

**Министерство образования Республики Беларусь
Полесский государственный университет**

**СБОРНИК
материалов II международной
научно–практической конференции
“Биотехнология:
достижения и перспективы развития”**

**Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь,
7–8 декабря 2017 г.**

Пинск 2017

УДК 60
ББК 30.16
Б63

Редакционная коллегия:
Шебеко К.К. (гл. редактор),
Волкова Е.М., Жерносеков Д.Д., Кручинский Н.Г., Пигаль П.Б.,
Русина Ю.Н., Цвирко Л.С., Чешевик В.Т.

Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов II международной научно–практической конференции, УО “Полесский государственный университет”, г. Пинск, 7–8 декабря 2017 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2017. – 121с.

ISBN 978–985–516–503–4

Приведены материалы участников II международной научно–практической конференции “Биотехнология: достижения и перспективы развития”.
Материалы изложены в авторской редакции.

УДК 60
ББК 30.16

ISBN 978–985–516–503–4

© УО “Полесский государственный университет”, 2017

БИОТЕХНОЛОГИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

УДК 575.22+577.21:582.912.46

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ ГОЛУБИКИ НА ОСНОВЕ CAPS-МАРКЕРОВ

¹ВОДЧИЦ Наталья Васильевна, *м.н.с., зав. НИЛ КТР*

²КУДРЯШОВА Оксана Александровна, *в.н.с., к.б.н.*

²ВОЛОТОВИЧ Антон Анатольевич, *к.б.н., доцент*

¹*Полесский государственный университет*

²*Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр*

Введение. С увеличением числа новых сортов голубики все более важным становится процесс регистрации посадочного материала, его сертификации и защиты авторских прав селекционеров [1 с. 92].

В настоящее время существует огромное количество различных типов молекулярных маркеров, которые применяются для анализа генетического полиморфизма и филогенетических отношений между видами, популяциями и отдельными индивидуумами [5 с. 206]. Преимуществами CAPS-маркеров являются: кодоминантный тип наследования, при котором не только гомо-, но и гетерозиготные генотипы четко отличаются друг от друга, простота идентификации получаемых результатов, так как продукты гидролиза четко представлены всего одним или несколькими фрагментами в геле и отсутствие необходимости использования дорогостоящего и сложного оборудования [5 с. 207].

Целью настоящей работы было выявить полиморфизм в элюированных мономорфных ISSR-фрагментах шести сортов голубики с помощью CAPS-анализа.

Материал и методы исследований. Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ).

Объектом исследования были полугодичные растения голубики щитковой – *Vaccinium corymbosum* L. (сорта Bluecrop, Reka, Denise blue и Bluejay) и 2 сорта от гибридизации *Vaccinium angustifolium* L. × *Vaccinium corymbosum* L. (Northland, Northblue), произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

Мономорфные фрагменты, выявленные у шести сортов голубики, выделяли из агарозного геля с помощью центрифугирования. Элюированные фрагменты использовали как ДНК-матрицу в повторной ПЦР [2 с. 133].

CAPS-анализ проводили с использованием следующих эндонуклеаз рестрикции фирмы New England Biolabs: *Taq* I, *Hha* I, *Hind* III, *Hin*P1I, *Xba* I, *Pvu* II. Рестриктную обработку продуктов амплификации в количестве 7 мкл проводили в буфере согласно инструкций, прилагаемых фирмой производителем к каждой эндонуклеазе. Время инкубации для рестриктаз 2 – 4 часа при температуре 37°C, для *Taq* I-эндонуклеазы – при 65°C.

Для визуализации фрагментов ДНК, использовали горизонтальный электрофорез продуктов рестрикции [3 с. 116].

Результаты и их обсуждение. При проведении молекулярно-генетического сравнительного анализа ряда сортов голубики нами были выявлены 110 ISSR-фрагментов, из них 25 (22,7 %) являлись мономорфными. Для дальнейшего исследования были выбраны маркеры, полученные с помощью праймеров UBC 824, 808, 818 и 845 [3 с. 117].

Как правило, кодоминантные маркеры проявляют различия в размере электрофоретических полос, в то время как доминантные — в наличии или отсутствии таких полос. Строго говоря, различные формы проявления используемого молекулярного маркера, являются «аллелями» данного ДНК-маркера [4 с. 35].

После электрофоретического разделения продуктов амплификации с праймером UBC 824 у всех исследованных сортов голубики были выделены фрагменты соответствующие 535 п.н. каждый, которые в дальнейшем были обработаны шестью эндонуклеазами рестрикции. Обработка реампликонов *Taq I* эндонуклеазой способствовала отделению от основного фрагмента сорта Northblue дополнительного, размером 410 п.н. Поскольку после рестрикции остается как исходный фрагмент, так и появляется один дополнительный фрагмент меньшего размера, а также учитывая, что CAPS-маркеры являются кодоминантными и позволяют выявить оба аллеля, можно говорить о том, что гибрид Northblue является гетерозиготным, остальные пять сортов – растения с гомозиготными генотипами.

Точно так же продукты амплификации шести фрагментов голубики, соответствующие 510 п. н., полученные из ДНК сортов с праймером UBC 808, были обработаны эндонуклеазами рестрикции, разделены электрофорезом в агарозном геле и сопоставлены между собой. В ходе проделанной работы по наличию сайтов рестрикции был обнаружен полиморфизм у сортов Reka и Bluejay, выявленный опять же *Taq I* эндонуклеазой. В результате исследования отделились маркеры, соответствующие 440 п.н.

Возможно, из-за небольшой длины не был выявлен полиморфизм внутри фрагментов размером 300 п.н., полученных при ISSR-ПЦР-реакции с 818 праймером и обработанных эндонуклеазами рестрикции *Taq I*, *Hha I* и *HinPII* и *Hind III*.

При визуализации результатов были обнаружены различия по мономорфным фрагментам, равным 615 п.н., полученным у шести сортов при амплификации с праймером UBC 818 и подвергшимся последующей рестрикции эндонуклеазой *HinPII*. Гидролиз по сайту узнавания для данного фермента привел к отделению у сорта Northblue CAPS-маркера равного 500 п.н.

Так же были обработаны шестью эндонуклеазами рестрикции характерные для всех сортов фрагменты равные 505 п.н. и 705 п.н., полученные с помощью праймера 845; 715 и 890, выявленные праймером UBC 824; 1060 п.н. детектируемые с праймером UBC 818, но полиморфизм выявлен не был.

Заключение. В результате CAPS-анализа исходно предположительно мономорфные ISSR-фрагменты обнаруживают полиморфность на уровне нуклеотидных сиквенсов. На основании этого разработаны четыре CAPS-маркера для трех сортов голубики. Полученные маркеры основаны на наличии четырехнуклеотидного локуса узнавания для эндонуклеаз рестрикции *Taq I* и *HinPII*. Кодоминантные маркеры с полиморфизмом по длине ISSR-ПЦР-фрагментов можно использовать как дополнительный источник информации при типировании растений, для выявления генетического внутривидового полиморфизма и для филогенетических исследований.

Список использованных источников

1. Бобошина, И. В. Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК / И. В. Бобошина, С. В. Боронникова // Фунд. исслед. – 2013. – № 6 (1). – С. 92-97.
2. Водчиц, Н.В. Применение CAPS-анализа ISSR-маркеров при типировании сортов голубики высокой / Н.В. Водчиц, Е.О. Юрченко, А.А. Волотович // Веснік ГрГУ .Серья 5. Эканоміка. Сацьялогія. Біялогія. – 2016. – Т. 6. – № 3.– С. 132-139.
3. Водчиц, Н.В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н.В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. біял. навук – 2016. – № 3. – С. 115-120.
4. Чесноков, Ю.В. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса / Ю.В. Чесноков, В.М. Косолапов. – Москва : ООО «Угрешская типография», 2016. – 172 с.
5. Шавруков, Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений / Ю.Н. Шавруков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – № 19(2). – С. 19-34.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И pH СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СОЛОДА

ГОЛЁТА Марина Вячеславовна, *магистрант*
Полесский государственный университет

Одним из актуальных направлений в производстве солода является усовершенствование биотехнологических процессов, связанных с применением ферментов. Речь идет о замене солода современными ферментными препаратами, прежде всего микробного происхождения. Создание комплексных ферментных препаратов позволяет более глубоко осуществить ферментативный гидролиз углеводов и белков. Изучение комплекса амилолитических и протеолитических ферментов для более быстрого и глубокого гидролиза углеводов и белков с целью интенсификации процесса и существенного повышения выхода солода из единицы перерабатываемого сырья весьма актуально [1, с.50].

Основная цель солодоращения – накопление в зерне максимального количества активных ферментов, главным образом амилолитических. Кроме того в солоде значительно повышается активность протеолитических, цитолитических и других ферментов [2, с.52]. Основной задачей солодовщиков является получение солода, в котором растворение клеточных стенок эндосперма (цитоллиз) достигает 70-80 %. Цитоллиз эндосперма сопровождается протеолизом – расщеплением 45-50 % конструктивного и резервного белка. Важной задачей является накопление амилолитических ферментов, когда при производстве пива осуществляется биоконверсия крахмала в растворимые углеводы, сбраживаемые дрожжами [3, с.58-64].

Для производства спирта из крахмалосодержащего сырья необходимы ферменты – главным образом амилазы, способные превращать крахмал в сахара, которые затем подвергаются сбраживанию при помощи дрожжей [4, с.82-98].

Одним из важнейших направлений научно-технического прогресса является частичная и полная замена солода ферментными препаратами микробного происхождения. Создание комплексных ферментных препаратов, состоящих из α -амилаз, глюкоамилаз, протеиназ, целлюлаз позволяет более глубоко осуществить ферментативный гидролиз углеводов [5, с.128-150].

Целью настоящей работы является определение оптимальных режимов (по показателям физических факторов и pH) для сохранения ферментативной активности амилолитических и протеолитических ферментов и осуществления глубокого ферментативного гидролиза углеводов и белков с полным сбраживанием сусла при наименьших энергетических затратах.

Объектом исследования является солодовая вытяжка из пробы пивоваренного ячменя сорта Квенч.

Методами исследования являются: метод Виндиш-Кольбаха для определения активности амилолитических ферментов и метод определения числа Кольбаха для протеолитических ферментов.

Результаты и обсуждение.

При изучении pH оптимума протеолитических ферментов установлено, что наибольшую активность эти ферменты проявляли при pH от 7 до 8. В случае амилолитических ферментов pH оптимум находился в зоне от 6,5 до 7.

Нами было показано, что амилолитическая активность зависит от влажности проращиваемого материала. Возрастание влажности проращиваемого материала вызывает резкое увеличение активности фермента. Её можно увеличить и больше, если доводить влажность до максимальной величины лишь после равномерного прорастания. Это обусловлено тем, что основное значение влажности зерна ячменя в том, что при ее изменении меняется содержание сухих веществ, а следовательно, и выход экстракта из единицы массы ячменя [3, с.98-104].

Изменение температурного режима также оказывает большое влияние на активность амилолитических ферментов. Наибольший эффект для увеличения активности амилолитических ферментов даёт подсушивание при низких начальных температурах и постепенном их повышении. Окончательное значение активности α -амилазы после высушивания всегда одинаково. Напротив, поддержание постоянной температуры в процессе подсушивания обеспечивает при сушке лишь небольшую инактивацию α -амилазы. В этом случае содержание ферментов в сухом солоде оказывается меньше исходного [5, с.36-54].

Температура сушки является одним из регулирующих факторов для активации амилолитических ферментов. Для сохранения наибольшего количества α -амилазы в процессе сушки необходимо подбирать оптимальные диапазоны температуры и сорт пивоваренного ячменя для улучшения производительности солода. При повышении температуры происходит инактивация ферментов вследствие денатурации [2, с.137-145].

Нами было показано, что активность протеолитических ферментов зависит от времени проращивания. Четверо суток являются оптимальными для проращивания ячменя, так как на четвертые сутки протеолитическая активность солода в пределах нормы. В течение периода 1-4-е сутки происходит возрастание интегрального показателя протеолиза числа Кольбаха и растворенного белка. На 4-ые сутки происходит максимальное накопление растворенного белка и азота и, соответственно, активность протеолитических ферментов очень высокая, а на 5-ые сутки она снижается [1, с.89-97].

Протеолиз солода в большей степени зависит также от сорта ячменя, так как на протеолитическую активность влияют такие факторы как: влажность, экстрактивность, место сбора урожая [4, с.64-78].

Вывод: в работе получены данные, позволяющие подобрать оптимальные условия активности амилолитических и протеолитических ферментов для максимального выхода экстракта из единицы перерабатывающего сырья.

Список использованных источников

1. Баланов, П.Е. Смотряева И.В. Технология солода: Учеб.-метод пособие / П.Е Баланов – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2014. – 82 с.
2. Булгаков, Н. И. Биохимия солода и пива: Пищевая промышленность / Н.И. Булгаков – М, 1976. – 389 с.
3. Василицец, И.М. Химия и технология солода и пива / И.М. Василицец, А.М Калашникова – СПб.: СПбГУНиПТ, 2003. – 96 с.
4. Меледина, Т.В. Сырье и вспомогательные материалы в пивоварении/ Т.В. Меледина. – СПб.: «Профессия», 2003. – 304 с.
5. Нарцисс, Л. Краткий курс пивоварения/ Л. Нарцисс. – СПб.: Профессия, 2007. – 640 с.

УДК 577.15.086.83: 615. 322

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ КОРНЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ОЦЕНКА ЕЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ

ДИТЧЕНКО Татьяна Ивановна, к.б.н., доцент
КОРОБКИНА Алеся Валерьевна, студент
ЮРИН Владимир Михайлович, д.б.н., профессор
Белорусский государственный университет

Тип экспланта, используемый для инициации каллусной культуры, способен оказывать существенное влияние на ее ростовые и биосинтетические характеристики. В случае травянистых растений каллусные ткани могут быть получены из изолированных отрезков стеблей и корней, фрагментов листьев, органов цветка и др. [1, с. 21]. Несмотря на процесс дедифференциации, предшествующий каллусогенезу и приводящий к упрощению структуры клеток и некоторой их стандартизации, различное тканевое происхождение клеток экспланта является одной из причин гетерогенности получаемой каллусной ткани, причем некоторые функциональные особенности могут передаваться в ряду клеточных поколений как стойкие модификации.

Представители рода *Echinacea* применяются в медицинской практике для профилактики и лечения заболеваний, связанных с состоянием иммунодефицита, а также инфекционных и воспалительных заболеваний. При этом эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* L. Moench) является лидером по содержанию ценных биологически активных соединений, в частности, гидроксикоричных кислот и их производных, полисахаридов, флавоноидов и др. В качестве лекарственного сырья используют траву эхинацеи пурпурной либо корневища с корнями [2, с. 674]. При исследовании уровней накопления гидроксикоричных кислот в вегетативных органах эхинацеи пурпурной в разные сроки вегетации установлено, что в фазах кущения и бутонизации содержание данных вто-

ричных метаболитов фенольной природы находится практически на одинаковом уровне в корнях и листьях растений [3]. Можно предположить, что и каллусная культура эхинацеи пурпурной, полученная из корневых эксплантов, не будет уступать по своему продукционному потенциалу каллусам, инициированным из листовых эксплантов, и, следовательно, может быть использована в качестве источника ценных фенилпропаноидов.

В связи с этим целью настоящей работы явилось получение каллусной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения и анализ ее ростовых характеристик в зависимости от состава и концентрации гормональных эффекторов в питательной среде.

В работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (МС), включающая 30 г/л сахарозы. Для индукции каллусогенеза у изолированных отрезков корней *Echinacea purpurea* протестированы 4 комбинации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и кинетина в концентрациях 1-2 мг/л. С целью оптимизации состава питательной среды для культивирования полученной каллусной культуры исследовано 10 комбинаций синтетических ауксинов (2,4-Д, нафтилуксусная кислота (НУК)) и цитокининов (кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП)) в составе среды МС.

Поскольку проращивание простерилизованных семян в асептических условиях дает наиболее пригодный материал для получения каллусов, первый этап настоящей работы заключался в проведении процедуры стерилизации семян *Echinacea purpurea*. В качестве стерилизующего агента использовали дезинфицирующее средство «Domestos», содержащее активный хлор. Процесс получения стерильных семян включал следующие стадии: 1) предварительная стерилизация (промывание семян светло-розовым раствором KMnO_4 в течение 20 мин с последующей обработкой 70 %-ным этанолом в течение 1 мин); 2) собственно стерилизация (инкубация в растворе «Domestos»); 3) постстерилизация (4-5-кратное промывание стерильной водой); 4) перенос простерилизованных семян в пробирки с безгормональной агаризованной средой МС. На этапе собственно стерилизации было протестировано 6 режимов, которые различались по продолжительности воздействия дезинфицирующего средства «Domestos» (15 и 30 мин) и его концентрации (50, 33 и 25 % (v/v)).

Установлено, что при 30-ти минутной инкубации семян в растворах стерилизующего агента независимо от его концентрации эффективность стерилизации составила 100 %, однако семена полностью теряли всхожесть. При 15-ти минутной экспозиции и концентрациях раствора антисептика 33 и 50 % (v/v) также обеспечивалась достаточно высокая эффективность стерилизации семян – на уровне 89 и 92%, соответственно, при нулевой энергии прорастания. При использовании «Domestos» в концентрации 25 % (v/v) эффективность стерилизации была самой низкой – 66 %. Однако в отличие от предыдущих режимов стерилизации в этом варианте жизнеспособность семян сохранялась на приемлемом уровне: энергия прорастания и всхожесть составили в среднем 51 % и 63 %, соответственно. Инкубация простерилизованных семян производилась на свету при освещенности 5000 лк в условиях фитостата с периодичностью освещения 14 часов свет/10 часов темнота. В результате были получены стерильные проростки, которые в возрасте 3 недель использовали в качестве источника эксплантов для получения первичного каллуса. Изоляцию эксплантов производили в условиях ламинар-бокса, с помощью стерильного скальпеля корни разрезали на отрезки длиной 1-1,5 см и стерильно переносили на чашки Петри с питательной средой МС, содержащей 2,4-Д и кинетин в разных концентрациях для индукции каллусогенеза. Инкубацию эксплантов осуществляли в условиях термостата в темноте при 25°C. Установлено, что наиболее эффективное формирование первичной каллусной ткани *Echinacea purpurea* корневого происхождения происходило на варианте питательной среды МС, включающем 1,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. Появление признаков каллусогенеза на корневых эксплантах наблюдалось в среднем через 18-20 суток. На 40-42 сутки формировалась первичная каллусная ткань в объеме, позволяющем провести ее субкультивирование.

Поскольку гормональные эффекторы являются важнейшими компонентами питательных сред, оказывающими влияние на процессы пролиферации клеток, далее в работе были протестированы разные комбинации синтетических ауксинов и цитокининов на показатели роста полученной каллусной культуры *Echinacea purpurea*. В первой серии экспериментов (6 вариантов сред) питательные среды содержали 2,4-Д в концентрациях 0,2; 0,5 и 1,0 мг/л, а также кинетин в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л на фоне 2,0 мг/л ИУК. Установлено, что наиболее высокие значения индекса роста ($2,81 \pm 0,14$) и скорости роста ($0,086 \pm 0,004 \text{ сут}^{-1}$) были обнаружены при использовании варианта питательной среды, включающего 0,5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК. При повышении концентрации кинетина до 1,0 мг/л при всех использованных концентрациях 2,4-Д значения ростовых параметров снижались в среднем в 1,6–1,7 раза. Во второй серии экспериментов (4 вариан-

та сред) в качестве ауксина использовали НУК в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л, в качестве цитокинина – БАП в аналогичных концентрациях. Также, как и в первой серии, все среды были дополнены ИУК в концентрации 2,0 мг/л. Среди испытанных вариантов следует отметить среду, включающую 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, на которой индекс роста и скорость роста каллусов составили $2,84 \pm 0,2$ и $0,079 \pm 0,006 \text{ сут}^{-1}$, соответственно, т.е. практически не отличались от показателей роста каллусов в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Для каллусных культур, выращиваемых в присутствии 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, наблюдалась вторичная дифференцировка по типу ризогенеза.

Таким образом, среди протестированных комбинаций 2,4-Д и кинетина, а также НУК и БАП для стимуляции ростовых процессов каллусной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения могут быть рекомендованы варианты, включающие по 0,5 мг/л каждого фитогормона на фоне 2,0 мг/л ИУК. Повышение концентрации кинетина от 0,5 до 1,0 мг/л оказывает негативное влияние на прирост биомассы полученной культуры, аналогичное повышение концентрации НУК приводит к формированию адвентивных корней, что может сопровождаться увеличением продукционного потенциала культуры. Проведенная оптимизация питательной среды по содержанию фитогормонов позволяет эффективно нарабатывать биомассу каллусной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения с целью дальнейшего установления ее биосинтетических характеристик в отношении вторичных метаболитов фенольной природы.

Список использованных источников

1. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – Москва ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студ. фармацевтических вузов / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУ», 2004. – 1180 с.
3. Динамика накопления гидроксикоричных кислот в различных частях растений эхинацеи пурпурной и рудбекии волосистой, выращенных в условиях светокультуры / И. В. Дойко [и др.] // Химия растительного сырья. – 2002. – №3. – С. 35-37.

УДК 581.14.6:634.738

СПОСОБ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA L.*) НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

¹ЖАТЬКО Карина Игоревна, магистрант

¹ВОДЧИЦ Наталья Васильевна, м.н.с., зав. НИЛ КТР

¹ВОЛКОВА Елена Михайловна, к. с.-х. наук, доцент

²ВОЛОТОВИЧ Антон Анатольевич, к.б.н., доцент

¹Полесский государственный университет

²Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр

Введение. Земляника (*Fragaria L.*) является наиболее распространенной ягодной культурой в мире. Она обладает массой положительных качеств: высокой приспособляемостью к различным условиям среды, хорошей ежегодной урожайностью [1, с. 3].

Земляника достаточно хорошо размножается вегетативным способом либо семенами [4, с. 21]. Однако стоит учесть, что при таком размножении есть риск снижения урожайности культуры на 20–50%, из-за поражения грибными и вирусными инфекциями, передающимися от материнского растения [1, с.12]. Всего этого можно избежать благодаря методу клонального микроразмножения растений, который позволяет в короткие сроки, вне зависимости от погодных условий, получить неограниченное количество, свободного от фитопатогенов, посадочного материала, генетически идентичного материнскому растению [5, с. 3]. Процесс начинается с изолирования экспланта, его стерилизации и посадки на агаризованную питательную среду. Одна из основополагающих ролей отводится подбору стерилизующих соединений, эффективных концентраций этих соединений, и продолжительности времени обработки с целью получения высокого выхода стерильных, жизнеспособных эксплантов [3, с. 13].

Целью данной работы явилось изучение разных способов стерилизации эксплантов земляники садовой на этапе введения ее в культуру *in vitro*.

Методика и объекты исследования. Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» в сентябре–ноябре 2017 года.

Для асептического введения в культуру *in vitro* были использованы верхушечные столоны (усы) земляники садовой сорта Honey. В качестве стерилизующих соединений испытывали либо 6%-й раствор хлорамина (время экспозиции 15 мин), либо 7,5%-й раствор гипохлорита натрия (время экспозиции 25 мин).

В первом эксперименте экспланты погружали в стерилизующий раствор хлорамина, как указано выше. Во втором эксперименте, до погружения в стерилизующий раствор гипохлорита натрия экспланты предварительно выдерживали в течение 18 минут в растворе фунгицидов (по 200 мг Ридомил Голд и Байтан на 100 мл раствора), с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты и 300 мкл Tween 20, из расчета на 100 мл раствора [2, с. 87].

После стерилизации материал трижды, на протяжении 5 минут каждый раз, промывали в трех порциях стерильной бидистиллированной воды с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты, из расчета на каждые 100 мл воды.

После стерилизации материал высаживали на агаризованные, питательные среды Мурасиге-Скуга [1, с. 24] и Андерсона [1, с. 25] с добавлением четырех различных концентраций 6-бензиламинопурина (6-БАП): 0,25 мг/л; 0,50 мг/л; 0,75 мг/л и 1,00 мг/л. Емкости с эксплантами размещали на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории НИЛКТР ПолесГУ при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16/8 ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

Ежедневно, на протяжении 2-х месяцев проводился учет количества инфицированных, окисленных, стерильных и жизнеспособных, активно регенерирующих растений.

Результаты и их обсуждение. Для асептического введения и стабилизации в культуре *in vitro* земляники используют различные части растения: верхушечные столоны, вычлененные меристематические апексы из почек усов и розеток, пыльники, базальные участки цветковых почек, листовые диски и семена. В данной работе в качестве исходного материала использовали верхушечные столоны, так как они содержат наименьшее количество возбудителей болезней земляники [1, с. 22].

Для каждого растения на этапе асептического введения *in vitro*, экспериментальным путем определяется оптимальный режим стерилизации, предотвращающий развитие вирусных и грибковых инфекций и способствующий высокому выходу стерильных, жизнеспособных, активно регенерирующих эксплантов [3, с. 14]. В первом случае, в качестве стерилизующего соединения был взят 6%-й раствор хлорамина, который по степени дезинфицирующего действия относится к средней группе и обладает наименее выраженным токсическим действием. Тем не менее, уже на второй день эксперимента мы наблюдали потемнение ткани и культурной среды продуктами окисления фенольных соединений, подавляющими деление и рост клеток эксплантов (рисунок А). Поскольку не применялись фунгициды, на пятый день эксперимента были замечены признаки развития грибного мицелия (рисунок Б).

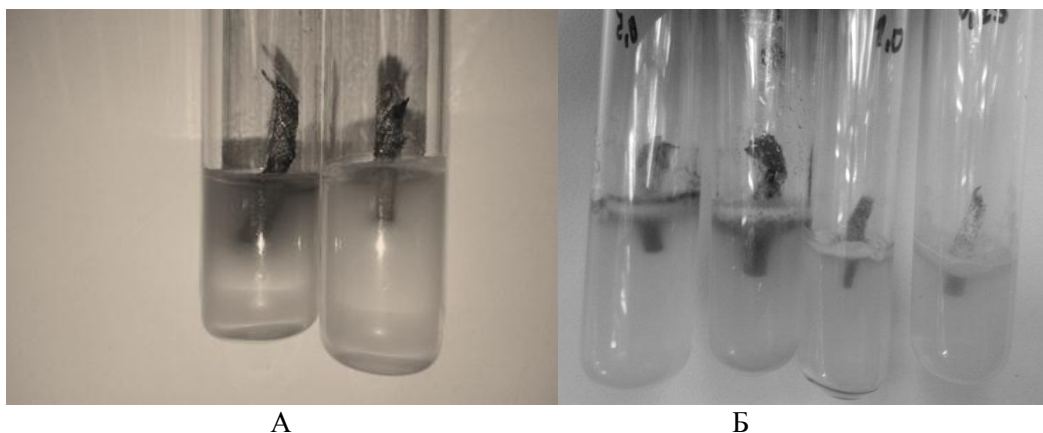


Рисунок – Асептическое введение земляники в культуру *in vitro*

А – Экспланты земляники с признаками окисления;

Б – Экспланты земляники, пораженные грибной инфекцией

В итоге, при использовании в качестве стерилизующего соединения 6%-ного раствора хлорамина, были получены следующие результаты: 86% эксплантов были инфицированы, и 14% были подвергнуты окислению.

Во втором случае до стерилизации растительного материала 7,5%-м раствором гипохлорита натрия, нами были использованы фунгициды. Поэтому инфицированного материала стало меньше в 1,1 раза (79%), заращение грибным мицелием начиналось на 10–12 день после высаживания экспланта на агаризованную, питательную среду. Процент окислившихся эксплантов был в 1,3 раза выше и составил 19%. Процент стерильных жизнеспособных растений – 2%.

Выводы. Наиболее подходящим способом получения 2% стерильных, жизнеспособных и регенерирующих эксплантов земляники садовой сорта Honey является способ, отработанный ранее на сортовой голубике высокой, с применением фунгицидов Ридомил Голд и Байтан (по 200 мг на 100 мл раствора), с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты и 300 мкл Tween 20, из расчета на 100 мл раствора, до стерилизации 7,5%-м раствором гипохлорита натрия на протяжении 25 минут.

Список использованных источников

1. Инновационные технологии возделывания земляники садовой / В.А. Высоцкий [и др.]; под общ. ред. И.М. Куликова науч.-практ. изд. – Москва : ФГНУ «Росинформагротех», 2010. – 88 с.
2. Кудряшова, О.А. Физиолого-биохимические особенности действия брассиностероидов на процессы микроклонального размножения голубики высокорослой *Vaccinium corymbosum* L.): дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05. / О.А. Кудряшова. – Минск, 2015. – 175 с.
3. Кутас, Е.Н. Влияние стерилизующих соединений на выход жизнеспособных эксплантов рододендронов (*Rhododendron* L.) при введении в культуру *in vitro* / Е.Н. Кутас, М.В. Гаранинова // Весці НАНБ. Сер. біял. навук – 2015. – № 2. – С. 13-17.
4. Линник, Т.А. Повышение эффективности способов размножения сортов земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.), характеризующихся низкой усобирающей способностью: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Т.А. Линник. – Москва, 2014. – 141 с.
5. Тимофеева, О.А. Клональное микроразмножение растений: учеб.-метод. пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 59 с.

УДК 577.151.45:577.113.3:582.284.3

ИЗМЕНЕНИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ СУБСТРАТОВ СУПЕРНАТАНТАМИ ГОМОГЕНАТОВ МИЦЕЛИЯ *PLEUROTUS OSTREATUS* В ПРИСУТСТВИИ АТФ *IN VITRO*

ИЛЬЮЧИК Ирина Анатольевна, ст. преподаватель
НИКАНДРОВ Виталий Николаевич, профессор, д.б.н.
ЖУК Ольга Николаевна, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

Во многих странах мира культивируются различные грибы – виды рода *Pleurotus*. Они отличаются хорошими пищевыми качествами, содержат комплекс биологически активных соединений: витаминов, белков, жиров, минералов, углеводов, антиоксидантов.

В последние годы начато изучение звеньев протеолиза этих грибов (как одного из ведущих механизмов регуляции жизнедеятельности на клеточном и молекулярном уровнях): в частности их протеиназ. Это обусловлено также прикладными аспектами использования протеолитических энзимов высших грибов. Однако сведения о протеазах *Pleurotus ostreatus* немногочисленны. Известно, что супернатанты ее жидких культур содержат внеклеточные «нейтральные» протеиназы, способные расщеплять казеин [1]. Между тем, материалы о влиянии эффекторов на уровень протеолитической активности грибов в литературе практически отсутствуют.

Ранее было установлено, что аденозинтрифосфат (АТФ) вызывает подавление активности ряда очищенных протеиназ и активаторов плазминогена [2]. Распространенность такого феномена в различных представителях живого мира пока остается практически неизученной.

В этой связи целью настоящей работы явилось выяснение влияния АТФ на протеолитическую активность супернатантов гомогенатов мицелия вешенки обыкновенной.

Материалы и методы исследования. «Дикий» штамм *P. ostreatus* культивировали на стерильной картофельно-сахарозной среде [3], в стеклянных колбах объемом 0,5 л, под ватно-марлевыми пробками, на качалке (70 об./мин), в темноте, при температуре 27-28 °С. На 14 сутки культивирования образцы мицелия гриба гомогенизировали в бидистиллированной воде (1:1) в течении 2 мин, гомогенаты центрифугировали 10 мин при 4 °С и 8000 об/мин.

Протеолитическую активность полученных супернатантов определяли по лизису фибриногена или желатина в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [4]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,15 М раствор хлорида натрия (рН 7,4), с добавлением АТФ в диапазоне концентраций – 10^{-8} – 10^{-2} М. Объем наносимого образца на белок-агаровые пластины супернатантов мицелия *P. ostreatus* – 10 мкл. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н хлорной кислотой.

Все эксперименты выполнены не менее чем четырехкратно. Полученные результаты обработаны математически и статистически с использованием программ MS Excel 2010, Statistica 6.0, Origin 6.1.

Результаты и их обсуждение.

Супернатанты гомогенатов мицелия *P. ostreatus* при рН 7,4 способны расщеплять оба белка-субстрата. Однако казеинолитическая активность была выше желатинолитической на 45,5% (таблица).

Таблица – Расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов мицелия *P. ostreatus* в присутствии аденозинтрифосфата (n=4)

Концентрация ионов АТФ, М	Площадь лизиса белков-субстратов, мм ²	
	казеина	желатина
Контроль (без добавок)	261,2 ± 4,2	179,6 ± 6,1
10^{-2}	257,9 ± 8,5	194,9 ± 8,0
10^{-3}	250,4 ± 3,4	210,5 ± 10,3*
10^{-4}	217,3 ± 9,8*	235,5 ± 11,4*
10^{-5}	235,4 ± 7,6*	207,1 ± 12,9
10^{-6}	194,7 ± 6,7*	181,0 ± 5,0
10^{-7}	206,8 ± 10,4*	190,2 ± 5,9
10^{-8}	196,5 ± 7,7*	183,5 ± 3,6

Примечание: * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Добавление АТФ оказало различное воздействие на расщепление белков протеиназами супернатантов гомогенатов мицелия гриба.

Казеинолитическая активность супернатантов в присутствии нуклеотида угнеталась в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М на 10–25% с максимумом эффекта в концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} М – на 21–25% (таблица, рисунок). Характер концентрационной зависимости изменения казеинолитической активности при добавлении АТФ приближался к линейной.

В тоже время расщепление желатина при добавлении АТФ в концентрации 10^{-5} – 10^{-3} М усиливалось на 15–31% с максимумом эффекта при 10^{-4} М – 31%.

Ранее было установлено, что эффект АТФ на расщепление белков различными протеиназами зависит не только от типа протеиназы, но и от белка-субстрата. Более того, оказалось, что протеолитическая активность очищенных протеиназ в ряде случаев растет при добавлении АТФ [2].

Полученные нами результаты с использованием более сложной энзиматической системы, включающей не только водорастворимые белки-энзимы, но и часть внутриклеточных мембран, являются дополнительной иллюстрацией этого явления.

Это позволяет считать, что описанный ранее феномен имеет, по-видимому, общебиологическое значение, что не исключает, однако, проведение дальнейших исследований на других биологических объектах.

Выводы. Итак, добавление АТФ вызвало разнонаправленные изменения расщепления белков протеиназами супернатантов гомогенатов мицелия *P. ostreatus*.

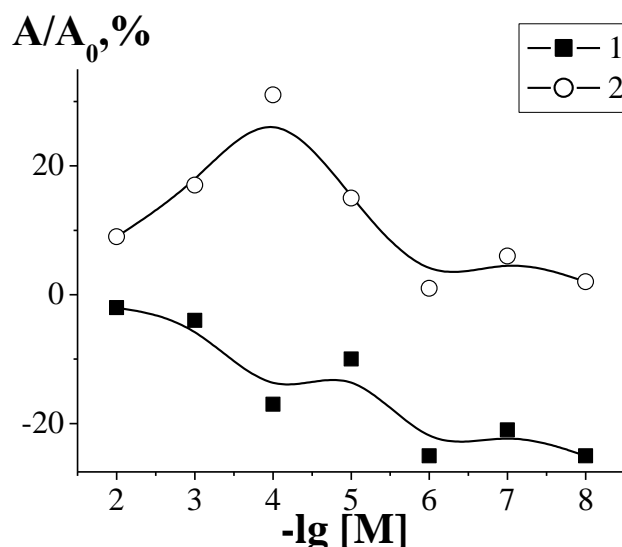


Рисунок – Изменения интенсивности расщепления казеина (1) и желатина (2) супернатантами гомогенатов мицелия *Pleurotus ostreatus* при добавлении аденозинтрифосфата, pH 7,4

Они, в целом, согласуются с описанными ранее на очищенных образцах протеиназ разного типа [2]. Вместе с тем, это не исключает возможность существования нескольких «нейтральных» протеиназ, имеющих разную субстратную специфичность, а также протеасомы.

Для выяснения этого обстоятельства необходимо проведение дальнейших исследований, включая ингибиторный анализ. Это составляет задачу дальнейших исследований.

Список использованных источников

1. Shaba, A.M. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production / A.M. Shaba, J. Baba // *Biopas*. – 2012. – Vol. 5, No 1. – P. 187-190.
2. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // *Биоорг. химия*. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382-391.
3. Чугай А.С. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной / А.С. Чугай и [др.] // *Материалы X Междунар. молод. науч.-практ. конф. «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси», УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, 15 апреля 2016 г.: в 2 ч. / Мин-во образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2016. – Ч. 1. – С. 520-522.*
4. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132-157.

УДК 635.9:581.6

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МЕЛКОЦВЕТКОВЫХ СОРТОВ КУЛЬТУРЫ *CHRYSANTHEMUM INDICUM* (L.) В УСЛОВИЯХ ЗАКРЫТОГО ГРУНТА

¹КАЛЕНЧУК Татьяна Владимировна, ассистент
²ЧЕРНЕЦКАЯ Алла Георгиевна, к. с.-х. наук, доцент
¹Полесский государственный университет
²МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ

Введение. Хризантема (*Chrysanthemum* L.) относится к семейству астровые (*Asteraceae* Dum.). Современные гибридные садовые хризантемы по происхождению связаны с хризантемой мелко-

цветковой (*C. indicum* L.) и хризантемой шелковицелистной, или крупноцветковой (*C. morifolium* R.). Деление сортов хризантемы на мелкоцветковые и крупноцветковые обусловлено размером соцветий: у мелкоцветковых сортов диаметр соцветий 2—9 см, таких соцветий на кусте может быть 10-20 и более, они собраны в рыхлый сложный щиток или в щитковидную метелку. У крупноцветковых сортов диаметр соцветий достигает 10-25 см, на кусте их бывает от одного до восьми [1, с. 12].

Научным центром по интродукции и сортоизучению хризантемы индийской в Республике Беларусь является Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ЦБС) [2, с. 3].

На сегодняшний день все большее распространение получают компактные растения данной культуры. Их растущая популярность обусловлена возможностью использования этих растений, как в озеленении, так и в композициях для открытого грунта. Технология получения горшечной культуры применительно к условиям страны отработана не достаточно полно. В связи с этим ведется с нашим участием работа по изучению возможности получения компактных обильноцветущих растений с помощью регуляторов роста. Из регуляторов роста первое место по значимости и масштабам практического применения занимают ретарданты широко используемые для борьбы с полеганием зерновых и других важнейших сельскохозяйственных культур, для повышения урожая овощных и плодово-ягодных растений.

Ретардант – синтетическое соединение, не встречающееся в растениях. Это новый тип химических регуляторов роста, которые замедляют вытягивание стебля, оказывают косванное влияние на цветение и не вызывают уродливых изменений в растении. Р-344 - фиторегулятор, производный фавихола, аналог хлорохолинхлорида с молекулярной массой 282, легко растворим в воде и свободно проникает в растения [3, с. 1].

Целью данной работы явилось изучение влияния ретарданта Р-344 на рост и развитие мелкоцветковых сортов культуры хризантемы индийской.

Методика и объекты исследования. Исследования проводили на базе оранжерей Центральный ботанический сад НАН Беларуси.

Для определения влияния физиологически активных веществ на рост и развитие растений культуры *Ch. indicum* отобрали следующие мелкоцветковые сорта: cv."Corsare" - немахровый, красный; cv."Corso" – анемоновидный, нежно-розовый.

