазы животных (L-NAME) и нитратредуктазы (вольфраматом натрия). При этом указанные ингибиторы практически полностью нивелировали вызываемое салицилатом закрывание устьиц. Участие NO, образующегося восстановительным путем, в индуцировании закрывания устьиц подтверждено и с использованием мутантов по нитратредуктазе. У растений арабидопсиса *nial1* и *nial2* замыкание устьиц под влиянием СК проявлялось слабее, чем у дикого типа, а у двойных мутантов *nial1/nial2* не проявлялось вообще [75]. Также ингибиторным методом показана роль протеинкиназ, цГМФ и цАДФ-рибозы в вызываемом СК накоплении NO и закрывании устьиц у растений *A. thaliana*.

На участие NO в реализации стресс-протекторного действия СК косвенно могут указывать и многочисленные данные об усилении защитных эффектов при совместном применении СК и донора оксида азота НПН для индуцирования устойчивости растительных объектов к стрессорам различной природы. Так, при совместной обработке СК и донором NO НПН растений *Lablab purpureus* L., выращиваемых в условиях гипертермии, были зафиксированы повышенное содержание фотосинтетических пигментов в листьях, меньшая интенсивность окислительного стресса, более высокие значения активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы), содержания аскорбиновой кислоты и глутатиона, чем у растений, обработанных СК и НПН по отдельности [76].

Сообщается о положительном влиянии комбинации СК и донора NO на устойчивость растений к низким температурам. В работе Esim и Atici [77] показано более полное предотвращение последствий холодоиндуцированного (3-дневное действие температур 2–5 °C) окислительного стресса у

неморозоустойчивого (ярового) сорта пшеницы при фоллиарной обработке комбинацией СК и НПН. Также исследовано влияние прайминга семян озимой мягкой пшеницы СК и донором NO НПН по отдельности и совместно на формирование морозоустойчивости этиолированных проростков пшеницы при их закаливании при низких положительных температурах. Показано повышение выживания проростков после промораживания при -6 и -8 °C под влиянием как СК, так и НПН [78]. Еще более заметным был протекторный эффект обработки семян «коктейлем» СК и НПН. При совместном использовании СК и донора NO в проростках наблюдали дополнительное повышение активности СОД и содержания сахаров.

Предпосевная обработка семян пшеницы СК снижала угнетение роста растений при почвенной засухе [79]. Такой же эффект вызывало опрыскивание перед засухой растворами донора оксида азота НПН. Защитное действие усиливалось при сочетании обработки семян СК в низких концентрациях с опрыскиванием растений НПН [79]. Такая обработка модифицировала активность антиоксидантных ферментов и накопление пролина в листьях. Похожие результаты были получены при изучении комбинированного действия СК и НПН на растения *Carthamus tinctorius* L. в условиях модельной засухи, создаваемой действием ПЭГ [80]. Комбинированное воздействие СК и НПН приводило к более существенному повышению активности СОД и каталазы по сравнению с эффектами каждого фактора по отдельности. В то же время содержание пролина в условиях обезвоживания в варианте с комбинированным действием СК и НПН было ниже, чем в варианте только с СК.

Усиление действия СК на растения разных видов в присутствии донора NO показано и в условиях солевого стресса. Так, смягчение ростингибирующего действия засоления на растения вигны в присутствии СК и НПН было более заметным, чем при обработке каждым соединением в отдельности. Более существенным также было положительное влияние комбинации СК и донора NO на показатели содержания пигментов, фотосинтетической активности, содержания пролина, глицинбетаина и сахаров, активности антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов [81]. Также «коктейль» из СК и НПН оказывал более заметное по сравнению с каждым соединением по отдельности стресс-протекторное действие на растения гороха в условиях засоления, что проявлялось в более заметном ингибировании развития окислительного стресса и более существенном индуцировании активности антиоксидантных ферментов и накопления совместимых осмолитов [82].

Сероводород. Наряду с оксидом азота к ключевым молекулам-газотрансмиттерам в клетках растений и животных относится сероводород (H_2S) [14, 83]. Одним из основных путей синтеза H_2S у растений считается превращение L-цистеина в пируват с высвобождением сероводорода и аммония [84]. Эта реакция катализируется L-цистеиндесульфгидразой, которая может быть локализована в цитоплазме, пластидах и митохондриях. Также возмож-

но образование сероводорода из D-цистеина под действием находящейся в цитоплазме D-цистеиндесульфгидразы [85].

К настоящему времени показано усиление синтеза сероводорода у растений при действии стрессоров различной природы [86], а также возможность индуцирования устойчивости экзогенным H_2S [14, 15]. По данным транскриптомики, сероводород как сигнальный посредник может быть задействован в трансдукции сигналов практически всех классов фитогормонов: ауксина, АБК, цитокининов, гиббереллинов, этилена, салициловой и жасмоновой кислот [87].

В работе Li et al. [88] показано, что индуцирование их теплоустойчивости экзогенной СК сопровождалось повышением содержания сероводорода в побегах. Также с использованием проростков кукурузы показан синергический эффект активации антиоксидантной системы при совместном действии СК и донора сероводорода NaHS [89]. В наших экспериментах обнаружено, что при воздействии СК индуцированию активности антиоксидантных ферментов в корнях проростков пшеницы предшествовало повышение эндогенного содержания сероводорода [90]. При этом обработка ингибиторами L-цистеиндесульфгидразы препятствовала активации антиоксидантной системы и развитию теплоустойчивости проростков под влиянием салициловой кислоты. Это свидетельствует о роли H_2S как посредника в реализации ее стресс-протекторных эффектов.

Действие низких температур на проростки огурца вызывало транзитное повышение в них содержания СК [91]. Их обработка СК усиливала накопление транскриптов L- и D-цистеиндесульфгидраз, повышала их активность и генерацию сероводорода, в то время как обработка донором H_2S гидросульфидом натрия не влияла на содержание СК. Экзогенное воздействие СК и NaHS смягчало проявление окислительного стресса, вызываемого действием низких температур. При этом эффекты СК не проявлялись в присутствии скавенджера сероводорода гипотаурина, в то время как ингибитор синтеза СК паклобутразол не влиял на проявление стресс-протекторного действия донора H_2S [91]. Авторы делают вывод о том, что в сигнальной цепи, индуцирующей развитие холодоустойчивости огурца, сероводород находится ниже СК.

Эффект индуцирования СК устойчивости растений перца к осмотическому стрессу также оказался зависимым от сероводорода [92]. Обработка растений СК повышала в них содержание сероводорода, активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла и относительное содержание воды в листьях. Эти эффекты СК не проявлялись в присутствии скавенджера сероводорода гипотаурина, но усиливались при одновременной обработке растений NaHS.

Также в присутствии донора сероводорода NaHS усиливалось стресс-протекторное действие СК на растения кукурузы, подвергнутые токсическому влиянию свинца, что проявлялось в уменьшении его накопления и повышении содержания глицинбетаина [93]. Примечательно, что обработ-

ка проростков кукурузы как СК, так и NaHS вызывала повышение в них содержания оксида азота [94]. Как отмечалось выше, оксид азота является посредником в реализации многих физиологических эффектов СК. В то же время возможное функциональное взаимодействие между NO и H₂S как сигнальными посредниками в реализации действия СК остается неисследованным. Не изучена пока и связь H₂S с другими компонентами сигнальной сети (АФК, Ca²⁺) в процессе передачи сигналов СК.

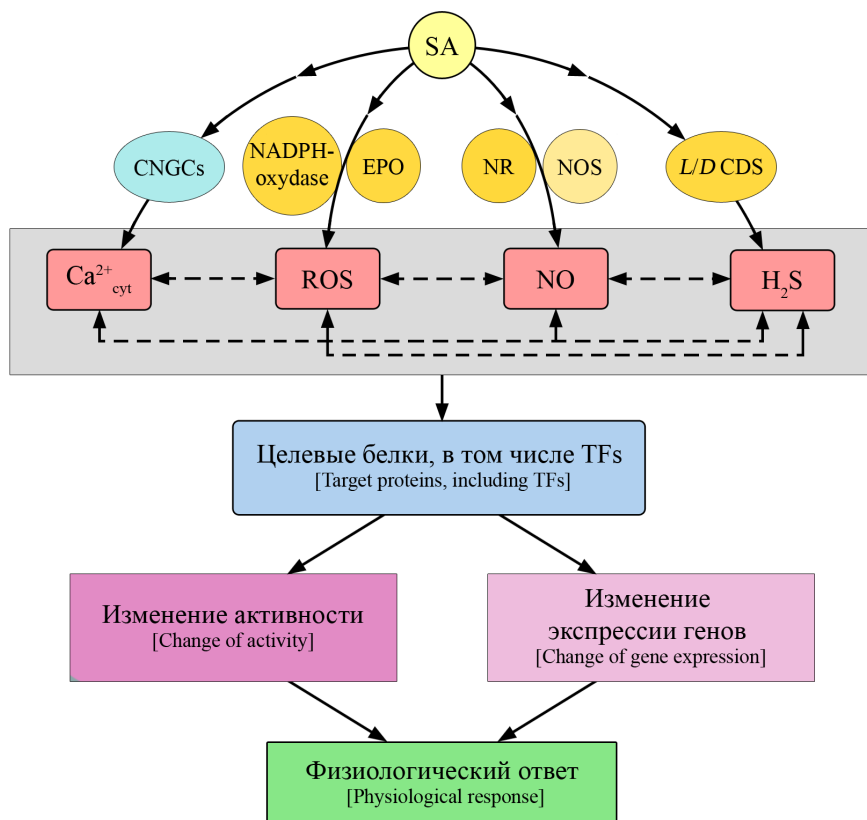


Рис. 2. Участие сигнальных посредников в реализации физиологических (стресс-протекторных) эффектов СК. CNGCs – cyclic nucleotide-gated calcium каналы; PO – внеклеточная пероксидаза; L/D-CDS – L/D-цистеиндесульфгидраза; NOS – NO-синтаза; NR – нитратредуктаза; ROS – активные формы кислорода; SA – салициловая кислота, TFs – транскрипционные факторы.

[Fig. 2. Signal mediators' participation in realization of physiological (stress-protective) SA effects. CNGCs - Cyclic nucleotide-gated calcium channels; EPO - Extracellular peroxidase; L/D-CDS – L/D-cysteine desulphydrase; NOS - NO synthase; NR - Nitrate reductase; ROS - Reactive oxygen species; SA - Salicylic acid; TFs - Transcription factors]

Функциональное взаимодействие посредников при передаче сигналов СК. Как отмечалось выше, к настоящему времени в реализации стресс-протекторных эффектов СК показано участие ионов кальция, поступающих

преимущественно с помощью CNGC-каналов, АФК, генерируемых разными ферментами (НАДФН-оксидазой, внеклеточной пероксидазой и др.), оксида азота, образующегося по восстановительному и окислительному путям, а также сероводорода, который синтезируется L/D-цистеиндесульфидразами (рис. 2).

Однако связи между большинством этих посредников при трансдукции сигналов СК исследованы недостаточно. Во многих случаях не известна последовательность расположения этих посредников в сигнальных цепях, которые обеспечивают необходимое для адаптации к действию стрессоров формирование СК-индуцированных изменений в клетках. Незнанием остаются связи с другими мессенджерами сероводорода как сигнального посредника, участвующего в проявлении физиологических эффектов СК, хотя к настоящему времени известно о его функциональном взаимодействии с ионами кальция, АФК, оксидом азота (см., например, [11, 14, 31]). Совершенно открытым остается вопрос о возможном участии монооксида углерода, являющегося третьим (после NO и H₂S) газотрансмиттером, в реализации либо модификации физиологических эффектов СК. При этом его связи с NO и АФК, которые установлены в последнее время [11], могут служить серьезным основанием для предположения об участии СО в сигнальных процессах, связанных с действием СК.