Весь эксперимент состоял из 2 этапов: 1. проведение морфометрических исследований и сравнительный анализ мелкоцветковых сортов *Ch. indicum* в период максимального цветения; 2. определение оптимальных сроков черенкования посадочного материала исследуемых сортов и влияние на укоренение, рост и развитие регуляторов роста с целью получения максимальной продуктивности данных сортов в условиях закрытого грунта ЦБС НАНБ.

Первый этап работы заключался в отборе опытного материала испытуемой культуры. Далее происходила подготовка маточников к зимовке, а затем черенкование молодой поросли.

Сразу после срезания с материнского растения черенки высаживали. Черенки укореняли в парниках (пикировочные ящики). Состав грунта: компостная земля, поверх слой песка и торфа в соотношении 2:1:1. Глубина посадки 1-1,5 см. Плотность посадки 4×4 или 5×5 см в зависимости от величины листовой пластинки.

Исходя из схемы: мелкоцветковые сорта обрабатывались трехкратно с интервалом в 1 месяц ретардантом Р-344 в трех концентрациях – 0,012%, 0,024%, 0,036%. Разводился препарат в 100 мл дистиллированной воды. Во всех вариантах опыта контроль обрабатывался дистиллированной водой. Всего вариантов опыта 4 (по количеству концентраций препаратов) в трехкратной повторности (по 30 растений в каждом варианте). Снятие морфометрических параметров производилось каждые 10 дней.

Результаты и их обсуждение. Тренд степени укоренения посадочного материала исследуемых сортов боковых и верхушечных черенков в апреле оставался практически на одном уровне, однако, в мае картина изменялась: происходит равномерное снижение процента укоренения боковых черенков и прямо противоположная тенденция по верхушечным. Можно предположить, что такая изменчивость по степени укоренения у боковых черенков объясняется повышенной температурой воздуха в оранжереях в этот период, а также тонкими, вытянутыми побегами во время снятия материала и как определяющий фактор – постепенное истощение маточника по мере срезки (рисунки).

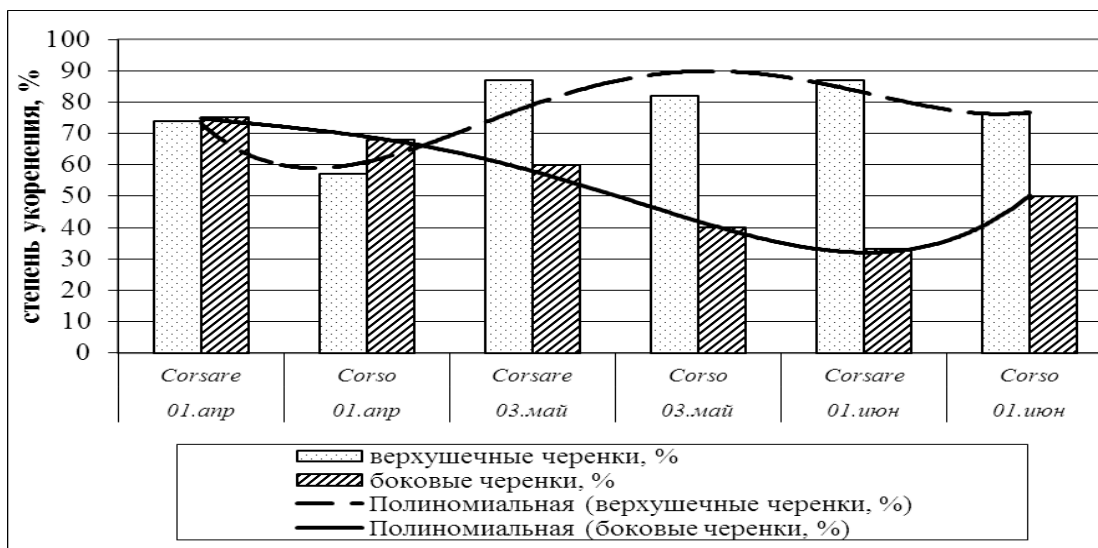


Рисунок – Степень укоренения посадочного материала мелкоцветковых сортов

Сравнение длины побега св. "Corsare" уже после 1-й обработки всеми исследуемыми концентрациями Р-344 позволяет заключить, что все 3 варианта достоверно больше, чем контроль. Аналогичная тенденция наблюдается на протяжении всех последующих месяцев вегетации. Не изменяет динамику и повторная обработка регулятором роста.

При обработке Р-344 0,036% сорта св. "Corsare" наблюдается незначительная линейная зависимость между количеством корзинок и их диаметром ($r=0,28$; $p<0,05$). По количеству корзинок растения с конц. 0,012% Р-344 достоверно больше контроля. Видна закономерность: чем больше количество корзинок, тем больше их \varnothing . По данным t – критерию Стьюдента, установлено, что при использовании Р-344 во всех 3-х вариантах опыта имеем увеличение количества побегов 2-го порядка по сравнению с контролем ($p<0,05$)

Статистический анализ экспериментальных данных, на сорте св. "Corso" показал, что использование ретарданта Р-344 не повлияло на морфометрические показатели. Выявлена слабая линейная зависимость между количеством побегов и количеством корзинок на них ($r=0,34$; $p<0,05$). Отмечено также, что использование Р-344 конц. 0,024% практически не ухудшает декоративных качеств сорта. Р-344 не проявляет себя как ретардант и снижает показатель диаметра корзинок.

Выводы. Оптимальные сроки черенкования изученных сортов являются апрель-начало мая. Все исследуемые сорта по критерию степени укоренения были отнесены к соответствующим феноритмотипам св. "Corso" и св. "Corsare" являются поздними сортами. Воздействие ретардантов на мелкоцветковые сорта в исследуемых концентрациях показали отсутствие ожидаемого эффекта у сорта св. "Corsare" и отрицательный эффект для сорта св. "Corso".

Список использованных источников

1. Дворянинова, К.Ф. Хризантемы. – Кишинев: Штиинца, 1982. –166 с.
2. Дьяченко, Н.Г. Список коллекции хризантем ЦБС НАНБ// Каталог цветочно-декоративных растений ботанических садов СНГ. – Минск: Изд. Э.С. Гальперин, 1997. – 475 с.
3. Инструкция №1 по проведению деляночных и производственных испытаний фиторегуляторов, Р – 344, Р – 456, Бензихол и Р – 577 на посевах корнеплодных и клубневых, зерновых и зернобобовых, на семенных посевах сахарной свеклы. Утв. Инновационным центром ТАХИАТ при Институте физиологически активных веществ РАН / ИФАВ РАН. – М., 2002. – 4 с.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫРАЩИВАНИЯ *STEREUM HIRSUTUM* И *PLEUROTUS OSTREATUS* IN VITRO

КАЛЬКО Елена Ивановна, аспирант
ЖУК Ольга Николаевна, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

Современная биотехнология является одним из главных приоритетов развития мировой экономики в XXI веке. Ее продукцией являются антибиотики для медицины и ветеринарии, аминокислоты, витамины, ферменты для пищевой и легкой промышленности, биологические средства защиты растений и др. Все перечисленные продукты имеют устойчиво растущий мировой рынок. Вместе с тем актуальным является поиск новых источников биологически активных соединений. Одним из перспективных направлений в решении данной задачи рассматриваются грибы базидиомицеты. Для промышленного получения биологически активных веществ из грибов может применяться как сбор плодовых тел в природе, так и биотехнологические приемы. Сбор плодовых тел в природе лимитируется несколькими факторами: непродолжительный период развития, редкая встречаемость или малочисленность гриба в природе и возможный урон, который может быть нанесен экосистеме процедурой изъятия плодовых тел. С этой точки зрения биотехнологическое производство удобно благодаря круглогодичности и берегающим отношением к окружающей среде.

Из базидиомицетов наиболее часто культивируемым является гриб *Pleurotus ostreatus*, технологические приемы глубинного культивирования разработаны именно на данном грибе. Объектом биотехнологии становится и гриб *Stereum hirsutum*. Это обычный разрушитель древесины ослабленных деревьев. В плодовых телах *S.hirsutum* найдены антиоксидантные [1], антимикробные и антираковые соединения [2]. Все эти биологически активные вещества крайне необходимы для разработки лекарственных препаратов нового поколения. Несмотря на то, что в благоприятных условиях плодовые тела *S. hirsutum* могут развиваться сотнями на одной единице субстрата, его урожайность в природе невысока из-за их чрезвычайно малых размеров. Разработка приемов, позволяющих получать биомассу круглогодично, является актуальной. В данной работе изучали особенности развития *S.hirsutum* in vitro в сравнении с *P. ostreatus*.

Для получения маточных культур *S. hirsutum* и *P. ostreatus* выделили их чистые культуры из плодовых тел – *S. hirsutum*, собранных в 2017 г. с листовых деревьев в г. Пинске, *P. ostreatus* – собранных в 2014 г. в г. Минске. В качестве питательной среды использовали картофельно-сахарозную среду [3]. Для первичного выделения мицелия использовали агаризованную картофельно-сахарозную среду.

Грибы слегка подсушивали и хранили в холодильнике при температуре $4\pm 1^\circ\text{C}$. При попытке культивирования на плотной питательной среде *S. hirsutum*, извлеченного из холодильника прямо перед введением в культуру, роста не наблюдали. Однако когда этот гриб был извлечен из холодильника и находился при комнатной температуре в течение 12 часов, рост мицелия был сравним с таковым *P. ostreatus*. Такие результаты мы получили четырехкратно. В дальнейшем всякий раз перед введением в культуру *S.hirsutum* выдерживали в течение указанного времени при комнатной температуре.

Зона роста всех культур на плотной питательной среде концентрическая, цвет колоний *S. hirsutum* имел желтый оттенок в отличие от белого цвета колоний *P. ostreatus*. Для *P. ostreatus* был присущ ярко выраженный грибной аромат, запах *S. hirsutum* был близок к запаху препаратов пенициллина. Отличались колонии и по скорости роста – для *P. ostreatus* коэффициент роста, вычисленный по методике [4, с.43], составил 70, для *S. hirsutum* – 50. Наблюдались отличия формирования мицелия и в глубинных культурах. Хотя опущение инокулюма на 2 день было во всех колбах и впервые 4–5 дней культуры развивались одинаково, уже на 7–8 дни у *P. ostreatus* мицелий имел вид рыхлых, ворсистых-лучистых клубочков молочно-белого цвета, а *S. hirsutum* образовал плотные, студенистые, малоопушенные клубочки цвета слоновой кости. Разительны были отличия по наращиванию массы – на 21 день in vitro влажная масса мицелия *P. ostreatus* составила $6,9\pm 1,8$ г (n=4), а мицелия *S. hirsutum* $28,3\pm 6,1$ г (n=4).

Таким образом, по скорости роста, формированию мицелия, наращиванию биомассы *S. hirsutum* сопоставим с *P. ostreatus*, что позволяет рассматривать его как перспективный объект

биотехнологии для дальнейшего изучения и промышленного получения характерных для данного гриба биологически активных субстанций.

Список использованных источников

1. Qin, H. Cell factories of higher fungi for useful metabolite production / H. Qin [et al.] // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2016. – Vol. 155. – P. 199-235.
2. Yun, B. S. Sterins A and B new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum* / B. S. Yun [et al.] // J. Antibiot. – 2002. – Vol. 55. – P. 208-210.
3. Чугай, А. С. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной / А. С. Чугай, Е. С. Гришан, Н. С. Коломацкая; науч. руков. Е. О. Юрченко // Вестник Полесского государственного университета – Пинск, 2016. – С. 520-522.
4. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.

УДК 58.085+581.143.6:582.814

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ СОРТОВ АКТИНИДИИ ОСТРОЙ *IN VITRO*

¹КАРУНОС Артур Сергеевич, магистрант

²КОНСТАНТИНОВ Андрей Вячеславович, мл. научный сотрудник

¹ЮРЧЕНКО Евгений Олегович, к. б. н., доцент

¹ГЕРАСИМОВИЧ Татьяна Васильевна, мл. научный сотрудник

¹Полесский государственный университет

²Институт леса Национальной академии наук Беларуси

Плоды лиана актинидия острая *Actinidia arguta* (Siebold et Zucc.) Planch. Ex. Miq, обладающие высокими вкусовыми качествами и лечебно-профилактическими свойствами, на международном рынке известны под названиями: Mini Kiwi, Kiwiberry, Hardy kiwifruit, Baby Kiwi, Bower Vine, Kiwibes, Kiwai, Kokuwa.

Возрастающая заинтересованность европейских потребителей данным продуктом стимулировала расширение площадей промышленных плантаций *A. arguta* и научную работу по селекции и разработке технологии интенсивного возделывания, организованы научный консорциум и союз плантаторов [1, 2].

В Беларуси культура *A. arguta* получила распространение в любительском приусадебном садоводстве. Вместе с тем, особенности биологии и требования к температурному режиму позволяют ведение товарной культуры в Южной и Центральной агроклиматических зонах.

Экспериментальная работа по изучению особенностей размножения сортов *A. arguta* в культуре *in vitro* выполнялась на базе лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси.

Материал в виде однолетних вегетативных побегов сортов *A. arguta*: ‘Киевская крупноплодная’, ‘Сентябрьская’, ‘Оригинальная’, ‘Римма’, ‘Надия’, ‘Перлына саду’, ‘Пурпурная’, мужское растение ‘Дон Жуан’ и подвид *A. arguta* var. *giraldii* (Diels) Vorosch. селекции НБС (Национальный ботанический сад) им. Гришко НАН Украины был получен из коллекции садовода – опытника Гузенко В.И.

Введение *A. arguta* в асептическую культуру *in vitro* и дальнейшее микрклональное размножение проводили в соответствии с общепринятыми методиками [3]. Первичными эксплантами служили фрагменты побегов однолетнего прироста. Выживаемость эксплантов после стерилизации составила 87%.

Питательные среды для введения и мультипликации в культуре *in vitro* готовили по прописям MS и QL, со стандартным содержанием органических веществ, и дополняли фитогормонами 6-BAР в концентрации 0,5-0,3 мг/л, ИВА 0,3-0,1 мг/л [4,5].

Среда MS с 0,5 мг/л 6-BAР и 0,1 мг/л ИВА, содержащая 39,6 мМ азота в виде нитрата аммония и четырех водного хлористого кальция, оказалась предпочтительнее на первых пассажах. Она стимулировала интенсивную пролиферацию пазушных меристем и образование мощных побегов с укороченными междоузлиями.

В процессе микроразмножения *in vitro* были выявлены некоторые сортоспецифические особенности органогенеза, зависящие от состава питательной среды, так, экспланты *A. arguta* сортов 'Киевская крупноплодная', 'Сентябрьская', 'Оригинальная' и *A. arguta* var. *giraldii* лучше регенерировали на среде MS с 0,5 мг/л 6-ВАР и 0,1 мг/л ИВА, у остальных сортов рост побегов был сниженный, наблюдалась витрификация и повышенное каллусообразование.

Экспланты сортов 'Римма', 'Надия', 'Перлына саду', 'Пурпурная' и мужское растение одинаково хорошо регенерировали и развивались на средах MS и QL с 0,3 мг/л 6-ВАР и 0,1 мг/л ИВА.

Повышенное содержание кальция в виде нитрата кальция в среде QL вызывало опробкование первичной коры и способствовало подготовке регенерантов к условиям *ex vitro*.

Коэффициент размножения, в зависимости от концентрации экзогенного цитокина, составлял 2-3 при концентрации 0,5 мг/л и 6-8 с 0,3 мг/л 6-ВАР.

Применение повышенных концентраций 6-ВАР вызывало интенсивный каллусогенез и массовое образование адвентивных побегов, что не допустимо в случае необходимости получения генетически однородного материала.

Изучение направленности органогенеза *A. arguta in vitro* позволило выявить определенную зависимость преимущественного развития побегов или корневых систем от типа экспланта (апикального, медиального или базального фрагмента микропобега) использованного для микрочеренкования. Показатели морфогенеза микрочеренков взятых из апикальной части микропобегов были оптимальными как для микроразмножения коллекционного материала *in vitro*, так и для получения микроклонального посадочного материала.

На эксплантах, полученных из медиальных фрагментов, наблюдалось интенсивное побегообразование на фоне пониженного ризогенеза; базальные фрагменты отличались снижением способности к побегообразованию, что делает их недостаточно пригодными для субкультивирования на последних пассажах перед перенесением микрорастений в условия *ex vitro*.

Для поддержания коллекции использовались апикальные микрочеренки и питательные среды с минимальными концентрациями фитогормонов.

Следует отметить что спонтанное укоренение микропобегов наблюдалось на средах для регенерации, поэтому с учетом повышенного уровня содержания эндогенных фитогормонов и действия гормонов, применявшихся для стимулирования регенерации, укоренение эксплантов целесообразно проводить без использования фитогормонов или с включением в среду ауксинов в минимальных концентрациях, что является предметом дальнейших исследований.

Акклиматизацию микроклонов проводили в специальных адаптационных камерах с повышенной (85-95%) влажностью воздуха. Материал с открытой корневой системой высаживался в поддоны на искусственный субстрат, представляющий собой агроперлит, насыщенный раствором минерального удобрения 'Кристаллон Желтый' ('YARA', Нидерланды) и культивировался в течение 2 месяцев с использованием фитоламп FLUORA ('OSRAM', Германия) при фотопериоде 16/8 ч и освещенности 2000-3000 люкс. Приживаемость микроклонов в зависимости от сорта составляла 82-98%

В результате проделанной опытной работы были выяснены особенности размножения *A. arguta in vitro*, зависящие от состава питательных сред, происхождения и морфологии эксплантов. Определены типы эксплантов, компетентные для поддержания *in vitro* коллекции и клонального микроразмножения. Оптимизирована технология получения регенерантов и адаптантов различных сортов *A. arguta*.

Список использованных источников

1. Caruel, J.P. Nergi@kiwiberry driving strong growth of fresh fruit [электронный ресурс] // Freshplaza. Режим доступа: <http://www.freshplaza.com/article/152248/NergipercenageC2percenageAE-kiwi-berry-drivingstrong-growth-of-fresh-fruit> – (Дата обращения: 07.11.2017г.)
2. Wspolpraca krajowa [электронный ресурс] // MiniKiwi – Режим доступа: <http://aktinidia.pl/pl/wspolpraca-krajowa/> – (Дата обращения: 06.11.2017г.)
3. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. No. 15. P. 473-497.
5. Quoirin, M. Etude de milieu adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus / M. Quoirin, P. Lepoivre // *Acta Hort.* – 1977. – Vol.78 – P. 437 – 442.

СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА *SILYBUM MARIANUM* КРАСНО- И БЕЛОЦВЕТКОВОЙ РАС: ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ

КОВЗУНОВА Ольга Викторовна, научный сотрудник
отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси»

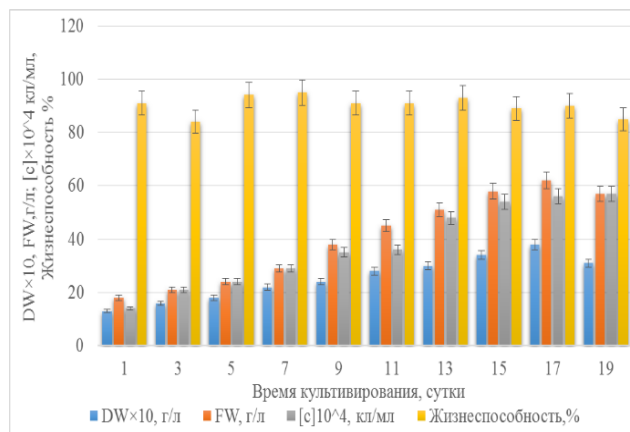
Лекарственные растения являются природными источниками ценных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологического действия. В настоящее время они широко применяются как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно-косметической промышленности. Альтернативными источниками получения биологически ценных веществ растительного происхождения могут стать культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Биотехнологические подходы позволяют получать продукт независимо от внешних климатических, почвенных условий, круглогодично и сохраняя при этом естественные ареалы ценных лекарственных растений [1,2]. Расторопша пятнистая характеризуется уникальным комплексом флавонолигнанов, обуславливающим антигепатотоксическое, гепатопротекторное и антихолестерологическое действия [3].

Цель нашего исследования состояла в получении суспензионной культуры *S.marianum* красно- и белоцветковых рас и анализе ее ростовых характеристик.

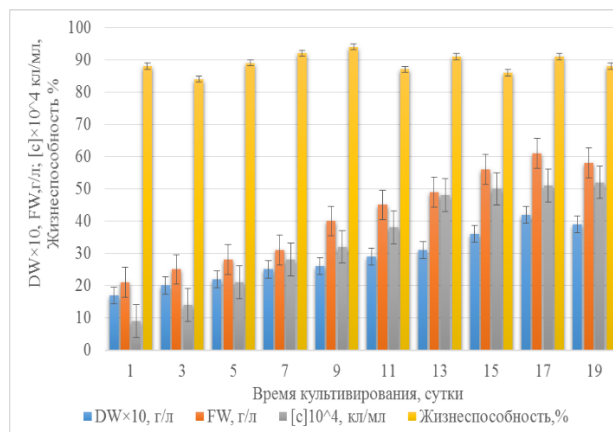
Суспензионную культуру расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортаобразца Sibilla получали из кусочков рыхлого корневого и стеблевого каллуса 3 пассажа красно- и белоцветковой рас расторопши (массой не более 1,5 г), далее помещали в круглодонные колбы объемом 100 мл, содержащие жидкую среду Мурасиге-Скуга, дополненную гормонами 2 мг/л бензиламинопурина и 1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Колбы ставили в люминостат при 24-25°C на круговой качалке (100-120 об/мин). Спустя 16 дней культуру ресуспендировали и удаляли крупные кусочки исходного каллуса и агрегаты клеток (фильтрованием). Пассирование проводили с интервалом 16-18 дней на свежую питательную среду.

Анализ ростовых характеристик культур клеток *S.marianum* красно- и белоцветковых рас определяли по общепринятым методикам [4]. Полученные результаты представлены на рисунке 1. Кроме того, были рассчитаны индекс роста, удельная скорость роста и продуктивность по биомассе.

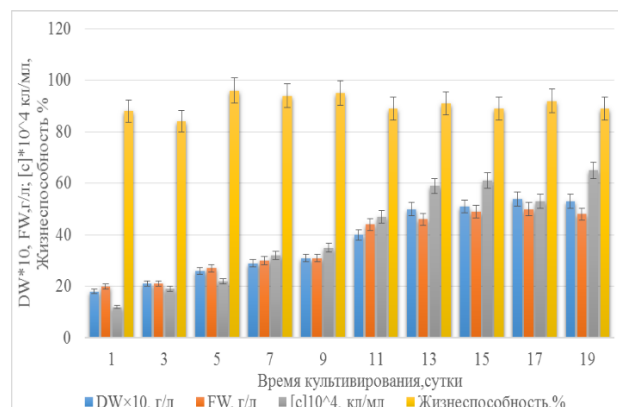
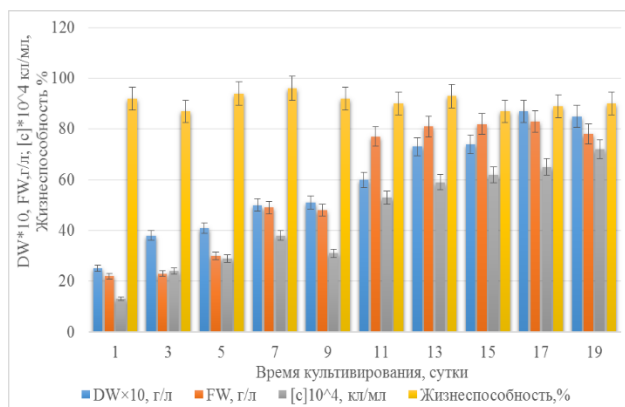
Как следует из представленных результатов, жизнеспособность клеток варьировала от 92 до 96 % у стеблевой культуры и от 88 до 95 % у корневой культуры белоцветкового сортаобразца и несколько снижалась к концу культивирования (до 90 и 89 %, соответственно). Для исследуемых линий суспензионной культуры в период 9-11-х суток отмечен эффект «ступеньки». Вероятно, данный эффект связан с особенностью утилизации сахарозы — расщеплением в среде с дальнейшим последовательным потреблением фруктозы, либо же с наличием двух субполярных клеток в культуре. Аналогичные эффекты были описаны для культур клеток женьшеня и трансгенных линий табака [5].



А



Б



В

Г

А, В – стеблевая культура, Б, Г – корневая культура, DW– масса сухих клеток, г/л; FW – масса сырых клеток, г/л; с – число клеток

Рисунок 1 — Динамика изменения ростовых характеристик и уровня жизнеспособности суспензионной культуры *S.marianum* красноцветкового сорта Золушка (А, Б) и белоцветкового сортообразца Sibilla (В, Г)

У красноцветкового сорта Золушка жизнеспособность клеток стеблевой и корневой культуры сохранялась на уровне от 84 до 95 % и от 84 до 94 %, соответственно. Наибольшая жизнеспособность клеток приходится на экспоненциальную фазу роста как у красно-, так и белоцветковой рас расторопши.

Было установлено, что ростовой цикл полученной культуры составляет 14-19 суток. Через 17 суток после начала инкубирования наблюдается прекращение прироста сухой массы.

У расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас латентная фаза длилась четверо суток. Затем наступала экспоненциальная фаза роста, где клетки активно делились. После экспоненциальной фазы роста, которая длилась около 7 суток, клетки вступали в фазу линейного роста и далее в стационарную фазу. На 17-е сутки начинается фаза деградации клеток. За период субкультивирования число клеток увеличилось в 4 раза в стеблевой и в 5,7 раз в корневой суспензионной культурах красноцветкового сорта Золушка и в 5,5 раз у стеблевой и 5,4 раз корневой суспензионной культур белоцветкового сортообразца Sibilla.

Исследуемые суспензионные культуры имеют удовлетворительные ростовые характеристики, из особенностей которых можно отметить отсутствие значительных различий удельной скорости роста, что может свидетельствовать о сбалансированности роста культуры. Однако стоит отметить, что максимальное значение удельной скорости роста приходится на стеблевую культуру белоцветкового сортообразца Sibilla. Время удвоения также не выявило значительных различий, за исключением стеблевой суспензионной культуры красноцветкового сорта Золушка, у которой оно было максимальным через 6 часов после начала культивирования. Был также рассчитан такой показатель, как продуктивность и экономический коэффициент. В целом, суспензионные культуры белоцветкового сортообразца дают более высокие показатели, в особенности стеблевая культура, где продуктивность и экономический коэффициент составили 6,1 г/л и 3,98 г/г сахарозы, соответственно. Для суспензионных культур расторопши красноцветкового сорта также характерны достаточно высокие уровни продуктивности, удельной скорости роста и максимального накопления биомассы, с максимумом у корневой и стеблевой суспензионной культуры, соответственно: 5,783 г/л, 2,733 сут⁻¹, 109,88 г/л, и 4,437 г/л, 2,095 сут⁻¹ и 84,32 г/л.

Эти данные позволяют нам выделить стеблевую суспензионную культуру белоцветковой рас расторопши Sibilla, как наиболее перспективную культуру для использования в биореакторах с целью получения биологически активных веществ.

Список использованных источников

1. Rao, S. R. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites / S. R. Rao, G. A. Ravishankar // Biotechnol. Advances. – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 101-153.
2. Karuppusamy, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures / S. Karuppusamy // J. Of Med. Plants Res. – 2009. – Vol. 3, № 13. – P. 1222-1239.

3. Pradhan, S. C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine / S. C. Pradhan, C. Girish // Ind. J. of Med. Res. – 2006. – Vol. 124, № 5. – P. 491-504.

3. Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук; АН УССР, Ин-т физиологии растений. – Киев: Навук. думка, 1980. – 488 с.

4. Рост и биосинтетические характеристики суспензионной культуры *Taxus baccata* при выращивании в колбах и биореакторе / Л. В. Орлова [и др.] // Вестн. Поволж. гос. технол. ун-та. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 3 (23). – С. 86-97.

УДК 631.523:633.264

СОЗДАНИЕ МЕЖРОДОВЫХ И МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (IN VITRO, КУЛЬТУРА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ)

¹КОНДРАЦКАЯ Ирина Павловна

²СТОЛЕПЧЕНКО Валентина Андреевна

²ВАСЬКО Петр Петрович

¹МАЗУР Татьяна Васильевна

¹ЧИЖИК Ольга Владимировна

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси

²РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

Современная биотехнология растений - сумма технологий молекулярной и клеточной биологии растений. Вклад биотехнологии в сельскохозяйственное производство заключается в облегчении традиционных методов селекции растений, разработке новых технологий, позволяющих повысить эффективность сельского хозяйства [1].

При создании межродовых и межвидовых гибридов злаковых трав мы использовали метод эмбриокультуры из незрелой зерновки и микроклональное размножение *in vitro*.

Метод эмбриокультуры используют для эффективного преодоления состояния покоя семян. Зародыши, изолированные на ранних стадиях развития из недозрелого семени или семенных зачатков сразу после оплодотворения, очень маленькие, имеют малые размеры органов, из которых они выделяются, поэтому их культивирование связано с определенными технологическими трудностями. Сложным является подбор питательной среды, которая должна обеспечить развитие зародыша до его нормального состояния в зрелом семени с последующим поддержанием прорастания и роста. Требования к физиологически активным веществам среды различаются на разных стадиях развития зародыша.

Микроклональное размножение позволяет получить оздоровленный посадочный материал. Рост растений можно поддерживать в течение многих лет; методом культуры *in vitro* можно размножать формы, не размножающиеся вегетативно или формы, не дающие жизнеспособных семян; можно выбирать генотипы, устойчивые к неблагоприятным условиям выращивания.

В представленной работе, для преодоления про- и постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации, в фазу полного вымётывания растения изолировали, в период цветения под изоляторами проводили опыление. После опыления срезанные колоски помещали в лабораторные условия для извлечения зародыша из незрелых зерновок. При создании межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) с лисохвостом вздутым (*Alopecurus ventricosus* Pers.), овсяницы луговой (*Festuca pratensis*) и овсяницы тростниковой (*Festuca arundinacea*) зародыши извлекали на 14 день, при создании межродовых гибридов житняка (*Agropyron cristatum*) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne*) – на 14-17 день, гибрида фестулолиума (*Festulolium*) морфотипа овсяницы тростниковой – на 15 день, межвидового гибрида райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.) и райграса многоцветкового (*Lolium multiflorum* L.) – на 14 день.

Зародыши, изолированные на ранних стадиях развития из недозрелого семени после оплодотворения очень маленькие, имеют малые размеры органов, из которых они выделяются, поэтому их культивирование связано с определенными технологическими трудностями. Сложным является подбор питательных сред для каждой культуры, которая должна обеспечивать развитие зародыша до его нормального состояния с последующим поддержанием прорастания и роста. На разных ста-

диях развития зародыша требования к физиологически активным веществам питательной среды разные. Специально подобранный состав компонентов питательных сред для культивирования незрезых зародышей предоставляет все необходимые вещества для развития зародыша и, таким образом, заменяет эндосперм. Результативность создания межродовых и межвидовых гибридов злаковых трав представлена в таблицах 1- 4.

Таблица 1 – Результативность создания межвидовых гибридов лисохвоста лугового с лисохвостом вздутым

Комбинации скрещивания	Извлечено зерновок	Высажено зародышей	Получено растений
Результаты проведения гибридизации в ФТК			
Лт—3, Лт-11, Лт-31	51	31	10
Результаты проведения гибридизации в полевых условиях			
Лк—2, Лк-3, Лк-5, Лк-7, Лк-9, Лк-11, Лк-31	271	153	33

Таблица 2 – Результативность создания межродовых гибридов житняка гребенчатого

Комбинации скрещивания	Извлечено зерновок, шт.	Высажено зародышей, шт.	Получено растений, шт.
6;74 6+; 8; 9;10;11;12	289	168	128

Таблица 3 – Результативность создания межвидовых гибридов райграса пастбищного

Комбинации скрещивания	Извлечено зерновок, шт.	Высажено зародышей.	Получено растений, шт.
райграс пастбищный X райграс многоцветковый	163	126	67
райграс многоцветковый X райграс пастбищный	356	251	88

Таблица 4 – Результативность создания межродовых гибридов фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой при гибридизации в полевых условиях

Комбинации скрещивания	Извлечено зерновок, шт	Высажено зародышей,шт	Получено растений, шт
Результаты проведения гибридизации в полевых условиях			
Fla-18a, Fla-18б, Fla-1, Fla-34, Fla-17 (раннеспелые формы)	466	299	174
Fla-26, Fla-28, Fla-14, Fla-32 (позднеспелые сорта)	205	167	153

Как видно из таблиц, при высадки зародышей на регенерационную питательную среду, погибло 76,7% в комбинации скрещивания лисохвост луговой X лисохвост вздутый; 23,4% - житняк гребенчатый X райграс пастбищный; 64,9% - райграс многоцветковый X райграс пастбищный; 46,8% - райграс пастбищный X райграс многоцветковый; 41,8 - фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой раннеспелые формы; 8,3% - фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой позднеспелые формы.

При разработке биотехнологического метода микрклонального размножения *in vitro* межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) с лисохвостом вздутым (*Alopecurus ventricosus* Pers.) и межродового гибрида фестулолиума фенотипа овсяницы тростниковой использовали стерилизованные семена. Одним из основных методов, использующихся при клональном микроразмножении растений, является активация развития меристем, что может достигаться добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих разви-

тие побегов. В составе большинства сред азот представлен в виде нитрата, но в среде МС кроме нитратов присутствуют соли аммония, что позитивно для протекания морфогенных процессов. Считается, что для индукции морфогенеза важно содержание в питательной среде иона NH_4^+ , а для развития образовавшихся морфогенных структур важен ион NO_3^- , то есть необходимо регулировать соотношение аммонийного и нитратного азота [2]. Успех индукции морфогенеза определяется, главным образом, соотношением цитокининов и ауксинов в питательной среде. Принято считать, что количество добавляемых в среду экзогенных регуляторов роста должно находиться в связи с балансом эндогенных фитогормонов. Поэтому оптимальное содержание в среде физиологически активных веществ зависит от вида и даже от сорта растения. Культивирование межвидовых гибридов лисохвоста лугового проводили на среде МС, содержащей 2 мг/л и 4 мг/л БАП, межродовых гибридов фестулолиума - на среде МС, содержащей 0,5 мг/л и 1 мг/л БАП. Для адаптации культуральных растений к измененным условиям влажности *ex vitro* культуральные сосуды приоткрывали на короткое время, а затем регенеранты переносили из культуральных сосудов в искусственный субстрат Биона.

Разработанные авторами постгеномные технологии (*in vitro*, культура клеток и тканей) позволяют существенно сократить сроки создания межродовых и межвидовых гибридов злаковых трав.

Список использованных источников

1. Генетические основы селекции растений. В 4т. Т.4. Биотехнология в селекции растений. Генетика и генетическая инженерия / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2014. – 653 с.

2. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС. – 1999. – 160 с.

УДК 581.4:634.1

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВ АМАРАНТАСЕАЕ JUSS. И АСАНТАСЕАЕ JUSS. ДЛЯ АКВАРИУМОВ

КОНСТАНТИНОВ Андрей Вячеславович, мл. научный сотрудник

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

КАРУНОС Артур Сергеевич, магистрант

Полесский государственный университет

ГРИЩЕНКО Илья Владимирович, студент

Гомельский государственный университет имени Ф.Скорины

Получение стерильных культур и культивирование микрорастений в условиях *in vitro* является наиболее широко используемым способом сохранения вегетативно размножаемых растений, обладающих всеми признаками исходных форм в контролируемых условиях среды [1].

Культура *in vitro* водных растений и гидрофитов позволяет сохранять надежную изоляцию растений, освобождать их от присутствия низших растений, моллюсков и бактериальной контаминации. Высокие коэффициенты размножения растений достигаются за счет введения в питательные среду регуляторов роста и устранения действия экстремальных абиотических факторов среды, связанных с выращиванием растений в погруженном состоянии и воде с неподходящими показателями жесткости, кислотности, температуры [2, 3]. Особая компактность пробирочной коллекции удобна для коммерческой реализации и обмена материалом между коллекциями. Биотехнологические методы на основе культур *in vitro* имеют широкое практическое применение и активно используются для производства посадочного материала декоративных культур, включая аквариумные растения, во многих странах мира (Голландия, Нидерланды, Франция, Китай, США и др.), где созданы крупные биотехнологические центры [4].

Альтернантера Рейнеки (*Alternanthera reineckii* Griseb.) – это неприхотливое аквариумное растение семейства Амарантовые (Amaranthaceae Juss.) Листья длиной 2-3 см и шириной около 1-1,5 см., разнообразной окраски от розовой до блестяще красной. Другие формы более декоративны: имеют крупные листья, разнообразную окраску и формирует цветочные пятна, при регулярной стрижке образует густые заросли.

Стаурогин ползучий (*Staurogyne repens* (Nees) Kuntze.) относится к семейству Акантовые (Acanthaceae Juss.), размер его листа около 2-4 см в длину и 1-1,5 см в ширину, длина побегов обычно не превышает 10 см. Растение не требовательно к условиям содержания, специальной стрижке и относится к почвопокровным видам. Скорость роста – средняя.

Цель исследований состояла в изучении возможностей поддержания стабильной культуры в коллекции *in vitro*, клональном микроразмножении и акклиматизации регенерантов двух видов декоративных аквариумных растений к нестерильным условиям *ex vitro*.

Культивирование растений *in vitro* проводили по стандартным методикам в условиях культуральной комнаты при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$ и постоянном освещении интенсивностью 2,0–3,0 тыс. люкс и адаптационного помещения при температуре $22 \pm 3^\circ\text{C}$ и освещении интенсивностью 3,0–4,0 тыс. люкс и фотопериодом 16/8 ч. Развитие растений оценивали по показателю длины побега (см), коэффициенту мультипликации и эффективности укоренения, учитывали приживаемость регенерантов при акклиматизации.

Среди существующих методов клонального микроразмножения растений, прямая регенерация характеризуется как наиболее надежный способ в отношении генетической стабильности размножаемых форм, универсальностью для определенных растений, высоким коэффициентом размножения и повторяемостью результатов, что делает его основным при промышленном производстве посадочного материала. Пролиферация пазушных побегов, основанная на снятии апикального доминирования, позволяет поддерживать рост растений круглый год, тиражировать трудноразмножаемые растения и в кратчайшие сроки получить большое количество растений при ограниченном количестве исходного материала. Лучшими индукторами регенерационных процессов на стадии собственно размножения является использование в составе основной питательной среды определенных концентраций цитокининов.

Получение побегов экспериментальных растений нормальных пропорций и последующее их деление на двух- трехузловые микрочеренки, которые используются в качестве эксплантов для повторения цикла размножения осуществляли на средах, приготовленных по прописи MS (Murashige T. & Skoog S., 1962.), дополненных регуляторами роста цитокининовой (6-BAР, $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и ауксиновой (NAA, $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) природы. Продолжительность пассажа составляла 60 суток. По прошествии указанного периода средняя длина основного побега микрорастений альтернантеры и стаурогина составляла $6,4 \pm 2,5$ см и $5,7 \pm 1,4$ см соответственно, коэффициент мультипликации в культуре *in vitro* за счет интенсивного формирования боковых побегов для альтернантеры составлял 6-10 шт. эксплантов на 1 растение. Для стаурогина указанный показатель находился в пределах 4-7 шт. на 1 растение. Повышение концентрации 6-BAР в питательной среде до $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ приводило к заметному угнетению ростовых процессов (снижение средних показателей длины побега в 1,2-1,6 раз), витрификации материала и формированию базального каллуса у регенерантов.

В связи с вышеописанным, теоретическая возможность размножения аквариумных растений изучаемых видов составляет до 1 млн. побегов из одного побега в год, при условии, что за два месяца можно получить один побег, дающий 10 микрочеренков, что позволяет рассматривать указанные растения как перспективные для развития производства орнаментальных растений для домашних аквариумов.

Коллекции растений *in vitro* можно длительно хранить в состоянии активного или замедленного роста. Для *Alternanthera reineckii* Griseb. и *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze. отмечено, что после 3 месяцев культивирования происходит существенное ухудшение состояния микропобегов, проявляются отмирание листьев и укорачивание метамеров. Продолжительность беспересадочной культуры была повышена до 6-8 месяцев путем стерильного (в ламинар-боксе) внесения в культуральные сосуды 50 мл дистиллированной воды или жидкой питательной среды MS без фитогормонов, что предотвращало высыхание агара.

Завершающим этапом клонального микроразмножения является акклиматизация микрорастений к почвенным условиям. Постепенный перевод микроклонов к погруженному выращиванию на последнем пассаже *in vitro* осуществляли путем внесения 100 мл водопроводной воды в культуральные сосуды со сформированными растениями за 7 суток до пересадки для предадаптации. Высадку укорененных и подготовленных регенерантов стаурогина и альтернантеры проводили в пластиковые горшочки объемом 100-150 мл в низинный торф, досыпая сверху 1-1,5 см слой крупного речного песка для удерживания субстрата и погружая горшочки в емкости с водопроводной водой. Приживаемость экспериментальных растений изучаемых видов после 1 месяца культивирования достигала 96-100%. Отмечали элонгацию главного и боковых побегов растений, форми-

рование новых метамеров и корневых систем саженцев. Успешность перехода к росту в погруженном состоянии подтверждало развитие более широких и относительно тонких листовых пластинок, характерных и для растений, выращиваемых в аквариумах.

Таким образом, изучение морфогенетических процессов аквариумных растений альтернантеры и стаурогина на этапе собственно размножения позволили разработать унифицированную методику тиражирования микроклонов и саженцев декоративных водных растений. Разработан двухстадийный прием акклиматизации растений-регенератов к условиям выращивания *ex vitro* с использованием приема преадаптации. Экономический эффект использования методов биотехнологии достигается за счет возможности получения высоких коэффициентов размножения декоративных водных растений изученных видов.

Список использованных источников

1. Kane, M.E. Micropropagation of the aquatic plant *Cryptocoryne lucens* / M.E. Kane, E.F. Gilman, M.A. Jenks, T.J. Sheehan // Hort. Science. – 1990. – Vol. 25. – P. 687-689.
2. Huang, L. Rapid *in vitro* multiplication of the aquatic angiosperm, *Anubias barteri* var. *undulate* / L. Huang, Y. Chang, Y. Chang // Aquat. Bot. – 1994. – Vol. 47. – P. 77-83.
3. Öztürk, M. *In vitro* Micropropagation of the aquarium plant *Ludwigia repens* / M. Öztürk, K.M. Khawar, H.H. Atar, C. Sancak, S. Özcan // Asia Pacific J. of Mol. Bio. and Biotech. – 2004. – Vol.12. – P. 21-25.
4. Pierik, R.L.M. Developments in the micropropagation industry in The Netherlands. Plant Tissue Cult. and Biotech. – 1997. – Vol. 3. – P. 152-153.

УДК 581.4:634.1

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ВОСПРОИЗВОДСТВА РЕДКИХ И ДЕКОРАТИВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BETULA* L. *IN VITRO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

КУЛАГИН Дмитрий Валерьевич, научный сотрудник
КОНСТАНТИНОВ Андрей Вячеславович, младший научный сотрудник
Институт леса Национальной академии наук Беларуси
КИРЬЯНОВ Павел Сергеевич, магистрант
Гомельский государственный университет имени Ф.Скорины
КАРУНОС Артур Сергеевич, магистрант
Полесский государственный университет

Климатические изменения глобального характера и возрастание уровня антропогенной нагрузки на лесные экосистемы существенно влияют на состояние популяций и жизненность растений, вызывают нарушения структуры фитоценозов. Редкие и реликтовые виды, в особенности на границах ареалов распространения, являются особенно уязвимыми к изменению условий обитания. Среди представителей рода *Betula* L. в Республике Беларусь самостоятельные лесные формации формируют береза повислая (*Betula pendula* Roth.) и береза пушистая (*Betula pubescence* Ehrh.). В то же время вид Береза карликовая (*Betula nana* L.), а также чернокорая (*Betula pendula* var. *obscura* (Kotula ex Fiek) Olšavská.) и карельская (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merclin) Hamet-Ahti.) формы березы повислой являются редкими и встречаются только на отдельных, строго ограниченных территориях [1, 2]. Помимо имеющихся в естественных условиях следует отметить форму березы повислой (*Betula pendula* Roth. var. *dalecarlica* Schneid.), так называемую далекарлийскую березу, отличающуюся перистораздельной формой листовой пластинки, перспективную для озеленения урбанизированных территорий.

Устойчивое управление лесами предполагает сохранение биологического и ландшафтного разнообразия при ведении лесохозяйственной деятельности. Одним из путей сохранения редких видов берез является создание генетических банков стерильных побеговых культур *in vitro*, обеспечивающее сокращение площадей под маточными коллекциями и дающими возможность массово производить посадочный материал ценных генотипов древесных растений для создания лесных культур и промышленных плантаций их рациональное хозяйственное использование, направленное на выращивание высококачественных саженцев для производства высокодекоративной узор-

чатой древесины, успешной реинтродукции видов в природную флору и зеленого строительства [3, 4].

Исследования направлены на формирование перевиваемой коллекции культур тканей редких и ценных представителей рода *Betula* L. для реализации возможности сохранения генофонда и его устойчивого воспроизводства в условиях *ex situ* с применением биотехнологических методов.

В качестве экспериментального материала были выбраны клоны березы карликовой, березы чернокорой и далекарлийской березы, поддерживаемые в коллекции лаборатории генетики и биотехнологии 9-12 лет. Клоны карельской формы березы повислой, использованные в исследованиях депонируются 2-4 года. Инициацию указанных культур проводили из материала, взятого с деревьев различных морфологических форм, отобранных сотрудниками лаборатории лесной селекции Института леса НАН Беларуси в ходе обследования естественных и искусственных насаждений.

В результате многолетних исследований определены стандартные условия поддержания коллекционного материала *in vitro*. Для выращивания применяется модифицированная культуральная среда без регуляторов роста на основе макросолей WPM (Lloyd & McCown 1980), микросолей и витаминов MS (Murashige & Skoog 1962), дополненная 7 г·л⁻¹ сахарозы в качестве источника углерода и 8 г·л⁻¹ микробиологического агара. Условия культивирования: температура 24±2°C и постоянное освещение интенсивностью 3,5–4,5 тыс. люкс. Для подсветки используются лампы со средними спектральными показателями дневного света и максимумом в синей части OSRAM L 36 W /765 Daylight, цветовая температура: 6500 К, световой поток: 2500 лм и фитолампами с максимумами в синей и красной частях спектра OSRAM L 36 W /77 FLUORA, цветовая температура: 7700 К, световой поток: 1400 лм, в равнозначном участии, обеспечивающем спектр света благоприятный для процессов роста и развития микрорастений березы различных видов.

Эффективным способом поддержания *in vitro* культур березы являются методы хранения растений в условиях их минимального роста. Нами была разработана схема культивирования, включающая черенкование растений на одно- или двухузловые экспланты длиной 0,8-1,5 см, их культивирование на модифицированной безгормональной среде WPM по 15-20 шт. в культуральных сосудах объемом 200 мл под крышками из пищевой фольги в стандартных условиях 15-20 дней и последующую герметизацию емкостей полиэтиленовой пленкой или лентой «Parafilm M» и помещением для культивирования в условиях пониженной освещенности (2,0–2,5 тыс. люкс).

Так для Березы карликовой и чернокорой формы березы повислой продолжительность пассажа увеличена с 3 до 8 месяцев, а для клонов карельской и далекарлийской березы с 2 до 6 месяцев, что позволяет хранить эти растения *in vitro* в состоянии замедленного роста. При этом показано, что вышеописанные приемы позволяют избежать массовой витрификации микропобегов на начальных этапах роста, а также гибель растений в результате токсического воздействия высоких концентраций минеральных солей связанного с подсыхания агаризованной среды. В случае беспересадочной культуры идет естественный процесс отмирания листовых пластинок и отдельных побегов, в связи с чем сохранность на микрорастении зеленых листьев является показателем их жизнеспособности при хранении *in vitro*.

Получение в зависимости от видовой/формовой принадлежности генотипа до 65-87% жизнеспособных эксплантов в ходе черенкования культуры после хранения дает возможность накопления материала, пригодного для последующего клонального микроразмножения к определенному сроку.

Эффективность приема получения растений-регенерантов на среде без регуляторов роста в культуре изолированных тканей можно оценить по показателям коэффициента мультипликации и интенсивности ризогенеза микроразмножения. Так выход эксплантов при мультипликации березы карликовой и чернокорой формы березы повислой после трех месяцев культивирования составляет 5-8 шт. эксплантов на 1 микрорастение. Данный показатель для клонов карельской и далекарлийской березы различных морфологических форм варьирует в пределах 4-6 шт. эксплантов на растение. Ризогенез микрорастений в существенной мере варьирует в зависимости от видовой принадлежности и генотипа растений. Максимальное укоренение (100% микрорастений) наблюдается для клонов высокоствольной (штамбовой формы) карельской формы березы повислой после 9-12 суток культивирования, число корней при этом составляет 3-8 шт. на 1 растение. Укоренения регенерантов карликовой березы удается достичь лишь после 20-32 суток выращивания, корни формируются тонкие, а их число редко превышает 2-5 шт. на 1 растение.

Акклиматизация микрорастений *ex vitro* успешно проводится на субстрате из верхового торфа, песка или перлита в соотношении компонентов 3:1 или 3:2 и на субстрате из перлита, насыщенно-

го раствором солей по прописи WPM. После 1,5-2,0 месяцев адаптации саженцы достигают размеров около 8,0-16,0 см и пригодны для перевода в условия закрытого грунта питомников.

В результате комплексных исследований морфоорганогенеза и структурно-функциональной адаптации регенерантов к почвенным условиям позволили создать банк генотипов, представленный коллекцией стерильных культур, включающей более 15 клонов и эффективно его использовать. Разработаны технологии клонального микроразмножения для различных видов и форм представителей рода *Betula* L., открывающие широкие возможности для сохранения генофонда и его устойчивого воспроизводства в условиях *ex situ*.

Список использованных источников

1. Мацкевич, Н.В. Охрана редких генотипов лесных деревьев и кустарников. М.: Агропромиздат, 1987. – 207 с.
2. Побирушко, В.Ф. Перспективы хозяйственного использования редких видов берез Беларуси в контексте сохранения их генетических ресурсов / В.Ф. Побирушко // Сборник научных трудов / Институт леса Национальной академии наук Беларуси. – Гомель, 2003. – Вып. 59: Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения). – С. 153-156.
3. Laird, S.A. Linking biodiversity prospecting and forest conservation. In: Pagiola, S., Bishop, J. and Landell-Mills, N. (eds), Selling forest environmental services, Earthscan / S.A. Laird, K. Kate. – London, 2002. – P. 151-172.
4. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001–2011) / P.M. Pijut [et al.] // Propagation of Ornamental Plants. – 2012. – Vol. 12. – P. 25-51.

УДК 581.14.6:634:737

МОРФОГЕНЕЗ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L. В АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ

КУТАС Елена Николаевна, д.б.н., гл.н.с.
Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Вопросу морфогенеза в культуре клеток и тканей посвящена обширная литература. Ее анализ позволяет прийти к выводу, что морфогенез – сложный и многофакторный процесс, зависящий от типа и физиологического состояния экспланта, состава питательной среды, то есть компонентов, содержащихся в ней (макро- и микросолей, витаминов, углеводов, гормональных добавок) и целого ряда других факторов. Подтверждением тому могут служить многочисленные экспериментальные исследования [1-6].

Изучение морфогенеза у интродуцированных сортов брусники обыкновенной было проведено нами для четырех сортов (Koralle, Masovia, Erntedank, Erntekróne) на трех типах питательных сред различных модификаций.

В качестве объектов исследования использовали различные типы эксплантов перечисленных сортов. Эксплантами служили: эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья ювенильных проростков, полученных нами ранее в асептических условиях на модифицированной питательной среде Андерсона, а также почки молодых побегов взрослого материнского растения.

Почки с кусочками стебля длиной 3-4 мм стерилизовали в 0,1% растворе диоксида на протяжении 10 мин., предварительно обмакнув в 70-градусный этиловый спирт, с последующим промыванием в трех сменах стерильной бидистиллированной воды (по 15 мин. в каждой).

Стерильный материал (почки, эпикотиль, гипокотиль, семядоли, листья, корешки) высаживали в колбы одинакового объема (по 15 мл среды в каждой) на три питательные среды: Мурасиге-Скуга, WPM и Андерсона. Каждая среда имела по несколько модификаций, различающихся концентрацией макро- и микросолей, комбинацией гормональных добавок и других компонентов (табл.1).

Высаженные экспланты культивировали при температуре 26⁰С, относительной влажности воздуха 56%, фотопериоде 16 ч, освещенности 4000 лк.

Таблица 1 – Состав питательных сред для изучения морфогенеза у интродуцированных сортов *Vaccinium vitis-idaea*

Компонент, мг/л	Номер модификации среды								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Соли и витамины по MS	+	-	1/2	-	-	1/2	1/2	-	-
Соли и витамины по WPM	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Соли и витамины по Андерсону	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Аденин сульфат	-	80	80	80	80	40	40	80	80
Тиамин	0,4	-	-	0,4	-	0,1	0,1	0,4	0,1
Пиридоксин	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
Индолилуксусная кислота	1,0	5,0	-	2,0	1,0	1,5	2,5	4,0	4,0
Гибберелловая кислота	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-
Бензиламинопурин	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-
Изопентениладенин	10,0	10,0	2,0	5,0	4,0	-	10,0	15,0	15,0
Сахароза, г/л	20	20	20	20	20	20	20	30	30
Агар, г/л	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
pH	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Примечание – Знак (+) – компонент присутствует в среде; знак (-) – компонент отсутствует в среде; ½ – половинная доза компонента в среде.

Таблица 2 – Побегообразование у интродуцированных сортов *Vaccinium vitis-idaea* в зависимости от состава питательной среды

Номер модификации среды	Количество побегов на один эксплант сорта, шт.			
	Koralle	Masovia	Erntedank	Erntekróne
1	8,5±1,2	7,9±2,0	8,0±1,0	7,6±1,5
2	7,5±1,5	7,0±2,0	7,8±1,4	7,4±1,3
3	2,0±1,0	2,5±1,5	2,9±0,0	2,4±1,2
4	3,3±1,5	5,0±1,0	4,5±1,2	5,0±2,0
5	5,5±1,0	5,0±1,2	5,4±2,0	4,1±1,1
6	1,0±1,0	0,9±0,2	1,1±0,5	1,7±1,2
7	1,5±1,1	1,9±1,3	1,0±0,0	1,9±1,0
8	15,0±2,0	14,0±1,0	15,2±2,7	14,7±1,9
9	16,0±2,5	15,0±3,2	16,3±2,9	15,5±2,7

Экспериментальный материал представлен в таблице 2. Цифры в таблице являются средними арифметическими с их стандартными ошибками.

По истечении 5 недель культивирования из почек развились вегетативные побеги у всех сортов брусники обыкновенной. После их пересадки на свежую питательную среду наблюдали пролиферацию новых побегов третьего-четвертого порядков. За четыре недели культивирования из одного микрочеренка образовалось в среднем от 1 до 16 микропобегов в зависимости от состава питательной среды (табл. 2). Из всех исследованных типов сред наиболее активное побегообразование наблюдали на среде WPM (№ 8) и Андерсона (№ 9) (табл. 2), содержащей полный состав макро- и микросолей со следующими добавками в (мг/л): мезоинозит – 100, аденин сульфат – 80, тиамин – 0.4, индолилуксусная кислота – 4, изопентениладенин – 15, сахара – 30 г/л, агар – 6 г/л, pH среды 4,0 (табл. 1).

Этот факт свидетельствует о том, что меняя количество и соотношение компонентов в питательной среде, можно добиться высокого уровня морфогенеза. В данном случае удалось активизировать развитие пазушных меристем путем снятия апикального доминирования и получить регенеранты.

Спустя 4-5 пассажей почти у всех микрочеренков, высаженных для побегообразования, наблюдали ризогенез на среде № 8 и № 9, чего не было отмечено на средах других модификаций. Это служит доказательством универсальности этих типов сред для обоих морфогенетических процессов: побегообразования и ризогенеза.

Образование корней у регенерантов интродуцированных сортов брусники обыкновенной на среде для побегообразования не исключает предположения о том, что в них содержится достаточно эндогенного ауксина, способного вызвать ризогенез.

У остальных эксплантов (эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья) через 5-6 недель культивирования образовался органогенный каллус с последующей регенерацией из него вегетативных побегов.

При этом следует отметить, что образование органогенного каллуса и дальнейшая регенерация побегов характерны для эксплантов (корешок, эпикотиль, гипокотиль, семядоли, листья), полученных из свежесобранных семян, а у эксплантов – из стратифицированных семян побегообразование происходило минуя стадию образования каллуса то есть непосредственно из ткани экспланта.

Таким образом, на основании изучения морфогенеза, протекающего у эксплантов *Vaccinium vitis-idaea* в культуре клеток и тканей на различных типах питательных сред (9 модификаций), показана принципиальная возможность регенерировать ее двумя методами: 1) путем активации пазушных меристем, 2) через пролиферацию каллуса и последующее образование из него побегов.

Список использованных источников

1. Бутенко, Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений / Р. Г. Бутенко – М.: Наука. – 1975. – 51 с.
2. Gupta, S. C. Control of organogenesis in cultures of different vegetative explants of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv / S. C Gupta., N. Chandra // Indian. J. Plant. Physiol. – 1985. – N 2. P. – 145-150.
3. Deepika, R. In vitro regeneration of *Punica granatum* L. plants from different juvenile explants / R. Deepika, K. Kanwar // Fruit Ornam. Plant Res. – 2010. – Vol. 18, N 1. – P. 5-22.
4. Grozeva, S. In vitro plant regeneration of two cucumber (*Cucumis sativum* L.) genotypes: effects of explant types and culture medium / S. Grozeva, N. Velkov // Genetika. – 2014. – Vol. 46, N 2. – P. 485-493.
5. Growth and phytochemical levels in micropropagated *Eucomis autumnalis* subspecies *autumnalis* using different gelling agents, explant source, and plant growth regulators / M. Nqobile [et al.] // In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. – 2015. – Vol. 51, N 1. – P. 102-110.
6. Kaveri, S. Thidiazuron mediated callus and multiple shoot induction in *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer – an important medicinal plant / S. Kaveri, R. Srinath // International Journal of Current Advanced Research. – 2017. – Vol. 6, N 2. – P. 1731-1734.

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛЁНА СЕРЕБРИСТОГО *ACER SACCHARINUM* L. НА ЭТАПЕ АСЕПТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

¹ЛУКОНИНА Юлия Дмитриевна, магистрант

¹КУДРЯШОВА Оксана Александровна, к.б.н.

¹ПОТАПОВА Александра Владимировна

¹БОРИСЕВИЧ Татьяна Александровна

¹ВОЛОТОВИЧ Антон Анатольевич, к.б.н., доцент

²ЖУК Ольга Николаевна, к.б.н.

¹Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр

²Полесский государственный университет

Клен серебристый (*Acer saccharinum* L.) – лиственное дерево до 40 м высотой, отличающееся быстрыми темпами роста (годовой прирост составляет 50 см в высоту и 40 см в ширину) и долговечностью. Древесина клена высоко ценится и находит широкое и разнообразное применение в промышленности и строительстве. По физико-механическим свойствам она приближается к древесине дуба, ее качества выше древесины хвойных пород. Клёны используются в полезащитном лесоразведении; выращиваются при проведении горно-овражных и агролесомелиоративных работ. Они являются одними из самых красивых лиственных деревьев, которые давно применяются для зеленого строительства, листья выделяют в воздух большое количество фитонцидов. Одним из источников получения доходов от эксплуатации кленов является добыча кленового сока, который получают путем подсочки дерева. Листья клёна могут быть применены в качестве лекарственного сырья [1].

Таким образом, *Acer saccharinum* является пока не самой распространённой, но весьма востребованной и перспективной культурой, с возрастающей популярностью и объёмами выращивания.

Из-за влияния на культуру клёна антропогенных факторов, а также восприимчивости к ряду фитопатогенов (*Colletotrichum orbiculare*, представителям родов *Verticillium*, *Phytophthora*, *Ganoderma*), возникает необходимость поддержки и увеличения численности культуры клёна [2].

Актуальным является вопрос получения саженцев данного вида путём микроклонального размножения. Этот принципиально новый метод вегетативного размножения *in vitro* (с лат. – «в пробирке») имеет целый ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения. Биотехнологические методы *in vitro* обеспечивают воспроизводство растения за короткое время с сохранением морфологических и генетических свойств материнского растения, освобождают их от бактериальных и вирусных инфекций, значительно увеличивают коэффициент размножения и обеспечивают массовое получение материала независимо от сезона, характера и периодичности плодоношения, качества семян и факторов окружающей среды [3].

В мировой практике проводились научные исследования по введению клёна серебристого в культуру *in vitro*. Клён серебристый был введён в 1987 году Кернсом и Мейером культуру с применением тидиазурона (TDZ) в среде, что доказывает положительное действие цитокинин-подобного гормона на пролиферацию клеток побега.

В 1991 году Дж. Присом и К. Хьютманом в Университете Южного Иллинойса был проведен научный эксперимент по сравнению действия регуляторов роста на количество побегов *A. saccharinum*, их высоту и объём каллуса. Экспланты выращивали на питательной среде DKW с одним из гормонов роста: зеатином, бензиладенином (BA), кинетином либо изопентениладенином (2iP), в концентрациях 1 и 10 µM. После первого и второго месяца *in vitro*, зеатин с концентрацией 10 µM показал наилучшую активность. Низкая пролиферация клеток эксплантов наблюдалась под воздействием кинетина, 2iP и BA. В следующей части эксперимента сравнивали действие четырёх аминокислот с тидиазуроном в концентрациях 0,001- 0,5 µM. После двух месяцев культивирования *in vitro*, на питательной среде с TDZ с концентрациями 0,01- 0,1 µM, было выявлено большее по сравнению с другими регуляторами роста количество побегов с длиной более 5 мм. Объём каллуса был наибольшим на среде, содержащей зеатин и TDZ в концентрации 0,5 µM. Таким образом, выяснилось, что зеатин и тидиазурон оказывают сравнительно больший эффект на регенерационную способность клёна серебристого [4].

В 2005 году в Китае К. Зао и З. Юань проведены исследования по влиянию различных концентраций тидиазурона на объект исследования *Acer freemanii*, гибрид *A. rubrum L.* и *A. saccharinum L.* Экспланты с пазушными почками помещали на безгормональную среду Мурасиге-Скуга для получения стерильных побегов, которые затем пересаживали на среду с концентрациями тидиазурона (TDZ), варьирующими от 0,05 до 0,01 М. Были отмечены оптимальные для микроклонального размножения *in vitro* концентрации TDZ [5].

Совместное воздействие регуляторов роста на регенерационную способность было исследовано в 2009 году К. Мансори и Дж. Прис. В эксперименте использовали BA, гиббереллин GA₃ и TDZ. Бензиладенин и/или гиббереллин GA₃ применяли в концентрациях 0, 0,3, 1, 3, 10 и 30 mM при раздельном использовании, и 1, 10, или 30 mM при совместном использовании гормонов, нанесённых в составе белой латексной краски на фрагменты стебля. После выгонки побегов, экспланты помещались на питательную среду DKW с концентрацией TDZ 0 или 0,01М. Были выявлены следующие результаты: экспланты, полученные из стеблей, покрытых составом с 3 mM BA и культивируемых на среде с 0,01 М TDZ, образовали большее количество побегов и больший объём каллуса, чем из стеблей с другой концентрацией BA. Добавление в краску GA₃ не вызывает стимуляции клеточного деления и роста почек, а при обработке стеблей двумя гормонами, лучшие результаты наблюдали при использовании 1 mM BA и 1 mM GA₃ в составе краски [1].

В июле 2017 года на базе учреждения “Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр” началась разработка способа асептического введения, стабилизации и размножения *in vitro* клёна серебристого.

Исходя из имеющихся на сегодняшний день данных, выбор гормона роста влияет на успех введения *Acer saccharinum L.* в культуру *in vitro*. Кроме того, необходимо учитывать концентрацию и совместное действие регуляторов роста. Отмечена высокая пролиферативная активность эксплантов в присутствии тидиазурона или зеатина в питательной среде, что будет учитываться при наших дальнейших исследованиях.

Список использованных источников

1. Mansouri, K. The influence of plant growth regulators on explant performance, bud break, and shoot growth from large stem segments of *Acer saccharinum L.* / K. Mansouri, J. E. Preece // Plant Cell Tiss Organ Cult. – USA, 2009. – P. 313-318.
2. Ciesla, W.M. Decline and dieback of trees and forests. A global overview / W. M. Ciesla, E. Donaubauer // FAO Forest Resources Division. – Rome, 1994. – 92 p.
3. Zhao, X.Q. The influence of thidiazuron on proliferation of *Acer × freemanii* *in vitro* / X.Q. Zhao, Z.H. Yuan // XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People. – China, 2010. – P. 143-147.
4. Bunn, E. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot / E. Bunn, Shane R. Turner, Kingsley W. Dixon // The Society for In Vitro Biology. – Australia, 2011. – P. 188-201.
5. John, E. Preece Micro- and cutting propagation of silver maple. Results with adult and juvenile propagules / J. E. Preece, C. A. Huettelman // Journal of the American Society for Horticultural Science № 116, 1991. – P. 142-148.

УДК 581.143.6+581.176

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ КАЛЛУСНЫМИ КУЛЬТУРАМИ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ И ЭХИНАЦЕИ БЛЕДНОЙ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

НЕСТЕР Гражина Владимировна, студент
ДИТЧЕНКО Татьяна Ивановна, к.б.н., доцент
Белорусский государственный университет

Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea L.* Moench) относится к числу фармакопейных растений, содержащих фенолпропаноиды (гидроксикоричные кислоты и их производные) в качестве ведущей группы биологически активных соединений. Наиболее характерный компонент – цикориевая кислота, обуславливающая иммуномодулирующую и противовирусную активность препаратов на основе сырья данного растения [1]. К сопутствующим фенолпропаноидам относят ко-

фейную и хлорогеновую кислоту. Наряду с эхинацеей пурпурной значительный интерес представляет эхинацея бледная (*Echinacea pallida* (nutt.) Nutt.), корни которой являются фармакопейным сырьем ряда европейских стран [2]. Каллусные культуры эхинацеи пурпурной сохраняют способность интактного растения к синтезу таких фенолпропаноидов как цикориевая, кафтаровая, хлорогеновая кислоты, и, следовательно, представляют собой альтернативный природному сырью биотехнологический источник фитопрепаратов с иммуномодулирующей активностью [3]. При этом актуальным является поиск условий культивирования, способствующих возрастанию продукции фенолпропаноидов культурами клеток представителей рода *Echinacea*.

Минеральный состав сред питательных сред для культур растительных клеток и тканей оказывает большое влияние на синтез вторичных метаболитов, при этом наиболее важно содержание такого макроэлемента как азот. Биосинтетическая активность культивируемых *in vitro* растительных клеток и тканей зависит от соотношения неорганических форм азота – NH_4^+ и NO_3^- . Изменение оптимального соотношения данных ионов, как в сторону увеличения, так и снижения поразному воздействует на ростовые процессы и накопление вторичных метаболитов [4, с. 192].

Целью настоящей работы явилось исследование зависимостей уровней накопления гидрокси-коричных кислот и их производных в каллусных культурах *E. purpurea* и *E. pallida* при снижении концентрации аммонийного и нитратного азота в питательной среде.

Объектами исследования служили длительно пассируемые каллусные культуры указанных лекарственных растений, полученные из листовых эксплантов. В работе использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга (МС), которая отличается от других сред для культивирования растительных клеток и тканей очень высоким содержанием аммонийного и нитратного азота. В контроле культивирование каллусов осуществлялось на питательной среде МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, 0,5 мг/л кинетина и 1 мг/л β -индолил-3-уксусной кислоты, 8 г/л агар-агара. Опытные варианты питательных сред представляли собой модификации указанной среды, для которых было характерно снижение вдвое концентрации ионов NO_3^- (вариант 1), исключение нитратного азота (вариант 2), исключение аммонийного азота на фоне 40 ммоль/л NO_3^- (вариант 3), исключение аммонийного азота на фоне 20 ммоль/л NO_3^- (вариант 4), а также одновременное исключение обоих источников азотного питания (вариант 5). При приготовлении опытных вариантов производилась замена KNO_3 на KCl (для исключения нитрата и сохранения калия), NH_4NO_3 на NH_4Cl (для исключения нитрата и сохранения аммония), NH_4NO_3 на NaNO_3 (для исключения аммония и сохранения нитрата). Культивирование каллусов осуществляли в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 25°C. Продолжительность ростового цикла составляла 30-32 сут. Для определения суммы гидрокси-коричных кислот и их производных использовали метод прямой спектрофотометрии [5]. Оценку прироста биомассы каллусных тканей и уровней накопления в них целевых фенолпропаноидов производили в стационарную фазу ростового цикла.

При изучении закономерностей прироста биомассы каллусной культуры *E. purpurea* в условиях дефицита азота в питательной среде было установлено, что уменьшение вдвое концентрации нитрата (от 40 ммоль/л до 20 ммоль/л) не приводило к изменению индекса роста культуры. При полном исключении нитратного азота либо одновременном исключении обоих форм азотного питания индекс роста каллусов уменьшался более чем в 2 раза относительно контроля. В случае каллусной культуры *E. pallida* отсутствие в питательной среде NH_4^+ не приводило к замедлению прироста биомассы каллусов, если концентрация нитрат-ионов составляла 40 и 20 ммоль/л. При полном исключении из питательной среды аммонийного и нитратного азота индекс роста каллусов снижался более чем в 3 раза по сравнению с контролем.

Количественное определение содержания гидрокси-коричных кислот и их производных в водно-спиртовых экстрактах из каллусной культуры *E. purpurea* показало, что резкое повышение уровней их накопления происходит при использовании безаммонийных вариантов питательных сред. Максимальный стимулирующий эффект отмечался в присутствии в среде 20 ммоль/л нитрата в качестве единственного источника азота (вариант 4). В этом случае уровни накопления гидрокси-коричных кислот были более чем в 4 раза выше по сравнению с контролем. При уменьшении вдвое концентрации нитратного азота в питательной среде МС на фоне 20 ммоль/л ионов аммония содержание гидрокси-коричных кислот и их производных в каллусах *E. purpurea* снижалось в 1,4 раза. В условиях полного отсутствия источников азотного питания содержание анализируемых фенолпропаноидов в исследуемой каллусной культуре было в 1,6 раза ниже относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют о непригодности безнитратных питательных сред для культивирования каллусов *E. purpurea*.

Уровни накопления гидроксикоричных кислот в каллусной культуре *E. pallida*, выращиваемой на полной питательной среде МС, были в среднем в 2,5-3 раза ниже по сравнению с каллусами *E. purpurea*. В условиях дефицита азота их содержание в наибольшей степени повышалось при исключении ионов аммония из питательной среды МС, т.е. в присутствии 40 ммоль/л NO_3^- (вариант 3). Стимулирующий эффект достигал в среднем 1,5 раза. Достоверное возрастание содержания гидроксикоричных кислот наблюдалось и в случае полного исключения аммонийного азота на фоне 20 ммоль/л NO_3^- (в 1,3 раза относительно контроля). В аналогичных условиях рост уровней накопления гидроксикоричных кислот в каллусах *E. purpurea*, как отмечалось ранее, был гораздо выше. Следовательно, каллусная культура *E. pallida* оказалась менее подверженной регуляторному влиянию дефицита источников азотного питания по сравнению с каллусной культурой *E. purpurea*.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что для повышения продукции гидроксикоричных кислот каллусами *E. purpurea* целесообразно полное исключение аммонийного азота на фоне 20 ммоль/л NO_3^- , а в случае каллусов *E. pallida* использование 40 ммоль/л NO_3^- в качестве единственного источника азота. На указанных вариантах питательных сред отмечалась выраженная стимуляция биосинтетического потенциала культур при полном сохранении их ростовой активности. Можно предположить, что отсутствие аммония, который играет важнейшую роль в процессах биосинтеза белка как ключевого компонента первичного метаболизма, приводит к изменению баланса между реакциями первичного и вторичного обмена веществ в сторону последнего. Для исследуемых каллусных культур это выражается в стимуляции накопления таких вторичных метаболитов как фенилпропаноиды.

Список использованных источников

1. Фитохимический состав представителей рода эхинацея и его фармакологические свойства / А. В. Самородов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – Т. 30, № 4. – С. 32-37.
2. Кисличенко, В. С. Эхинацея бледная — *Echinacea pallida* (nut.) Nutt. Аналитический обзор / В. С. Кисличенко, А. В. Дьяк, О. М. Кошевой // Провизор. – 2008. – № 8. – С. 18-29.
3. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea* / Т. И. Дитченко [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 55-63.
4. Endress, R. Plant Cell Biotechnology / R. Endress. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. – 353 p.
5. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* / В. А. Куркин [и др.] // Растительные ресурсы. – 1998. – Т. 34, Вып. 2. – С. 81-85.

УДК 535.62:635.21

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

НИКОНОВИЧ Тамара Владимировна, к.б.н, доцент

КАРДИС Татьяна Вацлавовна, к.с.-х.н., с.н.с.

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

ЦВИРКО Виталий Иванович, начальник испытательной лаборатории

Центр светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси

В настоящее время для размножения картофеля широко применяются биотехнологические методы, одним из которых является микрклональное размножение *in vitro*. К преимуществам данного метода относится возможность получения большого количества оздоровленного посадочного материала за короткое время в регулируемых условиях среды, а также быстрое размножение дефицитных сортов. Однако эффективность размножения растений в условиях *in vitro* зависит от влияния различных факторов, как внешних, так и внутренних. К внутренним относятся: генетические, гормональные, физиологические. К внешним: физические (температура, свет, фотопериод, влажность, аэрация) и химические или состав искусственной питательной среды. На размножение в пробирочной культуре также оказывают влияние возраст материнского растения, генотип, сезон введения в культуру *in vitro*, величина и качество первичного экспланта [3].

Солнечный свет или тот, который мы получаем при использовании ламп, не является однородным, входящие в него лучи имеют разную длину волны. Из всего спектра для жизни растений важна фотосинтетически активная (380-710 нм) и физиологически активная радиация (300-800 нм).

Основными поставщиками энергии для фотосинтеза являются красные (720-600 нм) и оранжевые (620-595 нм) лучи. Они влияют на изменение скорости роста и развития растений. Их избыток, например, задерживает переход растения к цветению. Лучи (490-380 нм) синего и фиолетового спектра непосредственно участвуют в фотосинтезе, а также стимулируют образование белков и обеспечивают скорость развития растения [4].

Эффективность светодиодных светильников обусловлена их монохроматическим излучением. Фитоактивная часть спектра подбирается непосредственно под культивируемое растение, что дает преимущество в отсутствии излишнего теплового и ультрафиолетового излучения, исключается риск ожогов и обезвоживания [2].

Светодиоды, используемые в фитотронах, являются довольно перспективными в плане их высокой светоотдачи, регулировки спектра излучения, длительного ресурса работы. Но для этого требуется проведение дополнительного анализа воздействия светового излучения на развитие и рост растений конкретного вида.

Главная задача при производстве оздоровленных растений картофеля – это увеличение коэффициента размножения и скорости отрастания после черенкования, поэтому необходимость оптимизации условий выращивания *in vitro* стоит достаточно остро [1].

Целью наших исследований являлось изучение влияния спектрального состава света на развитие растений-регенерантов картофеля, а также определение типа светодиодного светильника, при котором в контролируемых условиях *in vitro* у растений формируется высокий коэффициент размножения.

Материал и методы исследований. Работа проводилась на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии БГСХА. Объектами исследования служили три белорусских сорта картофеля: раннеспелый Лилея, среднеранний Архидея и среднеспелый Скарб.

Черенки помещались по одному в пробирки для культивирования с искусственной питательной средой Мурасиге-Скуга. Выращивание проводилось в культуральном помещении, где установлен автоматический температурный режим +24-26°C, влажность воздуха 70-80%, длина светового дня 16 часов, освещенность 4000-6000 лк. Источниками света являлись фитолампы LED различной модификации, которые отличались соотношением спектров R/B (красный/синий) в пределах от 1,3 до 7,8. Всего 12 вариантов освещения. В качестве контроля использовались люминесцентные лампы. Состояние растений-регенерантов оценивалось через 21 день после черенкования по следующим признакам: высота растения (см), количество листьев (шт.), площадь листовой пластинки (мм²), длина корней (см), количество корней (шт.).

Результаты и обсуждение. По всем признакам различия по вариантам освещения были достоверны. В отдельных вариантах сортовые различия незначительны, в других – превышают различия между вариантами освещения. При использовании определенных типов светильников различия между сортами были небольшими, в других вариантах выявлены значительные сортовые различия.

Максимальный интерес представляет признак количество листьев на растении. Этот признак тесно коррелирует с коэффициентом размножения растений-регенерантов, поскольку при черенковании количество новых растений напрямую зависит от числа междоузлий на материнском растении. Результаты исследований представлены на рисунке.

В варианте 5 показатели признака наименьшие и разница между сортами незначительна. При использовании фитоламп вариантов 8 и 11 количество листьев на опытных растениях картофеля было наибольшим.

Относительно сортовых различий выявлено, что максимальная разница по количеству листьев у растений-регенерантов проявилась в вариантах осветителей 1, 3, 8 и 11, минимальная – в вариантах 2, 4 и 5. Самую значительную зависимость данного признака от типа освещения проявил сорт Архидея – от 6,3 до 12,3 листа на растении.

Следовательно, при выращивании растений картофеля в культуре *in vitro* установлена зависимость проявления признака от спектрального состава света конкретного светодиодного светильника и выявлены сортовые различия при одинаковом качестве освещения. Таким образом, подбирая оптимальный тип светильника для микроклонального размножения растений картофеля в условиях *in vitro*, необходимо отдавать предпочтение фитолампам, при освещении которыми среднее значение признака всех испытываемых сортов будет наибольшим. В нашем эксперименте

выявлен оптимальный светодиодный светильник, а, следовательно, и спектральный состав света, при котором коэффициент размножения практически не отличался между сортами и составлял 7,7-8,3. Сортные различия при выборе светильника для широкого применения при массовом размножении растений являются вторичными.