Заключение

Многочисленные данные показывают повышение эндогенного содержания СК у растений, причем на довольно ранних этапах стрессовой реакции. Очень большой массив данных свидетельствует об индуцировании СК устойчивости растений разных таксономических групп к абиотическим стрессорам различной природы. Под влиянием СК происходит активация ключевых протекторных систем растений – антиоксидантной, синтеза стрессовых белков (БТШ, дегидринов, PR-белков), накопления мультифункциональных низкомолекулярных соединений, выполняющих мембранопротекторные, осмопротекторные, антиденатурационные, антиоксидантные функции (пролин, глицинбетаин, сахара, вторичные метаболиты).

СК принимает участие в активации многих сигнальных путей. Она связана с такими ключевыми сигнальными посредниками, как кальций, АФК, NO. В последние годы стало известно об ее функциональных связях с сероводородом – важным газотрансмиттером растительных клеток. Ряд эффектов СК реализуется с участием MAP-киназного каскада и другого стрессового фитогормона – АБК. При этом последовательность расположения сигнальных посредников в цепях передачи сигналов СК, особенности их функционального взаимодействия между собой остаются во многом неясными. Множество СК-связывающих белков может указывать на разные пути передачи ее сигналов. Однако нельзя исключить, что взаимодействие СК с некоторыми

белками не имеет отношения к собственно сигнальным процессам. Неясными остаются также возможные функциональные связи потенциальных белков-рецепторов СК и небелковых компонентов сигнальной трансдукции. В частности, определенно установлен факт редокс-модификации ключевого белка салицилатного сигналинга NPR1. Однако ее механизмы и последовательность событий, происходящих с участием АФК, NO и восстановителями и приводящих к такой модификации, известны далеко не полностью.

Можно надеяться, что выяснение механизмов функционального взаимодействия СК с другими компонентами сигнальной сети создаст теоретическую основу для практического применения в растениеводстве стресс-протекторных «коктейлей», состоящих из СК и доноров сигнальных молекул, усиливающих ее действие (NO, H₂S и др.). Невысокая стоимость и экологическая безопасность СК как природного соединения не вызывают сомнений в возможностях расширения сферы ее практического применения, прежде всего как регулятора роста стресс-протекторного действия.

Литература

1. Raskin I. Salicylate, a new plant hormone // *Plant Physiology*. 1992. Vol. 99, № 3. PP. 799–803. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.799>
2. Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Annual Review of Phytopathology*. 2009. Vol. 47. PP. 177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
3. Saleem M., Fariduddin Q., Janda T. Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: A review // *Journal of Plant Growth Regulation*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10152-x>
4. Dat J., Lopez-Delgado H., Foyer C., Scott I. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco // *Journal of Plant Physiology*. 2000. Vol. 156, № 5–6. PP. 659–665. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80228-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80228-X)
5. Larkindale J., Hall J., Knight M., Vierling E. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance // *Plant Physiology*. 2005. Vol. 138. PP. 882–897. <https://doi.org/10.1104/pp.105.06225>
6. Borsani O., Valpuesta V., Botella M. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings // *Plant Physiology*. 2001. Vol. 126. PP. 1024–1030. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024>
7. Molina A., Bueno P., Marlin M., Rodriguez-Rosales M., Belver A., Venema K., Danaire J. Involvement of endogenous salicylic acid content lipoxigenase and antioxidant enzyme activities in response of tomato cell suspension cultures to NaCl // *New Phycologist*. 2002. Vol. 156, № 3. PP. 409–415. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00527.x>
8. Rao M., Davis R. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid // *Plant Journal*. 1999. Vol. 17, № 6. PP. 603–614. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00400.x>
9. Chakraborty N., Sarkar A., Acharya K. Multifaceted roles of salicylic acid and jasmonic acid in plants against abiotic stresses // *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives* / eds. by A. Roychoudhury, D.K. Tripathi. John Wiley & Sons Ltd., 2020. PP. 374–387. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch18>

10. Santisree P., Jalli L.C.L., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K.K. Emerging roles of salicylic acid and jasmonates in plant abiotic stress responses // *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives* / eds. by A. Roychoudhury, D.K. Tripathi. John Wiley & Sons Ltd., 2020. PP. 342–373. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch17-11>
11. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasnyy S.P., Dmitriev A.P. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells // *Cytology and Genetics*. 2019. Vol. 53, № 5. PP. 392–406. <https://doi.org/10.3103/S0095452719050098>
12. Khan M.N., Mobin M., Abbas Z.K. Nitric oxide and high temperature stress: A physiological perspective. // *Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants*, eds. Khan M.N. et al. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. PP. 77–93. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2_5
13. He H., He L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses // *Nitric Oxide*. 2014. Vol. 42. PP. 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.08.011>
14. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Сероводород и адаптация растений к действию абиотических стрессоров // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2019. № 48. С. 158–190. <https://doi.org/10.17223/19988591/48/8>
15. Колупаев Ю.Е., Фирсова Е.Н., Ястреб Т.О., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. Влияние донора сероводорода на состояние антиоксидантной системы и устойчивость растений пшеницы к почвенной засухе // *Физиология растений*. 2019. Т. 66, № 1. С. 26–34. doi: <https://doi.org/10.1134/S0015330319010081>
16. Banerjee A., Tripathi D.K., Roychoudhury A. Hydrogen sulphide trapeze: Environmental stress amelioration and phytohormone crosstalk // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018. Vol. 132. PP. 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.028>
17. Pokotylo I., Kravets V., Ruelland E. Salicylic acid binding proteins (SABPs): The hidden forefront of salicylic acid signaling // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. Art. 4377. <https://doi.org/10.3390/ijms20184377>
18. Mou Z., Fan W., Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate npr1 function through redox changes // *Cell*. 2003. Vol. 113, № 7. PP. 935–944. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00429-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00429-x)
19. Wu Y., Zhang D., Chu J.Y., Boyle P., Wang Y., Brindle I.D., De Luca V., Després C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid // *Cell Reports*. 2012. Vol. 1. PP. 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>
20. Kwon D.-J., Jin H., Kang M.-J., Yun S.-H., Choi S.-M., Noh Y.-S., Noh B. Salicylic acid-induced transcriptional reprogramming by the HAC–NPR1–TGA histone acetyltransferase complex in Arabidopsis // *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46, № 22. PP. 11712–11725. <https://doi.org/10.1093/nar/gky847>
21. Manohar M., Tian M., Moreau M., Park S.-W., Choi H.W., Fei Z., Friso G., Asif M., Manosalva P., von Dahl C.C., Shi K., Ma S., Dinesh-Kumar S.P., O'Doherty I., Schroeder F.C., van Wijk K.J., Klessig D.F. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens // *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 5, Art. 777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00777>
22. Chen Z., Ricigliano J.W., Klessig D.F. Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1993. Vol. 90. PP. 9533–9537. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9533>
23. Dempsey D.A., Shah J., Klessig D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants // *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1999. Vol. 18. PP. 547–575. <https://doi.org/10.1080/0735268991309397>
24. Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death // *Trends in Plant Science*. 2003. Vol. 8, № 7. PP. 335–342. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00135-3)

25. Ding Y., Sun T., Ao K., Peng Y., Zhang Y., Li X., Zhang Y. Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity // *Cell*. 2018. Vol. 173. PP. 1454–1467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
26. Tada Y., Spoel S.H., Pajeroska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins // *Science*. 2008. Vol. 321. PP. 952–956. <https://doi.org/10.1126/science.1156970>
27. Pedranzani H., Vigliocco A. Evaluation of jasmonic acid and salicylic acid levels in abiotic stress tolerance: Past and present // *Mechanisms Behind Phytohormonal Signalling and Crop Abiotic Stress Tolerance* / eds. by V.P. Singh et al. N.Y. : Nova Science Publishers, 2017. PP. 329–370.
28. Тарчевский И.А. Компартиментация салицилат-индуцируемых белков (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2014. Т. 50, № 4. С. 374–382.
29. Castelló M.J., Medina-Puche L., Lamilla J., Tornero P. NPR1 paralogs of Arabidopsis and their role in salicylic acid perception // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, e0209835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209835>
30. Kim M.C., Chung W.S., Yun D., Cho M.J. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants // *Molecular Plant*. 2009. Vol. 2, № 1. PP. 13–21. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn091>
31. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P. Signal mediators in plants in response to abiotic stress: calcium, reactive oxygen and nitrogen species // *Cytology and Genetics*. 2015. Vol. 49, № 5. PP. 338–348. <https://doi.org/10.3103/S0095452715050047>
32. Johnson J.M., Reichelt M., Vadassery J., Gershenzon J., Oelmüller R. An Arabidopsis mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress // *BMC Plant Biology*. 2014. Vol. 14, Art. 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162>
33. Rai K.K., Pandey N., Rai S.P. Salicylic acid and nitric oxide signaling in plant heat stress // *Physiologia Plantarum*. 2020. Vol. 168, № 2. PP. 241–255. <https://doi.org/10.1111/ppl.12958>
34. Wang L.-J., Li S.-H. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants // *Plant Science*. 2006. Vol. 170, № 4. PP. 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.005>
35. Fan M., Sun X., Xu N., Liao Z., Li Y., Wang J., Fan Y., Cui D., Li P., Miao Z. Integration of deep transcriptome and proteome analyses of salicylic acid regulation high temperature stress in *Ulva prolifera* // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, Art. 11052. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11449-w>
36. Khokon A.R., Okuma E., Hossain M.A., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori I.C., Murata Y. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis // *Plant, Cell & Environment*. 2011. Vol. 34. PP. 434–443. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x>
37. Prodhon M.Y., Munemasa S., Nahar M.N.N., Nakamura Y., Murata Y. Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca²⁺/CPK-dependent pathway // *Plant Physiology*. 2018. Vol. 178. PP. 441–450. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.18.00321
38. Kohli S.K., Handa N., Gautam V., Bali S., Sharma A., Khanna K., Arora S., Thukral K.A., Ohri P., Karpets Y., Kolupaev Y., Bhardwaj R. ROS signaling in plants under heavy metal stress // *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress* / eds. by M.I.R. Khan, N.A. Khan. Singapore : Springer Nature, 2017. PP. 185–214. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_8
39. Miller E.W., Dickinson B.C., Chang C.J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2010. Vol. 107, № 36. PP. 15681–15686. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005776107>

40. Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008. Vol. 50, № 1. PP. 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>
41. Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Дмитриев А.П. Индуцирование пероксидом водорода солеустойчивости салицилат-дефицитных трансформантов арабидопсиса *NahG* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2017. Т. 53, № 6. С. 635–641. <https://doi.org/10.7868/S0555109917060149>
42. van Wees S.C.M., Glazebrook J. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid // *Plant Journal*. 2003. Vol. 33, № 4. PP. 733–742. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01665.x>
43. Horvath E., Janda T., Szalai G., Paldi E. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance // *Plant Science*. 2002. Vol. 163, № 6. PP. 1129–1135. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00324-2)
44. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment // *Plant Science*. 2002. Vol. 163, № 3. PP. 653–660. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00176-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00176-0)
45. La V.H., Lee B.-R., Islam M.T., Park S.-H., Jung H., Bae D.W., Kim T.-H. Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus* // *Environmental and Experimental Botany*. 2019. Vol. 157. PP. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.013>
46. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Швиденко М.В., Карпец Ю.В. Вплив салицилової і янтарної кислот на утворення активних форм кисню в колеоптилях пшениці // *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83, № 5. С. 82–88.
47. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Швиденко Н.В., Карпец Ю.В. Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы салициловой и янтарной кислотами: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48, № 5. С. 550–556.
48. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // *Protoplasma*. 2001. Vol. 217. PP. 125–128. <https://doi.org/10.1007/BF01289421>
49. Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Lüthje S., Vylegzhanina N., Buck F., Böttger M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // *Plant, Cell & Environment*. 2009. Vol. 32. P. 497–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x>
50. Mori I.C., Pinontoan R., Kawano T., Muto S. Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* // *Plant Cell Physiol*. 2001. Vol. 42. PP. 1383–1388. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce176>
51. Miura K., Okamoto H., Okuma E., Shiba H., Kamada H., Hasegawa P.M., Murata Y. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis* // *Plant J*. 2013. Vol. 73. PP. 91–104. <https://doi.org/10.1111/tpj.12014>
52. Kalachova T., Iakovenko O., Kretinin S., Kravets V. Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013. Vol. 66. PP. 127–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.006>
53. Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H. Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase // *Plant Physiology*. 2017. Vol. 173. PP. 2029–2040. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00060>
54. Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include

- synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death // *Plant Physiology*. 2006. Vol. 140. PP. 249–262. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072348>
55. Corpas F.J., Barroso J.B. Nitric oxide synthase-like activity in higher plants // *Nitric Oxide*. 2017. Vol. 68. PP. 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.10.009>
 56. Gupta K.J., Kaiser W.M. Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria // *Plant and Cell Physiology*. 2010. Vol. 51. PP. 576–584. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq022>
 57. Farnese F.S., Menezes-Silva P.E., Gusman G.S., Oliveira J.A. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7, Art. 471. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>
 58. Gupta K.J., Hancock J.T., Petrivalsky M., Kolbert Z., Lindermayr C., Durner J., Barroso J.B., Palma J.M., Brouquisse R., Wendehenne D., Corpas F.J., Loake G.J. Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytologist*. 2020. Vol. 225. PP. 1828–1834. <https://doi.org/10.1111/nph.16157>
 59. Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998. Vol. 95, № 17. PP. 10328–10333. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10328>
 60. Song F., Goodman R.M. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2001. Vol. 14, № 12. PP. 1458–1462. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.12.1458>
 61. Chun H.J., Park H.C., Koo S.C., Lee J.H., Park C.Y., Choi M.S., Kang C.H., Baek D., Cheong Y.H., Yun D.-J., Chung W.S., Cho M.J., Kim M.C. Constitutive expression of mammalian nitric oxide synthase in tobacco plants triggers disease resistance to pathogens // *Molecular Cell*. 2012. Vol. 34. PP. 463–471. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-0213-0>
 62. Kovacs I., Durner J., Lindermayr C. Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytologist*. 2015. Vol. 208. PP. 860–872. <https://doi.org/10.1111/nph.13502>
 63. Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J.M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2000. Vol. 97, № 16. PP. 8849–8855. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8849>
 64. Yastreba T.O., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Dmitriev A.P. Induction of salt tolerance in salicylate-deficient NahG *Arabidopsis* transformants using the nitric oxide donor // *Cytology and Genetics*. 2017. Vol. 51, № 2. PP. 134–141. <https://doi.org/10.3103/S0095452717020086>
 65. Grun S., Lindermayr C., Sell S., Durner J. Nitric oxide and gene regulation in plants // *Journal of Experimental Botany*. 2006. Vol. 57, № 3. PP. 507–516. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj053>
 66. Klepper L. NOx evolution by soybean leaves treated with salicylic acid and selected derivatives // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1991. Vol. 39, № 1. P. 43–48. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(91\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(91)90212-5)
 67. Tewari R.K., Paek K.Y. Salicylic acid-induced nitric oxide and ROS generation stimulate ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* roots // *Journal of Plant Growth Regulation*. 2011. Vol. 30. PP. 396–404. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9202-3>
 68. Gémes K., Poór P., Horváth E., Kolbert Z., Szopkó D., Szepesi A., Tari I. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity // *Physiologia Plantarum*. 2011. Vol. 142, № 2. PP. 179–192. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x>

69. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Косаковская И.В. Оксид азота и пероксид водорода как сигнальные посредники при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенными жасмоновой и салициловой кислотами // Физиология растений и генетика. 2016. Т. 48. № 2. С. 158–166. <https://doi.org/10.15407/frg2016.02.158>
70. Dubovskaya L.V., Bakakina Y.S., Kolesneva E.V., Sodel D.L., McAinsh M.R., Hetherington A.M., Volotovskii I.D. cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive Arabidopsis mutant *abi1-1* // New Phytologist. 2011. Vol. 191, № 1. PP. 57–69. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03661.x>
71. Shan C., Wang Y. Exogenous salicylic acid-induced nitric oxide regulates leaf water condition through root osmoregulation of maize seedlings under drought stress // Brazilian Journal of Botany. 2017. Vol. 40, № 2. PP. 591–597. <https://doi.org/10.1007/s40415-016-0355-y>
72. Shao R.X., Xin L.F., Guo J.M., Zheng H.F., Mao J., Han X.P., Jia L., Jia S.J., Du C.G., Song R., Yang Q.H., Elmore R.W. Salicylic acid-induced photosynthetic adaptability of *Zea mays* L. to polyethylene glycol-simulated water deficit is associated with nitric oxide signaling // Photosynthetica. 2018. Vol. 56. PP. 1370–1377. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0850-4>
73. Li X., Zhang L., Ahammed G.J., Li Y.-T., Wei J.-P., Yan P., Zhang L.-P., Han X., Han W.-Y. Salicylic acid acts upstream of nitric oxide in elevated carbon dioxide-induced flavonoid biosynthesis in tea plant (*Camellia sinensis* L.) // Environmental and Experimental Botany. 2019. Vol. 161. PP. 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.012>
74. Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2001. Vol. 98. PP. 13454–13459. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.012>
75. Hao F., Zhao S., Dong H., Zhang H., Sun L., Miao C. *Nia1* and *Nia2* are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in Arabidopsis // Journal of Integrative Plant Biology. 2010. Vol. 52, № 3. PP. 298–307. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00920.x>
76. Rai K.K., Rai N., Aamir M., Tripathi D., Rai S.P. Interactive role of salicylic acid and nitric oxide on transcriptional reprogramming for high temperature tolerance in *Lablab purpureus* L.: Structural and functional insights using computational approaches // Journal of Biotechnology. 2020. Vol. 309. PP. 113–130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.001>
77. Esim N., Atici Ö. Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) // Frontiers in Life Science. 2015. Vol. 8, № 2. PP. 124–130. <https://doi.org/10.1080/21553769.2014.998299>
78. Горелова Е.И., Шкляревский М.А., Рябчун Н.И., Кабашникова Л.Ф., Колупаев Ю.Е. Комбинированное влияние салициловой кислоты и донора оксида азота на развитие индуцированной закаливанием морозоустойчивости проростков пшеницы // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. 2020. № 2 (50). С. 93–104. <https://doi.org/10.35550/vbio2020.02.093>
79. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Луговая А.А. Комбинированное влияние салициловой кислоты и донора оксида азота на стресс-протекторную систему растений пшеницы в условиях засухи // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54, № 4. С. 400–407. <https://doi.org/10.7868/S0555109918040098>
80. Chavoushia M., Najafia F., Salimia A., Angaji S.A. Improvement in drought stress tolerance of safflower during vegetative growth by exogenous application of salicylic acid and sodium nitroprusside // Industrial Crops & Products. 2019. Vol. 134. PP. 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.071>
81. Ahanger M.A., Aziz U., Alsahli A.A., Alyemeni M.N., Ahmad P. Influence of exogenous salicylic acid and nitric oxide on growth, photosynthesis, and ascorbate-glutathione cycle in salt stressed *Vigna angularis* // Biomolecules. 2020. Vol. 10. Art. 42. <https://doi.org/10.3390/biom10010042>

82. Yadu S., Dewangan T.L., Chandrakar V., Keshavkant S. Imperative roles of salicylic acid and nitric oxide in improving salinity tolerance in *Pisum sativum* L. // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017. Vol. 23, № 1. PP. 43–58. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0394-7>
83. Singh S., Kumar V., Kapoor D., Kumar S., Singh S., Dhanjal D.S., Datta S., Samuel J., Dey P., Wang S., Prasad R., Singh J. Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions // *Physiologia Plantarum*. 2020. Vol. 168, № 2. PP. 301–317. <https://doi.org/10.1111/ppl.13002>
84. Romero L.C., García I., Gotor C. L-cysteine desulphydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol // *Plant Signaling & Behavior*. 2013. Vol. 8, № 5. e24007. <https://doi.org/10.4161/psb.24007>
85. Guo H., Xiao T., Zhou H., Xie Y., Shen W. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016. Vol. 38, Art. 16. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2038-x>
86. Pandey A.K., Gautam A. Stress responsive gene regulation in relation to hydrogen sulfide in plants under abiotic stress // *Physiologia Plantarum*. 2020. Vol. 168. PP. 511–525. <https://doi.org/10.1111/ppl.13064>
87. Li H., Li M., Wei X., Zhang X., Xue R., Zhao Y., Zhao H. Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves // *Molecular Genetics and Genomics*. 2017. Vol. 292. PP. 1091–1110. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1330-4>
88. Li Z.G., Long W.B., Yang S.Z., Wang Y.C., Tang J.H., Chen T. Involvement of sulphydryl compounds and antioxidant enzymes in H₂S-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension-cultured cells // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2015. Vol. 51. PP. 428–437. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9705-x>
89. Li Z.G., Long W.B., Yang S.Z., Wang Y.C., Tang J.H., Wen L., Zhu B., Min X. Endogenous hydrogen sulfide regulated by calcium is involved in thermotolerance in tobacco *Nicotiana tabacum* L. suspension cell cultures // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015. Vol. 37, Art. 219. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1971-z>
90. Карпец Ю.В., Шкляревский М.А., Горелова Е.И., Колупаев Ю.Е. Участие сероводорода в индуцировании салициловой кислотой антиоксидантной системы корней проростков пшеницы и их теплоустойчивости // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56, № 4. С. 383–389. <https://doi.org/10.31857/S0555109920040078>
91. Pan D.-Y., Fu X., Zhang X.-W., Liu F.-J., Bi H.-G., Ai X.-Z. Hydrogen sulfide is required for salicylic acid-induced chilling tolerance of cucumber seedlings // *Protoplasma*. 2020. Vol. 257. PP. 1543–1557. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01531-y>
92. Kaya C. Salicylic acid-induced hydrogen sulphide improves lead stress tolerance in pepper plants by upraising the ascorbate-glutathione cycle // *Physiologia Plantarum*. 2020. <https://doi.org/10.1111/ppl.13159>
93. Zanganeh R., Rahmani F., Jamei R. Impacts of seed priming with salicylic acid and sodium hydrosulfide on possible metabolic pathway of two amino acids in maize plant under lead stress // *Molecular Biology Research Communications*. 2018. Vol. 7, № 2. PP. 83–88. <https://doi.org/10.22099/mbrc.2018.29089.1317>
94. Zanganeh R., Jamei R., Rahmani F. Pre-sowing seed treatment with salicylic acid and sodium hydrosulfide confers Pb toxicity tolerance in maize (*Zea mays* L.) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020. Vol. 206, Art. 111392. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111392>

Поступила в редакцию 19.01.2021 г.; повторно 18.04.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 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

Ястреб Татьяна Олеговна, канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений, факультет защиты растений, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3604-9028>

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

Поляков Алексей Константинович, д-р биол. наук, профессор кафедры лесоводства, факультет лесного хозяйства, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2).

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

Дмитриев Александр Петрович, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. НАН Украины, главный научный сотрудник лаборатории иммунитета растений, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины (Украина, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2268-9104>

E-mail: dmitriev.ap@gmail.com

For citation: Kolupaev YE, Yastreb TO, Polyakov AK, Dmitriev AP. Salicylic acid and formation of plant adaptive responses to abiotic stressors: role of signaling network components. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:135-165. doi: 10.17223/19988591/55/8 In Russian, English Summary

Yuriy E. Kolupaev^{1,2}, Tetiana O. Yastreb¹, Aleksey K. Polyakov¹, Alexander P. Dmitriev³

¹Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, Ukraine

²Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

³Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Salicylic acid and formation of plant adaptive responses to abiotic stressors: role of signaling network components

Salicylic acid (SA) is one of the key phytohormones. A lot of signaling pathways are activated under its influence. SA takes part in regulation of physiological processes such as seed germination, flowering, synthesis of other hormones, photosynthesis, respiration, transpiration, thermogenesis, responses to infection with pathogens, as well as in adaptation to action of various stressors. Numerous data show an increase in endogenous SA content in plants at the early stages of stress response. Under SA influence, there is antioxidant system activation, as well as synthesis of stress proteins (heat shock proteins, dehydrins, PR- (pathogenesis related) proteins), and accumulation of multifunctional low-molecular-weight protective compounds (proline, glycine betaine, sugars, secondary metabolites). Also, SA has an ability to induce stomatal closure in plants.