Список использованных источников

1. Смолеговец Д.В. Инновации в системе клонального микроразмножения картофеля и выращивания биотехнологических микроклубней / Д.В. Смолеговец, Б.В. Анисимов // Картофелеводство (результаты исследований, инновации, практический опыт). – Т.1. – М., 2013. – С.304-310.
2. Тихомиров А.А. Светокультура растений в теплицах / А.А. Тихомиров, В.П. Шарупич, Г.М. Лисовский // Издательство СО РАН. – Новосибирск, 2013. – 205 с.
3. Фёдорова Ю.Н. Влияние света разного спектрального состава на рост растений картофеля *in vitro* / Ю.Н. Фёдорова, Н.В. Лебедева // Известия Великолукской ГСХА, 2016. – №4. – С.2-7.
4. Morphogenesis of Potato Plant *in vitro*. I Effekt of light quality and hormones / N.P. Aksenova, T.N. Konstantinova, L.I. Sergeeva, I. Machachkova, S.A. Golyanovskaya // J. Plant Growth Regul. – 2014. – V.13. – P.143-146.

УДК 634.8.034:631.532:631.589

АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ВИНОГРАДА НА ИОНООБМЕННОМ СУБСТРАТЕ ТРИОНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКАХ ИСКУССТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

ОЛЕШУК Евгений Николаевич, научный сотрудник
ЯНЧЕВСКАЯ Тамара Георгиевна, к.б.н.

Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси

НИКОНОВИЧ Тамара Владимировна, к.б.н., доцент

ФРАНЦУЗЕНКО Анастасия Васильевна, студент

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

ЦВИРКО Виталий Иванович, начальник испытательной лаборатории

Центр светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси

При культивировании посадочного материала в системе семеноводства и питомниководства нередко возникают трудности в процессе пересадки растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*, в принципиально новые условия выращивания. Разработанный субстрат Триона является полноценной питательной средой (почвой) для растений, содержит все необходимые элементы минерального питания в легкодоступной ионообменной форме и может использоваться в течение длительного времени, удобен в работе при пересадке растительного материала из условий *in vitro* [1, 2].

Цель исследований – дать оценку адаптации и развития растений-регенерантов винограда, полученных в культуре *in vitro*, при переводе их на корнесобственное питание на ионообменном субстрате Триона (ионитопоника) под различными источниками искусственного освещения.

Объекты и методы исследований. Для исследований выбраны районированные и перспективные универсальные (*Маршал Фош*, *Маркетт*) и столовые (*Аладдин*, *Красотка*, *Чарли*) сорта винограда раннего срока созревания различной генетической природы и происхождения.

В качестве фитоламп использовались искусственные источники освещения LED. Их применение позволяет подобрать нужный спектр любого диапазона ФАР в оптимальных соотношениях. В наших экспериментах применялись светильники ДНБ01-3х9-001 У4.1 «Светодар» различных модификаций с соотношением спектров R/B (красный/синий) в пределах от 1,3 до 7,8 и эффективно излучения фотонов около 2 мк-моль/с (Вт).

Методы исследований: биохимические, аналитические, морфометрические.

Растения-регенеранты винограда из стерильной культуры *in vitro* пересаживали в ионообменный субстрат Триона в пластиковые контейнеры с крышками 21х21х8 см для адаптации к естественным условиям минерального питания.

Корневую систему пробирочных растений отмывали от остатков искусственной питательной среды в 0,3% растворе KMnO_4 . Высокую влажность в контейнерах поддерживали путем опрыски-

вания растений из пульверизатора. При этом одновременно осуществляли полив по мере необходимости.

Прозрачные контейнеры с растениями помещали под источники искусственного света LED различных модификаций и контрольные лампы ДНаТ-400. Культивирование растений осуществляли при 14-часовом фотопериоде. Температуру поддерживали автоматически в пределах 24-25⁰С.

Результаты работы и их обсуждение. Для природно-климатических условий Беларуси, вся территория которой относится к зоне рискованного земледелия, наибольший интерес представляют сорта, сочетающие высокую стрессоустойчивость и биологическую пластичность, способные легко приспосабливаться к неблагоприятным факторам внешней среды [2, 3].

В естественных условиях адаптация и развитие саженцев винограда происходят в пределах, обусловленных генотипом конкретного вида и сорта. Вместе с тем, растения-регенеранты предъявляют особые требования к новой среде произрастания [1, 4]. При переводе микроросаженцев винограда в условия естественного минерального питания необходимо учитывать, что для корневой системы растений *in vitro* характерно отсутствие корневых волосков, выполняющих функцию всасывания биогенных элементов из почвы. Адаптация к новым условиям занимает обычно 13-18 суток (от сорта) и отмечается по активизации ростовых процессов. При переносе растений-регенерантов *ex vitro* недостаток доступных питательных веществ значительно увеличивает время адаптации, замедляет рост и развитие, поэтому оптимальный уровень минерального питания на ранних стадиях ризогенеза имеет принципиально важное значение.

В ходе исследований установлено, что растения-регенеранты винограда обладают высокой приспособительной способностью к адаптации и развитию на ионообменном субстрате Триона. Выявлены значительные сортовые различия и особенности к адаптации микроросаженцев винограда. В частности, наибольшая адаптивность отмечается у саженцев сорта *Маркетт* под LED-источником «Светодар» с соотношением спектров R/B (красный/синий) 1/3, - на уровне контроля (под лампами ДНаТ-400). У этих светильников более мощный световой поток и интенсивность излучения фотонов, при уровне освещенности в пределах 3-5 тыс. люкс. У других сортов выявлена та же тенденция в процессе адаптации, но процент прижившихся растений под LED-источником был ниже. Так, у столовых сортов *Красотка* и *Аладдин* он составил 48% и 64% соответственно, что связано, прежде всего, с их генетическими и сортовыми особенностями, а также с более низким уровнем стрессоустойчивости.

Большое влияние на приживаемость растений-регенерантов оказала степень развития их к моменту перевода из пробирки на корневое питание. Лучший вариант адаптации микроросаженцев наблюдался, когда у большинства из эксплантов активно протекали процессы ризогенеза и фотосинтеза, а на момент пересадки в условиях *in vitro* образовалось не менее 4-5 новых междоузлий и 5-6 листьев. При этом худшая приживаемость наблюдалась у растений, имеющих сильно развитую, но переплетенную в пробирке корневую систему (сорт *Маршал Фови*), которая травмируется при пересадке.

Нами установлено, что приживаемость в субстрате Триона растений-регенерантов в значительной степени зависит от состояния их корневой системы. Необходимо, чтобы у растений в пробирке сформировались не менее 3-4 пяточных корней, причем не следует давать возможность им чрезмерно вытягиваться и переплетаться. Пяточные корешки длиной 3-4 см при адаптации пробирочных растений *ex vitro* прочно удерживают их в субстрате, они быстро возобновляют рост и продолжают развиваться в новых условиях культивации.

Также выявлено, что значительное влияние на приживаемость растений в нестерильных условиях имеет степень их развития в пробирках *in vitro*. Предпочтительнее адаптировать растения-регенеранты с 5-6 хорошо развитыми листочками. Такие растения успешно формируются на искусственной питательной среде Мурасиге-Скуга, уменьшенной на половину по основному составу. Причем, как показали наши эксперименты, указанный состав питательной среды пригоден для большинства сортов винограда, не зависимо от их генетической природы и происхождения.

Дальнейший биотехнологический процесс предусматривает процедуру повторной пересадки растений винограда в отдельные сосуды для их доращивания и получения стандартных саженцев с закрытой корневой системой. Обычно это проводится на 15-21-е сутки после возобновления роста у растений, уже адаптированных к ионообменному субстрату Триона в условиях ионитопоники.

Заключение. Ионообменный субстрат Триона показал себя как полноценная и надежная среда для адаптации и развития растений-регенерантов винограда, полученных при микрклональном размножении. Он значительно облегчает и ускоряет процесс адаптации растений *ex vitro* и способствует динамичному росту и развитию саженцев на всех этапах.

Кроме того, выявлено положительное взаимодействие оптимизированного ионообменного субстрата Триона и искусственного светодиодного освещения с преобладанием синего света 1/3 R/B (красный/синий), который стимулирует экспрессию генов стрессоустойчивости, что обеспечивает лучшую приживаемость, рост и развитие микросаженцев винограда в условиях *ex vitro*.

Список использованных источников

1. Бургутин А.Б. Микрклональное размножение винограда: Перевод растения в почвенную культуру // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Междунар. конф.: Тез. докл. Новосибирск, 1988. – Т. 2. – С. 312.
2. Янчевская Т.Г. Оптимизация минерального питания растений. / Издательство Минск, «Беларуская навука». – 2014. – 458 с.
3. Голодрига П.Я., Зленко В.А., Чекмарев Л.А. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. Ялта. - 1986. - 56 с.
4. Зленко В.А., Котиков И.В., Трошин Л.П. Размножение оздоровленного посадочного материала винограда в культуре *in vitro* // Садоводство и виноградарство. – 2005. - № 1 – С. 21-23.

УДК 577.175:582.284

ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ

ОСОЧУК И.М., магистрант
ЖУК Ольга Николаевна, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

Растения ведут прикрепленный образ жизни и поэтому лишены поведенческого уровня адаптации. Для сохранения вида в неблагоприятных условиях, при таком образе жизни возможно лишь путем формирования эффективных механизмов приспособлений [2]. Показано, что для растений в качестве мощных адаптогенов выступают гормоны. Особый интерес представляет группа фитогормонов – brassinosteroidов, для адаптации к условиям среды.

Первый представитель группы – brassinolid – был выделен американскими учеными в 1979 году в виде кристаллического вещества в количестве 4 мг из 40 кг пыльцы рапса. Установлено, что данные гормоны у растений изменяют ферментативную активность, мембранный потенциал, активируют синтез белков и нуклеиновых кислот, изменяют состав аминокислот и жирных кислот, что приводит к стимуляции удлинения и деления клеток [4]. Эти сдвиги на клеточном уровне отражаются усилением роста и повышением продуктивности. Среди преимуществ brassinosteroidов можно отметить их экологическую безопасность и способность вызывать биологические эффекты в очень низких концентрациях по сравнению с другими группами растительных гормонов [5]. В настоящее время изолировано 69 природных brassinosteroidов. Высокая биологическая активность показана только для некоторых представителей brassinosteroidов, включая brassinolid, 24-эпibrassinolid и 28-гомоэпibrassinolid.

Данная группа соединений структурно близка к стероидным гормонам теплокровных животных, рыб и насекомых. Brassinosteroidы оказывают разнонаправленные эффекты на указанные классы животного мира. В научной литературе регулярно появляются новые сведения о роли этих соединений в биорегуляции метаболизма человека [6].

Грибы, как и растения неподвижны, подвержены влиянию стрессовых условий. Им также необходимы приспособительные механизмы адаптации, о которых известно не так много. Исследование влияния рассмотренных выше brassinosteroidов на рост и развитие культуры и плодовых тел мицелиальных грибов представляет большой интерес. Было показано, что brassinolidы оказывают влияние на плодообразование шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporas*) [1]. Неприхотлива в отношении источников питания, проста в получении мицелиальной культуры вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*). На ее культуре исследовалось влияние синтетического brassinosteroidа – эпина на рост мицелия. Было установлено, что максимальный его рост на агаризованной, а также жидкой среде с эпином достигается в концентрации $2,5 \times 10^{-8}$ мг/мл. Концентрация эпина в жидкой среде $2,5 \times 10^5$ мг/мл и выше вызывала ингибирование роста мицелиальных клеток [3].

Остается открытым вопрос о том, каков механизм разнонаправленного действия других представителей brassinостероидов на выращивание мицелиальных грибов.

Учитывая высокую биологическую эффективность и безопасность применения brassinостероидов в современном растениеводстве, представляет интерес изучение данных соединений в других областях биотехнологии, в том числе и в промышленном грибоводстве.

Список использованных источников

1. Бисько, Н.А., Дудка И.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка. Киев: Наукова думка. – 1987. – С.69-73.
2. Ефимова, М. В. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса brassinостероидами. / Ефимова М. В., Савчук А. Л., Хасан Дж. А. К. // Физиология растений. – 2014. – С. 778-789.
3. Польских, С.В. Влияние биологически активных компонентов и минеральных солей на рост и развитие мицелия гриба вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). Авторф. дисс., канд. биол. наук. – Воронеж, 2012. –169 с.
4. Fridman, Y. Brassinosteroids in growth control: How, when and where. // Fridman Y., Savaldi-Goldstein S. // Plant Sci.– 2003. – Vol.209. – P. 24-31.
5. Khripach, V.A. New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. //Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Khripach N.B. – In: Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity, Hayat S., Ahmad A. (eds.) Eds. Dordrecht: Kluwer. – 2003. – P. 189-230.
6. Zhabinskii, V. N. Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom // V. N. Zhabinskii, N. B. Khripach, V. A. Khripach. // – Steroids – 2015 – Vol. 97 – P. 87-97.

УДК 575.222.7:581.1

СОСТАВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ *ARTEMISIA ANNUA* L.

¹РЕШЕТНИКОВ Владимир Николаевич, академик, д.б.н.

¹ШУТОВА Анна Геннадьевна, к.б.н., доцент

¹ШИШ Светлана Николаевна

²МАТВЕЕВА Надежда Анатольевна, д.б.н.

²ДРОБОТ Катерина Александровна, аспирант

³ШАБУНЯ Полина Станиславовна, к.б.н.

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Результаты фармакологических исследований полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) характеризуют это растение как перспективный источник для создания новых лекарственных средств с антималярийной, антимикробной, цитотоксической активностью [1]. Начиная с момента открытия уникальных свойств артемизинина различными исследовательскими группами проводится систематическое изучение как отдельных органов растения, так и веществ, синтезируемых эндофитами полыни однолетней. Из полыни однолетней выделено и идентифицировано более 300 природных соединений, среди которых терпеноиды, фенольные, полиацетиленовые соединения, алкалоиды.

Культуру трансгенных («бородатых») корней получают путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации. Такие корни способны к изолированному росту на безгормональной среде и являются перспективным источником ценных биологически активных соединений [2]. В связи с этим, целью данного исследования была оценка состава фенольных соединений «бородатых» корней полыни однолетней в сравнении с растениями, культивируемыми в полевых условиях.

Материалы и методы исследования. Культура трансгенных корней была получена ранее [3] специалистами Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины путем *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации векторами pCB124, и pCB161, которые несли ген интерферона- $\alpha 2b$ человека (*ifn- $\alpha 2b$*) и ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*), а также диким штаммом *A. rhizogenes* A4. Корни культивировали *in vitro* на протяжении 30 суток при температу-

ре 24±2°C на питательной среде Мурасиге и Скуга с уменьшенным вдвое содержанием макросолей. Затем растительный материал подвергался лиофильной сушке и использовался для экстракции 96% этанолом.

Для анализа содержания **флавоноидов и гидроксикоричных кислот** был выбран метод количественного экстракционно–спектрофотометрического определения суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах растений [4]. Для определения общего содержания **фенольных соединений** применяли метод Фолина-Чокальтеу. Для калибровки использовали галловую кислоту в диапазоне концентраций 0,05–0,75 г/л.

Анализ содержания **фенольных кислот** в экстрактах полыни методом ВЭЖХ проводили для спиртовых экстрактов, полученных двукратной экстракцией 96% этанолом. Экстракты полыни переносили в хроматографическую виалу и использовали в работе. Для анализа был использован хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным детектором. Разделение компонентов проб проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1×150 мм; 1,8 мкм) при температуре +40°C. Детекция при длине волны 330 нм. В качестве подвижной фазы А использовали 0,15 об.% раствор уксусной кислоты в деионизованной воде (рН 3,5); подвижной фазы В – 100% ацетонитрил. Скорость потока – 0,3 мл/мин. Был использован градиентный режим элюирования. Время анализа 32 минут.

Производные кофейной кислоты были идентифицированы по масс-спектрам, которые содержали характерные ионы [M+H]⁺ с m/z 517 дикофеоилхинных кислот и с m/z 679 для трикофеоилхинной кислоты. Также масс-спектры этих соединений содержали характерный фрагмент с m/z 163, появляющийся при отщеплении кофейной кислоты. Наличие этих соединений в экстракте полыни согласуется с литературными данными [5].

Результаты исследования. Установлено достаточно высокое содержание фенольных соединений в растениях полыни однолетней, выращенных на опытном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси (табл.1). Для исследованных линий «бородатых» корней содержание фенольных соединений значительно варьировало, максимальное накопление отмечено в линии 6, где синтез фенольных соединений был практически также эффективен, как и у растений в полевых условиях. В результате анализа состава фенольных соединений показано преобладание гидроксикоричных кислот, в то время, как количество флавоноидов как в растениях, так и в культуре трансформированных корней было значительно ниже.

Таблица 1 – Фенольные соединения *A. annua*, мг/г сухого растительного сырья

Образцы экстрактов	Гидроксикоричные кислоты	Флавоноиды	Фенольные соединения
Растения, выращенные в полевых условиях	20,28±1,1	4,5±0,1	28,4±2,7
«Бородатые» корни, линии			
1	11,34±1,8	2,2±0,1	14,8±1,6
2	9,21±0,5	следы	не опр.
3	13,67±2,1	1,1±0,2	13,4±2,0
4	10,49±0,8	следы	9,51±1,3
5	14,94±1,1	0,05±0,1	18,3±2,0
6	23,7±1,6	следы	24,4±4,9

Результаты хроматографического анализа также подтвердили преимущественно наличие гидроксикоричных кислот в спиртовых экстрактах растительного сырья полыни однолетней (табл. 2).

Таблица 2 – Фенольные кислоты растений *Artemisia annua* L.

Образцы экстрактов	Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	Дикофеоилхинная кислота			3- кофеоилхинная кислота	Общее количество фенольных кислот
			Изомер 1	Изомер 2	Изомер 3		
Растения, выращенные в полевых условиях							
	5,93	-	7,14	6,13	0,78	0,15	20,13
«Бородатые корни», линии							
1	1,52	-	2,83	5,25	1,12	-	10,72
2	0,76	-	1,18	2,03	0,37	0,16	4,50
3	0,94	0,11	2,76	3,66	1,28	1,31	10,06
4	0,78	-	2,36	2,71	0,82	0,47	7,14
5	1,78	-	4,93	7,50	2,65	1,43	18,29
6	2,77	0,14	5,80	14,48	2,41	1,26	26,86

Публикация содержит результаты исследований, которые были проведены при грантовой поддержке Державного фонду фундаментальних досліджень (ДФФД) Украины и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) в рамках проектов №Ф73/2-2017 (ДФФД) и № Б16К-073 (БРФФИ).

Список использованных источников

1. Коновалов, Д.А. Биологически активные соединения полыни однолетней. Эфирное масло / Д.А. Коновалов, А.А. Хамилонов // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4. – № 4. – С. 4-33.
2. «Косматые» корни растений - важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей / Кулуев Б.Р. [и др.] // Биомика. – 2015. – Т. 7. – № 2 – С. 70-120.
3. Дробот, К.О. Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes*. / Дробот К.О. [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С.117-120.
4. Косман, В.М. Количественное экстракционно–спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Растительные ресурсы. – 2001. – Т. 37, вып. 4. – С. 123-129.
5. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties // S.Bourgou, [et al.] // Food Research International. – 2017. – in press/ doi: 10.1016/j.foodres.2017.06.009

УДК 582.287.238:57.082.26

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И УСЛОВИЙ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫРАЩИВАНИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PLEUROTUS OSTREATUS*)

САКОВИЧ Валерия Васильевна, м.б.н.
ЖУК Ольга Николаевна, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

Вешенка обыкновенная – съедобный гриб с хорошими пищевыми качествами, у которого обнаружена также ферментативная активность, что привлекает интерес к нему как к легко воспроизводимому источнику биологически активных субстанций [2, с.159]. Наряду с асептическим массовым производством плодовых тел вешенки ведутся исследования в области глубинной культуры [3, с.240]. *P. ostreatus* выращивается по всему миру, не токсичен, а его плодовые тела перспектив-

ны для всестороннего исследования, так как могут являться относительно дешевым и удобным сырьем для получения ферментных препаратов [1, с.139].

Целью работы являлся подбор экономически выгодных питательных сред и условий культивирования *P. ostreatus* для достижения наибольшей урожайности.

Исследования были проведены в научно-исследовательской лаборатории «Прикладной и фундаментальной биотехнологии» на базе УО «Полесский государственный университет». Был использован «дикий» штамм *P. ostreatus*, выделенный в 2014 г. из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.) в г. Минске. Для приготовления питательной среды применялся солод ржаной сухой неферментированный ГОСТ 29272. 200 г солода заливали 3 л воды и настаивали 24 часа, перемешивая 5 раз в течение настаивания. Отфильтровывали раствор, разливали по колбам и стерилизовали в автоклаве 40 мин при 112°C. Для приготовления картофельно-сахарозной среды навеску сырья нарезали ломтиками толщиной 3-4 мм (корнеплоды предварительно очищали), варили под крышкой в кипящей воде 20 мин, отфильтровывали отвар, доливали его водой до недостающего расчетного объема, разливали по колбам и стерилизовали в автоклаве 40 мин при 112°C. Для картофельно-сахарозной среды использовали картофель сорта Скарб. Применялась пищевая сахароза ГОСТ 21-94. Инокулюм вводили в виде фрагментов ковра мицелия площадью 1 см² в картофельно-сахарозную среду или среду с использованием ржаного неферментированного солода. Выращивали в течение 2х недель при температурах 26° С, 27° С и 28° С в стеклянных колбах объемом 500 мл на шейкере или в автоклавируемом ферментере LiFlus GX при скорости перемешивания 70 и 100 об/мин.

При температуре 27 °С и 28 °С на картофельно-сахарозной среде формировались 1-2 крупных шарика и многочисленные вторичные мелкие шарики (клубочки) мицелия. При температуре 26 °С и при отсутствии качалки мицелий представлял собой биомассу гриба на поверхности культуральной жидкости.

В ферментере наибольший урожай (13,8 г/л по сухой массе) получен на КСС при температуре 26 °С и перемешивании 70 об/мин (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты культивирования в ферментере

Питательная среда	Средняя температура инкубации, °С	Объем среды, мл	Перемешивание, об/мин	Масса гриба через 2 недели культивирования	
				сырая	сухая
Раствор солода	26	2500	100	73	3,2
Раствор солода	26	2500	70	121	13,1
Раствор солода	28	2500	100	42	2,5
Раствор солода	28	2500	70	81	4,9
Картофельно-сахарозная	26	2500	70	197	16,2
Картофельно-сахарозная	26	2500	100	98	5,2
Картофельно-сахарозная	28	2500	100	65	3,1
Картофельно-сахарозная	28	2500	70	87	4,8

Максимальные показатели урожая отвечают требованиям к грибам-продуцентам – не менее 10 г/л по сухой массе.

В колбах наибольший прирост биомассы (22,4 г/л по сухой массе) наблюдался на картофельно-сахарозной среде на качалке (70 об/мин) при температуре 27 °С (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты культивирования в колбах на качалке

Питательная среда	Средняя температура инкубации, °С	Объем среды, мл	Перемешивание, об/мин	Масса гриба через 2 недели культивирования	
				сырая, г/л	сухая, г/л
Раствор солода	27	200	100	112	11,2
Раствор солода	27	200	70	212	16,2
Раствор солода	28	200	100	75	3,5
Раствор солода	28	200	70	81	4,9
Картофельно-сахарозная	27	200	70	315	22,4
Картофельно-сахарозная	27	200	100	298	19,8
Картофельно-сахарозная	28	200	100	70	3,3
Картофельно-сахарозная	28	200	70	98	5,2

Максимальные показатели урожая отвечают требованиям к грибам-продуктам – не менее 10 г/л по сухой массе.

На среде, содержащей солод, число крупных шариков было такое же, однако вторичных было значительно меньше и прирост биомассы не превышал 8,1 г/л.

Культивирование в колбах без перемешивания также велось на двух средах: на растворе солода и на картофельно-сахарозной среде, при различных сочетаниях перемешивания и температуры (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты культивирования в колбах без перемешивания

Питательная среда	Средняя температура инкубации, °С	Объем среды, мл	Перемешивание, об/мин	Масса гриба через 2 недели культивирования	
				сырая, г/л	сухая, г/л
Раствор солода	26	200	-	94	5,6
Раствор солода	28	200	-	96	5,7
Картофельно-сахарозная	26	200	-	85	3,9
Картофельно-сахарозная	28	200	-	91	5,2

Урожай мицелия оказался низким.

Таким образом, использование картофельно-сахарозной среды, температуры 27 °С и перемешивания 70 об/мин является предпочтительным для наилучшего выхода мицелия *Pleurotus ostreatus*.

Список использованных источников

1. Deepalakshmi, K. Toxicological assessment of *Pleurotus ostreatus* in Sprague Dawley rats / K. Deepalakshmi, S. Mirunalini // Int. J. Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases. – 2014. – Vol. 4, issue 3. – P. 139.
2. Falck, R. Über die Waldkultur des Austernpilzes (*Agaricus ostreatus*) auf frischen Laubholzstubben / R. Falck // Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen. – 1917. – Bd. 19. – S. 159.
3. Gregori A., Svageli M., Pohleven J. Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. / A. Gregori // Food Technol. Biotechnol. – 2007 – P.240.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПЛОДОНОШЕНИЕ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

СЕРЕДИЧ Марина Николаевна, магистрант
Полесский государственный университет

Главной задачей грибоводства в условиях интенсивного производства является получение безопасного продукта питания, обогащенного белком, витаминами и минеральными элементами [2]. Вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) по производству и потреблению плодовых тел находится на втором месте в мире среди культивируемых макромицетов [5].

Вешенка – это белковый, биологически активный продукт питания, содержит незаменимые аминокислоты, ценные липиды, витамины, макро- и микроэлементы, в том числе вещества, обладающие терапевтическим и онкостатическим действием. Это экономически выгодная, урожайная и транспортабельная культура [4].

На жизнедеятельность и плодоношение вешенки обыкновенной влияют такие факторы как температура, свет, влажность, концентрация углекислого газа [1, 4]. Существует прямая зависимость между интенсивностью плодоношения и температурным режимом. Общее правило – температура при инкубации выше чем температура, необходимая для формирования примордиев. Для обрастания субстрата необходима температура не более 24°C [1, 5]. Оптимальной температурой для плодоношения вешенки является 16°C. При снижении температурного режима до 8-11°C интенсивность плодоношения угнетается. В случае повышения температуры до 18°C внешние показатели отвечают биологическим особенностям гриба формой шляпки и ножки. При такой температуре грибы формируются правильной формы, и их созревание может происходить на протяжении 3-4 суток [2].

При дальнейшем повышении температуры воздуха до 23°C интенсивность плодоношения снижается, при этом форма шляпки и ножки не отличается от плодовых тел, выращенных при температуре 18°C. В то же время плодовые тела более крупные в сравнении с плодовыми телами, выращенными при температуре 16°C [3]. При увеличении температуры до 27°C наблюдается еще более низкая интенсивность плодоношения, но по морфологическим особенностям плодовые тела соответствуют телам, выращенным при температуре воздуха 11°C [2, 3].

Таким образом, при поддержании температуры на уровне 16°C наблюдается наиболее интенсивный процесс плодоношения. С повышением или с ее понижением интенсивность уменьшается, изменяется форма и период созревания плодовых тел, что не способствует получению конкурентоспособной продукции.

Список использованных источников

1. Алексеева, К.Л. Защита съедобных грибов от вредителей и болезней в условиях применения интенсивных технологий выращивания / К.Л. Алексеева. – М., 2001. – С. 439-443.
2. Гарибова, Л.В. Выращивание грибов / Л.В. Гарибова. – Москва: Вече, 2005. – 95 с.
3. Jo, W.-S. Fruitbody development of *Pleurotus ostreatus* via bottle cultivation using recycled substrate / W.-S. Jo, J.-S. Kim, D.-H. Cho, S.-D. Park, H.-Y. Jung // Mycobiology. – 2008. – Vol. 36. – P. 157-160.
4. Neelam, S. Comparative studies on growth parameters and physio-chemical analysis of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* / S. Neelam, S. Chennupati, S. Singh // Asian J. Plant Sci. Res. – 2013. – P. 163-169.
5. Sánchez, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms / C. Sánchez // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 85, No. 5. – P. 1321-1337.

ВЛИЯНИЕ LED-ОСВЕЩЕНИЯ НА РОСТ РАСТЕНИЙ *VACCINIUM CORYMBO-SUM L. EX VITRO*

ФЕДОРЕНКО Марта Петровна, аспирант

Полесский государственный университет

ВОЛОТОВИЧ Антон Анатольевич, к.б.н., доцент

Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр

Определяющим фактором роста и развития растений при их выращивании в условиях лабораторий, оранжерей и закрытого грунта является освещение. В условиях повышения роли энергосбережения в различных сферах деятельности человека все большую популярность приобретают светодиодные источники освещения. Светодиоды обладают определенными преимуществами по сравнению с традиционными источниками освещения и могут излучать свет любой длины волны, в т.ч. физиологически активной радиации (ФАР), необходимой для функционирования растительного организма. При этом узкий диапазон длин волн светодиодов позволяет конструировать источники освещения с любым соотношением разных областей спектра [1, с.77].

Целью данной работы было исследование биометрических показателей и содержания фотосинтетических пигментов у микроклонально размноженных растений голубики высокой в процессе их адаптации к нестерильным условиям *ex vitro* при светодиодном (С) и люминесцентном (Л) освещении.

Исследования проводили с сентября по декабрь 2016 года. В качестве объекта исследований использовали укорененные в культуре *in vitro*, внешне однотипные регенеранты голубики высокой *Vaccinium corymbosum L.* сортов Elizabeth, Bluetta и Patriot. Укорененные регенеранты в количестве 40 шт высаживали в прозрачные пластиковые контейнеры объемом 1,5 л, заполненные на 1/3 грунтом, который представляет собой смесь верхового торфа и карьерного песка в соотношении 1:1. Контейнер закрывали прозрачной пластиковой крышкой в целях создания условий влажной камеры и ставили на стеллажи адаптационного помещения (изолированные отсеки объемом по 0,45 м³) под источники светодиодного (с соотношением красной, синей и зеленой областей спектра 6:2:1 соответственно, 20 Вт,) и люминесцентного (OSRAM Natura L36W/76, 1000÷1300 лк, 36 Вт, CCT=6200–6500 К) освещения. Опыт осуществляли в трехкратной биологической повторности. В каждом варианте опыта анализировали не менее чем по 120 растений.

Для оценки роста проводили анализ изменчивости высота растений, количества листьев, содержания фотосинтетических пигментов [2, с.54] с использованием расчетных формул Витштейна, сырой массы надземной части растения и содержания сухих веществ [3, с.26]. Замеры анализируемых признаков проводили на 31-й, 45-й, 59-й и 73-й день, отбор листьев для выделения фотосинтетических пигментов на 60-й день, анализ надземной массы растения и определение сухих веществ – на 125-й день после высадки в торфяной субстрат.

Анализ высоты растений выявил незначительные достоверные (при $P < 0,05$) различия между вариантами для сорта Elizabeth лишь на 73 день в пользу светодиодного освещения, в остальных случаях достоверных различий между вариантами не выявлено (таблица).

Таблица – Изменчивость количественных признаков у растений сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum L. ex vitro*

Сорт	Возраст растений, дни	Тип лампы	Высота растения, см	Количество листьев, шт
Bluetta	31	Л	2,65±0,15	9,34±0,42
		С	2,73±0,13	9,60±0,32
	45	Л	3,35±0,18	8,45±0,55
		С	3,65±0,14	10,08±0,35
	59	Л	3,70±0,20	9,64±0,66
		С	4,25±0,15	12,50±0,53**
	73	Л	4,62±0,24	12,09±0,76
		С	4,98±0,16	16,02±0,59**

HCP ₀₅			0,59	1,80
HCP ₀₁			0,87	2,66
Elizabeth	31	Л	2,86±0,09	7,08±0,20
		С	2,81±0,09	7,68±0,22
	45	Л	4,12±0,12	7,99±0,23
		С	3,97±0,12	7,81±0,23
	59	Л	4,72±0,16	9,31±0,26
		С	4,91±0,16	9,61±0,30
73	Л	5,5±0,21	10,89±0,33	
	С	5,99±0,23*	12,01±0,39*	
HCP ₀₅			0,43	1,28
HCP ₀₁			0,60	1,78
Patriot	31	Л	3,78±0,14	7,60±0,24
		С	3,31±0,13	8,49±0,34
	45	Л	4,84±0,17	8,50±0,33
		С	4,43±0,17	10,34±0,42
	59	Л	5,76±0,20	9,63±0,37
		С	5,28±0,21	10,89±0,49
73	Л	6,84±0,23	11,33±0,43	
	С	5,85±0,23	12,18±0,58	
HCP ₀₅			2,16	3,43
HCP ₀₁			3,00	4,76

Примечание: * – значимо при $P<0,05$; ** – значимо при $P<0,01$.

Анализ количества листьев выявил достоверные различия (при $P<0,01$ и $P<0,05$) лишь на 59 и 73 день для сортов Bluetta и Elizabeth, так растения под светодиодными лампами имели в среднем в 1,1-1,3 раза больше листьев, чем растения под люминесцентными лампами (таблица 1). В случае сорта Patriot количество листьев под светодиодами было больше при каждом замере в 1,07-1,22 раза, однако данные различия были недостоверными (таблица 1).

Анализ содержания фотосинтетических пигментов и каротиноидов (в мг/г сырого веса листьев) на 60 день после высадки растений в торфяной субстрат выявил тенденцию превышения данного показателя у растений, освещаемых люминесцентными лампами, несмотря на то, что спектр светодиодной лампы составлен в соответствии с максимумами поглощения *Хл а* и *б*. Достоверные различия (при $P<0,05$) были обнаружены лишь по содержанию *Хл а* у сорта Patriot, превышение составило 1,44 раза, и по содержанию *Хл б* у сортов Patriot и Bluetta, превышение составило 1,43 и 1,48 раза соответственно. Одной из причин данного эффекта, на наш взгляд, является равномерное распределение определенного количества фотосинтетических пигментов у вариантов под светодиодами по большей листовой поверхности, т.к. листьев у данных вариантов на 59 день развивалось больше в среднем в 1,03-1,30 раза (таблица 1). Определение содержания фотосинтетических пигментов на единицу площади листа не проводили.

Показатель сырой массы надземной части растения у сортов Elizabeth и Bluetta был выше под светодиодными лампами, для сорта Bluetta данное превышение было достоверным при $P<0,05$ и составило 1,84 раза. Анализ содержания сухих веществ выявил достоверные при $P<0,05$ различия в сторону повышения показателя под светодиодами только в случае сорта Patriot – в 1,15 раза, у сортов Elizabeth и Bluetta показатель данного признака при разных типах освещения был одинаков.

Таким образом, источник светодиодного освещения, энергопотребление которого в 1,5 раза ниже, чем у люминесцентного, обеспечивает нормальный рост и адаптацию, а также формирование нормального пигментного состава листьев растений *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro*. Также светодиодное освещение при той же высоте растений, что и в варианте с люминесцентными лампами обеспечивает более быструю закладку новых метамеров, что выражается в развитии большего количества листьев, зафиксированном при каждом замере у трех сортов.

Список использованных источников

1. Бахарев, И. Применение светодиодных светильников для освещения теплиц: реальность и перспектива / И. Бахарев, А. Прокофьев, А. Туркин, А. Яковлев / Современные технологии автоматизации. – 2010. – № 2. – С. 76-82.
2. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова. – М.: Академа, 2003. – 256 с.
3. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

УДК 581.192.7

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЭЛИСИТОРЫ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ БОБОВЫХ КУЛЬТУР К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

¹ФИЛИПЦОВА Галина Григорьевна, к.б.н., доцент

²СОКОЛОВ Юрий Александрович, к. ф-м. н.

²ЛУЩИК Александр Яковлевич

¹ЮРИН Владимир Михайлович, д.б.н., профессор

¹Белорусский государственный университет

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Важнейшим элементом интенсивных технологий в растениеводстве является применение природных и синтетических регуляторов роста, способных в чрезвычайно низких концентрациях изменять активность метаболических процессов растений, увеличивать их устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, повышать урожайность и качество продукции. В последние десятилетия особое внимание исследователей привлекают природные элиситоры, которые распознаются растениями и осуществляют запуск сигнальных систем, приводящих к экспрессии защитных генов и формированию неспецифической системной устойчивости [1, 2]. Вещества, проявляющие элиситорные свойства, не накапливаются в растениях и окружающей среде, не обладают биоцидным действием, безопасны для человека и животных. Очень низкие нормы расхода делают применение элиситоров экологически и экономически выгодным.

К элиситорам относятся различные классы химических соединений: углеводы, белки и пептиды, гликопротеиды, липиды и гликолипиды, стероиды и др. [2]. Одним из наименее изученных классов веществ являются эндогенные пептидные элиситоры. Вместе с тем имеется ряд исследований, свидетельствующих об участии данных соединений во внутриклеточном сигналинге у растений и запуске механизмов устойчивости к стрессовым воздействиям [1, 3]. Известно, что пептидные элиситоры индуцируют синтез стрессовых фитогормонов, вызывают экспрессию ряда защитных генов, стимулируют синтез фенольных соединений, играющих важную роль в индуцированном иммунитете растений [2]. Участие пептидов в развитии защитных ответов растительной клетки дает возможность их использования в растениеводстве для активации механизмов индуцированной устойчивости сельскохозяйственных культур к биотическим и абиотическим стрессорам.

Учитывая вышесказанное, целью данной работы был химический синтез пептидных элиситоров GmPep914, GmPep890, AtPep1 и SubPep [3] и изучение их влияния на морфометрические показатели и скорость окислительных процессов в проростках бобовых культур при действии окислительного стресса.

Семена исследованных культур замачивали в дистиллированной воде в течение суток, после чего высаживали в бумажные рулоны и выращивали в течение двух недель при температуре 20–22 °С с фотопериодом 16 ч – свет, 8 ч – темнота. Исследовалась биологическая активность синтетических пептидов в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-12} М. Для этого листья проростков опрыскивали водными растворами пептидов, через 24 ч после обработки проростки подвергали действию окислительного стресса (ОС). Через 24 часа отбирали часть растений и определяли уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Оставшиеся растения переносили в стандартные условия и продолжали выращивать в течение недели, затем определяли сырую и сухую массу корней и надземной части проростков, а также площадь первого листа.

Установлено, что синтетические пептиды GmPep890 и GmPep914 оказывают элиситорное действие на проростки исследованных культур в концентрациях 10^{-10} – 10^{-12} М, тогда как пептиды AtPep1 и SubPep проявляют биологическую активность в более высокой концентрации – 10^{-9} М. Анализ уровня первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых, оксодиеновых и триеновых конъюгатов) в листьях проростков подвергнутых стрессовому воздействию показал, что исследованные синтетические пептиды оказывают влияние на скорость окислительных процессов. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют, что ОС приводит к существенному увеличению суммарного уровня продуктов ПОЛ: в листьях сои данный показатель увеличивается на 43 %, а в листьях гороха на 51 % по сравнению с контролем. Предстрессовая обработка надземной части растений синтетическими пептидами (GmPep890 и GmPep914 в концентрации 10^{-12} М, AtPep1 в концентрации 10^{-9} М) приводит к уменьшению содержания первичных продуктов ПОЛ. Наиболее выраженный эффект на растения сои оказывает пептид GmPep890, в данном варианте опыта уровень продуктов ПОЛ в листьях проростков сои, подвергнутых стрессу, сравним с контролем. На растения гороха примерно одинаковое действие оказывают пептиды GmPep890 и AtPep1, приводящие к незначительному росту исследованного параметра.

Таблица – Влияние синтетических пептидных элиситоров на уровень продуктов ПОЛ (мкг/г) в листьях проростков сои и гороха, подвергнутых окислительному стрессу (ОС)

Растение	Вариант опыта				
	контроль	ОС	GmPep890+ОС	GmPep914+ОС	AtPep1+ОС
Соя	8,6±0,51	12,3±0,84*	8,9±0,37	9,4±0,55	10,5±0,58*
Горох	6,1±0,33	9,2±0,56*	7,2±0,31*	8,8±0,42*	7,5±0,39*

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$.

Как было показано в работах [4, 5], обработка надземной части проростков пептидами GmPep890 и GmPep914 приводит к увеличению уровня растворимых фенольных соединений и повышению показателя антиоксидантной активности в листьях, что свидетельствует об активации защитных систем растений. Кроме того выявлено, что обработка растений синтетическими пептидами GmPep914, GmPep890 и AtPep1 приводит к снижению уровня АФК в листьях проростков, подвергнутых ОС, вследствие активации пероксидазы и супероксиддисмутазы [6]. Полученные данные позволяют заключить, что обработка растений сои и гороха синтетическими пептидами вызывает индукцию механизмов антиоксидантной защиты, в результате чего происходит снижение скорости окислительных процессов в растениях в условиях действия стрессовых факторов.

На следующем этапе было изучено влияние синтетических пептидов на морфометрические характеристики проростков сои, гороха и маша, подвергнутых окислительному стрессу. Как и следовало ожидать, стрессовое воздействие приводит к существенному снижению исследуемых параметров: сырая масса надземной части проростков всех видов растений уменьшается на 30–35 %, а корней – примерно на 25 % по сравнению с контролем. Предстрессовая обработка растений элиситорами оказывает защитное влияние и приводит к минимизации негативного действия стрессора. Максимальный защитный эффект в условиях стресса на морфометрические характеристики проростков сои выявлен при обработке пептидом GmPep890, для гороха и маша – AtPep1. Синтетический пептид SubPep оказывает менее выраженное протекторное действие на исследованные растения в условиях окислительного стресса.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что синтетические пептиды GmPep890, GmPep914, AtPep1 и SubPep проявляют элиситорные свойства. Экзогенная обработка надземной части бобовых культур данными соединениями вызывает индукцию механизмов антиоксидантной защиты, в результате чего снижается скорость окислительных процессов и, как следствие, увеличение устойчивости растений к стрессовым воздействиям.

Список использованных источников

1. Albert, M. Peptides as trigger of plant defence / M. Albert // J of Experimental Botany. – 2013. – V. 64. – P. 5269-5279.
2. Соколов, Ю.А. Элиситоры и их применение в растениеводстве / Ю.А. Соколов. Минск: Бел. Наука, 2016. – 201 с.
3. Yamaguchi Y., Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants / Y. Yamaguchi, A. Huffaker // Current Opinion in Plant Biology. – 2011. – V. 14. – P. 351-357.

4. Филипцова, Г.Г. Действие пептидного элиситора GmPer890 на физиолого-биохимические показатели проростков сои / Г.Г. Филипцова и др. // Труды БГУ. – 2015. – Т. 10. – Ч 1. – С. 75-81.
5. Филипцова, Г.Г. Исследование элиситорного действия синтетического пептида GmPer914 на проростки сои / Г.Г. Филипцова и др. // Вестник БГУ. Сер. 2. № 2. – 2016. – С. 23-29.
6. Филипцова, Г.Г., Юрин В.М. Синтетические пептидные элиситоры как редокс-регуляторы в растениях / Г.Г. Филипцова, В.М. Юрин // Материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений». Уфа, 26-30 июня 2017. – С. 256-259.

УДК 577.21:633.111.1

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ ПО АЛЛЕЛЬНОМУ СОСТАВУ ГЕНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ КАЧЕСТВА ЗЕРНА И ВЫСОТУ РАСТЕНИЙ

ФОМИНА Елена Анатольевна, н.с.

ДМИТРИЕВА Татьяна Михайловна, м.н.с.

**УРБАНОВИЧ Оксана Юрьевна, д.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси**

Озимая мягкая пшеница – одна из важнейших зерновых культур в Республике Беларусь. Из зерна пшеницы вырабатывают муку, которая используется для получения большого числа продуктов, таких как хлеб, макаронные изделия, различные виды кондитерских изделий и др. Посевные площади под сортами озимой мягкой пшеницы в 2016 г. составили 566,2 тыс. га. Важная роль в обеспечении нашей республики собственным зерном пшеницы принадлежит сортам. Поэтому ведётся планомерная работа по созданию новых короткостебельных сортов озимой пшеницы с высоким потенциалом урожайности и хорошими хлебопекарными качествами, адаптированных к почвенно-климатическим условиям Республики Беларусь.

Качество хлеба, производимого из гексаплоидных сортов пшеницы - это сложный признак, который зависит от многих факторов. Высокомолекулярные субъединицы глютеинов играют главную роль в определении вязко – эластичных свойств, придаваемых пшеничной мукой тесту. Их структура кодируется полиморфными генами *Glu-1* локуса, расположенного на длинном плече хромосом первой группы. В каждом локусе (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*) расположены два близко сцепленных гена: *x*- и *y*-типа. Ген *x*-типа определяет структуру высокомолекулярных субъединиц с большей молекулярной массой, а ген *y*-типа – с меньшей [1, 2].

Разнообразие аллелей, определяющих аминокислотный состав больших субъединиц, является одним из главных факторов, определяющих качество муки, производимого из того или иного сорта пшеницы.

Использование генов короткостебельности для снижения роста растений с целью предотвращения полегания злаков, увеличения урожайности является важным направлением селекции высокоурожайных сортов мягкой пшеницы. Описано более 21 гена короткостебельности [3, 4]. Гены, определяющие рост растений, можно разделить на две группы в зависимости от их реакции на экзогенную гибберелиновую кислоту (ГК). Нечувствительные к ГК гены короткостебельности располагаются на коротких плечах хромосом 4В и 4D [4]. К ним относятся гены *Rht1* и *Rht2*. Гены, чувствительные к ГК, расположены на хромосомах 2А, 2DS, 7BS и 5А [3].

В связи важностью для селекционного процесса генов, кодирующих глютеины и влияющих на высоту растений, целью проведенного исследования являлось определение аллельного состава данных генов среди сортов и линий озимой пшеницы и выделение генотипов с комплексом хозяйственно-ценных генов.

Объектом исследования служила коллекция, состоящая из 33 селекционных линий озимой пшеницы, полученных в лаборатории озимой пшеницы РУП “Научно - практический центр НАН Беларуси по земледелию” (г. Жодино).

В результате исследования определен состав аллелей *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1* локусов. При исследовании аллельного состава *Glu-A1* локуса было выявлено, что 25 исследуемых образцов (75,8 % от всех исследуемых образцов) несут в своих геномах *Glu-A1c* аллель, оказывающий неблагоприятное влияние на хлебопекарное качество зерна. Изучение аллельного состава генов, кодирующих первичную структуру высокомолекулярных субъединиц глютеинов в *Glu-B1* локусе пока-

зало, что 60,6% исследуемых образцов (20 селекционных линий) обладают *Glu-B1d* аллелем, также оказывающим неблагоприятное влияние на хлебопекарное качество зерна. Анализ аллельного состава *Glu-D1* локуса показал, что большинство исследуемых линий (28 или 84,8%) несут в своих геномах *Glu-D1d* аллель, оказывающий благоприятное влияние на хлебопекарное качество зерна. Полученные данные об аллельном составе гомеологичных генов были использованы для проведения суммарной оценки хлебопекарных качеств исследуемых сортов и линий. Чем выше оценка, тем более высокими хлебопекарными качествами обладает тот или иной сорт или линия. Информация об аллельном составе генов, кодирующих первичную структуру запасных белков семян глютеинов в А-, В- и D-геноме и процентном количестве сортов и линий озимой пшеницы, соответствующих определенной итоговой оценке хлебопекарных качеств (индексу качества) приведена на рисунке.

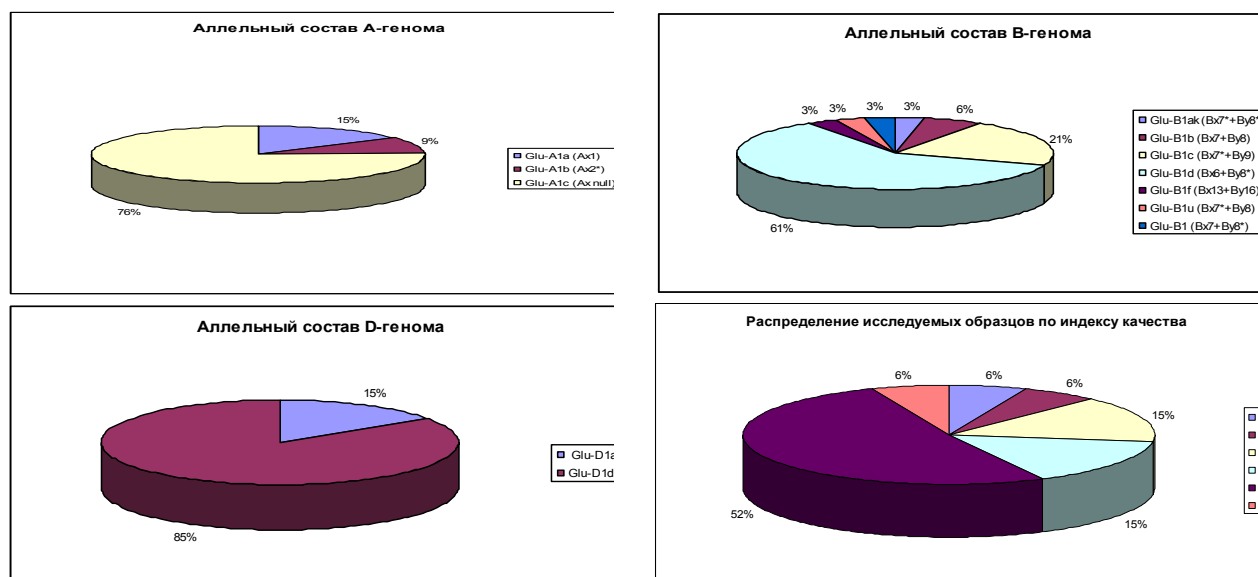


Рисунок - Аллельный состав генов, кодирующих первичную структуру запасных белков семян глютеинов в А-, В- и D-геноме и процентное количество селекционных линий озимой пшеницы, соответствующих определенной итоговой оценке хлебопекарных качеств (индексу качества)

Было выявлено, что среди исследованных сортов и линий 12,1% (4 образца) обладают высокими (итоговая оценка – 9-10 баллов), 30,3% (10 образцов) - средними (итоговая оценка – 7-8 баллов) и 57,6% (19 образцов) – низкими (итоговая оценка – 6 баллов и ниже) хлебопекарными качествами.

В результате анализа аллельного состава генов короткостебельности *Rht1*, *Rht2* и *Rht8* были выявлены перспективные образцы, несущие *Rht-D1b* мутацию, приводящую к снижению высоты растения. Их доля составила 9,1 % (рисунок 2). Аллель WMS261 192, сцепленный с *Rht8* геном, был обнаружен у 36,4 % образцов. Образцы, несущие *Rht-B1b* мутацию, также приводящую к снижению высоты растения, в исследуемой коллекции не представлены (таблица 1).

Таблица – Источники *Rht-D1b* мутации, приводящей к снижению высоты растения, а также WMS261 192 аллеля, сцепленного с *Rht8* геном

Вид аллеля	Название селекционной линии	Количество линий (%)
<i>Rht-D1b</i>	КСИ-17 №3, 0560 (Cubus x Kriss), 89/20-11 ((ВхБ) x СТН)	3 (9,1%)
<i>Rht8</i>	КСИ-17 №5, КСИ-17 №6, КСИ-17 №10St, ПСИ-17 №27, ПСИ-17 №28, ПСИ-17 №34, ПСИ-17 №35, ПСИ-17 №37, CW, W-237/12, 59/4-12 (Turbin x Leo 0949), 32-3-09 (Прэстыж x СТН 735),	12 (36,4%)

Проведенный молекулярно-генетический анализ позволил выделить из коллекции озимой пшеницы образцы W-237/12 и 59/4-12 (Turbin x Leo 0949), сочетающие в своем геноме ген *Rht8* и обладают высокими хлебопекарными качествами (итоговая оценка – 10 баллов). Выделенные генотипы будут использованы в селекционном процессе с целью создания высокоурожайных короткостебельных сортов, обладающих улучшенными хлебопекарными качествами.

Список использованных источников

1. Gale, K.R. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat / K.R. Gale // Journal of Cereal Science. – 2004. – Vol. 41. – P. 181-192.
2. Ma, W. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat / W. Ma, W. Zhang, K.R. Gale // Euphytica. – 2003. – Vol. 134. – P. 51-60.
3. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / V. Korzun [et al.] // Theor Appl Genet. – 1998. – Vol. 96, № 8. – P. 1104-1109.
4. “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat / M.H. Ellis [et al.] // Theor. Appl. Genet. . – 2002. – Vol. 105, № 6-7. – P. 1038-1042.

УДК 581.17+57.05+631.526

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ В ЮВЕНИЛЬНЫХ РАСТЕНИЯХ *CALENDULA OFFICINALIS* L.

¹ШИШ Светлана Николаевна, научный сотрудник

¹ШУТОВА Анна Геннадьевна, к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник

²МАЗЕЦ Жанна Эммануиловна, к.б.н., доцент

¹СПИРИДОВИЧ Елена Владимировна, к.б.н., доцент,
зав. лабораторий прикладной биохимии

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси

²Белорусский государственный педагогический университет им. М.Танка

Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) на растения изучается исследователями разных стран на протяжении 50 лет [1]. Однако механизм его действия до конца еще не выяснен, но уже установлено, что при обработке ЭМИ происходит активизация ферментов в растительной клетке. У растений, выросших из обработанных семян, увеличивается энергия прорастания, лабораторная и полевая всхожесть, повышается продуктивность и устойчивость к неблагоприятным условиям среды, в том числе и биогенного характера [2]. Такая реакция растений на обработку ЭМИ связана с запуском стрессовой реакции и образованием избытка активных форм кислорода (АФК). В первую очередь на воздействие реагирует антиоксидантная система (АОС) растений, включающая низко- и высокомолекулярные компоненты. Поэтому изучение состояния данной системы, а в частности низкомолекулярных антиоксидантов, является важным для понимания механизма влияния ЭМИ на растения.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись ювенильные проростки календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) сорта белорусской селекции 'Махровый 2000' из коллекции хозяйства Большое Можейково. Семена обрабатывали низкоинтенсивным ЭМИ в широком и узком частотных диапазонах режимах: Режим 1 (частота обработки 53,57–78,33 ГГц) с экспозицией обработки 20 минут (P1), 12 минут (P1.1), 8 минут (P1.2) и режим 2 (частота обработки 64,00–66,00 ГГц) с аналогичными экспозициями обработки 20 минут (P2), 12 минут (P2.1), 8 минут (P2.2). Обработку семян проводили в Институте ядерных проблем БГУ на лабораторной установке для микроволновой обработки семян различных сельскохозяйственных культур в широком частотном диапазоне (от 37 до 120 ГГц) с плавной регулировкой мощности от 1 до 10 мВт [3]. Эксперимент проведен в лабораторных условиях. Обработанные и контрольные семена по 100 штук проращивали в растильнях на увлажненной фильтровальной бумаге при температуре 20–21 °С в темноте, с третьего дня помещали на интенсивное освещение. Для исследования использовались 7-ми и 14-ти дневные проростки, масса навески 200 мг. Определение количества каротиноидов (КАР), хлорофолла *a* (Хл *a*) и *b* (Хл *b*) проводили по методу, описанному в работе Ермаковой [4,

с.107]. Уровень фенольных соединений (ФС) измеряли с реактивом Фолина-Чокальтеу при длине волны 730 нм [5] на спектрофотометре Agilent 8453. Полученные результаты были обработаны с помощью статистического пакета программ M.Excel и Stadia 8.0.

Результаты и их обсуждение. Изучение влияния ЭМИ на содержание фотосинтетических пигментов (Хл *a* и Хл *b*, а также каротиноидов) и на соотношение их между собой, является значимым для понимания особенностей процесса фотосинтеза в подвергшихся воздействию растений. Так как данные пигменты не только определяют интенсивность протекания световых реакций, но и выступают низкомолекулярным антиоксидантами и способны повышать защитные свойства растений во время окислительного стресса, который может возникать после воздействия ЭМИ. Показано, что уровень каротиноидов в 7-ми дневных проростках при обработке ЭМИ на 42–82% ниже контрольного значения. Это говорит о том, что каротиноиды нейтрализуют АФК, образовавшиеся в результате сдвигов метаболических процессов в семени под влиянием ЭМИ. По мере роста к 14 дню наблюдений происходит восстановление уровня каротиноидов до контрольного значения и выше, за исключением P1.2, где отмечено падение на 62,6% (рис.1). Это, вероятно, свидетельствует о снижении стрессовой нагрузки, или о том, что включаются другие компоненты АОС.

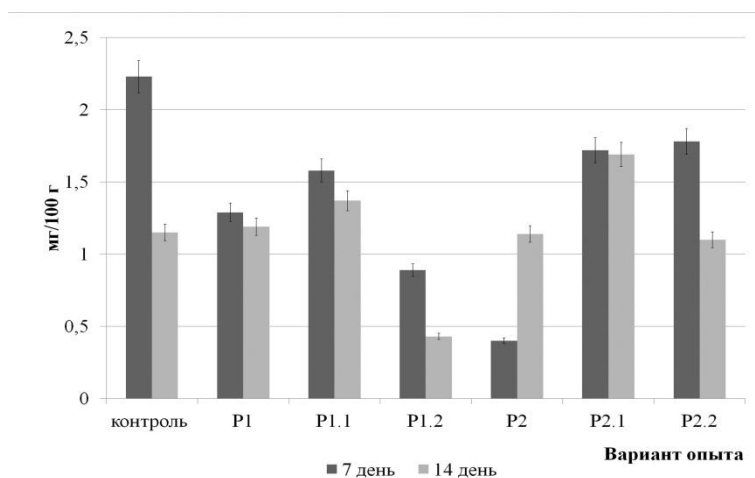


Рисунок 1 – Динамика уровня каротиноидов в ювенильных проростках календулы

В отличие от каротиноидов, суммарное содержание хлорофиллов при всех режимах обработки ЭМИ выше контрольных в 7-ми и 14-ти дневных проростках (кроме P1 и P1.2). Отмечено также изменение соотношения хлорофилла Хл *a* и Хл *b* между собой у обработанных растений. Так в 7-ми дневных проростках растет доля Хл *a* (кроме P1, P2.2) относительно значений контроля, а в 14-ти дневных проростках – Хл *b* (кроме P1, P2.1) (рис. 2).

Также проведена оценка уровня ФС, отмечено, что их роль как антиоксидантов возрастает к 14 дню от 15 до 108% относительно контроля (рис.2 Б). В 7-ми дневных проростках уровень ФС выше контрольного значения в P1 и P1.1 на 22 и 80% соответственно и ниже в P2.1 на 26% относительно контроля (рис. 2.А).

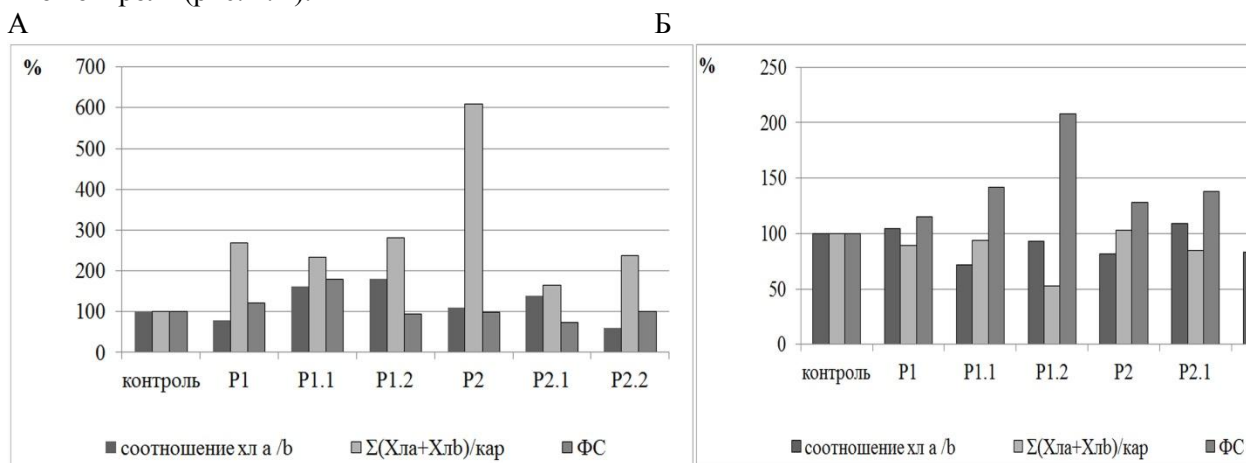


Рисунок 2 – Влияние ЭМИ на соотношение хлорофиллов и каротиноидов, количество ФС в 7-ми и 14 дневных проростках *C. officinalis* L

Таким образом, установлено, что в результате воздействия ЭМИ происходит активизация антиоксидантных свойств каротиноидов в 7-ми дневных проростках и возрастание роли ФС в качестве антиоксидантов к 14-му дню. Под действием ЭМИ происходят сдвиги в соотношении фотосинтетических пигментов. P1.2 оказывает негативное влияние на количество Хл и КАР, которое нарастает к 14 дню и проявляется в снижении уровня Хл *a* и Хл *b*, соотношения всех фотосинтетических пигментов и возрастании уровня ФС в 2 раза относительно контроля.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Конвергенция – 2020».

Список использованных источников

1. Шиш, С.Н. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкого уровня мощности на целостность семян календулы лекарственной / С.Н. Шиш // прил. к журн. «Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». Серия биологических наук – Минск: Беларуская навука. – Ч. 4. – 2015. – С. 135-139.
2. Фирсов, В.Ф. Использование физических факторов и микроэлементов в повышении болезнестойчивости и продуктивности возделываемых культур / В.Ф. Фирсов, В.В. Чекмарев, В.А. Левин // Вопросы современной науки и практики. – Университет им. В.И. Вернадского. – 2005. – №. 1. – С. 19-26.
3. Карпович, В.А. Патент РБ №5580 Способ предпосевной обработки семян овощных или зерновых культур/ В.А Карпович, В.Н. Родионова. – Выд. 23.06.2003 г.
4. Ермакова, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермакова. – Ленинград: ВО «Агроиздат», 1987. – С. 101-111.
5. Wang, M. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) / M. Wang [et. al.] // Journal of agricultura and food chemictry. – 2003. – Vol. 51, №3. – P. 601-608.

УДК 633.52.577.21:632.165

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ЯРОВОГО РАПСА, НЕСУЩИЕ В СВОЕМ ГЕНОМЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ ГЕНЫ ЖИВОТНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ШИШЛОВА-СОКОЛОВСКАЯ Анастасия Михайловна, научный сотрудник
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Экспрессия в растениях гетерологичных генов млекопитающих, которые кодируют белки, выполняющие важные регуляторные функции в клетках животных, представляет интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. К числу таких белков относятся цитохромы P450. Японскими учеными было показано, что встраивание генов *суп1А1*, *суп2В6*, *суп2С19* цитохрома P450 человека в геном риса и картофеля приводит у трансгенных растений к устойчивости к гербициду и способности к фиторемедиации [1]. Экспрессия гена *суп1А1* из печени крысы в растительном геноме вызывает устойчивости к гербицидам, синтезированным на основе мочевины и фенилмочевины [2]. Также созданы трансгенные растения тополя с геном *суп2Е1* кроличьего цитохрома P450 устойчивые к трихлорэтилену, хлороформу, четыреххлористому углероду и обладающие фиторемедиацией окружающей среды [3].

В нашей работе мы использовали митохондриальный ген из коры надпочечников быка *суп11А1*, кодирующий цитохром P450_{ssc}. Цитохром P450_{ssc} является ключевым ферментом стероидогенеза в тканях животных и осуществляет реакцию отщепления боковой цепи холестерина с превращением его в прегненолон [4]. Основные стадии метаболизма стероидных гормонов животных и брассиностероидов растений имеют сходство [5]. В экспериментах по трансформации растений табака геном *суп11А1* показано его влияние на рост, развитие и физиолого-биохимические характеристики растений [6].

В этой связи представляют большой интерес трансгенные растения с геном *суп11А1* цитохрома P450_{ssc}, созданные на основе культур, имеющих хозяйственную ценность, таких как яровой рапс (*Brassica napus var. olerifera* D.C.).

Исходным материалом для создания трансгенных растений служил сорт ярового рапса Магнат белорусской селекции. Трансгенные растения рапса были получены в результате *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с использованием вектора pCB093, несущего два гена: кДНК гена

sup11A1 и ген *bar* [7]. Интеграцию и транскрипционную активность трансгенов в реципиентном геноме детектировали в T₀-T₃ поколениях методами ПЦР и ОТ-ПЦР, согласно ранее описанным методикам [8].

Для изучения влияния гена *sup11A1* на рост и развитие трансгенных растений рапса, обладающих в T₁-T₃ поколениях устойчивостью к гербициду, нами был выбран ряд признаков: высота растения, длина и количество боковых побегов главной кисти, а также элементы структуры урожайности - масса 1000 семян, количество стручков на главной кисти.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием вариационного анализа, для определения достоверности различий был применен двухвыборочный t-критерий Стьюдента. Для оценки связи между изучаемыми фенотипическими признаками применялся корреляционный анализ.

В результате трехлетних исследований нами было получено 525 растений ярового рапса 8 трансгенных линий T₀-T₃ поколений, несущие в своем геноме к-ДНК гена *sup11A1* цитохрома P450_{scs} и ген *bar*.

Методами ПЦР- и ОТ-ПЦР анализа подтверждена инсерция и транскрипция кДНК ген *sup11A1* цитохрома P450_{scs} геноме в трансгенных растениях. Показана вставка и экспрессия гена *bar* в трансгенных растениях T₀, T₁, T₂, T₃ поколений при обработке промышленной концентрацией глюфосината аммония.

Посредством биометрического анализа, включающего статистическую обработку ряда морфологических признаков и элементов продуктивности впервые показано влияние кДНК митохондриального гена *sup11A1* цитохрома P450_{scs} быка на растительный геном, а именно, показано стабильное увеличение массы 1000 семян в T₁-T₃ поколениях, а также показателей главной кисти (длины, количества стручков и боковых побегов). Анализ коэффициентов вариации за три года (T₁-T₃ поколения) выявил, что наиболее константными и наименее изменчивыми признаками являются высота растения и масса 1000 семян. Корреляционный анализ зависимости массы 1000 семян от остальных элементов продуктивности показал тесную положительную корреляцию: 0,3<r>0,86 для T₁ поколения, 0,4<r>0,52 для T₂ поколения, 0,4<r>0,7 для T₃ поколения. Максимальными значениями коэффициентов корреляции в поколениях по большинству признаков обладала линия Vn9/93/21. Кроме этого данная линия обладала максимальными значениями как признаков архитектоники, так и элементов структуры урожайности в различных поколениях, что может быть связано с влиянием транскрипционной активности гетерологичных генов *sup11A1* цитохрома P450_{scs}, *bar* на геном рапса.

Список использованных источников

1. Inui, H. Metabolism of herbicides and other chemicals in human cytochrome P450 species and in transgenic potato plants co-expressing human *CYP1A1*, *CYP2B6* and *CYP2C19* / H. Inui, N. Shiota, Y. Motoi, Y. Ido, T. Inoue, T. Komada, H. Ohkawa // J Pestic Sci. – 2001b. – 26. – P. 28-40.
2. Yamada, T. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the rat *CYP1A1* gene / Y. Yamada, Y. Ohashi, M. Ohsima, H. Inui, N. Shiota, H. Ohkawa, Y. Ohkawa // Theor. Appl. Genet. – 2002. – 104, N 2. – P. 308-314.
3. Doty, S.L. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees / S.L. Doty, C.A. James, A. Moore A. L. Vajzovic, GL Singleton, Ma C, Z Khan, G Xin, JW Kang, JY Park, R Meilan, SH Strauss, J Wilkerson, F Farin, SE. Strand // Proc. Nath. Acad. Sci. USA. – 2007. – 104, N 43. – P. 16816-16821.
4. Miller, WL. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorder / WL. Miller, RJ. Auchus // Endocr Rev. – 2011. – 32, N 4. – P. 579.
5. Спивак, С.Г. Создание и характеристика трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum L.*), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} / И.Н. Бердичивец, Д.Г. Ярмолинский, Т.В. Манешина, Г.В. Шпаковский, Н.А. Картель // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217–1224.
6. Введение кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} животного происхождения в растения рапса / А.М. Шишлова, Н.А. Картель, Л.А. Сахно, Б.В. Моргун, Н.В. Кучук // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Мн., 2010. – Т.11. – С. 12-19.
7. Шишлова-Соколовская, А.М. Получение трансгенных растений ярового рапса (*Brassica napus var. L. olerifera, DC*), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} животного происхождения / А.М. Шишлова-Соколовская, Н.В. Кучук, М.П. Шишлов, Н.А. Картель // Весці НАНБ сер. біял. навук. – 2011. – Т.1. – С. 27-33.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ЧЕРНУШКА (*NIGELLA* L.)

¹ЮХИМУК Андрей Николаевич, научный сотрудник лаборатории прикладной биохимии

²ЛЕ НГУЕН ТХАНЬ, директор

¹СПИРИДОВИЧ Елена Владимировна, к.б.н., доцент, заведующий лабораторией прикладной биохимии

¹ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

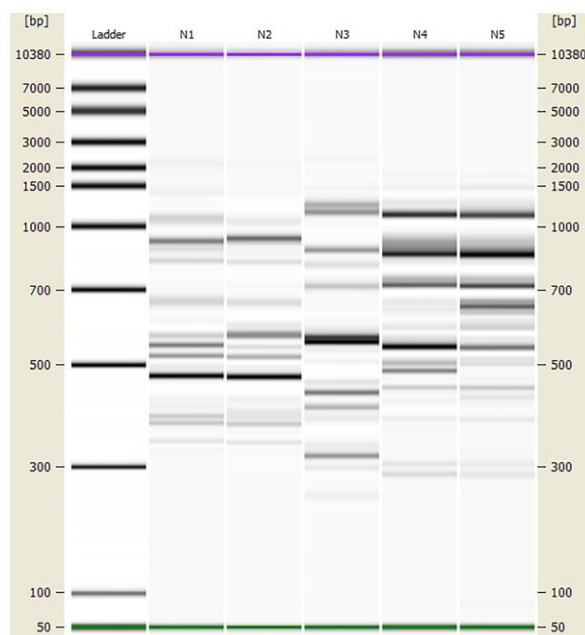
²Институт морской биохимии Вьетнамской академии наук и технологий

Растения рода чернушка (*Nigella* L.) – однолетние травянистые растения семейства лютиковых (*Ranunculaceae* JUSS.), произрастают в Западной Европе, Северной и Западной Африке, Юго-Восточной и Западной Азии [1]. Род *Nigella* L. насчитывает около 25 видов. Самыми распространенными являются чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), чернушка посевная (*Nigella sativa* L.), а также чернушка восточная (*Nigella orientalis* L.).

В последнее время физиолого-биохимические особенности чернушки и ее свойства активно изучаются в Беларуси и сопредельных странах. Однако информация о молекулярно-генетическом разнообразии этой культуры в нашей стране отсутствует. Целью данного исследования явилось изучение генетического разнообразия различных видов растений рода и создание их генетических паспортов. Объектами исследования являлись 3 вида рода: *Nigella sativa* L. (культивируемая в ЦБС (далее [BY]) и видообразец, полученный по делектусу из г. Бонна [DE]), *Nigella orientalis* L. [BY], *Nigella damascena* L., (видообразец ЦБС [BY], и полученный по делектусу из г. Тарту [EE]).

Молекулярно-генетическая паспортизация видов рода чернушка (*Nigella* L.) была проведена на основе данных мультилокусного ДНК-маркирования. Препараты ДНК получали методом 2×СТАВ экстракции с модификациями [2]. ДНК-маркирование проводилось с использованием техники ПЦР, для чего были отобраны праймеры, маркирующие произвольные (RAPD-техника) и межмикросателлитные (ISSR-техника) участки ДНК [3]. В общей сложности для генотипирования растений рода чернушка (*Nigella* L.) было отобрано 6 RAPD- и 4 ISSR-праймера, обладающих достаточным полиморфизмом и имеющих воспроизводимую амплификационную активность. ПЦР проводили в объеме 25 µl. Состав ПЦР-смеси был следующим: 1× PCR буфер (ПраймТех, Беларусь), 1× dNTP (ПраймТех, Беларусь), 20 pM праймера (ПраймТех, Беларусь), 1 ед. Таq-полимеразы (ПраймТех, Беларусь) и 60 ng матрицы ДНК. Разделение продуктов амплификации проводили на генетическом анализаторе Bioanalyzer–2100 (Agilent) с использованием DNA 7500 Series Kit.

Все использованные в исследовании праймеры генерировали четкие, воспроизводимые маркеры, набор которых для каждого исследуемого таксона характеризовался уникальностью (рисунок 1). Для таксонов рода чернушка (*Nigella* L.) максимальное количество локусов (ДНК-маркеров) 36 было идентифицировано с помощью праймера OPX–01, минимальное – 7 с использованием праймера UBC–824. В общей сложности было идентифицировано 235 локусов (ДНК-маркеров) – 155 для RAPD- и 80 для ISSR-ПЦР соответственно. Для каждого праймера был рассчитан показатель **Rp**, отражающий разрешающую способность [4]. Максимальной разрешающей способностью обладал праймер OPP–09 (15,5), минимальной – UBC–824 (2,5). Обе ПЦР техники позволили выявить высокий уровень полиморфизма у исследуемых таксонов чернушки – в среднем 95,74%. Максимальный полиморфизм выявлен при использовании праймеров OPA–18, OPP–09 и ISSCR–04 (100,00%), минимальный – 85,71% при использовании праймера UBC–824.



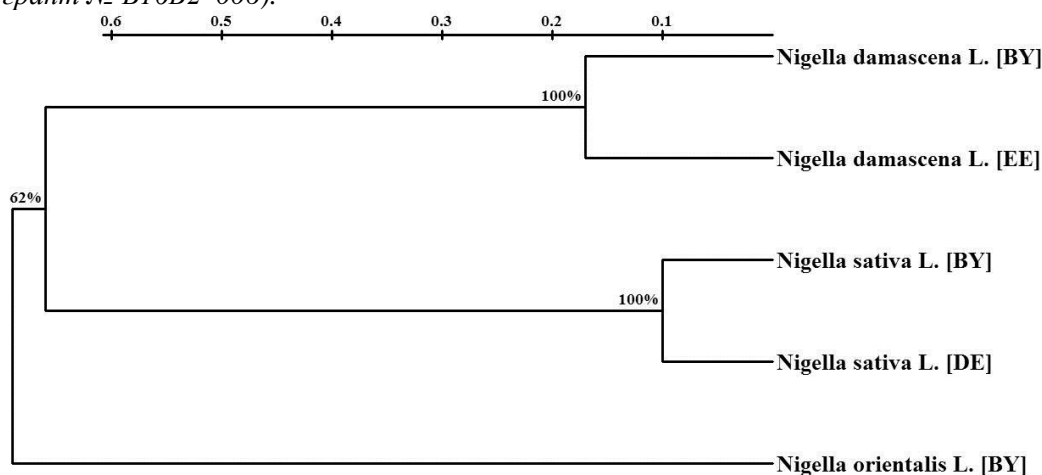
N1 – *Nigella sativa* L. [BY], N2 – *Nigella sativa* L. [DE], N3 – *Nigella orientalis* L. [BY], N4 – *Nigella damascena* L. [BY], N5 – *Nigella damascena* L. [EE].

Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации тотальной ДНК видов рода *Nigella* L. с праймером *UBC-818*

На основании 235 ДНК-маркеров были рассчитаны генетические дистанции, произведена кластеризация исследованных видов рода чернушка по методу UPGMA и сконструирована консенсусная (RAPD+ISSR) дендрограмма, представленная на рисунке 2. Комплексный RAPD+ISSR анализ данных позволил уточнить топологию и генетические взаимосвязи исследуемых образцов.

Проведенное мультилокусное ДНК-маркирование 3 видов рода чернушка (*Nigella* L.) позволило дифференцировать все исследованные генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них, рассчитать генетические дистанции родства/отдаленности. На основании полученных мультилокусных RAPD/ISSR-спектров для исследованных образцов составлены генетические паспорта. В таблице приведен пример генетического паспорта для вида *Nigella damascena* L.

Работа выполнена при финансовой поддержке ВАИТ (грант VAST.HTQT.Belarus.01/16–17) и БРФФИ (грант № Б16В2–006).



Узлы, имеющие достоверную топологию (более 50%), обозначены соответствующим значением bootstrap-анализа (2000 реплик) в %.

Рисунок 2 – Дендрограмма, отражающая степень генетического сходства между видами рода чернушка (*Nigella* L.) на основе 235 ДНК-маркеров

Таблица – Мультилокусный генетический паспорт вида чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.)

<i>Nigella damascena</i> L. [BY]	
Пример	Маркер
RAPD	
OPA-18 (A18)	A18 ₃₃₅ , A18 ₄₄₀ , A18 ₄₉₀ , A18 ₆₉₅ , A18 ₈₂₀ , A18 ₁₀₈₅ , A18 ₁₄₅₅
OPA-20 (A20)	A20 ₃₇₀ , A20 ₅₁₅ , A20 ₆₅₀ , A20 ₆₉₀ , A20 ₇₂₅ , A20 ₈₆₀ , A20 ₉₄₀ , A20 ₉₉₅ , A20 ₁₄₁₀ , A20 ₁₆₀₅
OPK-01 (K01)	K01 ₅₄₀ , K01 ₆₄₅ , K01 ₆₈₀ , K01 ₇₈₅ , K01 ₁₁₀₅ , K01 ₁₄₅₅ , K01 ₁₇₂₀ , K01 ₁₉₄₅
OPP-09 (P09)	P09 ₄₄₀ , P09 ₄₉₅ , P09 ₅₂₅ , P09 ₅₆₅ , P09 ₆₃₅ , P09 ₆₇₅ , P09 ₇₄₅ , P09 ₈₀₅ , P09 ₉₄₀ , P09 ₁₀₀₅ , P09 ₁₁₂₀ , P09 ₁₃₉₅
OPX-01 (X01)	X01 ₃₄₅ , X01 ₃₇₀ , X01 ₄₂₀ , X01 ₄₃₅ , X01 ₄₄₅ , X01 ₄₆₀ , X01 ₅₁₅ , X01 ₆₃₅ , X01 ₆₉₀ , X01 ₇₃₅ , X01 ₉₅₀ , X01 ₁₄₂₀ , X01 ₁₇₀₀
OPZ-12 (Z12)	Z12 ₅₄₅ , Z12 ₅₆₅ , Z12 ₅₈₅ , Z12 ₆₁₅ , Z12 ₆₄₅ , Z12 ₈₃₀ , Z12 ₉₁₅ , Z12 ₁₆₂₅ , Z12 ₂₄₄₅
ISSR	
UBC-818 (818)	818 ₂₉₀ , 818 ₃₀₅ , 818 ₃₉₅ , 818 ₄₅₅ , 818 ₄₉₀ , 818 ₅₀₅ , 818 ₅₄₅ , 818 ₆₀₀ , 818 ₆₅₅ , 818 ₆₆₀ , 818 ₇₂₀ , 818 ₈₇₀
UBC-824 (824)	824 ₆₄₅ , 824 ₆₆₀
UBC-836 (836)	836 ₂₀₅ , 836 ₂₂₅ , 836 ₂₈₀ , 836 ₃₃₅ , 836 ₃₅₀ , 836 ₆₉₅ , 836 ₈₈₀
ISSCR-04 (CR4)	CR4 ₃₀₅ , CR4 ₄₅₀ , CR4 ₅₂₀ , CR4 ₆₂₀ , CR4 ₇₀₀ , CR4 ₇₈₀ , CR4 ₈₃₅

Список использованных источников

1. Алексеев, Ю.Е. Травянистые растения / Алексеев Ю.Е., Вехов В.Н., Гапочка Г.П. и др. // СССР. – М.: Мысль, 1971. – Т.1. – 488 с.
2. Dempster, E.L. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D., Young J.E., Rogers H.J. // Biotechniques. – 1999. – V. 27(1). – P. 66–68.
3. Poyraz, I. An efficient DNA isolation method from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) seeds for RAPD and ISSR analysis / I. Poyraz // Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, Cilt: 1, Sayı:1, 2014. – P. 22-27.
4. Prevost, A. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars / Prevost A., Wilkinson M.J. // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – V. 98. – P. 107–112.