We discussed the role of NPR1 protein, which is considered a key transcriptional regulator of SA signaling. We noted that the interaction of SA with this protein occurs in at least two ways: through direct binding and through SA-induced changes in cell redox homeostasis, leading to the NPR1 transition from an oligomer state to a monomer form. For NPR1 monomerization in the cytosol, there must be a sufficient pool of reducing agents, but their nature is not fully understood. At a low SA concentration

in cells, NPR1 protein forms an oligomer and remains in the cytosol (See Fig. 1). Wherein proteins NPR3 and NPR4 bind residual NPR1 in the nucleus and limit its functional activity. With an increase in the SA concentration, NPR1 transforms into a monomer state and penetrates into the nucleus. In addition to the redox-dependent monomerization of NPR1, the increased SA concentration blocks the activity of NPR3 and NPR4, which in the absence of SA act as repressors of transcription regulated by the TGACG-binding factor in SA-sensitive promoters. Thus, blocking NPR3 and NPR4 leads to the activation of the expression of SA-induced genes. However, the list of SA-binding proteins is not limited to NPR. Data on the participation in SA binding of methylesterase, carbonic anhydrase, several isoenzymes of glutathione S-transferase, chloroplast thioredoxin-*m1*, some enzymes of the Krebs cycle, and a number of other proteins, including those with unknown functions, have been obtained. In this regard, the hypothesis of multinodular (decentralized) SA perception by a plant cell is discussed.

In addition to specific proteins, calcium ions, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide and hydrogen sulfide are involved in SA signaling (See Fig. 2). However, the relationships between most of these mediators during SA signal transduction have not been sufficiently studied. We found out that calcium ions in signaling chains are located both below the SA (involved in the transduction of its signals) and above (involved in the induction of SA synthesis). We considered the participation of cationic channels of the CNGC type (cyclic nucleotide-gated calcium channels) in the activation of SA synthesis in plant cells under an action of stressors. The entry of calcium through them into the cytosol leads to the activation of calmodulin, and then protein kinases dependent on calmodulin and calcium. These calcium sensor proteins modulate the activity of transcription factors CBP60g and CAMTA3/SR1, which are positive regulators of the expression of isochorismate synthase gene and other genes that provide the process of SA synthesis. On the other hand, treatment of plants with exogenous SA or an increase in its content in cells due to stress-induced enhancement of synthesis leads to an increase in the concentration of cytosolic calcium, which is necessary for transduction of the SA signal into the genetic apparatus and the realization of its physiological effects.

SA can also be involved in the implementation of action of signaling mediators such as ROS and nitric oxide. In this case, however, not all of their physiological effects are realized with the participation of SA. In particular, our work provides examples of the successful induction of salt tolerance of salicylate-deficient transformants of *Arabidopsis NahG* by the action of hydrogen peroxide and the nitric oxide donor sodium nitroprusside.

On the other hand, ROS, nitric oxide and hydrogen sulfide can act as intermediaries in the implementation of the SA action. This review analyzes new information on the effect of SA on functioning of enzymatic systems that generate ROS (NADPH oxidase, extracellular peroxidase), hydrogen sulfide (L- and D-cysteine desulhydrases) and that synthesize nitric oxide by the reductive and oxidative pathways.

We considered the effects of enhancing stress-protective effect of SA on plants when combined with donors of signaling molecules-gasotransmitters. We noted that the low cost and environmental safety of SA as a natural compound should contribute to the expansion of the scope of its practical application, primarily as a growth regulator of stress-protective action.

The paper contains 2 Figures and 94 References.

Key words: salicylic acid; phytohormones; reactive oxygen species; calcium; nitric oxide; hydrogen sulfide; antioxidant system; resistance

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Raskin I. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology*. 1992;99(3):799-803. doi: [10.1104/pp.99.3.799](https://doi.org/10.1104/pp.99.3.799)
2. Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 2009;47:177-206. doi: [10.1146/annurev.phyto.050908.135202](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202)
3. Saleem M, Fariduddin Q, Janda T. Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2021;40:464-485. doi: [10.1007/s00344-020-10152-x](https://doi.org/10.1007/s00344-020-10152-x)
4. Dat J, Lopez-Delgado H, Foyer C, Scott I. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *Journal of Plant Physiology*. 2000;156(5-6): 659-665. doi: [10.1016/S0176-1617\(00\)80228-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80228-X)
5. Larkindale J, Hall J, Knight M, Vierling E. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*. 2005;138:882-897. doi: [10.1104/pp.105.06225](https://doi.org/10.1104/pp.105.06225)
6. Borsani O, Valpuesta V, Botella M. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*. 2001;126:1024-1030. doi: [10.1104/pp.126.3.1024](https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024)
7. Molina A, Bueno P, Marlin M, Rodriguez-Rosales M, Belver A, Venema K, Danaire J. Involvement of endogenous salicylic acid content lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phycologist*. 2002;156(3):409-415. doi: [10.1046/j.1469-8137.2002.00527.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00527.x)
8. Rao M, Davis R. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Journal*. 1999;17(6):603-614. doi: [10.1046/j.1365-313x.1999.00400.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00400.x)
9. Chakraborty N, Sarkar A, Acharya K. Multifaceted roles of salicylic acid and jasmonic acid in plants against abiotic stresses. In: *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives*. Roychoudhury A and Tripathi DK, editors. John Wiley & Sons Ltd.; 2020. pp. 374-387. doi: [10.1002/9781119552154.ch18](https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch18)
10. Santisree P, Jalli LCL, Bhatnagar-Mathur P, Sharma KK. Emerging roles of salicylic acid and jasmonates in plant abiotic stress responses. In: *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives*. Roychoudhury A and Tripathi DK, editors. John Wiley & Sons Ltd.; 2020. PP. 342-373. doi: [10.1002/9781119552154.ch17](https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch17)
11. Kolupaev YuE, Karpets YuV, Beschasniy SP, Dmitriev AP. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytology and Genetics*. 2019;53(5):392-406. doi: [10.3103/S0095452719050098](https://doi.org/10.3103/S0095452719050098)
12. Khan MN, Mobin M, Abbas ZK. Nitric oxide and high temperature stress: A physiological perspective. In: *Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants*. Khan MN, Mobin M, Mohammad F and Corpas F, editors. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. pp. 77-93. doi: [10.1007/978-3-319-17804-2_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2_5)
13. He H, He L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses. *Nitric Oxide*. 2014;42:40-43. doi: [10.1016/j.niox.2014.08.011](https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.08.011)
14. Kolupaev YuE, Yastreb TO. Hydrogen sulfide and plant adaptation to abiotic stressors. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2019;48:158-190. doi: [10.17223/19988591/48/8](https://doi.org/10.17223/19988591/48/8) In Russian, English Summary
15. Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO, Ryabchun NI, Kirichenko VV. Effect of hydrogen sulfide donor on antioxidant state of wheat plants and their resistance to soil drought. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019;66(1):59-66. doi: [10.1134/S1021443719010084](https://doi.org/10.1134/S1021443719010084)

16. Banerjee A, Tripathi DK, Roychoudhury A. Hydrogen sulphide trapeze: Environmental stress amelioration and phytohormone crosstalk. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;132:46-53. doi: [10.1016/j.plaphy.2018.08.028](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.028)
17. Pokotylo I, Kravets V, Ruelland E. Salicylic acid binding proteins (SABPs): The hidden forefront of salicylic acid signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20:4377. doi: [10.3390/ijms20184377](https://doi.org/10.3390/ijms20184377)
18. Mou Z, Fan W, Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate npr1 function through redox changes. *Cell*. 2003;113(7):935-944. doi: [10.1016/s0092-8674\(03\)00429-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00429-x)
19. Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports*. 2012;1:639-647. doi: [10.1016/j.celrep.2012.05.008](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008)
20. Kwon DJ, Jin H, Kang MJ, Yun SH, Choi SM, Noh YS, Noh B. Salicylic acid-induced transcriptional reprogramming by the HAC–NPR1–TGA histone acetyltransferase complex in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(22):11712-11725. doi: [10.1093/nar/gky847](https://doi.org/10.1093/nar/gky847)
21. Manohar M, Tian M, Moreau M, Park SW, Choi HW, Fei Z, Friso G, Asif M, Manosalva P, von Dahl CC, Shi K, Ma S, Dinesh-Kumar SP, O'Doherty I, Schroeder FC, van Wijk KJ, Klessig DF. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Frontiers in Plant Science*. 2015;5:777. doi: [10.3389/fpls.2014.00777](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00777)
22. Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF. Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1993;90:9533-9537. doi: [10.1073/pnas.90.20.9533](https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9533)
23. Dempsey DA, Shah J, Klessig DF. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1999;18:547-575. doi: [10.1080/07352689991309397](https://doi.org/10.1080/07352689991309397)
24. Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science*. 2003;8(7):335-342. doi: [10.1016/S1360-1385\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00135-3)
25. Ding Y, Sun T, Ao K., Peng Y, Zhang Y, Li X., Zhang Y. Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*. 2018;173:1454-1467. doi: [10.1016/j.cell.2018.03.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044)
26. Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*. 2008;321:952-956. doi: [10.1126/science.1156970](https://doi.org/10.1126/science.1156970)
27. Pedranzani H, Vigliocco A. Evaluation of jasmonic acid and salicylic acid levels in abiotic stress tolerance: Past and present. In: *Mechanisms Behind Phytohormonal Signalling and Crop Abiotic Stress Tolerance*. Singh VP, Singh S and Prasad SM, editors. USA, NY: Nova Science Publishers; 2017. pp. 329-370.
28. Tarchevsky I.A. Compartmentation of salicylate-induced proteins. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. 50(4):338-345. doi: [10.1134/S0003683814040115](https://doi.org/10.1134/S0003683814040115)
29. Castelló MJ, Medina-Puche L, Lamilla J, Tornero P. NPR1 paralogs of *Arabidopsis* and their role in salicylic acid perception. *PLoS ONE*. 2018;13:e0209835. doi: [10.1371/journal.pone.0209835](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209835)
30. Kim MC, Chung WS, Yun D, Cho MJ. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant*. 2009;2(1):13-21. doi: [10.1093/mp/ssn091](https://doi.org/10.1093/mp/ssn091)
31. Kolupaev YuE, Karpets YuV, Dmitriev AP. Signal mediators in plants in response to abiotic stress: calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytology and Genetics*. 2015;49(5):338-348. doi: [10.3103/S0095452715050047](https://doi.org/10.3103/S0095452715050047)
32. Johnson JM, Reichelt M, Vadassery J, Gershenzon J, Oelmüller R. An Arabidopsis mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC Plant Biology*. 2014;14:162. doi: [10.1186/1471-2229-14-162](https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162)
33. Rai KK, Pandey N, Rai SP. Salicylic acid and nitric oxide signaling in plant heat stress. *Physiologia Plantarum*. 2020;168(2):241-255. doi: [10.1111/ppl.12958](https://doi.org/10.1111/ppl.12958)

34. Wang LJ, Li SH. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*. 2006;70(4):685-694. doi: [10.1016/j.plantsci.2005.09.005](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.005)
35. Fan M, Sun X, Xu N, Liao Z, Li Y, Wang J, Fan Y, Cui D, Li P, Miao Z. Integration of deep transcriptome and proteome analyses of salicylic acid regulation high temperature stress in *Ulva prolifera*. *Scientific Reports*. 2017;7:11052. doi: [10.1038/s41598-017-11449-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-11449-w)
36. Khokon AR, Okuma E, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*. 2011; 34:434-443. doi: [10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x)
37. Prodhan MY, Munemasa S, Nahar MNN, Nakamura Y, Murata Y. Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca^{2+} /CPK-dependent pathway. *Plant Physiology*. 2018;178:441-450. doi: [10.1104/pp.18.00321](https://doi.org/10.1104/pp.18.00321)
38. Kohli SK, Handa N, Gautam V, Bali S, Sharma A, Khanna K, Arora S, Thukral KA, Ohri P, Karpets Y, Kolupaev Y, Bhardwaj R. ROS signaling in plants under heavy metal stress. In: *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Khan MIR and Khan NA, editors. Singapore: Springer Nature; 2017. pp. 185-214. doi: [10.1007/978-981-10-5254-5_8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_8)
39. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2010;107(36):15681-15686. doi: [10.1073/pnas.1005776107](https://doi.org/10.1073/pnas.1005776107)
40. Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008;50(1):2-18. doi: [10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x)
41. Yastreb TO, Kolupaev YE, Lugovaya AA, Dmitriev AP. Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in the *Arabidopsis* salicylate-deficient transformants *NahG*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(6):719-724. doi: [10.1134/S000368381706014X](https://doi.org/10.1134/S000368381706014X)
42. van Wees SCM, Glazebrook J. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant Journal*. 2003;33(4):733-742. doi: [10.1046/j.1365-3113x.2003.01665.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2003.01665.x)
43. Horvath E, Janda T, Szalai G, Paldi E. *In vitro* salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Science*. 2002;163(6):1129-1135. doi: [10.1016/S0168-9452\(02\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00324-2)
44. Geetha HM, Shetty HS. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. *Plant Science*. 2002;163(3):653-660. doi: [10.1016/S0168-9452\(02\)00176-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00176-0)
45. La VH, Lee BR, Islam MT, Park SH, Jung H, Bae DW, Kim TH. Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus*. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;157:1-10. doi: [10.1016/j.envexpbot.2018.09.013](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.013)
46. Kolupaev YuYe, Yastreb TO, Shvidenko MV, Karpets YuV. Influence of salicylic and succinic acids on formation of active oxygen forms in wheat coleoptiles. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal*. 2011;83(5):82-88. In Ukrainian, English Summary
47. Kolupaev YuE, Yastreb TO, Shvidenko NV, Karpets YuV. Induction of heat resistance of wheat coleoptiles by salicylic and succinic acids: connection of the effect with the generation and neutralization of reactive oxygen species. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012;48(5):500-505. doi: [10.1134/S0003683812050055](https://doi.org/10.1134/S0003683812050055)
48. Minibayeva FV, Gordon LK, Kolesnikov OP, Chasov AV. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*. 2001;217:125-128. doi: [10.1007/BF01289421](https://doi.org/10.1007/BF01289421)

49. Minibayeva F, Kolesnikov O, Chasov A, Beckett RP, L  thje S, Vylegzhanina N, Buck F, Böttger M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment*. 2009;32:497-508. doi: [10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x)
50. Mori IC, Pinontoan R, Kawano T, Muto S. Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiology*. 2001;42:1383-1388. doi: [10.1093/pcp/pce176](https://doi.org/10.1093/pcp/pce176)
51. Miura K., Okamoto H, Okuma E, Shiba H, Kamada H, Hasegawa PM, Murata Y. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis. *Plant J*. 2013;73:91-104. doi: [10.1111/tpj.12014](https://doi.org/10.1111/tpj.12014)
52. Kalachova T, Iakovenko O, Kretinin S, Kravets V. Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013;66:127-133. doi: [10.1016/j.plaphy.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.006)
53. Belt K, Huang S, Thatcher LF, Casarotto H, Singh KB, Van Aken O, Millar AH. Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase. *Plant Physiology*. 2017;173:2029-2040. doi: [10.1104/pp.16.00060](https://doi.org/10.1104/pp.16.00060)
54. Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*. 2006;140:249-262. doi: [10.1104/pp.105.072348](https://doi.org/10.1104/pp.105.072348)
55. Corpas FJ, Barroso JB. Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide*. 2017;68:5-6 doi: [10.1016/j.niox.2016.10.009](https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.10.009)
56. Gupta KJ, Kaiser WM. Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant and Cell Physiology*. 2010;51:576-584 doi: [10.1093/pcp/pcq022](https://doi.org/10.1093/pcp/pcq022)
57. Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:471. doi: [10.3389/fpls.2016.00471](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471)
58. Gupta KJ, Hancock JT, Petrivalsky M, Kolbert Z, Lindermayr C, Durner J, Barroso JB, Palma JM, Brouquisse R, Wendehenne D, Corpas FJ, Loake GJ. Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytologist*. 2020; 225:1828-1834. doi: [10.1111/nph.16157](https://doi.org/10.1111/nph.16157)
59. Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998;95(17):10328-10333. doi: [10.1073/pnas.95.17.10328](https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10328)
60. Song F, Goodman RM. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2001;14(12):1458-1462. doi: [10.1094/MPMI.2001.14.12.1458](https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.12.1458)
61. Chun HJ, Park HC, Koo SC, Lee JH, Park CY, Choi MS, Kang CH, Baek D, Cheong YH, Yun DJ, Chung WS, Cho MJ, Kim MC. Constitutive expression of mammalian nitric oxide synthase in tobacco plants triggers disease resistance to pathogens. *Molecular Cell*. 2012;34:463-471. doi: [10.1007/s10059-012-0213-0](https://doi.org/10.1007/s10059-012-0213-0)
62. Kovacs I, Durner J, Lindermayr C. Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2015;208:860-872. doi: [10.1111/nph.13502](https://doi.org/10.1111/nph.13502)
63. Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2000;97(16):8849-8855. doi: [10.1073/pnas.97.16.8849](https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8849)

64. Yastrebo TO, Karpets YuV, Kolupaev YuE, Dmitriev AP. Induction of salt tolerance in salicylate-deficient *NahG* Arabidopsis transformants using the nitric oxide donor. *Cytology and Genetics*. 2017;51(2):134-141. doi: [10.3103/S0095452717020086](https://doi.org/10.3103/S0095452717020086)
65. Grun S, Lindermayr C, Sell S, Durner J. Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(3):507-516. doi: [10.1093/jxb/erj053](https://doi.org/10.1093/jxb/erj053)
66. Klepper L. NOx evolution by soybean leaves treated with salicylic acid and selected derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1991;39(1):43-48. doi: [10.1016/0048-3575\(91\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(91)90212-5)
67. Tewari RK, Paek KY. Salicylic acid-induced nitric oxide and ROS generation stimulate ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* roots. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2011;30:396-404. doi: [10.1007/s00344-011-9202-3](https://doi.org/10.1007/s00344-011-9202-3)
68. Gémes K, Poór P, Horváth E, Kolbert Z, Szopkó D, Szepesi A, Tari I. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum*. 2011;142(2):179-192. doi: [10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x)
69. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Kosakivska IV. Nitric oxide and hydrogen peroxide as signal mediators at induction of heat resistance of wheat plantlets by exogenous jasmonic and salicylic acids. *Fiziologiya Rastenii i Genetica*. 2016;48(2):158-166. doi: [10.15407/frg2016.02.158](https://doi.org/10.15407/frg2016.02.158) In Russian, English Summary
70. Dubovskaya LV, Bakakina YS, Kolesneva EV, Sodel DL, McAinsh MR, Hetherington AM, Volotovskii ID. cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive Arabidopsis mutant *abi1-1*. *New Phytologist*. 2011;191(1):57-69. doi: [10.1111/j.1469-8137.2011.03661.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03661.x)
71. Shan C, Wang Y. Exogenous salicylic acid-induced nitric oxide regulates leaf water condition through root osmoregulation of maize seedlings under drought stress. *Brazilian Journal of Botany*. 2017;40(2): 591-597. doi: [10.1007/s40415-016-0355-y](https://doi.org/10.1007/s40415-016-0355-y)
72. Shao RX, Xin LF, Guo JM, Zheng HF, Mao J, Han XP, Jia L, Jia SJ, Du CG, Song R, Yang QH, Elmore RW. Salicylic acid-induced photosynthetic adaptability of *Zea mays* L. to polyethylene glycol-simulated water deficit is associated with nitric oxide signaling. *Photosynthetica*. 2018;56:1370-1377. doi: [10.1007/s11099-018-0850-4](https://doi.org/10.1007/s11099-018-0850-4)
73. Li X, Zhang L, Ahammed GJ, Li YT, Wei JP, Yan P, Zhang LP, Han X, Han WY. Salicylic acid acts upstream of nitric oxide in elevated carbon dioxide-induced flavonoid biosynthesis in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:367-374. doi: [10.1016/j.envexpbot.2018.11.012](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.012)
74. Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001;98:13454-13459. doi: [10.1016/j.envexpbot.2018.11.012](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.012)
75. Hao F, Zhao S, Dong H, Zhang H, Sun L, Miao C. *Nia1* and *Nia2* are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010;52(3):298-307. doi: [10.1111/j.1744-7909.2010.00920.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00920.x)
76. Rai KK, Rai N, Aamir M, Tripathi D, Rai SP. Interactive role of salicylic acid and nitric oxide on transcriptional reprogramming for high temperature tolerance in *Lablab purpureus* L.: Structural and functional insights using computational approaches. *Journal of Biotechnology*. 2020;309:113-130. doi: [10.1016/j.jbiotec.2020.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.001)
77. Esim N, Atici Ö. Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Frontiers in Life Science*. 2015;(2):124-130. doi: [10.1080/21553769.2014.998299](https://doi.org/10.1080/21553769.2014.998299)
78. Horielova EI, Shkliarevskiy MA, Ryabchun NI, Kabashnikova LF, Kolupaev YuE. Combined effect of salicylic acid and nitric oxide donor on development of hardening-induced frost resistance of wheat seedlings. *Visnik Harkivs'kogo natsional'nogo agrarnogo*

- universitetu. Seriâ Biologiâ*. 2020;2(50):93-104. doi: [10.35550/vbio2020.02.093](https://doi.org/10.35550/vbio2020.02.093) In Russian, English Summary
79. Kolupaev YuE, Karpets YuV, Yastreb TO, Lugovaya AA. Combined effect of salicylic acid and nitrogen oxide donor on stress-protective system of wheat plants under drought conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(4):418-424. doi: [10.1134/S0003683818040099](https://doi.org/10.1134/S0003683818040099)
 80. Chavoushia M, Najafia F, Salimia A, Angaji SA. Improvement in drought stress tolerance of safflower during vegetative growth by exogenous application of salicylic acid and sodium nitroprusside. *Industrial Crops & Products*. 2019;134:168-176. doi: [10.1016/j.indcrop.2019.03.071](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.071)
 81. Ahanger MA, Aziz U, Alsahli AA, Alyemeni MN, Ahmad P. Influence of exogenous salicylic acid and nitric oxide on growth, photosynthesis, and ascorbate-glutathione cycle in salt stressed *Vigna angularis*. *Biomolecules*. 2020;10:42. doi: [10.3390/biom10010042](https://doi.org/10.3390/biom10010042)
 82. Yadu S, Dewangan TL, Chandrakar V, Keshavkant S. Imperative roles of salicylic acid and nitric oxide in improving salinity tolerance in *Pisum sativum* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017;23(1):43-58. doi: [10.1007/s12298-016-0394-7](https://doi.org/10.1007/s12298-016-0394-7)
 83. Singh S, Kumar V, Kapoor D, Kumar S, Singh S, Dhanjal DS, Datta S, Samuel J, Dey P, Wang S, Prasad R, Singh J. Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions. *Physiologia Plantarum*. 2020;168(2):301-317. doi: [10.1111/ppl.13002](https://doi.org/10.1111/ppl.13002)
 84. Romero LC, García I, Gotor C. L-cysteine desulphydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signaling & Behavior*. 2013;8(5):e24007. doi: [10.4161/psb.24007](https://doi.org/10.4161/psb.24007)
 85. Guo H, Xiao T, Zhou H, Xie Y, Shen W. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016;38:16. doi: [10.1007/s11738-015-2038-x](https://doi.org/10.1007/s11738-015-2038-x)
 86. Pandey AK, Gautam A. Stress responsive gene regulation in relation to hydrogen sulfide in plants under abiotic stress. *Physiologia Plantarum*. 2020;168:511-525. doi: [10.1111/ppl.13064](https://doi.org/10.1111/ppl.13064)
 87. Li H, Li M, Wei X, Zhang X, Xue R, Zhao Y., Zhao H. Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Molecular Genetics and Genomics*. 2017;292:1091-1110. doi: [10.1007/s00438-017-1330-4](https://doi.org/10.1007/s00438-017-1330-4)
 88. Li ZG, Long WB, Yang SZ, Wang YC, Tang JH, Chen T. Involvement of sulfhydryl compounds and antioxidant enzymes in H₂S-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension-cultured cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2015;51:428-437. doi: [10.1007/s11627-015-9705-x](https://doi.org/10.1007/s11627-015-9705-x)
 89. Li ZG, Long WB, Yang SZ, Wang YC, Tang JH, Wen L, Zhu Byu, Min X Endogenous hydrogen sulfide regulated by calcium is involved in thermotolerance in tobacco *Nicotiana tabacum* L. suspension cell cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37:219. doi: [10.1007/s11738-015-1971-z](https://doi.org/10.1007/s11738-015-1971-z)
 90. Karpets YuV, Shkliarevskiy MA, Horielova EI, Kolupaev YuE. Participation of hydrogen sulfide in induction of antioxidant system in roots of wheat plantlets and their heat resistance by salicylic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(4):467-472. doi: [10.1134/S0003683820040079](https://doi.org/10.1134/S0003683820040079)
 91. Pan DY, Fu X, Zhang XW, Liu FJ, Bi HG, Ai XZ. Hydrogen sulfide is required for salicylic acid-induced chilling tolerance of cucumber seedlings. *Protoplasma*. 2020;257:1543-1557. doi: [10.1007/s00709-020-01531-y](https://doi.org/10.1007/s00709-020-01531-y)
 92. Kaya C. Salicylic acid-induced hydrogen sulphide improves lead stress tolerance in pepper plants by upraising the ascorbate-glutathione cycle. *Physiolgia Plantarum*. 2020. doi: [10.1111/ppl.13159](https://doi.org/10.1111/ppl.13159)
 93. Zanganeh R, Rahmani F, Jamei R. Impacts of seed priming with salicylic acid and sodium hydrosulfide on possible metabolic pathway of two amino acids in maize plant under lead