УДК 582.746.51

КЛЕН ЯСЕНЕЛИСТНЫЙ КАК ОПАСНЫЙ ИНВАЗИОННЫЙ ВИД

ЯХНОВЕЦ Максим Николаевич, магистрант
Полесский государственный университет

Актуальность исследований. Клен ясенелистный (*Acer negundo* L.) является опасным инвазионным видом на территории Припятского Полесья. Присутствие клена ясенелистного во флоре ведет к изменению экосистем, что приводит к вытеснению аборигенных видов растений. В результате меняется световой и минеральный режимы. В отдельных случаях происходит формирование мертвопокровных участков, на которых травостой фактически отсутствует. Американский клен дает обильный самосев, который приводит к нарушению упорядоченности посадок [1].

Существует также информация и о том, что американский клен является основным рассадником и источником заражения лесов белой американской бабочкой. Два-три раза за лето его можно наблюдать обглоданным гусеницами, которые потом расползаются на соседние деревья и постепенно из года в год расширяют свой рацион за счет других деревьев [2].

На территории нашей республики действует постановление Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды от 10.01.2009 №2, измененное и дополненное 01.01.2014 «О некоторых вопросах регулирования распространения и численности видов дикорастущих растений» [3]. Согласно данного нормативного правового акта, регулированию распространения и численности видов подлежат дикорастущие растения, которые оказывают вредное воздействие и (или) представляют угрозу биологическому разнообразию в соответствии с перечнем видов данных расте-

ний. Данный перечень состоит из 5-ти видов, на 4-ом месте которого прописан клен ясенелистный как биологически агрессивный вид.

Следует отметить, что на территории Республики Беларусь темой инвазии клена ясенелистного уже занимаются некоторые ученые. Так, белорусскими учеными из Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины совместно с русскими из Брянского государственного университета им. Академика И. Г. Петровского проводились исследования в условиях Добрушского района Гомельской области [4].

Меры борьбы. В процессе натурализации клен стал зимостойким и засухоустойчивым растением, которое образует огромное количество семян, переносимых на большие расстояния. Американский клен образует поросль от пня, что обеспечивает его размножение в еще большем количестве. Клен выдерживает многолетнее затенение коренными породами и разрастается в местах появления прогалин. Древесина данного вида клена малоценна ввиду ее мягкости, ломкости, хрупкости и водонасыщенности. Это препятствует использованию древесины в производственных целях [1].

Исходя из вышесказанного, данный вопрос нуждается в проработке мер борьбы. Самым эффективным и дешевым способом является предотвращение заноса новых особей. Также неэффективны мероприятия по сокращению, а в некоторых местах – полному прекращению посадок в целях озеленения. Наиболее эффективный способ борьбы с кленом возможен на ранней стадии развития, когда растение только появляется из семени или в молодом возрасте. Для старых деревьев подобная мера борьбы более затратна, долговременна и малоэффективна. Простое спиливание деревьев также не приносит желаемых результатов, потому что клен восстанавливается пневой и корневой порослью. Весьма результативна химическая обработка, потому что вид чувствителен ко многим гербицидам [1].

Клен ясенелистный в садово-парковом строительстве. В декоративном садоводстве и паркостроении клен ясенелистный считается нежелательной культурой, поскольку на основании многолетней практики стало ясно, что декоративной и рекреационной ценности он не несет. Это привело к практически повсеместному отказу от применения этого растения в озеленении городов и населенных пунктов. Его декоративные садовые формы и культивары могут использоваться для этих целей, но с большой осторожностью. Разумнее всего эти сорта выращивать методом порослевой культуры, то есть регулярно «сажать на пень», оставляя пеньки размером 10–15 см. В этом случае образуется масса порослевых побегов с очень крупными, яркими и самыми здоровыми листьями. «Порослевой» куст смотрится плотным цветным шаром и не занимает в саду много места, максимум до 2,5–3 м в диаметре [5].

Список использованных источников

1. Виноградова, Ю. К. Черная книга флоры Сибири: монография / Ю. К. Виноградова, А.Н. Куприянов [и др.]. – Новосибирск: академическое издательство «ГЕО», 2016. – 440 с.
2. Шарапановская, Т. Д. Заповедник «Ягорлык» – жемчужина природы Приднестровья / Т. Д. Шарапановская. – Дубоссары: Есо-TIRAS, 2011. – 24 с.
3. О некоторых вопросах регулирования распространения и численности видов дикорастущих растений [Электронный ресурс]: постановление Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, 10 янв. 2009 г., №2 // Законодательство Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://pravo.newsby.org/belarus/postanov8/pst659.htm>. – Дата доступа: 08.11.2017.
4. Дайнеко, Н. М. Инвазия клена ясенелистного (*Acer negundo* L.) в условиях Добрушского района Гомельской области / Н. М. Дайнеко, С. Ф. Тимофеев, А. Д. Булохов, Н. Н. Панасенко // Известия ГГУ им. Ф. Скорины. Сер. Биология. – 2017. – № 3 (102). – С. 35-39.
5. Клен ясенелистный [Электронный ресурс] // Садовый журнал. – Режим доступа: <http://www.rfc-online.ru/?page=40&art=48>. Дата доступа: 08.11.2017.

БИОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ И АКВАКУЛЬТУРЕ

УДК 637.5.05

ТИРЕОГЛОБУЛИН В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

ГАБРИЛЕВСКАЯ Наталья Валерьевна, *магистрант*

Полесский государственный университет

Существенное влияние на качественные характеристики животноводческой продукции оказывают особенности жирового обмена животных, направление и интенсивность липидного метаболизма. Селекционно-значимыми показателями, характеризующими жировой обмен, являются мраморность мяса и жирность молока [1].

Мясо – один из наиболее ценных продуктов питания, важнейший поставщик белка. Соотношение в его составе мышечной, соединительной и жировой ткани определяют качество этого продукта, которое зависит от вида и породы животных, пола, возраста, части туши и упитанности животного. Мраморность мяса обуславливается содержанием внутримышечного жира (IMF – сумма внутриклеточных, межклеточных и межволоконных жировых компонентов), и характеризует, прежде всего, его вкусовые качества. Многочисленными исследованиями выявлено невысокое значение этого параметра у европейских мясных пород, чаще всего около 2,5. Сообщается о корреляции IMF с такими признаками, как степень мраморности (+0,81) и постность мяса (-0,47). Так как, коэффициент наследования содержания внутримышечного жира достаточно невысок (38-55% – у мясных пород европейского скота) в совокупности с низкой вариабельностью этого признака, использование традиционных методов селекции не позволяет добиться значительных успехов [1].

Степень мраморности – показатель качества мяса крупного рогатого скота, которая оценивается визуально по системе USDA путем сравнения с эталонным стандартом и поэтому является субъективной оценкой. Стандарт качества USDA (отборный (Select) / лучший (Choice) / наилучший (Prime)) – производная величина таких показателей, как степень мраморности и развитие туши [4].

Создание животных, способных к откорму с получением мраморного мяса, можно значительно ускорить путем привлечения молекулярной генетики, и идентификации генов, связанных с этим признаками. Это позволит проводить отбор животных по желательным генетическим маркерам, что значительно ускорит селекционный процесс. С этой целью ведется поиск генов-кандидатов, и разрабатываются тест-системы для изучения влияния полиморфных вариантов таких генов на показатели липидного обмена животных, что является актуальной задачей современной животноводческой науки. Одним из генов, связанных с мраморностью мяса может рассматриваться ген тиреоглобулина (TG5) [3, 4, 5]. Тиреоглобулин (TG5) – гликопротеин, предшественник тироидных гормонов трийодтиронина (Т3) и тетраiodтиронина (Т4), является одним из важных генов липидного обмена [2].

Исследования, проведенные на группах скота ангусской, шортгорнской пород и Вагью показали, что скот, гомозиготный или гетерозиготный по аллелю Т (генотипы ТТ или СТ) отличается более высокой мраморностью на 14-20% по сравнению с животными, несущими генотип гомозиготный по аллелю С (генотип СС). Самая высокая частота желательного аллеля Т наблюдается в японской породе Вагью (76%) [3, 4].

Однако данные литературных источников недостаточны. В связи с этим продолжают исследования по идентификации генотипов мясных пород, имеющих желательные генетические задатки с целью накопления дополнительных сведений о формировании мясной продуктивности и качественном составе мяса.

Список использованных источников

1. Ларионова, П. В. Разработка и экспериментальная апробация систем анализа полиморфизма генов-кандидатов липидного обмена у крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / П. В. Ларионова; Всероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства. – Дубровицы, 2006. – 24 с.

2. Селионова, М. И. Молекулярно-генетические маркеры в селекционной работе с разными видами сельскохозяйственных животных / М. И. Селионова [и др.] // Вестник АПК Ставрополя. – 2012. – № 2. – С. 30–35.
3. Сурундаева, Л. Г. Аллельный полиморфизм гена тиреоглобулина у крупного рогатого скота мясных пород / Л. Г. Сурундаева // Вестник мясного скотоводства. – 2016. – № 3 (95). – С. 47–53.
4. Barendse, W. TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle / W. Barendse [et al.] // Proc. Beef Quality CRC Marbling Symp. – 2001. – P. 52–57.
5. Panier, L. Association analysis of nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred Bos taurus cattle / L. Panier [et al.] // Meat. Sci. – 2010. – V. 85. – № 3. – P. 515–518.

УДК 58.02, 639.64, 639.3.043.13

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ВИТАМИННЫЙ СОСТАВ СУСПЕНЗИИ ВОДОРΟΣЛЕЙ *CHLORELLA VULGARIS* (BEIJERINCK) И *SCENEDESMUS ACUTUS* (MEYEN)

ДМИТРОВИЧ Наталья Павловна, ассистент
Полесский государственный университет
КОЗЛОВА Тамара Васильевна, д.с.-х.н., доцент
Гродненский государственный аграрный университет

Введение. Культивирование водорослей, в частности хлореллы и сценедесмуса в виде суспензии, дает возможность использовать их в качестве ценной кормовой добавки и биостимулятора в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и рыбоводстве. Применение таких суспензий в аквакультуре на личиночных стадиях развития рыб, оказывает положительное влияние на иммунную систему, рост и развитие их организма в дальнейшем, способствует более высокой усвояемости кормов при снижении их расхода [1, 3, 5]. Установлено, что наибольший эффект достигается при использовании именно суспензии, а не сухой или сырой массы, так как рыбы получают не только биомассу водорослей, но и продукты жизнедеятельности их клеток (витамины, аминокислоты, ферменты), находящиеся в растворе, а также все минеральные вещества, которые имелись в составе питательной среды.

Учитывая огромную роль витаминов и микроэлементов в обеспечении жизненно важных процессов рыб, в настоящее время широко используют витаминно-минеральные премиксы, содержащие в своем составе всё необходимое для нормального развития организма. Разработаны специализированные премиксы, используемые при производстве стартовых и продукционных кормов для осетровых, лососевых и карповых рыб, при этом следует отметить, что наравне с премиксами, витаминами и биодобавками в кормовой рацион рыб вводят и водоросли [1, 3]. Многие водоросли являются ценным источником витаминов группы В, а хлорелла, кроме этого, содержит витамины А, D и В₁₂ в чистом виде. Поэтому включение ее в состав комбикормов значительно повышает их питательные качества.

В настоящее время при разработке и производстве витаминно-минеральных добавок для комбикормов предпочтение отдают культивированию хлореллы и сценедесмуса.

Материалы и методы. Водоросли *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus acutus* выращивали в накопительном режиме в сосудах (V=1 л) при температуре 25±1°C. Освещенность на поверхности сосудов – 5000-5500 Лк, продолжительность световых и темновых фаз составляла 16ч/8ч для *Chl. vulgaris* и 12ч/12ч – для *Sc. acutus*. Культивирование *Chl. vulgaris* проводили с использованием 6 видов питательных сред: среда №1 (модифицированная среда Тамийя), среда №2 (удобрение “Kristalon” универсальный), среда №3 (Тамийя), среда №4 (*Chlorella medium*), среда №5 (BG-11), среда №6 (Чу-10) [2, 4]. Для культивирования *Sc. acutus* использовали 4 питательные среды: среда №1 (среда Кнопа 1:2, в авторской модификации), среда №2 (удобрение “Kristalon” универсальный), среда №3 (среда Тамийя 1:5), среда №4 (ЧУ-10) [2, 4]. При выращивании водорослей использовали продувку воздухом различной степени интенсивности: без барботажа (продувка №1), 40–45 л/ч (продувка №2), 60–65 л/ч (продувка №3) для *Chl. vulgaris* и без барботажа (продувка №1), 30 л/ч (продувка №2), 60 л/ч (продувка №3) для *Sc. acutus*.

Качественный и количественный витаминный состав суспензии определяли в лаборатории Отдела качества кормов НИИ Прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» с использованием стандартных методик.

Результаты. Проведенный дисперсионный анализ результатов исследований не выявил достоверного влияния использования различных видов питательных сред и совместного влияния факторов «интенсивность продувки» и «вид питательной среды» как при культивировании водоросли *Chl. vulgaris*, так и при выращивании *Sc. acutus*. Однако, при анализе данных выявлено достоверное влияние различной степени интенсивности продувки на количественное содержание в составе суспензий витаминов (Таблица).

Таблица – Качественный и количественный витаминный состав суспензий водорослей при различной интенсивности продувки

Витамины, мкг/мл	<i>Chl. vulgaris</i>			<i>Sc. acutus</i>		
	продувка №1	продувка №2	продувка №3	продувка №1	продувка №2	продувка №3
V ₁	1,66±0,29	2,03±0,32	2,33±0,17	1,40±0,07	1,43±0,11	1,53±0,09
V ₂	2,67±0,16	2,95±0,11	3,02±0,20	2,33±0,20	2,53±0,08	2,40±0,09
V ₃	5,00±0,09	4,82±0,20	4,68±0,15	4,70±0,24	4,50±0,16	4,45±0,09
V ₅	4,75±0,33***	5,13±0,15***	6,18±0,12***	4,80±0,39	4,60±0,21	4,73±0,13
V ₆	3,73±0,14**	3,10±0,16**	2,97±0,08**	3,15±0,19	2,78±0,09	3,20±0,18
V _c	2,40±0,21	2,21±0,09	2,11±0,05	2,27±0,15	2,50±0,15	2,25±0,16
P	7,70±0,64	8,00±0,34	7,65±0,35	7,50±0,30	7,25±0,70	8,15±0,18
H	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,01	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
C	8,73±0,45*	8,62±0,36*	10,18±0,42*	9,15±0,43	9,18±0,41	8,95±0,25

Примечание: * – данные достоверно различны при $p < 0,05$, ** – данные достоверно различны при $p < 0,01$, *** – данные достоверно различны при $p < 0,001$.

Анализ данных результатов исследований показал, что по количественному содержанию витаминов В₅, В₆ и С при использовании в процессе культивирования водоросли *Chl. vulgaris* различной интенсивности продувки имеются достоверные различия. Максимальное количество витаминов В₅ и С содержалось в суспензии при применении самой интенсивной продувки – 60-65 л/ч (продувка №3), а максимальное содержание витамина В₆ – при отсутствии барботажа. При анализе данных по культивированию водоросли *Sc. acutus* достоверных различий по количественному содержанию витаминов в составе суспензии не установлено.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что витаминный состав суспензий водорослей зависит не только от условий их культивирования, но и от их видовой принадлежности.

Закключение. Анализ результатов исследований по выявлению влияния условий культивирования на качественный и количественный состав витаминов в суспензии водорослей *Chl. vulgaris* и *Sc. acutus* показал следующее:

- количественный состав витаминов в суспензии водорослей как у *Chl. vulgaris*, так и у *Sc. acutus* не зависит от вида используемых для культивирования питательных сред;
- совместное влияние факторов «интенсивность продувки» и «вид питательной среды» на количественное содержание витаминов при культивировании обоих видов водорослей не установлено;
- фактор «интенсивность продувки» оказывает влияние на количественное содержание витаминов в суспензии водоросли *Chl. vulgaris*. Максимальное накопление витаминов В₅ и С в суспензии отмечено при использовании интенсивности барботажа 60-65 л/ч., а витамина В₆ – при отсутствии барботажа.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что условия культивирования суспензий обоих видов водорослей, следует сочетать с целью их использования.

Список использованных источников

1. Богданов, Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных / Н. И. Богданов. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – Пенза, 2007. – 48 с.

2. Гайсина, Л. А., Современные методы выделения и культивирования водорослей: учеб. пособ. / Л. А. Гайсина, А. И. Фазлутдинова, Р. Р. Кабиров. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152 с.
3. Мухрамова, А.А. Исследование влияния кормов с биологически активными добавками на рост осетровых рыб при бассейновой технологии выращивания / А.А. Мухрамова, С.К. Койшибаева // Вестник КазНУ. Сер. экологическая. – 2012. – № 1 (33). – С. 106-108.
4. Belcher, H. Culturing algae: guide for schools and colleges / H. Belcher, E. Swale. – Cambridge : Titus Wilson & Son Ltd, 1988. – 28 p.
5. Spolaore, P. Review: commercial applications of microalgae / P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert // Journal of bioscience and bioengineering . – 2006. – Vol. 101, №. 2. – P. 87-96.

УДК 636.13.082

ОЦЕНКА ЭКСТЕРЬЕРА МОЛОЧНЫХ КОБЫЛ РУССКОЙ ТЯЖЕЛОВОЗНОЙ ПОРОДЫ

ЗЯЯЦ Олег Викторович, к. с.-х. н., доцент

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины

СМОК Алиса Александровна, главный зоотехник

ООО «БелКумысПром»

Коневодство имеет важное значение в народном хозяйстве и особенно выделяется среди других отраслей животноводства. Отрасль развивается по многим направлениям и обеспечивает народное хозяйство рабочепользовательными, племенными, продуктивными и спортивными лошадьми.

В связи с переходом с рабочепользовательного направления на продуктивное наиболее желательным для породы стал тип крупных, гармонично сложенных животных. В селекционной работе начали использовать лошадей высокорослого типа с хорошим развитием вымени и высокой молочностью. Одновременно с улучшением продуктивных качеств проводили селекцию по экстерьерным признакам и развитию отдельных статей.

Так как кобылы тяжеловозных пород используются в молочном коневодстве недавно, пока нет четких критериев отбора молочных кобыл по внешнему виду. Не было исследований по изучению особенностей экстерьера высоко молочных кобыл русской тяжеловозной породы [1,2].

Поэтому цель наших исследований состояла в оценке экстерьера кобыл молочного типа в русской тяжеловозной породе. Для этого нужно было решить ряд задач: оценить экстерьер кобыл путем взятия промеров с дальнейшим расчетом основных индексов и проанализировать результаты племенной оценки кобыл. Исследования были проведены в ООО «БелКумысПром».

По результатам оценки фенотипа кобылы русской тяжеловозной породы имеют ярко выраженный тяжеловозный тип. Они характеризуются небольшим ростом; массивным телосложением; удлиненным, глубоким туловищем на коротких достаточно сухих с хорошими суставами конечностях; средней, широкой во лбу, с прямым или вогнутым профилем, головой; короткой, массивной шеей; низкой широкой мускулистой холкой; длинной, часто мягкой спиной; хорошо выраженной поясницей; свислым крупом.

Основные промеры кобыл русской тяжеловозной породы приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные промеры русской тяжеловозной породы

Линии	Количество животных, гол	Высота в холке, см	Косая длина туловища, см	Обхват груди, см	Обхват пясти, см
Градуса	29	148,8±0,7	158,9±0,7	185,6±2,1	21,4±0,1
Свиста	27	151,0±0,8	160,8±0,4	189,9±2,5	21,9±0,1
Поденщика	12	148,9±1,1	159,9±0,6	186,3±4,4	21,5±0,2
В среднем	68	149,7±0,5	159,8±0,4	187,4±1,5	21,6±0,1

Оценивая промеры кобыл русской тяжеловозной породы видно, что высота в холке у кобыл составляет 149,7±0,5 см, косая длина туловища – 159,8±0,4, обхват груди – 187,4±1,5, обхват пясти – 21,6±0,1 см.

Однако следует выделить кобыл линии Свиста, которые среди других животных выделялись значительно большим ростом и длиной туловища, развитием грудной клетки и более крепким костяком. Так по высоте в холке данные кобылы превосходили животных других линий на 1,4-1,5 %, косой длине туловища на - 1,0-1,2 %, обхвату груди на - 1,9-2,3 % и по обхвату пясти на - 1,8-2,3 %.

Основные индексы кобыл русской тяжеловозной породы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные индексы русской тяжеловозной породы

Линии	Количество животных, гол	Индекс формата, %	Индекс массивности, %	Индекс широкотелости, %	Индекс костистости, %
Градуса	29	106,4±0,5	124,6±0,9	118,2±1,1	14,4±0,09
Свиста	27	106,5±0,2	125,6±1,2	121,4±0,6	14,4±0,04
Поденщика	12	106,0±0,3	124,9±2,2	121,1±1,7	14,5±0,08
В среднем	68	106,0±0,3	125,1±0,7	119,9±0,6	14,4±0,04

По результатам экстерьерной оценки видно, что лошади имеют ярко выраженный тяжеловозный тип, они достаточно растянуты средний индекс формата составляет 106,0 %, массивны средний индекс массивности равен 125,1 % и широкотелы среднее значение по индексу широкотелости составляет 119,9 %, что обеспечивает высокий показатель относительной работоспособности.

Здесь также необходимо отметить кобыл линии Свиста, которые по индексам формата, массивности и широкотелости имеют сравнительно большие показатели, по которым значительно превосходят кобыл линий Градуса и Поденщика.

Для более подробной оценки необходимо также привести оценку племенной ценности кобыл русской тяжеловозной породы, которая представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты племенной оценки кобыл литовской тяжеловозной породы

Линии	Количество животных, гол	Типичность, бал	Промеры, бал	Экстерьер, бал	Сумма баллов
Градуса	29	8,3±0,1	8,8±0,2	7,8±0,2	24,8±0,4
Свиста	27	8,4±0,2	9,1±0,2	8,1±0,3	25,3±0,6
Поденщика	12	8,1±0,4	8,9±0,3	7,7±0,4	24,5±0,5
В среднем	68	8,3±0,1	8,9±0,1	7,9±0,1	24,8±0,3

Из результатов племенной оценки кобыл русской тяжеловозной породы видно, что наивысшие балы за типичность, промеры и экстерьер получили кобыл линии Свиста по которым они превосходили кобыл линий Градуса и Поденщика на 1,2-5,2 %.

Таким образом, при линейной оценке кобыл русской тяжеловозной породы, было установлено, что конституция и экстерьер оцененных лошадей в основном характерны для русской тяжеловозной породы. Однако в общем массиве кобыл русской тяжеловозной породы используемых для получения молока по основным промерам индексам и результатам племенной оценки выделяются кобылы, принадлежащие к линии Свиста.

Список использованных источников

1. Чиргин, Е.Д. Характеристика кобыл молочного типа литовской тяжеловозной породы / Е.Д. Чиргин // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe. - 2015. - Т. 2. - № 3. - С. 98-102.
2. Чиргин, Е.Д. Молочное коневодство – резерв повышения отрасли / Е.Д. Чиргин, В.С. Яворский, К.С. Новоселова // Коневодство и конный спорт. - 2001. - № 2. - С. 9.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ОКАЗАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

КАРАТ Светлана Борисовна, магистрант
ВОЛКОВА Елена Михайловна, к.с.-х.н., доцент
Полесский государственный университет

Перед агропромышленным комплексом Беларуси стоит задача обеспечения продовольственной безопасности страны, важнейшим условием которой является развитие отечественного животноводства и повышение уровня его продуктивности за счет рационально организованного воспроизводства стада и снижения числа бесплодных самок и самцов. Вместе с тем в настоящее время наблюдается снижение воспроизводительной способности высокопродуктивных животных, одной из главных причин которого является воздействие таких стресс-факторов как нарушение условий кормления, содержания, эксплуатации и т.д. Несмотря на то, что многие аспекты влияния стресса на организм раскрыты, некоторые вопросы остаются до конца неизученными, в частности реакция организма на воздействие стресс-факторов различного генеза. Особенно это касается самцов, половая потенция и качество спермы которых отражаются на репродуктивной способности самок.

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение влияния 24-эпибрассинолида (ЭПБ) на репродуктивную способность самцов лабораторных мышей, оказавшихся под воздействием стресс-факторов.

Фитогормон 24-эпибрассинолид (ЭПБ) – один из наиболее активных представителей брассиностероидов, структурно сходных со стероидными гормонами животных – вызывает широкий спектр ответов клетки, включая рост растений, прорастание семян, активность фотосинтеза, фиксацию азота, повышение устойчивости к холоду, патогенам, солевому стрессу [5].

Много исследований посвящено изучению влияния 24-ЭПБ на рост и развитие растений. Так, было исследовано влияние предпосевной обработки семян раствором 24-эпибрассинолида на устойчивость растений проса (*Panicum miliaceum L.*) к засухе на ранних фазах развития в условиях почвенной культуры. Под влиянием 24-ЭПБ в листьях растений при засухе отмечалось более высокое содержание воды по сравнению с растениями, выращенными из необработанных семян. Обработка семян 24-ЭПБ также уменьшала вызываемое засухой угнетение роста растений [1].

Внесение в питательные среды 24-эпибрассинолида при микроклональном размножении щавеля (*R. acetosa L.*) способствовало снижению гибели эксплантов и увеличению сроков культивирования регенерантов без смены питательной среды. При дорацивании у регенерантов, выращиваемых без 24-эпибрассинолида, на начальных стадиях наблюдалось более активное развитие листовидной части, тогда как различий в развитии корневой системы не наблюдалось. Предполагается, что повышение устойчивости на начальных стадиях акклиматизации связано со снижением темпов развития «зеленой» части и перехода от резких ростовых процессов к усилению общего развития [3].

Небольшое количество исследований указывает на положительный эффект использования 24-ЭПБ на рост и развитие рыб. Применение 24-эпибрассинолида способствует лучшей оснащенности крови рыб дыхательным белком, содержащимся в эритроцитах.

Обработка личинок растительноядных рыб растворами 24-эпибрассинолида во время транспортировки способствовала значительному повышению их жизнестойкости в концентрации 10^7 мг/л. Положительное влияние 24-эпибрассинолида прослеживается при дорацивании мальков до сеголетков.

Преимущества предлагаемого способа повышения жизнестойкости растительноядных рыб на ранних стадиях развития очевидны. Способ незаменим при длительной транспортировке личинок к местам зарыбления.

Имеются данные, указывающие на то, что брассиностероиды влияют на белково-нуклеиновый обмен, свойства мембран, активность ферментов, а также на адаптивность и стрессоустойчивость организма. Исследования влияния 24-эпибрассинолида, проведенные в РЦСМ со спортсменами игровых видов спорта, показали также положительное влияние этого фитогормона на координационные способности. В целом, в соответствии с имеющимися данными применение биодобавок на основе 24-эпибрассинолида повышает работоспособность, оказывает адаптогенное, иммуно-

дулирующее, стресспротекторное, антивирусное действие, а также положительно влияет на липидный обмен (снижает «плохой» холестерин) [4].

По результатам немногочисленных экспериментов, можно констатировать, что длительное воздействие эпибрассинолида на организм животных приводит к развитию типичной аутоиммунной реакции, в которой присутствуют основные компоненты этого процесса [2].

Таким образом, на основании материалов, доступных в печати, можно рекомендовать широкое применение биодобавок на основе растительных стероидов в качестве средств адаптогенного и восстановительного действия. В наших исследованиях предполагается, что психоэмоциональный и физический стресс будет сопровождаться морфофункциональными изменениями семенников: появлением оптических пустот между базальными мембранами семенных канальцев, уменьшением их внешнего диаметра в сочетании с уменьшением просвета канальцев; угнетением гормоноподобной функции (снижением концентрации тестостерона); ухудшением качества спермы (снижение концентрации спермиев; двигательной активности); повышение числа спермиев с патологическими формами хвостов, с патологическими формами головок. На фоне выявленных патологий применение препарата 24-ЭПБ нормализует гормоноподобную функцию семенников мышей, находящихся в состоянии психоэмоционального и физического стресса, улучшит качественные показатели спермы. Его применение позволит снизить число спермиев с патологическими формами.

Список использованных источников

1. Вайнер, А.А. Влияние 24-эпибрассинолида на устойчивость растений проса (*Panicum miliaceum*) к водному стрессу / А. А. Вайнер, Ю. Е. Колупаев, А. И. Обозный, Т. О. Ястреб, В. А. Хрипач // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. : Біологія. – 2014. – Вип. 2. – С. 46-55.
2. Войтович, А. М. Влияние эпибрассинолида на показатели иммунной системы / А. М. Войтович, А. И. Котеленец, В. В. Шевляков, В. Ю. Афонин, Л. А. Наджарян, Е. С. Лобано, Б. Василевич. – 2006. – 33-37 С.
3. Скапцов, М. В. Влияние 24-эпибрассинолида на продолжительность культивирования щавеля (*Rumex acetosa L.*) *in vitro* / М. В. Скапцов, М. Г. Куцев // Вестник Томского государственного университета. Сер.: Биология. – 2013. – № 2 (22). – С. 52-56.
4. Шакирова, Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф.М. Шакирова. Уфа: Гилем, 2001. –160 с.

УДК 573.6.086.83:636; 004.048

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПОРОДОСПЕЦИФИЧНЫХ SNP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОПОРОДНОСТИ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПОРОДЫ ДЮРОК

КИПЕНЬ Вячеслав Николаевич, научный сотрудник
НИЛ молекулярно-биологических исследований
ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета
судебных экспертиз Республики Беларусь»

Введение. Дюрок (анг. Duroc) – порода свиней красной масти. Изначально порода была сального направления, но учитывая высокий спрос, со временем направление продуктивности изменилось на мясное. Дюрок – американская порода свиней, выведенная в конце 19 века. В настоящее время широко распространена во всем мире. Дюроки достаточно выносливые и хорошо приспособляются к пастбищному содержанию.

Порода отличается своими высокими мясными качествами. Животные этой породы больших размеров, крепкой конституции. Туловище умеренной длины, глубокое и широкое. По плодовитости свиньи породы дюрок не очень плодовиты. По плодовитости уступают крупной белой и ландрасу. За один опорос свиноматка приносит от 9 до 11 поросят.

Хряки этой породы используются в качестве терминальной линии для производства товарных свиней, характеризующихся высоким качеством мяса и туши. На сегодняшний день порода дюрок

широко распространена в европейских странах. В Республике Беларусь данная порода распространена слабо – доли процента от общей численности поголовья *Sus scrofa domesticus*.

Ранее нами была показана возможность с использованием данных полногеномных сиквенсных проектов коммерческих пород свиней определить наличие породоспецифичных SNP-маркеров для животных некоторых пород свиней [1-3].

Цель и задачи. Смоделировать с использованием MDR-анализа (Multifactor dimensionality reduction [4]) панель генетических маркеров, способную дифференцировать животных породы дюрок от представителей пород крупная белая, ландрас, пьетрен и мейшан, а также охарактеризовать ее с позиций чувствительности, специфичности и общей точности.

Материалы и методы. Поиск породоспецифичных SNP был выполнен с помощью алгоритма SRA Nucleotide BLAST (Sequence Read Archive Nucleotide BLAST) и программы BioEdit v.7.2.5. Количество включенных в анализ SNP – 193 [5]; число полногеномных прочтений для свиней породы дюрок – 28 (BioSample NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample>) – SAMEA1557407, SAMEA1557419, SAMEA1557423, SAMEA1557434, SAMEA3497837, SAMEA3497838, SAMEA3497839, SAMEA3497840, SAMN03031126, SAMN03031127, SAMN03031128, SAMN03031129, SAMN03031130, SAMN03031131, SAMN03031132, SAMN03031133, SAMN03031134, SAMN03031135, SAMN03031136, SAMN03031137, SAMN03031138, SAMN03031139, SAMN03031140, SAMN03031141, SAMN03031142, SAMN03031143, SAMN03031144, SAMN03031145), для других пород – 58 (крупная белая – 17 (SAMEA3497789, SAMEA3497790, SAMEA3497853, SAMEA1557412, SAMEA1557415, SAMEA1557431, SAMEA1557413, SAMEA1557402, SAMEA1557389, SAMEA1557435, SAMEA1557422, SAMEA1557406, SAMEA1557404, SAMEA1557383, SAMEA1557425, SAMEA1557427, SAMEA1557399), ландрас – 21 (SAMEA1557405, SAMEA1557416, SAMEA1557436, SAMEA1557390, SAMEA3497847, SAMEA3497848, SAMEA3497850, SAMEA3497851, SAMN03031146, SAMN03031147, SAMN03031148, SAMN03031149, SAMN03031150, SAMN03031151, SAMN03031152, SAMN03031153, SAMN03031154, SAMN03031155, SAMN03031156, SAMN03031157, SAMN03031158), мейшан – 14 (SAMEA3497800, SAMEA3497801, SAMEA3497802, SAMEA3497803, SAMEA3497804, SAMEA3497805, SAMEA3497806, SAMEA3497807, SAMEA3497808, SAMEA3497809, SAMEA1557420, SAMEA1557428, SAMEA1557395, SAMEA1557410), пьетрен – 6 (SAMEA1557430, SAMEA1557432, SAMEA1557392, SAMEA1557408, SAMEA1557397, SAMEA3497860)). Общее количество проанализированных сиквенсов – 32 754 738 518.

Были использованы SRA-данные по полногеномному секвенированию (NGS, Next-Generation Sequencing), размещенные в открытом доступе на облачном сервисе DNAnexus (<http://sra.dnanexus.com/>), а также в SRA-NCBI – high-throughput DNA and RNA sequence read archive (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra).

Построение модели взаимодействий SNP (определение минимального и достаточного количества генетических маркеров для решения поставленной задачи) проводилось с использованием биоинформатического метода MDR (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>).

Результаты и обсуждение. В результате проведенного исследования нами было выявлено наличие 32 строго специфичных SNP-маркеров (породоспецифичный аллель отмечен только у представителей данной породы) для породы дюрок: H3GA0041584, ALGA0080273, ALGA0080306, ALGA0121437, ALGA0005730, ALGA0048872, ALGA0066693, ALGA0123578, ASGA0098607, ALGA0025040, ASGA0008074, ALGA0073165, ALGA0019280, ALGA0044392, ASGA0069555, ALGA0078851, ALGA0106902, ASGA0004361, ASGA0050174, ALGA0061248, ALGA0097613, ALGA0100515, ALGA0097844, ALGA0069975, ALGA0093148, ALGA0048730, ALGA0047768, ALGA0066573, ALGA0120198, ASGA0051859, ALGA0112306, ALGA0053392. Частота пороспецифического аллеля варьировала в широких пределах – от 8,0% до 96,4%.

В процессе моделирования нами были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) – 100; анализ топ-моделей (track top models) – 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) – exhaustive; классификация ячеек (ambiguous cell assignment) – unclassified.

В результате проведенного моделирования были определены 5 моделей, отражающие такое сочетание породоспецифичных для породы дюрок SNP, которое позволило наилучшим образом отличить животных этой породы от других пород в рамках данной работы. В частности, каждая мо-

дель включала в себя только два SNP и характеризовалась следующими характеристиками: сбалансированная точность (adj. Balanced accuracy) – не менее 96%, чувствительность (Sensitivity) – не менее 99%, специфичность (Specificity) – не менее 99%, воспроизводимость (Cross Validation Consistency) – 100%.

Заключение. Таким образом, предложена и охарактеризована модель, включающая два SNP-маркера, с помощью которой имеется возможность с высокой точностью (более 96%) отличить чистопородных домашних свиней породы дюрок от особей пород крупная белая, ландрас, пьетрен и мейшан. Для некоторых моделей показана возможность определения генотипа с использованием ПЦР-ПДРФ, т.е. данная схема может быть реализована в молекулярно-генетической лаборатории с минимальным оборудованием.

Полученные результаты могут лечь в основу создания панели SNP-маркеров для определения чистопородности особей породы дюрок подвида *Sus scrofa domesticus*.

Список использованных источников

1. Моделирование панели породоспецифичных SNP-маркеров для определения чистопородности домашних свиней крупной белой породы / В.Н. Кипень // IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017», категория Ветеринария и селекция в животноводстве: Сборник материалов конф. – Москва, РФ. – 2017. – С. 396-397.

2. Снытков Е.В. Моделирование панели породоспецифичных SNP-маркеров для определения чистопородности домашних свиней породы пьетрен / Е.В. Снытков, В.Н. Кипень // Сборник XVII Всероссийской молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», 6-7 апреля 2017. – Москва. – 2017. – С. 134-136.

3. Кипень В.Н. Моделирование панели породоспецифичных SNP-маркеров для определения чистопородности домашних свиней породы мейшан / Сборник XVII Всероссийской молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», 6-7 апреля 2017. – Москва. – 2017. – С. 143-146.

4. Greene, C. Multifactor dimensionality reduction for graphics processing units enables genome-wide testing of epistasis in sporadic ALS // Bioinformatics. – 2010. – P. 694-695.

5. Ramos, A.M. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / A.M. Ramos, H.J. Megens, R.P. Crooijmans [et al.] // Anim. Genet. – 2011. – Vol. 42(6). P. 613-620.

УДК 58.087, 639.64, 639.3.043.13

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ВОДОРΟΣЛЕЙ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ АКВАКУЛЬТУРЫ

КОЗЛОВА Тамара Васильевна, д.с.-х.н., доцент
Гродненский государственный аграрный университет
ДМИТРОВИЧ Наталья Павловна, ассистент
Полесский государственный университет

Введение. Водоросли, являясь неотъемлемой частью природных экосистем, представляют собой источник разнообразных ценных и уникальных биоорганических соединений, богаты белками, витаминами, микроэлементами и биологически активными веществами [2]. Это способствует широкому спектру использования водорослей. Выделяя в окружающую среду различные биологически активные вещества, они способны оказывать регуляторное воздействие на другие организмы [4]. Культивирование в специальных установках водорослей, в частности хлореллы и сцендесмуса, позволяет получать суспензию, которую применяют в качестве ценного корма и биостимулятора в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и аквакультуре.