- stress. *Molecular Biology Research Communications*. 2018;7(2):83-88. doi: [10.22099/mbr.2018.29089.1317](https://doi.org/10.22099/mbr.2018.29089.1317)
94. Zanganeh R, Jamei R, Rahmani F. Pre- sowing seed treatment with salicylic acid and sodium hydrosulfide confers Pb toxicity tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;206:111392. doi: [10.1016/j.ecoenv.2020.111392](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111392)

Received 19 January 2021; Revised 18 April 2021;
Accepted 27 July 2021; Published 29 September 2021.

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

Yastreba Tetiana O, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Professor, Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Plant Protection, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483, Ukraine.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3604-9028>

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

Polyakov Aleksey K, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Forestry, Faculty of Forestry, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483, Ukraine.

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

Dmitriev Alexander P, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Chief Researcher, Laboratory of Plant Immunity, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Academician Zabolotnogo Str., 148, Kyiv 03143, Ukraine.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2268-9104>

E-mail: dmitriev.ap@gmail.com

ЭКОЛОГИЯ

UDC 594.124:577.1(262.5)
doi: 10.17223/19988591/55/9

Natalya S. Chelyadina, Mark A. Popov

*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian
Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation*

Mortality of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) depending on sex

*The mussel *Mytilus galloprovincialis* is one of the most popular species for cultivation globally and is one of the most abundant mollusc species in the Black Sea. In recent decades, there have been changes in the sex structures of the Black Sea settlements of *M. galloprovincialis*, trending towards an increase in the number of males. However, data on the effects of male and female mortality on the sex ratio in the population of *M. galloprovincialis* are insufficient. Therefore, this study aimed to assess how sex impacts the mortality of *M. galloprovincialis*. Mussels with shell lengths of either 30 or 55 mm were selected during the mass spring spawning. A total of 580 specimens were collected for the study. The separation of molluscs by sex was performed individually for each specimen via temperature stimulation of spawning. Each mussel was labelled according to its sex. The mortality of the mussels was studied in natural and laboratory experiments. In the natural experiment, different-sized females and males were selected and placed in cages that were hung in polluted harbour water. After 6 months, the number of dead mussels was recorded. In the laboratory experiment, sex-labelled mussels were placed in aquariums. The laboratory experiment was terminated after the death of 50% of the mussels. The mortality of females was found to be significantly higher than that of males. In the natural experiment, the mortality of females compared to males in the 55 mm size group was 23% higher and 18% higher in the 30 mm size group. In the laboratory experiment, the mortality of females in both size groups was 16% higher than that of males. Therefore, it was established that one of the reasons for the increase in the number of males in the settlements of *M. galloprovincialis* in the Black Sea is the higher mortality rate of females compared to males.*

The paper contains 4 Figures and 42 References.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*; mollusc; aquaculture; pollution; Black Sea
The Authors declare no conflict of interest.

For citation: Chelyadina NS, Popov MA. Mortality of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) depending on sex. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:166-176.
doi: 10.17223/19988591/55/9

Introduction

The mortality rate is one of the most important population parameters. It is necessary for assessing the state of various types of hydrobionts, as it largely determines the features of the size-age structure of a population, the production properties of organisms, and the lifetime and survival of hydrobionts [1-3]. The mussel *M. galloprovincialis* is one of the most important marine resources for aquaculture in boreal ocean waters [4]. It is one of the most abundant species of the Black Sea [5-6].

Previous research has primarily focused on the study of the mortality of molluscs based on age and size, as well as the issues of mollusc survival in various habitats [1, 7-10]. However, there are limited studies examining the mortality of *M. galloprovincialis* depending on sex. The relationship between the sex ratio of a population and the survival rate of the different sexes is an interesting yet insufficiently studied phenomenon. Until the 2000s, most researchers observed a balanced sex ratio equal to 1:1 (♀:♂) in *M. galloprovincialis* settlements in the Black Sea [5, 11-12]. However, over the last decades, the ecosystem of the Black Sea has undergone considerable natural and anthropogenic changes [13-14]. This has led to a transformation of the sexual structures in both natural and artificial settlements of *M. galloprovincialis*, trending towards an increase in the number of males [15-16]. In unfavourable environmental conditions, the sex ratio can reach 1:7 (♀:♂) [15, 17]. The sex-dependent mortality of mussels can influence the shift in the sex ratio of *M. galloprovincialis* populations. This can lead to negative consequences for populations of *M. galloprovincialis* in the Black Sea. In recent years, there has been a decrease in the number of *M. galloprovincialis* in the northern Black Sea, as well another species of mussel, *Mytilaster lineatus*, in natural settlements [18]. The current study suggests that the unbalanced number of male individuals in the coastal waters of Crimea may be due to the increased mortality of *M. galloprovincialis* females.

Thus, the main aim of the current study was to assess the sex-dependent mortality of *M. galloprovincialis* in natural and laboratory conditions.

Materials and methods

Material sampling area and research objects

The mortality of *M. galloprovincialis* was studied in natural and laboratory experiments in 2017 and 2018, respectively. Mussels with shell sizes of 55.7 ± 2.9 and 30 ± 1.6 mm were used, as it enabled any variability along the length of the shell to be excluded. Furthermore, the choice of these sizes is due to molluscs with a shell length of 30 mm being able to reproduce and, therefore, able to have their sex determined. 55 mm molluscs are of commercial size and have a practical interest to farmers. For the current study, mussels from a mussel-oyster farm located at the outer roadstead of Sevastopol were collected from a depth of 3 – 4 metres. The natural experiment took place at the mussel-oyster farm

(44°37'13.4"N; 33°30'13.6"E), in a semi-enclosed harbour (44°36'56.4"N; 33°30'10.6"E; Fig. 1).

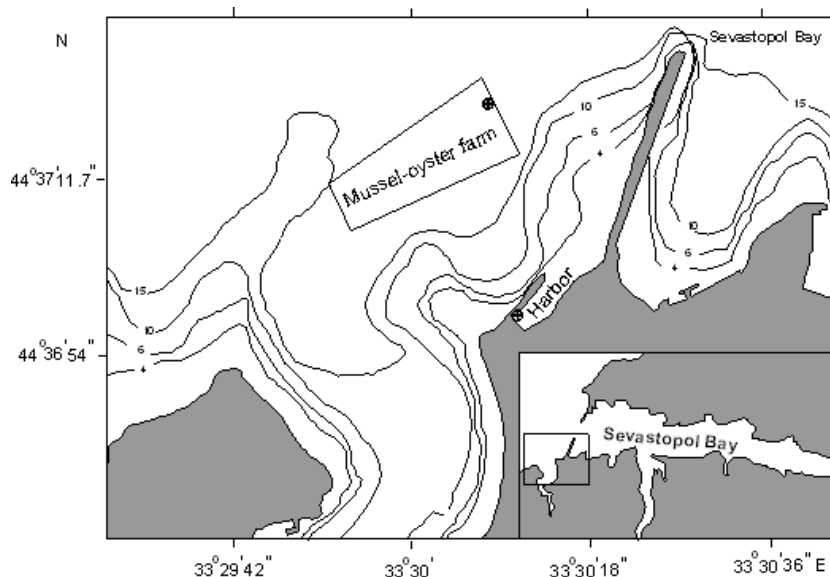


Fig. 1. The map of the study area

The waters at the mussel-and-oyster farm are classified as mesotrophic [19]. Feed resources at the marine farm are favourable for the growth and development of molluscs [20].

The water area of the adjacent semi-enclosed harbour is occasionally polluted by household wastewater, resulting in increases in water trophicity. The maximum nitrate concentration was recorded as $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the phosphate concentration as $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the coliform index as 1000 L^{-1} , and the total bacterial count (TBC) as 910 mL^{-1} [21]. The concentration of the nutrients was 8 times higher than in the conditionally clear coastal areas of the sea, and organic pollution indicators exceeded the threshold limit values by 9 – 10 times [22]. The concentration of the nutrients was determined by standard hydrochemical methods [23].

Experimental work

The *M. galloprovincialis* population was sampled during the mass spring spawning period. Artificial spawning was carried out to determine the sex of the mussels. The spawning was temperature-stimulated in laboratory conditions for each individual mussel to discriminate their sex [6]. To stimulate spawning, each mollusc was placed in a separate 250 mL container. The water in the container was heated up to between 20°C – 24°C with the temperature measured using a meteorological thermometer TM-10 (Termopribor, Klin, Russia). The sex of each mollusc was determined after spawning using a Jenaval microscope (Carl Zeiss Jena, Germany). Hermaphrodites were discarded [24].

For individual identification of molluscs, the marking method was used. A marking denoting whether a mollusc was female or male was engraved on each mollusc shell using a Sturm GM2316 handheld electric engraver. This method reduced the laboriousness of the labelling process and increased the reliability of the research, as mollusc identification is not affected by prolonged exposure in the marine environment.

In the natural experiment, 100 individual females and 100 individual males of each size (30 mm or 55 mm) were put in four separate Ostriga-5 cages (Istituto Delta Ecologia Applicata, Italy) and placed in a semi-closed polluted harbour (Fig. 1). At the same time, the same number of cages and mussels were placed in relatively clean water on the mussel-oyster farm. The duration of sea exposure was six months for each cage of mussels (from April to October). After 6 months, the number of dead mussels was counted.

The laboratory experiments examining the mortality of mussels were carried out in triplicate. The experiment was conducted in six aquariums, with each aquarium considered an individual experiment. Three aquariums contained 30 mm mussels, and three aquariums contained 55 mm mussels. Oxygen content in the aquariums was measured monthly using the Winkler method [23]. The oxygen content for the studied period was in the range of $4 - 4.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. In each aquarium, there were 15 males and 15 females, labelled according to their sex. The molluscs were placed in separate 20 L aquariums filled with seawater. The water was taken from the mussel-oyster farm. Water in the aquarium was replaced after the death of any individual mollusc, and there was no feeding or aeration. Each experiment lasted until 50% of the molluscs in the aquarium died. The duration of the experiments ranged from 1 – 6 months. The aquariums were in a semi-basement unheated laboratory room in order to prevent rapid death of the mussels due to any rise in temperature, and the water temperature was measured daily. The mortality of mussels was calculated as the fraction of dead molluscs compared to the total number of molluscs. The individual age of the mussels was determined using the method of sclerochronology [25]. This method is based on the calculation of the seasonal growth layers in a shell when it is cut. The cut shows alternating light and dark layers of calcium carbonate. Summer layers are dark, and winter layers are light. A pair of stripes (dark and light) is formed in one year. This method makes it possible to determine age with accuracy within six months. The age of mussels with a shell size of 30 mm was in the range of 6 months, whereas the age range of the 55 mm mussels was 1 – 1.5 years.