Аквакультура как управляемая система технологических приемов воспроизводства и выращивания гидробионтов базируется на использовании комбикормов. В рыбоводстве обычно используются корма, сбалансированные по всем компонентам и питательным веществам [3]. Известно, что добавки в них водорослей способствуют нормализации обменных процессов у рыб, ускоряют

рост естественной полезной микрофлоры при пищеварении и способствуют укреплению иммунного статуса организма.

Материалы и методы. Водоросли *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus acutus* выращивали в накопительном режиме в сосудах (V=1 л) при температуре 25±1°C. Освещенность на поверхности сосудов – 5000-5500 Лк, продолжительность световых и темновых фаз составляла 16ч/8ч для *Chl. vulgaris* и 12ч/12ч – для *Sc. acutus*. Культивирование *Chl. vulgaris* проводилось с использованием 6 питательных сред: среда №1 (модифицированная среда Тамийя), среда №2 (удобрение “Kristalon” универсальный), среда №3(Тамийя), среда №4 (*Chlorella medium*), среда №5 (BG-11), среда №6 (Чу-10) [1,5]. Для культивирования *Sc. acutus* использовали 4 питательные среды: среда №1 (среда Кнопа 1:2, в авторской модификации), среда №2 (удобрение “Kristalon” универсальный), среда №3 (среда Тамийя 1:5), среда №4 (ЧУ-10) [1,5]. При выращивании водорослей использовали продувку воздухом различной степени интенсивности: без барботажа (продувка №1), 40-45 л/ч (продувка №2), 60-65 л/ч (продувка №3) для *Chl. vulgaris* и без барботажа (продувка №1), 30 л/ч (продувка №2), 60 л/ч (продувка №3) для *Sc. acutus*.

Подсчет клеток проводили визуально с помощью камеры Нажотта под микроскопом ЛОМО Микмед-5 (×40). Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре Metertech SP8001 при следующих длинах волн: 500, 560 и 680 нм.

Результаты. Определение численности клеток водорослей методом измерения оптической плотности суспензии является известным приемом. Этот метод является менее трудоемким и более быстрым в сравнении с подсчетом количества клеток в счетной камере. На основании сравнительного анализа экспериментальных данных построены графики линейного и экспоненциального роста, определены коэффициенты детерминации и построены уравнения регрессии. Это отражает связь между численностью клеток, подсчитанной с помощью счетной камеры, и ОП суспензии при определенных длинах волн: 500 и 560 нм – для суспензии хлореллы и 500, 560 и 680 нм – для суспензии сценедесмуса.

Уравнения регрессии, отражающие связь между численностью клеток и ОП для суспензии *Chl. vulgaris* имели следующий вид:

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 3 \cdot 10^6 - 87970 \cdot \text{ОП}_{500} \quad (r^2=0,641, P<0,001);$$

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 3 \cdot 10^6 e^{-0,038 \cdot \text{ОП}_{500}} \quad (r^2=0,667, P<0,001).$$

Исследованиями установлено, что измерение оптической плотности может осуществляться как при длине волны 500 нм, так и при 560 нм, так как полученные уравнения регрессии абсолютно идентичны. Учитывая, что коэффициент ковариации выше в экспоненциальном уравнении ($r^2=0,667$), следует, что именно уравнение регрессии такого вида наиболее полно отражает взаимные изменения обоих параметров в процессе культивирования.

Уравнения регрессии, отражающие связь между численностью клеток и оптической плотностью при культивировании водоросли *Sc. acutus* имели следующий вид:

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 4 \cdot 10^6 + 209841 \cdot \text{ОП}_{500} \quad (r^2=0,804, P<0,001);$$

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 4 \cdot 10^6 e^{0,0409 \cdot \text{ОП}_{500}} \quad (r^2=0,792, P<0,001).$$

При культивировании сценедесмуса также как и при культивировании хлореллы, установлено, что измерение оптической плотности можно осуществлять при длинах волн 500, 560 и 680 нм, так как полученные уравнения регрессии абсолютно идентичны. Однако, коэффициент ковариации выше в линейном уравнении ($r^2=0,804$), из этого, следует, что именно уравнение регрессии такого вида наиболее полно отражает взаимные изменения обоих параметров при культивировании водоросли сценедесмус.

Заключение. Таким образом, для определения численности клеток суспензии по ОП при культивировании следует использовать следующие уравнения:

– для *Chl. vulgaris* экспоненциальное уравнение вида:

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 3 \cdot 10^6 e^{-0,038 \cdot \text{ОП}_{500}} \quad (r^2=0,667, P<0,001);$$

– для *Sc. acutus* линейное уравнение вида:

$$\text{Количество клеток (млн. кл/мл)} = 4 \cdot 10^6 + 209841 \cdot \text{ОП}_{500} \quad (r^2=0,804, P<0,001).$$

Применение спектрофотометрического метода для определения численности клеток суспензии при культивировании водорослей с целью использования их в качестве добавки в корма, в том числе и для рыб, позволяет снизить трудоемкость процесса культивирования водорослей.

Список использованных источников

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

2. Георгицина, К. А. Водоросли – продуценты биоорганических соединений / К. А. Георгицина // Pontus Euxinus 2011: тезисы VII Междунар. науч.-практ. конф. по проблемам водных экосистем, посвящённой 140-летию Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины, Севастополь, 24–27 мая 2011 г. / ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 66-67.

3. Мухрамова, А.А. Исследование влияния кормов с биологически активными добавками на рост осетровых рыб при бассейновой технологии выращивания / А.А. Мухрамова, С.К. Койшибаева // Вестник КазНУ. Сер. экологическая. – 2012. – № 1 (33). – С. 106-108.

4. Судницына, Д. Н. Экология водорослей Псковской области: учебное пособие / Д. Н. Судницына. – Псков: ПГПУ, 2005. – 128 с.

5. Belcher, H. Culturing algae: guide for schools and colleges / H. Belcher, E. Swale. – Cambridge : Titus Wilson & Son Ltd, 1988. – 28 p.

УДК 636.084.523

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ПРОДУКЦИЯ МОЛОКА У ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНОМ КОЛИЧЕСТВЕ РУБЦОВО-СТАБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАЦИОНЕ

КРЕДИКОВА Янина Владимировна, *магистрант*
ЧИГРИН Анатолий Иванович, *к.с/х.н., доцент*
Полесский государственный университет

В существующих нормах кормления, которыми сегодня пользуются животноводы Беларуси, за основу нормирования взяты живая масса коров, удой и жирность молока. А такие факторы, как стадия лактации коров, порода животных, содержание сухого вещества и белка в молоке, уровень нейтрально- и кислотно-детергентной клетчатки (НДК и КДК), биологическая ценность протеина (с учетом его деградируемости в рубце), баланс азота в рационе, биологическая ценность крахмала по его устойчивости к ферментации в рубце, а также сочность и структурная ценность рациона (без учета которых добиться высокой продуктивности коров невозможно) остаются без внимания. Недостаток же тех или иных питательных веществ, несбалансированность рациона по отдельным питательным элементам, незнание особенностей их переваримости в различных отделах пищеварительного тракта неизбежно ведут к снижению молочной продуктивности коров. Поэтому можно утверждать, что нормы кормления не дают специалистам возможности организовать полноценное питание животных, так как не учитывают достижений современной науки, не являются действенным средством ориентации на высокую продуктивность и прогрессивные технологии. Материалы по кормлению крупного рогатого скота перегружены нормами кормления на голову в сутки. Достаточно было бы данных для выражения потребности по концентрации питательных веществ в сухом веществе, и лишь в одной таблице следовало указать, какое количество сухого вещества требуется на голову в сутки по всем физиологическим группам и периодам лактации [2, с. 25].

Рост продуктивности дойного стада в хозяйствах Беларуси связан с дифференцированным подходом к кормлению коров с учетом периодов лактации (начало, середина и конец). Потребности организма животного в питательных веществах существенно различаются в разные периоды лактации в связи с физиологическими изменениями.

Также важным этапом в системе повышения эффективности кормления коров является соотношение энергии и белка в рационе. Главными белковыми кормами признаны бобовые (люцерна, клевер, жмых, шрот), основными энергетическими – силос, кукуруза, овес, пшеница или зерно-меси. Удовлетворение потребности животного в энергии обеспечивает увеличение живой массы. Белок обеспечивает рост продуктивности. Следовательно, удовлетворение потребности в энергии и белке – важнейший элемент рационального питания скота [4, с. 74].

Избыток протеина, особенно легко деградируемого в рубце, может провоцировать развитие кетоза, вызывать нарушения функции печени, приводить к развитию неврозов и нарушению воспроизводительной функции. Поэтому в начале лактации содержание расщепляемого в рубце протеина не должно превышать 65 % протеина рациона, в более поздние стадии лактации оно может быть повышено до 80 %.

Регулирование расщепляемости протеина в первые 100 дней после отела увеличивает количество надоев молока на 8-10% и обеспечивает стабилизацию продуктивности в этот критиче-

ский период. Повышение уровня протеина без учета его качества приводит к понижению воспроизводительной способности высокопродуктивных коров. При перекармливании коров азотистыми веществами (свыше 19%) снижается потребление корма (на 5-10%), уменьшается бактериальный синтез в рубце, повышается образование мочевины в организме животного, образуются фолликулярные кисты и кисты желтого тела, учащаются случаи эндометритов.

Первостепенное значение в достижении высокого уровня продуктивности, здоровья животных, воспроизводства и использования питательных веществ имеет обеспечение глюкозой. Источником ее чаще всего является крахмал. Высокопродуктивные коровы могут потреблять от 2 до 10 кг крахмала, что теоретически покрывает потребности в глюкозе, 50-95% кормового крахмала распадается в рубце (это зависит от источника крахмала и уровня потребления корма) и ферментируется в летучие жирные кислоты. Остальная часть крахмала (так называемый «стабильный» крахмал) усваивается в кишечнике, увеличивая при этом содержание глюкозы в крови животного.

В кормлении крупного рогатого скота важно также обеспечить должные условия для жвачки. Секрет жвачки – в эффективной клетчатке, источниками которой являются сено и солома. Однако если солома сильно измельченная, к эффективной клетчатке ее относить нельзя. Эффективной она будет при размере частиц корма 4-15 см, которые задерживаются в рубце, благодаря чему корова отрыгивает корм, пережевывает его и повторно проглатывает. Если нарушается этот физиологический процесс, корова не дает молока. Поэтому обязательное правило в кормлении коров – обеспечение их эффективной клетчаткой – минимум 12% от сухого вещества рациона [1, с. 88].

Одним из определяющих факторов управления кормлением коров является обеспечение структурной ценности кормового рациона. Понятие «структурная ценность» определяется совокупностью факторов (грубость стеблей, содержание клетчатки и сухого вещества в кормах, степень измельчения (длина резки). Уменьшение величины частиц грубых кормов ниже критического уровня (4 см) понижает кислотность рубца, изменяет соотношение продуктов ферментации (ацетата и пропионата) и приводит к падению жирности молока

Сырая клетчатка кормов состоит из нейтрально-детергентного (НДВ) и кислотно-детергентного (КДВ) вещества. Уровень НДВ является хорошим показателем для прогнозирования потребления сухого вещества, в то время как уровень КДВ прогнозирует процесс переваривания рациона. Минимальный уровень НДВ в пределах 27-30% сухого вещества является лучшим для коровы в период ранней лактации. Этот минимум необходим, чтобы поддерживать функционирование системы рубца на должном уровне.

Ограниченная способность потреблять корма может оказаться основной причиной, сдерживающей дальнейший рост продуктивности лактирующих коров. Жвачные потребляют меньше сухого вещества при высокой влажности кормов.

Таким образом, кормление молочного скота должно отвечать следующим требованиям:

- корма, скармливаемые животным должны соответствовать требованиям I класса. Низкое качество основных кормов заставляет балансировать рационы путем повышенного расхода концентратов, что неоправданно физиологически и экономически невыгодно;
- балансирование энергетического, протеинового, минерального и витаминного питания должно производиться за счет комбикормов и премиксов;
- кормление должно нормироваться в зависимости от физиологического состояния, молочной продуктивности, периода лактации, массы животного, возраста в лактациях;
- кормление коров должно быть групповым по кормовым классам [3, с. 432].

Список использованных источников

1. Визнер, Э. Кормление и плодовитость сельскохозяйственных животных. / Пер. с нем. и предисл. О.Н. Преображенского. – Москва: Колос, 1976. – 160 с.
2. Калашников А.П., Клейменов И.И., Баканов В.Н. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. / Москва: Агропромиздат, 1985. – 352 с.
3. Макарец, Н.Г. Кормление сельскохозяйственных животных. / Н.Г. Макарец // Учебник для ВУЗов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Калуга, 2007. – 608 с.
4. Николаев, С.И. Биологические особенности нормированного кормления: учебно-методическое пособие / Матяев В.И., Чепрасова О.В., Родионов С.Н., Горбунов А.В., Агапова С.В., Кротова О.Е. – Волгоград: ФГБОУ ВПО Волгоградский ГАУ, 2013. – 124 с.

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ТЕМПЫ РОСТА И СКОРОСТЬ УТИЛИЗАЦИИ ЖЕЛТОЧНОГО МЕШКА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) НА ЭТАПЕ ДОИНКУБАЦИИ

КУДЕЛИЧ Андрей Эдуардович, ГУК Екатерина Сергеевна
Полесский государственный университет

Радужная форель занимает 2 место по объему производства в центральной и восточной части Европы [2]. В Дании, Швеции, Италии, Франции, США, Финляндии и др., производство форели составляет 15–20 тыс. т ежегодно. Форель и продукты из нее относятся к деликатесной продукции, и цены на нее, равно как и спрос, стабильно высоки, поэтому производство форели имеет высокую окупаемость во всех странах [1].

В Республике Беларусь радужная форель составляет около 0,5% от всего производства рыбы [2]. Развитие форелеводства в нашей стране находится на начальном этапе. Госпрограммой развития агробизнеса в Беларуси предусмотрено увеличение объемов производства ценных видов рыб до 1200 тонн, в том числе товарной форели-

Одной из главных проблем в форелеводстве является относительно высокая смертность на ранних стадиях развития. Использование аскорбиновой кислоты может оказать стимулирующее воздействие на физиологические процессы внутри организма. Она выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов, является антиоксидантом [5]. В то время как дефицит витамина С вызывает снижение сопротивляемости организма к возбудителям инфекций [3]. Также наблюдается отсутствие аппетита, прекращение роста, кровотечение во внутренних органах и тканях [4].

Цель – изучить влияние аскорбиновой кислоты на темпы роста и скорость утилизации желточного мешка радужной форели на этапе доинкубации.

Объект исследования – икра радужной форели на стадии «глазка» (*Oncorhynchus mykiss*). Доинкубация происходила в холодильнике в пластиковых контейнерах в условиях *in vitro*. На постоянном уровне поддерживалась температура (9–11⁰С), содержание кислорода (4 мг\л), рН (7,6) и другие гидрохимические показатели. Доинкубация осуществлялась в растворах аскорбиновой кислоты, концентрации 50 мкмоль/л, 100 мкмоль/л, 150 мкмоль/л и 200 мкмоль/л. В контроле находилась вода. Во время доинкубации происходила ежедневная смена воды для поддержания режима проточности и обеспечено отсутствие источника света. Количество эмбрионов – по 3 в контейнере в восьмикратной повторности для каждой опытной группы.

Анализ полученных данных проводился в статистической среде R. Нормальность распределения данных подтверждена тестом Шапиро-Уилка. Проверка соблюдения условий однородности групповых дисперсий в выборках осуществлялась тестом Ливина. Для анализа различий между опытными группами использовался одномерный дисперсионный анализ – критерий Тьюки.

Показатели длины получали в результате обработки фотоснимков предличинок и личинок в программе ImageJ.

Коэффициент утилизации желточного мешка рассчитывали как соотношение средней длины желточного мешка к средней длине личинки.

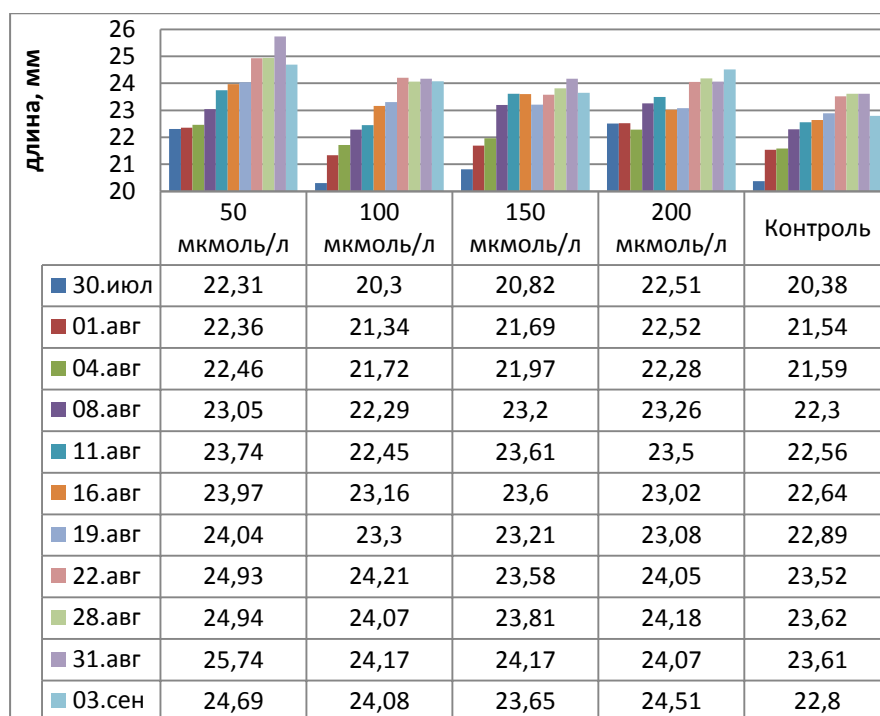


Рисунок 1–Динамика изменения средней длины личинок радужной форели в течении эксперимента при использовании различных концентраций аскорбиновой кислоты на этапе доинкубации в условиях *in vitro*

Согласно рисунку 1, средняя длина к концу эксперимента в группах составляла: 50 мкмоль/л– $24,69 \pm 0,32$ мм, 100 мкмоль/л– $24,08 \pm 0,43$ мм, 150 мкмоль/л– $23,64 \pm 0,45$ мм, 200 мкмоль/л– $24,51 \pm 0,53$ мм, контроль– $22,80 \pm 0,54$ мм. Различия статистически достоверны на уровне значимости $p=0,05$ для всех групп. Таким образом, во всех опытных группах показатель средней длины достоверно выше чем в контрольной группе.

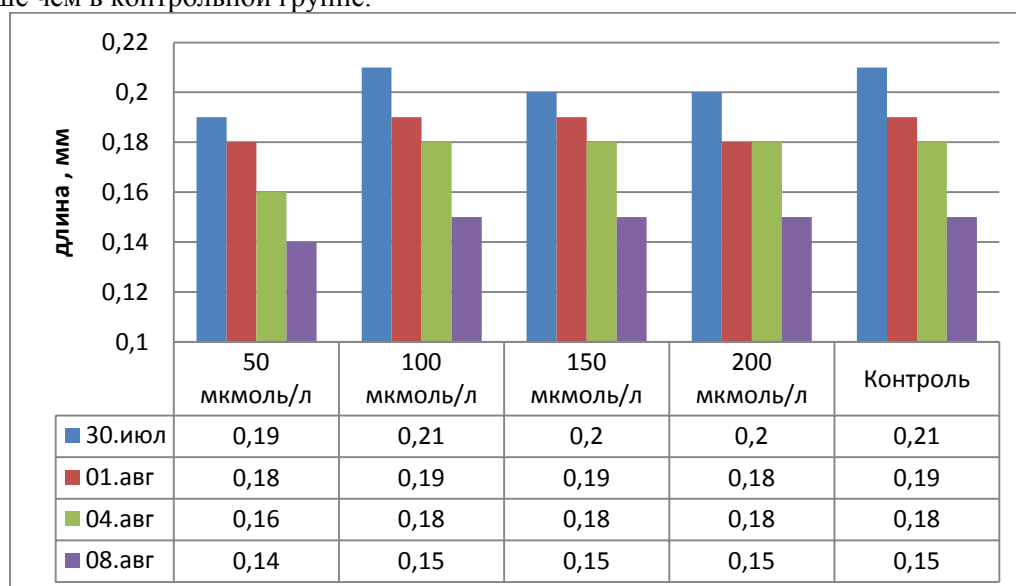


Рисунок 2– Динамика изменения коэффициента желточного мешка личинок радужной форели в течении эксперимента при использовании различных концентраций аскорбиновой кислоты на этапе доинкубации в условиях *in vitro*

Из рисунка 2 следует, коэффициент утилизации желточного мешка составляет: 50 мкмоль/л–0,14, 100 мкмоль/л–0,15, 150 мкмоль/л–0,15, 200 мкмоль/л–0,15, контроль–0,15. Из этого следует что в группе 50 мкмоль/л коэффициент ниже чем в контрольной группе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при использовании аскорбиновой кислоты в процессе доинкубации икры радужной форели ускоряется личиночный рост, а также увеличивается скорость рассасывания желточного мешка. Это делает аскорбиновую кислоту перспективным веществом для дальнейших исследований в направлении повышения эффективности инкубационного процесса и аквакультуры в целом.

Список использованных источников

1. Рекомендации по выращиванию рыбопосадочного материала радужной форели в рыболовных индустриальных комплексах (с временными нормативами) / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки : БГСХА, 2016. – 180 с.
2. “Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций” [Электронный ресурс] / Обзор национального рыболовного сектора (НАСО). – FAO, 2017. – Режим доступа: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_belarus/ru#tcN70085. – (Дата обращения: 08.10.2017).
3. Влияние витамина С и антибиотиков на иммуногенез / И. М. Карпуть Ветеринария. – 1974. – 59–61 с.
4. Форелеводство / Е. Ф. Титарев. – Москва: Пищевая промышленность, 1980. – 118-121 с.
5. Определение аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах методами капиллярного зонного электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии / Е.В. Зыкова, Н.Г. Сандецкая, В.Е. Веровский., О.В. Островский // Химико-фармацевтический журнал. – 2010.- Т.44, №8. – С. 39-41.

УДК 636.2.085.12

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САПРОПЕЛЕЙ В КОРМЛЕНИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹ЛЕМЕСЬЕВСКИЙ Виктор Олегович, к.с.-х.н., доцент

¹ГМИР Виталий Сергеевич, магистрант

²КУРЕПИН Александр Александрович, к.с.-х.н., зав. лаб.

³НАТЫНЧИК Татьяна Михайловна, ст. преподаватель

¹Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета

²Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству

³Полесский государственный университет

В настоящее время с недостатком в рационах энергии, протеина, сахара и других элементов питания сельскохозяйственных животных остро ощущается дефицит биологически активных веществ. Особую значимость обеспеченность рационов минеральными веществами приобретает и в связи с тем, что территория Республики Беларусь является биогеохимической провинцией с недостаточным содержанием в почве некоторых макро- и микроэлементов, приводящее к дефициту их в кормах, а также с усилением техногенного загрязнения окружающей среды в республике [1, 5].

Потребность сельскохозяйственных животных в макро- и микроэлементах, витаминах и других биологически активных веществах, обладающих стимулирующим действием, в значительной степени может быть удовлетворена за счет использования сапропелей [2, 4]. Запасы сапропелей в Беларуси, по данным института проблем использования природных ресурсов и экологии Академии наук Беларуси, составляют 3,73 млрд м³ [3, 5].

По литературным данным, сапропели обладают стимулирующим действием на обменные процессы, продуктивность и состояние здоровья животных [1]. Ценность сапропелей состоит в том, что по своему химическому составу они близки ко многим кормам, которые являются основными поставщиками питательных веществ в рационах сельскохозяйственных животных [2, 3, 5].

В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение эффективности использования энергии рационов в продукцию при скормливании бычкам комбикормов с разным вводом в их состав обезвоженного сапропеля.

Научно-хозяйственный опыт по включению разных доз сапропеля в состав комбикорма для выращиваемого на мясо молодняка крупного рогатого скота проведен в ГП «ЖодиноАгроПлемЭ-

лита» Смолевичского района на бычках черно-пестрой породы живой массой на начало опыта 354-358 кг. Продолжительность исследований составила 93 дня.

Было сформировано 4-е группы животных по 10 голов в каждой – I (контрольная), II, III и IV опытные группы. Условия кормления и содержания были одинаковыми, за исключением того, что животные каждой подопытной группы к основному рациону получали комбикорм № 1, № 2, № 3 и № 4, соответственно в I контрольной, II, III и IV опытной группах.

Комбикорма № 2, № 3 и № 4 отличались от комбикорма № 1 наличием в их составе сапропеля, который вводили в следующих количествах: в № 2 – 4 %, в № 3 – 6 % и в № 4 – 8 % вместо зерновой части. Сапропель брали из оз. Червоное Житковичского района.

В сапропеле и комбикормах определяли первоначальную и общую влагу, жир, протеин, клетчатку, БЭВ, золу, макро- и микроэлементы, каротин, витамины.

В результате проведенного исследования установлено, что используемый в опыте сапропель имел следующий состав: влага – 25 %; сырой протеин – 10,02; сырая клетчатка – 6,2; сырой жир – 0,91; сырая зола – 41,3; зола, не растворимая в соляной кислоте – 31,8; кальций – 1,2; кадмий – 0,40; свинец – 14,69; мышьяк – остаток; фтор – 3,05; цинк – 65; железо – 14934; кобальт – 4,2; марганец – 244 мг/кг; цезий-137 – 120,4 Бк/кг; стронций-90 – 8,24 Бк/кг; витамин В₁ – 0,42 мг/кг; В₂ – 21,64; В₄ – остаток; В₆ – 195 мг/кг.

По содержанию энергии опытные комбикорма оказались несколько беднее по сравнению с контрольным, так как питательность сапропелей составляет всего 0,23 корм. ед. в 1 кг 25 %-ной влажности, или 2,34 МДж обменной энергии. Комбикорм I контрольной группы содержал 1,14 корм. ед. в 1 кг, II опытной – 1,10, III – 1,08 и IV – 1,06 корм. ед., или соответственно 10,67, 10,38, 10,23 и 10,09 МДж обменной энергии.

По содержанию протеина, жира, клетчатки, крахмала, кальция, фосфора, магния, калия не установлено существенных различий.

Состав основного рациона входили сенаж разнотравный – 12,7-13,6 кг и свекловичная патока – 0,5 кг. Скармливали комбикорма по 3,5 кг на 1 голову в сутки. В тоже время отмечено увеличение содержания кобальта в рационе для бычков II группы на 13,9 %, III – на 21,4, IV – на 28 %, марганца – на 1,0 %, 7,4 и 8,1 %, цинка – на 1,8 %, 3,0 и 3,2 %, меди – на 1,6 %, 3,2 и 4,9 % соответственно.

Бычки II группы несколько меньше потребляли сенажа по сравнению с контрольной и III группами. Такая же тенденция наблюдалась и у животных IV группы. Эти различия находились в пределах 4,5-4,7 % по энергии и 2-3 % по сырому веществу. Некоторые изменения между контрольной и опытными группами отмечены по потреблению крахмала в связи со снижением количества зерновой части в рационах II, III и IV групп. Как уже отмечалось ранее, рационы бычков опытных групп были лучше обеспечены микроэлементами (цинком, марганцем и кобальтом). Повышение концентрации биологически активных веществ в рационах опытных групп обусловлено их поступлением с сапропелем.

Анализ морфо-биохимического состава крови показал, что изучаемые показатели – гемоглобин, эритроциты, белок, мочевины, щелочной резерв, глюкоза, кальций, фосфор, каротин и витамин А – находились в пределах физиологической нормы (таблица 1).

Таблица 1 – Морфо-биохимический состав крови

Показатель	Группа			
	I	II	III	IV
Гемоглобин, г/л	98,1±3,19	99,9±2,47	97,9±0,87	96,4±1,47
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,23±0,28	8,02±0,16	7,64±0,40	7,99±0,19
Общий белок, г/л	74,07±1,83	75,9±2,1	79,77±1,93	76,0±3,26
Мочевина, ммоль/л	4,1±0,5	4,0±0,2	3,8±0,1	3,6±0,3
Щелочной резерв, мг%	450±10,3	461±14,8	455±12,1	464±13,4
Глюкоза, ммоль/л	0,189±0,006	0,185±0,004	0,192±0,004	0,178±0,003
Кальций, ммоль/л	2,35±0,2	2,38±0,3	2,38±0,15	2,33±0,1
Фосфор, ммоль/л	1,6±0,1	1,7±0,2	1,6±0,3	1,7±0,1
Каротин, ммоль/л	0,012±0,01	0,011±0,02	0,012±0,01	0,011±0,02
Витамин А, мкмоль/л	0,05±0,001	0,048±0,002	0,047±0,001	0,048±0,002

Следует отметить, что четко прослеживается тенденция по увеличению белка также в сыворотке крови животных опытных групп. У этих же бычков наблюдалось снижение содержания мочевины в крови. Это дает основание полагать, что обменные процессы в организме подопытных животных протекали более интенсивно по сравнению с контрольными аналогами. По концентрации кальция, фосфора, каротина и витамина А бычки контрольной и опытных групп имели очень близкие показатели. Следовательно, включение в состав комбикормов сапропелей 4-8 %, вместо зерновой части рациона, не оказало отрицательного влияния на состояние организма и обмен веществ.

Среднесуточные приросты у бычков контрольной группы составляли 807 г. Включение в состав комбикорма 4 % сапропеля (II группа) повысило среднесуточные приросты до 814 г.

Повышение количества сапропеля до 6 и 8 % не сказалось отрицательно на энергии роста бычков. Среднесуточные приросты у них составляли 823 и 835 г соответственно, или на 2 и 3,5 % выше, чем в контроле ($P>0,05$). Затраты кормов на единицу продукции были на 5,6-7,7 % ниже, чем у животных контрольной групп. Таким образом, судя по продуктивным показателям, скармливание в составе комбикорма до 8 % обеспечивает среднесуточные приросты на уровне 814-835 г. При этом затраты питательных веществ на единицу продукции остались прежними.

Данные по эффективности использования энергии корма на образование прироста живой массы свидетельствуют о том, что бычки, которым скармливали комбикорм с сапропелем, больше на 3,4-12,5 % трансформировали обменной энергии рациона в прирост массы (таблица 2).

Животные опытных групп отличались от контрольной и более эффективным использованием энергии. Это подтверждается и количеством обменной энергии рациона, затраченной на 1 МДж энергии, отложенной в приросте живой массы. Этот показатель оказался ниже во всех опытных группах с колебаниями от 5 до 15,4 %. Так, замена фуражного зерна в составе комбикорма на 4-6-8 % не только позволяет экономить дорогостоящие концентраты, но и снижает затраты энергии корма в расчете на единицу энергии, отложенной в приросте живой массы выращиваемых на мясо бычков.

Таблица 2 – Основные показатели трансформации энергии корма в энергию прироста живой массы бычков

Группа	Энергия прироста, МДж	Трансформация ОЭ рациона в прирост живой массы, %	Затраты ОЭ рациона на 1 МДж в приросте живой массы, МДж	%
I	14,62	15,0	6,6	100,0
II	16,45	17,8	5,6	84,6
III	15,11	15,8	6,3	95,0
IV	15,25	16,3	6,1	92,2

Таким образом, использование в кормлении бычков комбикормов с включением 4 %, 6 и 8 % сапропеля взамен зерна злаков повышает на 3,4-12,5 % трансформацию обменной энергии рациона в приросты живой массы, в результате чего коэффициент продуктивного использования обменной энергии корма повышается с 0,27 до 0,29-0,33.

Количество сапропелей в составе комбикорма при откорме бычков может составлять 6-8 %. Такие комбикорма охотно поедаются животными, стимулируют обменные процессы в организме, в результате среднесуточные приросты повышаются на 2-3,5 % при снижении затрат кормов на получение прироста до 8 %.

Включение в рацион молодяку крупного рогатого скота при выращивании на мясо кормового сапропеля взамен зерна злаков до 2,9 % в сухом веществе рациона, позволяет не только экономить фуражное зерно, но и повысить эффективность использования энергии корма на прирост живой массы.

Список использованных источников

1. Конверсия энергии рационов бычками в продукцию при скармливании сапропеля / В. Ф. Радчиков [и др.] // Зоотехнічна наука: історія, проблеми, перспективи: матер. IV міждун. науч.-практ. конф. – Кам'янець-Подільський : Видавель ПП Зволейко Д. Г. 2014. – С. 154-155.

2. Сапропели белорусского Полесья – важный источник кормов для животных / В. Ф. Радчиков [и др.] // Проблемы рационального использования природных ресурсов и устойчивое развитие Полесья : сб. докл. междунар. науч. конф. В 2 т. Т. 2. – Минск : Беларуская навука, 2016. – С. 46-50.

3. Субстратная обеспеченность метаболизма бычков на откорме / А. И. Денькин, В. О. Лемешевский, В. Б. Решетов // Фундаментальные и прикладные аспекты кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов : материалы конф. – Дубровицы : ВНИИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2016. – С. 323-328.

4. Энергетическое питание молодняка крупного рогатого скота / В.Ф. Радчиков [и др.]. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – Минск : ИВЦ Минфина, 2016. – 172 с.

5. Lemiasheuski, V. O. Substrate energy use by calves for weight gain / V. O. Lemiasheuski // Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. – 2017. – № 23(1). – P. 24-30.

УДК 636.084.523

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ ЧИСТОЙ ЭНЕРГИИ ЛАКТАЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ПИТАТЕЛЬНОСТИ ОБЪЕМИСТЫХ КОРМОВ

НАТЫНЧИК Татьяна Михайловна, *старший преподаватель*
Полесский государственный университет

Введение. В современных условиях ведения отрасли животноводства основным источником производства молока и мяса становится не столько увеличение поголовья скота, сколько повышение его продуктивности. В связи с этим возникает необходимость дальнейшего изучения потребности высокопродуктивных животных в питательных и биологически активных веществах. Без обеспечения полноценного кормления показатели молочной продуктивности, здоровье животных и качество молока становятся непрогнозируемыми и неуправляемыми. В результате неполноценного кормления в организме животных возникают нарушения, проявляющиеся в виде регулярных заболеваний конечностей, яловости, ацидозов, снижения продуктивности коров в хозяйствах [1].

Характер кормления влияет, прежде всего, на пищеварительную систему, рост и развитие животных, их воспроизводительную функцию и продуктивность. Организовать полноценное и сбалансированное кормление животных возможно при условии знания питательной ценности кормов и ингредиентов рациона.

Растительное сырье является важным источником питательных веществ, принимающих активное участие в обменных процессах и выполняющих структурную функцию в пищеварении жвачных. Прежде всего, это различные фракции углеводов

Следует учитывать, что химический состав растительного сырья постоянно изменяется, начиная с момента посева, далее в период вегетации растений, а также при уборке, хранении и переработке урожая на предприятиях.

В Беларуси питательность кормов оценивается по обменной энергии.

В ряде стран западной Европы и США оценка энергетической питательности кормов для лактирующих животных проводится на основе чистой энергии лактации (ЧЭЛ) [2].

В системе ЧЭЛ в качестве критерия оценки питательности кормов используется энергия образовавшегося из них молока. Благодаря этому удается практически полностью исключить влияние рациона на использование обменной энергии, что является более точным критерием оценки его питательности для лактирующих жвачных животных.

Цель исследования – установить возможность практического применения системы чистой энергии лактации для оценки энергетической питательности объемистых кормов в условиях молочно-товарных предприятий.

Материал и методы исследования. Исследования проводились на образцах кормов отобранных на молочно-товарных комплексах, расположенных в Дрогиченском и Пинском районе Брестской области. В качестве объектов исследования использовали консервированные корма: силос кукурузный и сенаж злаковых трав.

Содержание чистой энергии лактации в кормах для лактирующих жвачных животных рассчитывали по формуле Ван Эса (1978) [4].

В качестве промежуточного критерия оценки питательности использовали значение обменной энергии. Для расчета обменной энергии использовали уравнение регрессии для крупного рогатого скота [3], данные химического состава и стандартные коэффициенты переваримости питательных веществ растительных кормов в зависимости от фаз вегетации растений и содержания зерна в кукурузном силосе [4].

Химический состав кормов определялся согласно общепринятым методикам.

Степень раздробленности зерна не учитывалась.

Полученные данные энергетической ценности пересчитывались на сухое вещество и обрабатывались методом вариационной статистики с использованием встроенных статистических функций программы MS Excel.

Результаты исследования и их обсуждение.

Таблица – Показатели энергетической питательности растительных кормов

Показатель	Корма			
	силос кукурузный n=5		сенаж злаковый n=5	
	$\bar{M} \pm m$	Cv, %	$\bar{M} \pm m$	Cv, %
ОЭ, мДж/кг СВ	10,7±0,1	2,4	9,8±0,3	7,0
ЧЭЛ, мДж/кг СВ	6,4±0,1	2,9	6,0±0,2	7,7
Отношение ЧЭЛ/ОЭ	0,6±0,01	1,8	0,6±0,01	1,4

Проведенные нами исследования по изучению энергетической питательности консервированных объемистых кормов силоса и сенажа, используемых в рационах лактирующих коров в хозяйствах позволили установить, что содержание обменной энергии и чистой энергии лактации в кукурузном силосе варьирует незначительно, что обусловлено естественными отличиями в его химическом составе, а также долей наличия зерна. В образцах сенажа из злаковых трав вариabельность показателей энергетической ценности была несколько выше, что обусловлено естественными отличиями в видовом составе трав и продолжительности вегетации.

Анализ отношения чистой энергии лактации (ЧЭЛ) к обменной энергии (ОЭ) составило 0,6±0,01. Однако, коэффициент вариации этого отношения, по сравнению с вариabельностью содержания ОЭ и ЧЭЛ, характеризуется как очень низкий, что может использоваться для производственных расчетов питательности этих кормов и рационов на их основе.

Заклучение. Данные исследования подтверждают возможность практического применения системы чистой энергии лактации для оценки энергетической питательности объемистых кормов в молочно-товарном производстве.

Список использованных источников

1. Григорьев, Н.Г. Биологическая полноценность кормов. // Н.Г. Григорьев, Н.П. Волков, Е.С. Воробьев. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 287.
2. Кормление сельскохозяйственных животных : учебное пособие для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по специальностям "Ветеринарная медицина", "Зоотехния" / В.К. Пестис [и др.]; под. Ред. В.К. Пестиса – Минск : ИВЦ Минфина, – 540 С.
3. Чигрин, А.И. Комплексная методика управления питательностью рационов и продуктивностью жвачных животных : науч.-метод. разработка / А.И. Чигрин. – Пинск : ПолесГУ, 2016. – 46 с.
4. DLG-Futterwerttabellen: Wiederkäuer. – Frankfurt am Main. DLG-Verl., 1997. – 212 S.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ В ОБЪЕМЕ РАЦИОНА В СУХОСТОЙНЫЙ ПЕРИОД

РЫЖКОВЕЦ Кристина Викторовна, *магистрант*

ЧИГРИН Анатолий Иванович, *к.с/х.н., доцент*

Полесский государственный университет

Первоочередной задачей отрасли животноводства в современных условиях является повышение уровня его продуктивности и сохранения поголовья животных. Для этого, кроме совершенствования существующих и выведения новых пород, необходимо использовать потенциальные возможности животных путем создания максимально благоприятных условий их кормления и содержания [1, с.4].