Data analysis

580 samples of mussels were investigated in total. In the natural experiment, the results were processed by a pseudo-random number sampling method [26]. Up to 33 molluscs were randomly sampled from each cage, and each sample was analysed individually. The results are presented as mean (M), standard deviation (S), and confidence interval (Δx). An unpaired Student's *t*-test was used for statistical evaluation ($P < 0.05$).

Results of the research

Mortality of mussels in a natural experiment

High mortality of *M. galloprovincialis* was observed in the natural experiment in both harbour cages, regardless of mussel size. The mortality of females compared to males was 23% higher in the 55 mm size group, while in the 30 mm size group, it was 18% higher. There was no significant difference in mortality of mussels based on the size of the mussels (Fig. 2).

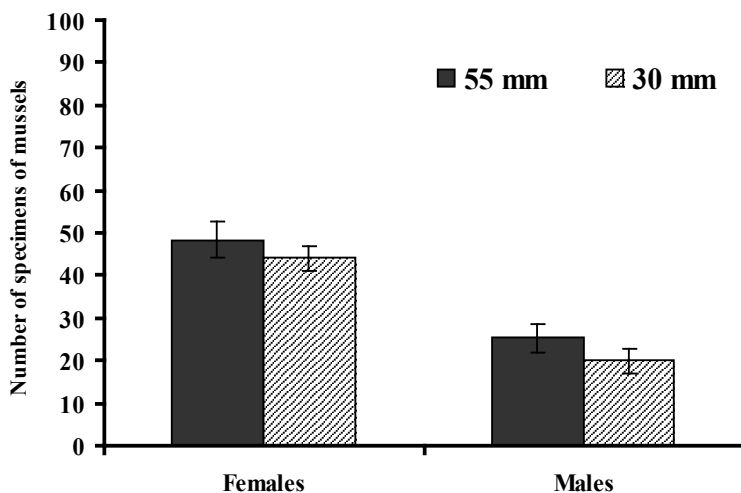


Fig. 2. Mortality of *M. galloprovincialis* depending on sex and size in the natural experiment, 2017.
Data are presented as means (M)

In the clear water area at the mussel-oyster farm, mussel mortality was low. In the 55 mm size group, 4 females died. In the 30 mm size group, 2 males and 4 females died.

Mortality of mussels in the laboratory experiment

In the laboratory experiment, the mortality rate of females of both sizes was 16% higher than males ($P < 0.01$). Additionally, females began to die first. There was no significant difference in the mortality of mussels depending on size (Fig. 3).

The mortality of mussels in each aquarium varied. The onset of death depended on the viability of the molluscs and the water temperature. Molluscs lived up to 6 months under laboratory conditions. However, weakened mussels that died in the aquariums poisoned the water with the decay products from their dead tissues after 1–4 days [27]. Mussels in the experimental aquariums began to die gradually (within two to three weeks). The mortality of mussels increased sharply if the water temperature in the aquariums exceeded 22°C. Figure 4 shows the mortality of mussels with a shell size of 55 mm in the longest experiment.

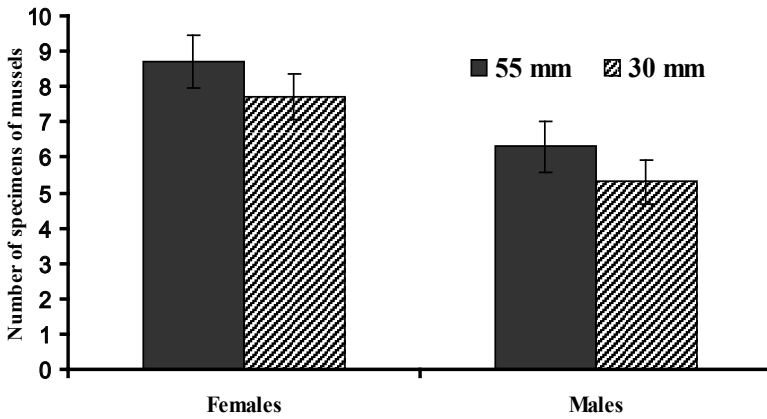


Fig. 3. Mortality of the mussel *M. galloprovincialis* depending on sex and size in the laboratory experiment, 2018

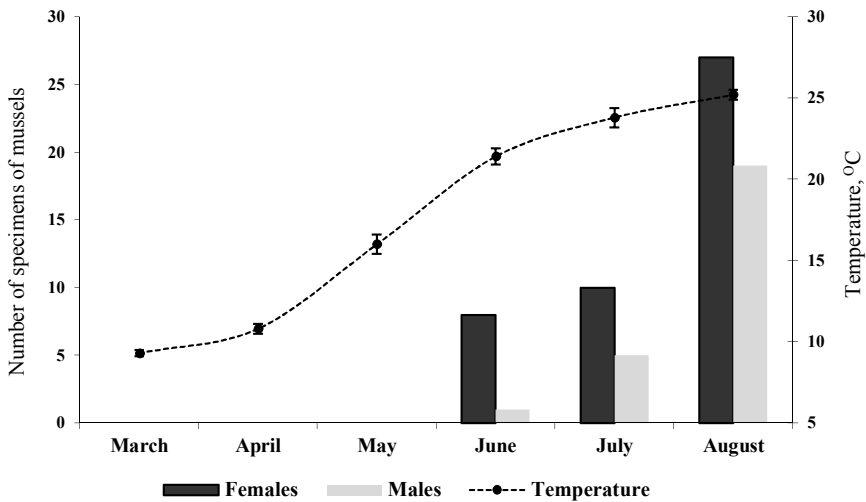


Fig. 4. Monthly mortality of *M. galloprovincialis* with a shell size of 55 mm in the laboratory experiment, 2018.

Discussion of the research

The survival of molluscs is influenced by such factors such as age, size, the density of aggregations, temperature, salinity, and water pollution [8, 9, 28-30].

The high mortality of mussels (35%) in the harbour during the natural experiment was associated with the unfavourable conditions in this area, such as limited water exchange and wastewater discharge. High mortality under the influence of untreated municipal wastewater was also observed in freshwater mussels *Amblesma plicata* (Say, 1817) and *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) of the Colo-

rado River located in eastern Travis County, Texas [9]. In the clear waters of the mussel-oyster farm, the mortality of mussels was 4% – 6%. The conditions for growing mussels at a mussel-oyster farm were favourable for the development of suspended conchioculture.

In the laboratory experiment, environmental conditions influenced the mortality of mussels. The oxygen content in the aquariums was at the lower limit of the total limit value [31] and had no effect on mussel mortality. Therefore, the biggest impact may have been a lack of nutrition. During the experiment, mussels lived off their internal body resources for an extended period of time. It is known, with prolonged exposure to unfavourable factors, the mechanisms of anaerobic resynthesis of adenosine triphosphate, using carbohydrate and protein substrates, is activated in mussels [32]. Over time, the body's resources, therefore, become depleted. In the last two months of the experiment, molluscs that were still alive were not attached to the walls of the aquarium or to each other by a byssus. Some mussel shells were opened slightly. After the death of a mussel, their tissue was observed to be thin and had a cadaverous smell. It is well-known that as molluscs increase in age (size), so too does their individual mortality [8]. This phenomenon has been described in populations of *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) off the coast of Canada [33] and in *Macoma balthica* (Linnaeus, 1758) in the northern Baltic Sea and Hudson Bay [34]. A significant difference in the mortality of *M. galloprovincialis* depending on age (size) was not observed in the laboratory experiment ($p \geq 0.01$). In the current study, a slight increase in the rate of elimination in larger mussels was observed. This could be due to a small difference in the age of the mussels studied. The influence that the density of mussel aggregations and water salinity has on mortality has been noted in previous literature. However, these factors can be disregarded in the current study, as the experiments were conducted in aquariums and cages, where mussels did not experience dense aggregations. The salinity of water in the experiments also did not affect mortality, as the salinity of the mussel-oyster farm from 2001 – 2018 was in the range of 17.25% – 18.40% [35]. The optimal salinity range for *M. galloprovincialis* is 12% – 25% [5].

Sex ratios of mollusc populations are often presented as the proportion of males and females among adult individuals. Typically, these ratios do not account for mortality, size, or other features that could potentially affect the ratio. Therefore, disregarded differential sex-dependent mortality can cause misrepresentation of the sex ratio in adult molluscs [36].

In the current study, significant differences in the mortality of mussels depending on sex were observed, with the mortality of females found to be higher. The uneven death and survival between sexes are common among animals. However, females are usually more viable. One of the popular explanations for the difference in life expectancy between the sexes is that the heterogametic sex lives less than the homogametic one due to the recessive X-linked deleterious mutations negatively affecting the lifetime of the heterogametic sex [37]. However, the sex of mussels is not genetically determined [38]. Thus, the differences in the sur-

vival rates of male and female mussels is thought to be associated with the high energy expenditures needing for oogenesis [30, 39]. Myrand et al. [40] noted that after spawning, the mussel *M. edulis*, which is found in the southern bay of the Magdalena Islands, had low post-spawning glycogen content, which weakened their vitality. Similar results were obtained experimentally in the freshwater bivalve mollusc of the genus *Unio* [41]. In the current study, it was demonstrated that female mussels are more sensitive to unfavourable environmental conditions, with the mortality of *M. galloprovincialis* females from natural Black Sea settlements being higher than that of males during prolonged anoxia [1]. Furthermore, a lower female survival rate was previously noted in the White Sea *Hydrobia ulvae* mollusc populations (Pennant 1777) due to a decrease in water salinity and temperature [30]. A shift in the sexual structure, trending towards an increase in the number of males, has also been observed in *Macoma calcareea* populations (Gmelin, 1790) from the Barents and Pechora seas due to the high mortality rate of females [42].

Conclusion

In the natural experiment of the current study, the mortality of females compared to males in the polluted harbour was 23% higher in the 55 mm group and 18% higher in the 30 mm group. However, both males and females experienced high mortality rates of up to 35% in the harbour, which was associated with the unfavourable conditions of the area. In the conditionally clear water area of the mussel-oyster farm, the mussel mortality was comparable lower, at 4% – 6%. In the laboratory experiment, the mortality of females of both sizes was 16% higher than that of males. It was also observed that females began to die first in the laboratory experiment. Therefore, in both the natural and laboratory experiments, the mortality of females was significantly higher than that of males.

Differential mortality is important for studying the state of dynamic equilibrium in the population of *M. galloprovincialis*. These studies can be useful and applicable to other species of bivalve molluscs. One of the reasons for the increase in the number of males in the settlement of the mussel *M. galloprovincialis* of the Black Sea is the high mortality of females compared to males. However, the study of sex-dependent mortality requires further, more detailed research.

References

1. Shurova NM. Strukturno-funktsional'naya organizatsiya populyatsii midiy *Mytilus galloprovincialis* Chërnogo morya [Structural and functional organization of the population of mussels *Mytilus galloprovincialis* of the Black Sea]. Kiev: Naukova dumka Publ.; 2013. 208. In Russian
2. Stadnichenko SV. Kosvennyye otsenki smertnosti i vyzhivayemosti midiy v severo-zapadnoy chasti Chernogo morya. [Indirect estimates of mortality and survival of mussels in the northwestern part of the Black Sea]. *Visnik Odesskogo natsional'nogo universitetu*. 2010;15(17):82-87. In Russian

3. Zolotarev VN, Shurova NM. Rodolzhitel'nost' zhizni gidrobiontov kak pokazatel' okruzhayushchej sredy [Life expectancy of hydrobionts as an environmental indicator]. *Scientific Notes of the Ternopil Sovereign Pedagogical University*. 2001;3(14):52-53. In Russian
4. Atasaral ŞŞ, Romero MR, Cueto R, González-Lavín N, Marcos MP. Subtle tissue and sex-dependent proteome variation in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) populations of the Galician coast (NW Spain) raised in a common environment. *Proteomics*. 2015;15(23-24):3993-4006. doi: [10.1002/pmic.201500241](https://doi.org/10.1002/pmic.201500241)
5. Ivanov VN, Kholodov VI, Senicheva MI, Pirkova AV, Bulatov KV. Biologiya kul'tiviruemykh midiy [Biology of cultivated mussels]. Kiev: Naukova dumka Publ.; 1989. 100 p. In Russian
6. Kholodov VI, Pirkova AV, Ladygina LV. Vyrashchivaniye midiy i ustrits v Chernom more [Cultivation of mussels and oysters in the Black Sea]. Voronezh: Publishing House LLC Izdat-Print Publ.; 2017. 508 p. In Russian
7. Davis CJ, Ruhmann EK, Acharya K, Chandra S, Jerde CL. Successful survival, growth, and reproductive potential of quagga mussels in low calcium lake water: is there uncertainty of establishment risk? [Electronic resource]. Available at: <https://peerj.com/articles/1276.pdf> (accessed: 03.11.2015).
8. Guerasimova AV, Maksimovich NV. On regularities of bivalvia population organization in the White Sea. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo Universiteta. Seriya 3. Biologiya = Biological Communications*. 2009;3(3):82-97. In Russian
9. Nobles T, Zhang Y. Survival, growth and condition of freshwater mussels: effects of municipal wastewater effluent [Electronic resource]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128488> (accessed: 04.06.2015).
10. Toptikov VA, Totsky VN, Alekseeva TG, Kovtun OA. Sravnitel'nyy analiz adaptivnogo potentsiala osobey rapany (*Rapana venosa* Valenciennes, 1846) i midii (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) iz odnogo biotopa [Comparative analysis of adaptive potential of rapa (*Rapana venosa* valenciennes, 1846) and mussels (*Mytilus galloprovincialis* lamark, 1819) populations from one biotope]. *Visnik Odes'kogo natsional'nogo universitetu. Biologiya = Odesa National University Herald*. 2014;19(35):61-65. doi: [10.18524/2077-1746.2014.2\(35\).43640](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2014.2(35).43640) In Russian
11. Kudinsky OYu, Shurova NM. Realizatsiya pola u midii *Mytilus galloprovincialis* severo-zapadnoy chasti Chernogo morya. [Realization of sex in the *Mytilus galloprovincialis* mussel of the northwestern part of the Black Sea]. *Biologiya Morya*. 1990;5:43-48. In Russian
12. Zaika VE, Valovaya NA, Povchun AS, Revkov NK. Mitilidy Chernogo morya [Mytilids of the Black Sea]. Kiev: Naukova Dumka Publ.; 1990. 208 p. In Russian
13. *State of the Environment of the Black Sea* (2009-2014/5). Krutov A, editor. Istanbul: Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution (BSC) Publ.; 2019. 811 p.
14. *Chernomorskiye mollyuski: elementy sravnitel'noy i ekologicheskoy biokhimii* [Black Sea mollusks: elements of comparative and environmental biochemistry]. Shulman GE and Soldatov AA, editors. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysika Publ.; 2014. 323 p. In Russian
15. Chelyadina NS. Analysis of phenotypic, sex structure and stage of gonad maturity cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis* on the Crimean coast. In: *Current issues in aquaculture*. Proceedings of the Int. Sci. Conf. (Rostov-on-Don, Russia, September 28-October 2, 2015). Bugaev LA, Tkacheva IV and Voikina AV, editorial board. Rostov-on-Don: FGBNU "AzNIIRKH" Publ.; 2015. pp. 190-193. In Russian
16. Machkevsky VK, Popov MA, Kovrigina NP, Lozovsky VL, Kozintsev AF. Izmenchivost' parametrov populyatsiy midii *Mytilus galloprovincialis* Lam. i yeye endosimbiontov v rayone Balaklavskoy bukhty [Variability of *Mytilus galloprovincialis* Lam. population parameters and its endosymbionts in the region of Balaklava Bay]. *Ecological Safety of Coastal and Shelf Zones*. 2011;25(1):417-428. In Russian

17. Chelyadina NS. Phenotypic and sexual structure of *Mytilus galloprovincialis* Lam., cultivated on the mussel-oyster farm in the outer harbor of Sevastopol city (Crimea, Black Sea). *Marine Biological Journal*. 2018;3(3):86-93. doi: [10.21072/mbj.2018.03.3.09](https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.3.09) In Russian
18. Kazankova II. Definition of the potential recruitment of mussel, mitilaster and anadara settlements in the coastal waters of the Black and Adriatic seas by experimental substrates. *Environmental Control Systems*. 2019;3(37):112-119. doi: [10.33075/2220-5861-2019-3-112-119](https://doi.org/10.33075/2220-5861-2019-3-112-119) In Russian
19. Kuftarkova EA, Gubanov VI, Kovrigina NP, Eremin IYu, Senicheva MI. Ecological assessment of modern state of waters in the region of interaction of the Sevastopol bay and part of the sea contiguous to it. *Morskoy Ekologicheskii Zhurnal*. 2006;5(1):72-91. In Russian
20. Ryabushko LI, Pospelova NV, Balycheva DS, Kovrigina NP, Troshchenko OA, Kapranov SV. Epizoon microalgae of the cultivated mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lam. 1819, phytoplankton, hydrological and hydrochemical characteristics in the mussel-and-oyster farm area (Sevastopol, Black Sea). *Marine Biological Journal*. 2017;2(4):67-83. doi: [10.21072/mbj.2017.02.4.07](https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.4.07) In Russian
21. Kuzminova NS, Skuratovskaya EN, Vakhtina TB, Omelchenko SO. Ispol'zovanie khimiko-biologicheskikh parametrov pri monitoringe morskikh akvatoriy [Use of chemical and biological parameters in monitoring marine aquatories]. In: *Sistemy kontrolya okruzhayushchey sredy: sredstva i monitoring* [Environmental control systems: tools and monitoring. Proceedings]. Ereemeev VN, editor. Sevastopol: Marine Hydrophysical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine; 2004. pp. 263-269. In Russian
22. *Marikul'tura midiy v Chernom more* [Mariculture of mussels in the Black Sea]. Ivanov VN, editor. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysika Publ.; 2007. 314 p. In Russian
23. Sapozhnikov VV. Metody gidrokhimicheskikh issledovaniy osnovnykh biogennykh elementov [Methods of hydrochemical studies of the main biogenic elements]. Moscow: Russian federal research institute of fisheries and oceanography Publ.; 1988. 118 p. In Russian
24. Pirkova AV, Ladygina LV, Schurov SV. Formation of settlements of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) on collectors of the Laspi Bay farm depending on environmental factors. *Uchenye Zapiski Krymskogo Federal'nogo Universiteta Imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya*. 2019;5(71):92-106. In Russian, English Summary
25. Zolotarev VN. Sklerohronologiya morskikh dvustvorchatykh mollyuskov [Sclerochronology of marine bivalves]. Kiev: Naukova Dumka Publ.; 1989. 107 p. In Russian
26. Davison AC, Hinkley DV. Bootstrap methods and their application (10th ed.). Cambridge: Cambridge University Press Publ.; 2008. 558 p.
27. Carter DO, Tibbett M. Soil analysis in forensic taphonomy. New York: CRC Press Publ.; 2009. 364 p.
28. Eertman RHM, Wagenvoort AJ, Hummel H, Smaal AC. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1993;170:179-195.
29. Hua D, Neves R. Captive Survival and Pearl Culture Potential of the Pink Heelsplitter *Potamilus alatus*. *North American Journal of Aquaculture*. 2007;69:147-158.
30. Levakin IA. the influence of infections with trematodes *Bunocotyle progenetica* (Hemiuridae) and *Cryptocotyle cancanum* (Heterophyidae) onto mortality of littoral mollusks *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia) after freezing. *Parasitologiya*. 2005;39(5):407-413. In Russian
31. Korshenko AN. Zagryazneniye morskoy vody [Marine water pollution]. Moscow: Yearbook. Science Publ.; 2016. 185 p. In Russian
32. Gosling E. The mussel *Mytilus* ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam: Elsevier Publ.; 1992. 589 p.

33. Freeman KR, Dickie LM. Growth and mortality of the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) in relation to environmental indexing. *J Fish Res Board Can.* 1979;36(10):1238-1249.
34. Green RH. Growth and mortality in an Arctic intertidal population of *Macoma balthica* (Pelecypoda, Tellinidae). *J Fish Res Board Can.* 1973;30(9):1345-1348.
35. Kapranov SV, Kovrigina NP, Troshchenko OA, Rodionova NYu. Long-term variations of thermohaline and hydrochemical characteristics in the mussel farm area in the coastal waters off Sevastopol (Black Sea) in 2001-2018. *Continental Shelf Research.* 2020;206(104185):1-16. doi: [10.1016/j.csr.2020.104185](https://doi.org/10.1016/j.csr.2020.104185)
36. Yusa Y, Breton S, Hoeh WR. Population Genetics of Sex Determination in *Mytilus* Mussels: Reanalyses and a Model. *J. Heredity.* 2013;104(3):380-385. doi: [10.1093/jhered/est014](https://doi.org/10.1093/jhered/est014)
37. Pipoly I, Bókony V, Kirkpatrick M, Donald PF, Székely T, Liker A. The genetic sex-determination system predicts adult sex ratios in tetrapods. *Nature.* 2015;527:91-94. doi: [10.1038/nature15380](https://doi.org/10.1038/nature15380)
38. Thiriot-Quievreux C. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Marine Biology.* 1982;70:165-172.
39. Teaniniuraitemoana V, Leprêtre M, Levy P, Vanaa V, Parrad S, Gaertner-Mazouni N, Gueguen Y, Huvet A, Le Moullac G. Effect of temperature, food availability, and estradiol injection on gametogenesis and gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 2016;325(1):13-24. doi: [10.1002/jez.1992](https://doi.org/10.1002/jez.1992)
40. Myrand B, Guderley H, Himmelman J. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen. *Mar. Ecol. Prog Ser.* 2000;197:193-207. doi: [10.3354/meps197193](https://doi.org/10.3354/meps197193)
41. Kartavykh TN, Podkovkin VG. An effect of a transmission line's electromagnetic field on the cholinesterase activity in bivalves. *Bulletin of Samara State University. Natural Science Series.* 2003;4(30):189-194. In Russian
42. Noskovich AE, Pavlova LV. Some reproductive parameters of populations of *Macoma calcarea* (Bivalvia, Tellinidae) in the Barents and Pechora Seas. *Vestnik of MSTU.* 2017;20(2):463-471. doi: [10.21443/1560-9278-2017-20-2-463-471](https://doi.org/10.21443/1560-9278-2017-20-2-463-471) In Russian

Received 26 April, 2021; Revised 05 August 2021;

Accepted 27 August 2021; Published 29 September 2021.

Author info:

Chelyadina Natalya S, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Aquaculture and Marine Pharmacology, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Nakhimov Ave., Sevastopol 299011, Russian Federation.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2552-4073>

E-mail: chelyadina2007@mail.com

Popov Mark A, Cand. Sci. (Geogr.), Senior Researcher, Department of Aquaculture and Marine Pharmacology, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Nakhimov Ave., Sevastopol 299011, Russian Federation.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0220-1298>

E-mail: mark.a.popov@mail.ru

For citation: Chelyadina NS, Popov MA. Mortality of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) depending on sex. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2021;55:166-176. doi: [10.17223/19988591/55/9](https://doi.org/10.17223/19988591/55/9)

Для цитирования: Chelyadina N.S., Popov M.A. Mortality of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) depending on sex // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. №. 55. С. 166–176. doi: [10.17223/19988591/55/9](https://doi.org/10.17223/19988591/55/9)