Характер кормления сельскохозяйственных животных является важнейшим фактором, оказывающим многообразное воздействие на функциональную и морфологическую изменчивость животного организма. Прежде всего кормление оказывает влияние на пищеварительную систему животных, непосредственно связанную функционально с переработкой и усвоением корма. В последующем влияние распространяется на органы и системы организма. В итоге кормление оказывает влияние на весь организм животного в целом, изменяя внешнюю форму и общее состояние животного [2, с.6].

В сухостойный период в организме коровы происходит глубокая перестройка, вызванная подготовкой молочной железы к предстоящей лактации. При этом происходит увеличение содержания железистой ткани в вымени коровы. В этот период отмечается значительное увеличение интенсивности обмена веществ, особенно минерального и белкового, имеет место преобладание ассимиляционных процессов.

Одна из главных задач сухостойного периода – восстановить живую массу коровы и накопить резерв питательных веществ для будущей лактации. Если корова за это время не восстановит массу тела и не подойдет к отелу в заводской кондиции, то в последующую лактацию она не сможет показать высокой продуктивности.

Наилучшими кормами для стельных сухостойных коров будут: злаково-бобовое сено, сенаж, силос кукурузный, убраный в фазе молочно-восковой спелости, концентраты [3, с.16].

Обеспеченность рациона по протеину определяется по концентрации альбуминов в сыворотке крови. Эти белки в процессе гидролиза используются для синтеза специфических белков тканей, их считают аминокислотным резервом организма. Резкое снижение их уровня на фоне нормативных показателей активности amino-трансфераз и альдолаз свидетельствует об аминокислотном и белковом дефиците в организме коров.

Аминный азот характеризует общее количество свободных аминокислот, воссавшихся в кровь после ферментативного разложения микробного и растительного протеина в кишечнике и участвующих в белковом обмене.

Пировиноградная кислота содержится во всех тканях и органах, и является связующим звеном обмена углеводов, жиров и белков, играет важную роль в обмене веществ. Концентрация пировиноградной кислоты в тканях изменяется при болезнях печени, авитаминозах, особенно при недостатке витамина В1.

Уровень глюкозы и кетоновых тел в крови характеризуют энергетическую эффективность рационов кормления коров для биосинтетических процессов в организме животных.

Состояние витаминного обмена в организме коров имеет большое значение для повышения их продуктивности, сохранения жизни и воспроизводительной способности. Дефицит витамина А нарушает энергетический обмен, недостаток его приводит к уменьшению марганца в печени, почках, мышцах и увеличению его накопления в селезенке, мозге.

Нарушения обмена веществ являются одним из основных факторов, препятствующих реализации генетического потенциала молочной продуктивности коров. Последствия нарушений выражаются в повышении заболеваемости животных, маститами, снижении плодовитости, учащении заболеваемости приплода и его гибель [4, с.25].

Несбалансированность рационов даже по нескольким питательным веществам может приводить к серьезным нарушениям в жизнедеятельности всего организма, и только своевременное

устранение дисбаланса питательных веществ может предотвратить снижение молочной продуктивности и ухудшение состояния здоровья коров [5, с. 15].

Список использованных источников

1. Гамко, Л.Н. Кормление высокопродуктивных коров. / Л.Н. Гамко // Брянск: Издательство Брянской Государственной сельскохозяйственной академии, 2010. – 103 с.
2. Макарец, Н.Г. Кормление сельскохозяйственных животных. / Н.Г. Макарец // Учебник для ВУЗов. – 2-е изд., перераб. И доп. – Калуга, 2007. – 608 с.
3. Пахомов, И.Я. Полноценное кормление высокопродуктивных коров: Справочное пособие. / И.Я. Пахомов, Н.П. Разумовский.- Витебск.- УО ВГАВМ, 2006 – 108 с.
4. Профирьев, И.А. Обмен веществ и продуктивность. Нарушения обмена веществ у высокопродуктивных молочных коров при различных условиях содержания и кормления / И.А. Профирьев // Сельскохозяйственная биология. – 2001. – 120 с.
5. Тяпугин, Е. А. Производство молока в сельскохозяйственных зонах Вологодской области / Е. А. Тяпугин, В. И. Литвинов // Зоотехния. – 2008. – 90 с.

УДК 579.6

СКРИНИНГ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРУДОВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ

САВЧИЦ Татьяна Леонидовна, *м.н.с.*

Институт микробиологии НАН Беларуси

АЛЕЩЕНКОВА Зинаида Михайловна, *д.б.н., зав. лабораторией ВМП и ВР*

Институт микробиологии НАН Беларуси

Введение. Обеспечение объектов культивирования рыбоводных прудов естественным кормовым ресурсом остается одной из актуальных проблем рыбоводства. В связи с этим уделяется внимание улучшению трофической среды для микрофлоры в виде бактерий и низших водных растений, служащих пищей для зоопланктона и бентоса, являющихся в свою очередь естественной кормовой базой для ихтиофауны [1, 2].

Производство прудовой рыбы в Республике Беларусь базируется на применении интенсивных технологий с целью повышения рыбопродуктивности. Одним из которых является использование удобрений как органического, так и минерального происхождения. Однако избыточное применение азотных минеральных удобрений способствует развитию токсичных сине-зеленых водорослей, приводит к зарастанию прудов высшей водной растительностью. Большинство видов фосфорных удобрений являются недоступными для гидробионтов т.к. связываются с донными соединениями и переходят в труднорастворимое состояние. Использование таких биотехнологических приемов зачастую нарушает экологическое равновесие прудовой экосистемы, что приводит к снижению содержания кислорода в воде и вызывает заморные явления [2].

Важная роль микроорганизмов в процессах биологической продуктивности водоемов определяется тем, что микроорганизмы разлагают мертвое органическое вещество, превращая продукты его распада в пригодные для питания водной растительности и, кроме того, сами микроорганизмы служат пищей для водных животных. Благодаря высокой скорости размножения, бактерии обеспечивают накопление большого количества бактериального белка, играющего важную роль в балансе органического вещества в водоёмах и легкоусваиваемого животными организмами, особенно на ранних стадиях онтогенеза.

Перспективным направлением в рыбоводстве является использование экологически безопасных бактериальных препаратов, созданных на основе природных штаммов азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий.

Их применение не приводит к накоплению труднорастворимых минеральных соединений биогенных элементов в водоемах, что является необходимым условием органического производства. Внесение биоудобрений в рыбоводные пруды положительно влияет на выживаемость и продукционные способности рыб, при этом достигается экономия минеральных удобрений [3].

Цель исследования – первичный скрининг азотфиксирующих микроорганизмов, выделенных из рыбоводных прудов.

Объекты исследования: изоляты азотфиксирующих бактерий, выделенные из эпилимниона.

Методы исследований. Микробное число воды изучали методом высева разведений водной суспензии на элективные питательные среды (Эшби, Берка) [4]. Для определения наличия *nifH*-гена у изолятов, выделенных из прудовой воды, ДНК выделяли СТАВ-методом с небольшими модификациями [5].

Результаты и обсуждение. За период проведенных исследований были выделены из эпилимниона рыбоводных прудов 676 изолятов олигонитрофильных микроорганизмов. По наличию *nifH*-гена и азотфиксирующей способности были отобраны наиболее активные азотфиксирующие бактерии. Были проведены исследования способности выделенных штаммов к деструктивной активности (БПК1 и БПК5) при внесении их в высоких концентрациях (1,5; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 мл/л).

Одним из наиболее активных среди отобранных микроорганизмов является штамм, идентифицированный по морфологическим, физиолого-биохимическим свойствам и с использованием молекулярно-генетических методов как *Sphingobium xenophagum* 11АТ. Данный штамм не оказывает отрицательного влияния на кислородный режим в воде и не обладает патогенными, токсическими или раздражающими свойствами при внесении в воду.

Анализ влияния бактериального штамма *Sphingobium xenophagum* 11АТ показал, что его применение увеличило концентрацию минерального азота в водной среде на 4 – 27%. Рост содержания минерального азота в воде отмечался на 11 сутки при внесении штамма в концентрации 0,1 и 0,2 мкл/л (рисунок).

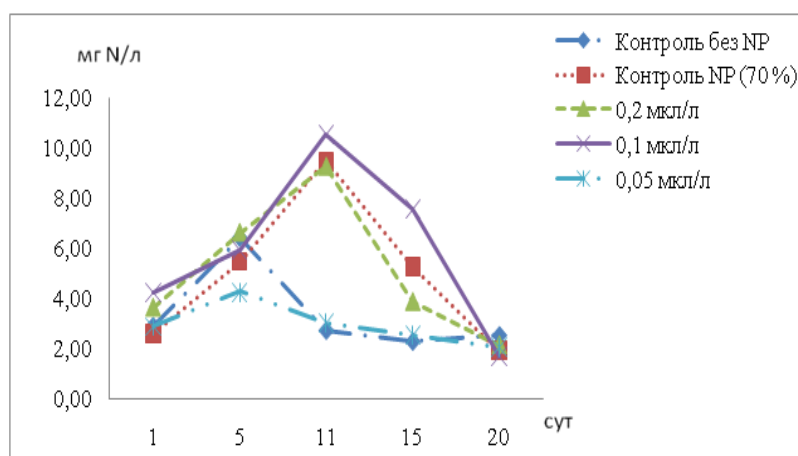


Рисунок – Динамика содержания минерального азота (NH₄⁺⁺NO₃⁻) в воде модельных опытов при внесении азотфиксирующего изолята бактерий *Sphingobium xenophagum* 11АТ

Таким образом, штамм *Sphingobium xenophagum* 11АТ является потенциально перспективным для использования увеличения естественной продуктивности рыбоводных прудов.

Список использованных источников

1. Акимов, В. А. Общая численность микроорганизмов в воде рыбоводных прудов при интенсивном удобрении и кормлении рыб // Труды ВНИИПРХ. Т. 14. – М., 1966. – С. 70-78.
2. Кожаева, Д. К., Казанчев, С. Ч. Трофическая цепь водоёмов КБР. Методы и способы формирования конкурентных преимуществ. МАКБ. – М., 2008. – С. 97-100.
3. Казанчев, С. Ч., Казанчева, Л. А. Естественно трофическая база сообщества прудовых рыб // Естественно и технические науки. – М., 2007. – № 1. – С. 72-74.
4. Методы общей бактериологии / пер.с англ./ под ред. Герхардт, Ф. – Том 3. –Москва «Мир», 1984.– 72 с.
- 5 DNA isolation procedures / М.К. Nishiguchi [et al.] //Methods and Tools in Biosciences and Medicine / Techniques in molecular systematic and evolution, ed. by Rob DeSalle et al. – Switzerland. – 2002. – P. 279-280.

БИОТЕХНОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.64

МОНИТОРИНГ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЕ РЫБОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

ГРЕЦКАЯ Надежда Александровна, *магистрант*

Белорусский государственный технологический университет

РИМДЕНОК Вероника Васильевна, *начальник производственной лаборатории*
ОАО "Белрыба"

ДУБОВСКАЯ Людмила Юрьевна, *к.т.н., доцент кафедры интерьер и оборудование*
Белорусская государственная академия искусств

ДУБОДЕЛОВА Екатерина Владимировна, *к.т.н., старший преподаватель*
Белорусский государственный технологический университет

Мониторинг санитарно-гигиенического состояния производственной среды является одним из эффективных инструментов управления безопасностью и качеством пищевых продуктов. Это обусловлено тем, что в настоящее время наблюдается ухудшение экологического состояния объектов внешней среды, загрязнение рыбы и других морепродуктов токсикантами и паразитами. Нельзя не заметить, что соблюдение правил производственной санитарии и гигиены в современных условиях также важно, как личная гигиена для любого человека. Порядок соблюдения санитарного режима, способы проведения дезинфекции и санитарно-гигиенические и противоэпидемические требования, в том числе микробиологические, регламентируются СанПиН от 24.08.2012 № 129 «Санитарно-эпидемиологические требования для организаций, осуществляющих производство рыбной продукции».

Рыбоперерабатывающим предприятиям при контроле общей бактериальной обсемененности необходимо определять наиболее значимую и многочисленную группу микроорганизмов, а именно, количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (далее КМАФАнМ). Известно, что КМАФАнМ продукта – количество живых мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г (1 см³). В составе КМАФАнМ представлены различные таксономические группы микроорганизмов – бактерии, дрожжи, плесневые грибы. Необходимость контроля КМАФАнМ обусловлена тем, что с одной стороны оптимальная температура для роста данных микроорганизмов составляет интервал 35–37 °С (в аэробных условиях), температурная граница роста – 20–45 °С, с другой стороны, предпочтительной средой обитания мезофильных микроорганизмов являются теплокровные животные, также они приспосабливаются к таким средам как почва, вода, воздух. Показатель КМАФАнМ оценивается лаборантом-микробиологом по численности мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, выросших в виде видимых колоний на плотной питательной среде после инкубации при 37 °С в течение 48–72 ч.

В процессе исследований был проведен внутрिलाбораторный мониторинг по определению КМАФАнМ в производственной среде крупнейшего рыбоперерабатывающего предприятия Республики Беларусь ОАО «Белрыба». В данном эксперименте участвовало микробиологическое отделение производственной лаборатории данного предприятия, которое работало по Инструкции 4.2.10-15-10 «Микробиологический контроль производства пищевой продукции из рыбы и нерыбных объектов промысла». Испытания проводились на пяти объектах, представленных в виде уровней:

- уровень 1 – рабочий стол;
- уровень 2 – весы;
- уровень 3 – мелкий рабочий инвентарь (нож);
- уровень 4 – доска разделочная;
- уровень 5 – стена.

Выбор объектов для испытаний основывался на том, что на предприятии используется оборудование, инвентарь, тара, посуда, упаковочные материалы, изготовленные с применением различ-

ных материалов: металлов, сплавов, керамики, дерева, полимеров, эластомеров, лаков, и др. В процессе эксплуатации различных материалов под действием химических агентов (воды, спиртов, кислот, кислорода) или физических воздействий (температуры, света, ионизирующего излучения, механической энергии) может происходить деформация, растрескивание и разрушение изделий, что приводит к скоплению микроорганизмов. В производственной среде рыбоперерабатывающего предприятия наиболее опасными в санитарном отношении объектами в технологическом процессе являются рабочий стол, весы, мелкий рабочий инвентарь (нож), доска разделочная, стена.

Наиболее показательными, на наш взгляд, являются результаты оценки в упаковочном цехе ОАО «Белрыба», представленные в таблице.

Таблица – Результаты измерений КМАФАнМ

Номер измерений	Уровни, КОЕ на 1 см ³									
	1		2		3		4		5	
1	15	19	4	8	23	27	19	23	21	21
2	8	10	5	3	18	20	22	20	25	19
3	12	18	0	2	17	21	17	17	18	20
4	12	16	4	6	16	14	24	20	23	25
5	20	18	1	3	19	17	18	20	17	23

Из таблицы видно, что наиболее обсемененными являются стены, это связано с недостатком покрытия керамической плитки в том числе благодаря наличию стыков, которые в процессе эксплуатации подвержены выщелачиванию, а также наличию трещин, разрывов, неровных краев, где может скапливаться микрофлора. Наименее обсемененными по результатам испытаний являются весы, поверхность которых изготовлена из прочного, гладкого, водонепроницаемого и легкомоющегося материала. Гигиенический норматив по количеству КМАФАнМ составляет – не более 300 КОЕ на 1 см² поверхности. Следовательно, результаты, полученные по ходе испытаний показали, что санитарно-гигиенические требования на рыбоперерабатывающем производстве в упаковочном цеху соблюдаются, объекты, выбранные для анализа являются безопасными, однако требуют контроля с периодичностью 2 раза в месяц с обработкой поверхностей в процессе производства.

Далее была проведена статистическая обработка представленных данных в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-2 для оценки повторяемости, СТБ ИСО 5725-3 – для оценки промежуточной прецизионности.

В результате проведения испытаний были установлены следующие метрологические характеристики методики определения КМАФАнМ в производственной среде упаковочного цеха ОАО «Белрыба».

- СКО повторяемости $S_r = 2,30$ КОЕ/см³;
- предел повторяемости $r = 6,42$ КОЕ/см³;
- СКО промежуточной прецизионности $S_{I(T)} = 3,162$ КОЕ/см³;
- предел промежуточной прецизионности $R = 8,853$ КОЕ/см³.

Данная методика прошла процедуру валидации согласно требованиям СТБ ИСО 5725, что документально оформлено в виде плана и отчета по валидации. Результаты работ были использованы при подготовке к периодическому контролю производственной лаборатории ОАО «Белрыба» в форме аккредитации на соответствие требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025.

Таким образом, санитарно-гигиеническое состояние рыбоперерабатывающего производства, наряду с качеством сырья и технологическим процессом производства, является важным элементом систем контроля по обеспечению выпуска безопасных продуктов гарантированного качества за счет организации системы мер и осуществления контроля по их исполнению.

Список использованных источников

1. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений: СТБ ИСО 5725-2-2002. – Введ. 01.07.2003. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2003. – 56 с.
2. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений: СТБ ИСО 5725-3-2002.

– Введ. 01.11.2002. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2003. – 39 с.

3. Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы Республики Беларусь. Санитарно-эпидемиологические требования для организаций, осуществляющих производство рыбной продукции, утвержденные постановлением Совета Министров №129 от 24.08.2012. – Введ. 24.08.2012. – Минск: Госстандарт, 2012 – 28 с.

4. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий: СТБ ИСО/МЭК 17025. – Введ. 01.08.2007. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2007. – 40 с.

УДК 573.6: 577.158: 579.66

АНАЛИЗ ПУТЕЙ ДЕГРАДАЦИИ ПЕСТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ 2,4-Д-КИСЛОТ БАКТЕРИЯМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ

ИГНАТОВЕЦ Ольга Степановна, *к.б.н., доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии*

ЛЕОНТЬЕВ Виктор Николаевич, *к.х.н., доцент,
заведующий кафедрой биотехнологии и биоэкологии*

РАДЧЕНКО Юрий Сергеевич, *к.т.н., доцент,
декан факультета технологии органических веществ
Белорусский государственный технологический университет*

Пестициды на основе хлорфеноксиалканкарбоновых кислот (ФКК) интенсивно применяются при уничтожении сорняков. Среди гербицидов этой группы широко применяются препараты с 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) в качестве действующего вещества [1]. Это химическое соединение используется в составе таких препаратов как «Дикопур», «Аминка», «Левират», «Эстерон», «Элант», «Прима», «Диамакс», «Флоракс» и более 1500 других гербицидов. Однако применение указанных ксенобиотиков влечет за собой целый ряд проблем экологического характера.

Биотехнологический подход к предупреждению нежелательных для биосферы последствий, основанный на использовании микроорганизмов-деструкторов, способных превращать молекулы ксенобиотиков в безопасные формы, является одним из самых современных и позволяет избежать образования продуктов вторичного загрязнения. Огромная роль в деградации циркулирующих в окружающей среде ксенобиотиков принадлежит почвенным бактериям [2]. Целенаправленное применение микроорганизмов-деструкторов для биоремедиации природных сред требует изучения путей биотрансформации указанных соединений.

На кафедре биотехнологии и биоэкологии из почв, где с различной периодичностью применялись указанные ксенобиотики, были выделены 8 штаммов бактерий-деструкторов 2,4-Д. Используя данные для идентификации, выделенные микроорганизмы охарактеризовали до рода по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам: форма клеток, подвижность, окраска по методу Грама, оксидазная активность и каталазная активность, способность формировать гранулы поли-β-оксимасляной кислоты и наличие эндоспор. Культурально-морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика выделенных бактерий позволила установить, что они являются представителями родов *Pseudomonas* sp. Д2, Д3, Д5 Д6, Д8, *Bacillus* sp. Д1, Д4, Д7.

На следующем этапе исследований с помощью метода ВЭЖХ-МС были изучены продукты биодеградации 2,4-Д наиболее активными штаммами.

На рисунке 1 представлена хроматограмма 2,4-Д и продуктов ее деградации. Идентификацию образовавшихся продуктов проводили на основании масс- и электронных спектров, зарегистрированных в хроматографических пиках в разные временные интервалы от начала ферментации

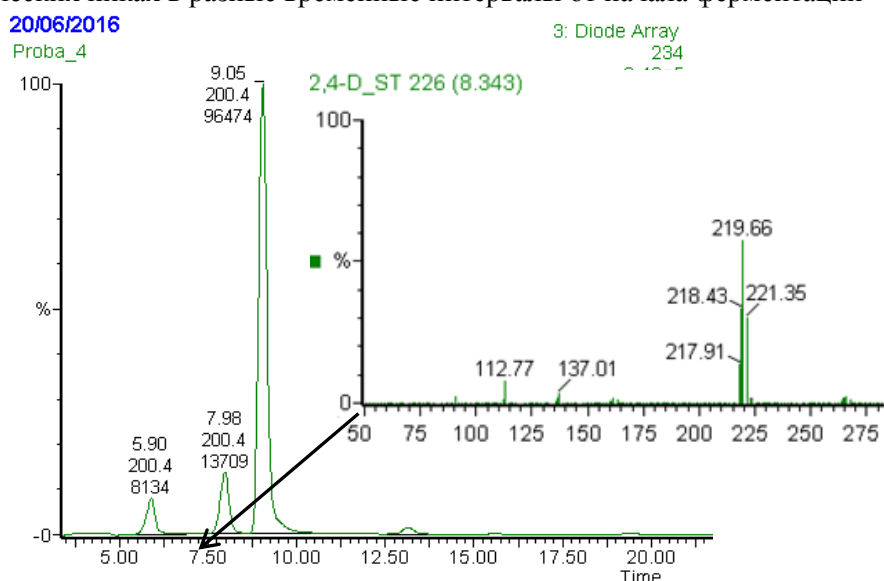


Рисунок 1 – Хроматограмма 2,4-Д и интермедиатов ее деградации (на 5-ые сутки культивирования) и масс-спектр 2,4-Д.

Продукт 1 – появлялся в КЖ на первые сутки культивирования бактерий-деструкторов. Хроматографический пик со временем удержания 9,05 мин (рисунок 2). В масс-спектре этого соединения, полученном при электроспрей ионизации в отрицательной области был зарегистрирован интенсивный пик молекулярного иона с m/z 162,01 соответствующий иону $[M-H]^-$ (рисунок 2). Электронный спектр данного соединения изменился по сравнению со спектром субстрата, а именно максимум поглощения сместился на 3 нм в красную область. На основании полученных результатов, сделали вывод о соответствии структуры продукта 1 2,4-дихлорфенолу, который образуется при воздействии на субстрат монооксигеназной ферментной системы, что хорошо согласуется с литературными данными.

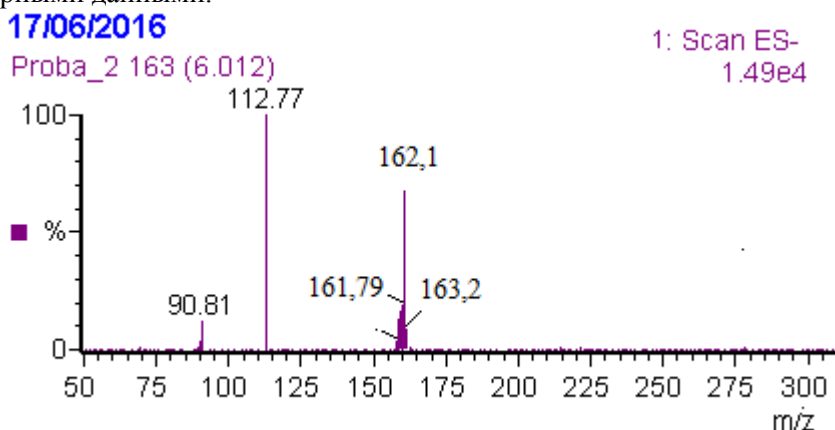


Рисунок 2 – Масс-спектр интермедиата биодеградации 2,4-Д (получен на 1-ые сутки культивирования)

Продукт 2 появлялся на 4-ые сутки культивирования, был более полярным чем 2,4-дихлорфенол (время выхода из колонки 5,9 мин). В масс-спектрах детектируется только в области отрицательно заряженных ионов. Хроматографически более подвижен, чем первый интермедиат. Масс-спектр представлен на рисунке 3. Данное соединение имеет молекулярный ион с m/z 191,5 и является 2-хлормалеилацетатом. Это соединение образуется за счет действия целого ряда ферментов и является одним из промежуточных продуктов деградации 2,4-дихлорфенола через ортоссащепление. Электронный спектр продукта имеет максимум поглощения при 275 нм. Это обусловлено сопряжением n и π электронов двойной $C-C$ связи и атомов кислорода.

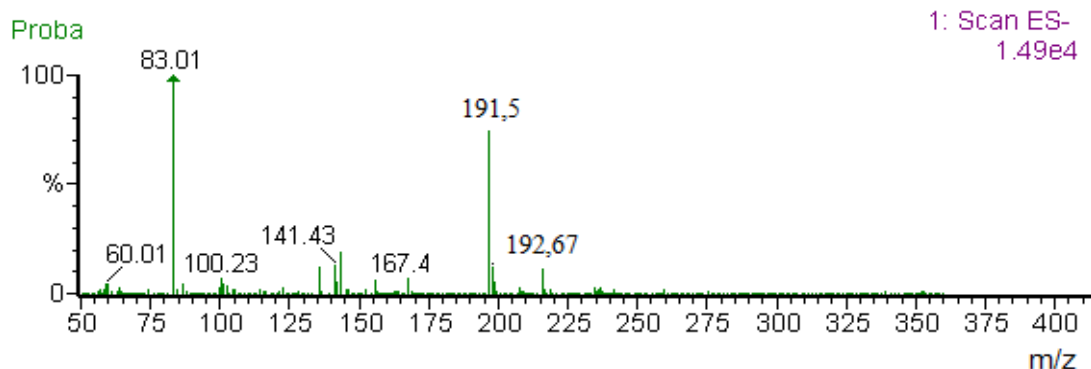


Рисунок 3– Масс-спектр интермедиата биодegradации 2,4-Д (получен на 5-ые сутки культивирования)

Таким образом, установлено что дegradация 2,4-Д ферментными системами бактерий-деструкторов протекает через орто-расщепление 2,4-дихлорфенола и сопровождается образованием таких промежуточных продуктов как 2,4-дихлорфенол и 2-хлормалеилацет.

Полученные результаты будут использованы при разработке препарата для биоремедиации природных сред, загрязненных пестицидами на основе 2,4-Д.

Список использованных источников

1. Исследование дegradации фенола, хлорфенолов и 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты консорциумом микроорганизмов деструкторов /Л.Х. Халимова [и др.]; – Башкирский химический журнал, 2006. – Т. 13. № 1. – С. 210-224.

2. Stoytcheva, M Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management / M. Stoytcheva.– Rijeka, Croatia: In Tech, 2011. – 520 p.

УДК 579.61:579.25

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МЕТИЦИЛЛИНУ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

КОРОЛЕВИЧ Виолетта Михайловна, м.п.б.

ЖУК Ольга Николаевна, к.б.н., доцент

Полесский государственный университет

С момента появления в 70-х годах и до настоящего времени метициллинрезистентные стафилококки и, прежде всего, метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA) являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. Частота MRSA в структуре стафилококковых инфекций за последние годы резко возросла во всём мире [1, с.12].

В связи с этим целью работы является выявление резистентности к метициллину с помощью метода полимеразной цепной реакции.

Исследования были проведены в лаборатории «клинической и экспериментальной микробиологии» на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», а также в научно - исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования –«Полесский государственный университет».

S.aureus выделяли у пациентов УЗ «Пинская центральная больница» (30 больных), идентифицировали с использованием прибора Vitek 2 Compact, детекцию экспрессии гена *mecA* *S.aureus* проводили с помощью полимеразной цепной реакции, выделение ДНК – по методике В.А. Великова [2, с. 48].

Для проведения полимеразной цепной реакции, было подобрано определенное количество компонентов на 1 пробу (Таблица).

Таблица – Количество компонентов на 1 пробу (мкл)

Компоненты	Объем на реакцию, мкл
Прямой праймер	3,16мкл.
Обратный праймер	2,32 мкл
Буфер	2,5 мкл
дНТФ	1,3 мкл
Таg-полимераза	0,4 мкл
ДНК	1 мкл
Вода	13,27 мкл
MgCL2	1,25 мкл

У 10 пациентов из 30 обследованных был выделен *S.aureus*.

Типичные продукты амплификации *mesA*-S1281 и *mesA*- A1341 комплекса одновременно были получены у 6 (60%) исследованных изолятов. Чтобы исключить возможность загрязнения ДНК другого штамма, ПЦР была повторена для образцов ДНК, изолированных независимо друг от друга из 5 отдельных колоний, выросших на отдельных чашках. Во всех повторных экспериментах был получен тот же профиль продуктов ПЦР (рисунок).

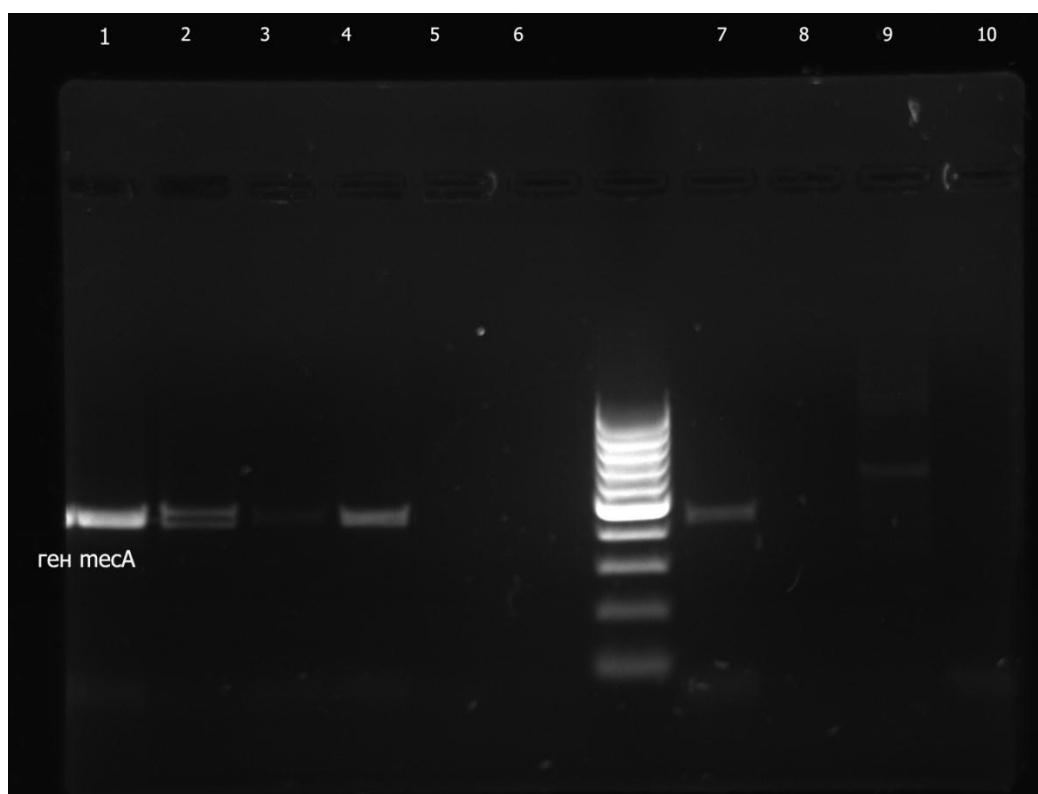


Рисунок - Электрофореграмма гена *mesA*

Во всех 6 изолятах была выявлена устойчивость штаммов *S.aureus* к бета-лактамам (пенициллину, цефалоспорином, карбапенемам), что указывает на неэффективность лечения таких больных указанными препаратами.

Таким образом, множественная лекарственная резистентность к большинству бета-лактамов ассоциирована с наличием гена *mesA*.

Список использованных источников

1. Ермакова, Т. С. Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций / Т. С. Ермакова, В. А. Горбунов, Л. П. Титов // Здоровоохранение. – М.: 2011. – 25 с.

ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ПОЛИСАХАРИДЫ И ЭКЗОДЕПОЛИМЕРАЗЫ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК РАСТЕНИЙ

КУЛИШ Светлана Анатольевна, *ст. научный сотрудник*
САПУНОВА Леонида Ивановна, *к.б.н., доцент, главный научный сотрудник*
ЕРХОВА Людмила Викторовна, *мл. научный сотрудник*
Институт микробиологии НАН Беларуси

В современном животноводстве в качестве альтернативы антибиотикам все более широкое применение находят кормовые добавки комплексного действия, которые содержат активные (живые) дрожжи, полисахариды и ферменты. Известно, что полисахариды обладают иммуностимулирующим, гиполипидимическим, противовоспалительным, радио- и криопротекторным действием. Ферменты участвуют в деструкции белков и полисахаридов, что способствует повышению питательной ценности и усвояемости кормов. Эффект от использования дрожжевых культур выражается в укреплении иммунитета и нормализации пищеварения у животных, сокращении их заболеваемости, смертности и, как следствие, повышении рентабельности животноводства [1, с. 18; 2, с. 114].

В настоящее время в мире зарегистрировано немногим более десятка кормовых добавок, содержащих различные штаммы дрожжей от европейских, американских и китайских производителей [1, с. 21]. В Беларуси официально зарегистрированы кормовые добавки, основным компонентом которых являются клеточные стенки дрожжей, в т.ч. гидролизованные и фосфорилированные, производства Украины, Франции, Бельгии, Нидерландов, а также препараты, включающие инактивированные дрожжевые клетки производства Литвы, Польши. Отечественные производители (ООО «Биоком», ООО «Мол-Интер-Фуд») предлагают кормовые продукты на основе импортных составляющих (дрожжевых клеточных стенок и/или глюканов, глюкаманнанов), которые предназначены, в основном, для адсорбции микотоксинов. Кормовая добавка пребиотического действия на основе живых дрожжей рода *Cryptococcus* разработана в Институте микробиологии НАН Беларуси, на опытно-промышленном производстве которого ведется освоение ее выпуска. Собственного производства кормовых добавок комплексного действия на основе живых дрожжей в Беларуси не имеется, что обуславливает актуальность исследований в названном направлении.

Целью настоящей работы явилось получение штамма дрожжей – продуцента полисахаридов и экзогидролаз, разрушающих полимеры клеточных стенок растений.

Объектами исследования были 52 культуры дрожжей, выделенные из природных источников (почва на территории молочной фермы, разлагающиеся растительные остатки, поверхность контаминированного посторонней микрофлорой сквашенного молока, зерно сельскохозяйственных культур). Изучение продукции дрожжами ферментов проводили чашечным методом, который предусматривает выращивание культур при 26–28 °С в течение 72 ч на питательных средах различного состава с добавлением субстратов исследуемых ферментов [3, с. 1022]. Синтез культурами полисахарида оценивали визуально. Опыты выполнены в трехкратной повторности.

В результате среди исследованных изолятов было отобрано 6 культур, которые выделялись повышенным уровнем синтеза полисахарида. Одна из культур (ФПСК-17), кроме того, продуцировала каротиноиды.

Оценка ферментативной активности показала способность отобранных штаммов продуцировать комплекс, включающий ферменты различной субстратной специфичности (таблица).

Таблица – Характеристика ферментативной активности дрожжей, выращенных на агаризованных средах со специфическими субстратами

Изолят дрожжей	Активность:						
	липазы	протеазы	α -амилазы	пектиназы	эстеразы	целлюлазы	хитиназы
ФПС-1	–	+	+	+	+	–	–
ПСК-10	–	–	+	+	–	–	–
ФПС-16	+	+	–	–	–	–	–
ФПСК-17	+	+	–	+	+	+	–
ПСК-25	–	+	–	+	–	+	–
ПСК-34	–	+	+	+	–	–	–

Как видно из приведенных в таблице данных, свойство синтезировать весь комплекс исследованных ферментов не выявлено ни у одной из отобранных дрожжевых культур. Максимальное количество компонентов ферментного комплекса, включающего липазу, протеазу, пектиназу, целлюлазу и эстеразу, продуцирует изолят ФПСК-17.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных изолят ФПСК-17 отобран в качестве штамма-продуцента комплекса биологически активных веществ – полисахаридов, каротиноидов и ферментов, участвующих в переваривании кормов растительного происхождения. Живая культура дрожжей после идентификации, исследования токсикологических, культурально-морфологических, физиолого-биохимических и генетических свойств будет использована для создания опытно-промышленной технологии производства кормовой добавки комплексного действия.

Список использованных источников

1. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия / А. Г. Лобанок [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 1. – С. 17-22.
2. Microbial exopolysaccharide – an inevitable product for living beings and environment / S. R. Dave [et al.] // J. Bacteriol. Mycol. – 2016. – Vol. 2, No. 4. – P. 112-117.
3. Buzzini, P. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments / P. Buzzini, A. Martini // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 93, No. 6. – P. 1020-1025.

УДК 579.22

КАЛЬЦИЕВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ ДЫХАНИИ И БРОЖЕНИИ

ПОДОЛЬСКИЙ Дмитрий Эдуардович, магистрант
Полесский государственный университет

Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* способны к осуществлению процессов брожения и дыхания. В клетках *S. cerevisiae*, глюкоза является предпочтительным источником углерода, а брожение – основной путь для производства энергии, даже в аэробных условиях. Однако, в случае дефицита глюкозы, этанол, произведенный в результате брожения, а также лактат, ацетат или глицерин могут быть использованы в качестве источника углерода и энергии, что требует переключения метаболизма дрожжевых клеток в режим дыхания [4].

Известно, что при переходе с одного типа энергетического метаболизма на другой (с брожения на дыхание и наоборот), наблюдается динамика количества митохондрий в клетках дрожжей. Митохондрии включают в себя уникальный набор ключевых клеточных функций, таких как синтез

АТФ, производство активных форм кислорода (АФК) и буферизацию Ca^{2+} . Способность митохондрий к накоплению ионов кальция позволяет им кодировать и расшифровывать сигналы Ca^{2+} , оказывая прямое влияние на сигнализацию клеток и энергетический метаболизм [5].

Кальциевая сигнализация является универсальным механизмом, с помощью которого внеклеточные сигналы модифицируют активность клеток. Клетки декодируют сигналы Ca^{2+} на основе характеристик внутриклеточных изменений концентрации Ca^{2+} (амплитуда, длительность, частота и локализация), что оказывает влияние на клеточные процессы (например, пролиферацию или апоптоз). С этой целью в эукариотических клетках возник комплексный инструментарий Ca^{2+} , который включает в себя белки, способные обнаружить изменения уровня Ca^{2+} , тем самым индуцируя сигнальный каскад, а также сложные гомеостатические механизмы, включающие кальциевые каналы в плазматической мембране и мембранах органелл, кальций-связывающие белки, а также системы экстрюзии и секвестрации кальция [3].

Несмотря на значительные достижения в исследовании роли кальция во внутриклеточной сигнализации, малоизвестными остаются механизмы участия ионов кальция в переходе между различными типами метаболизма клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Клетки *S. cerevisiae* являются исключением среди других эукариот с точки зрения кальциевой сигнализации в митохондриях. В этих одноклеточных организмах отсутствуют Ca^{2+} -унипортёры, эквивалентные таковым у млекопитающих, и, соответственно, отсутствуют чувствительные к кальцию дегидрогеназы. Ключевое значение в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae* играет переносчик Sal1p , входящий в семейство кальций-зависимых АТР-Mg/Pi-переносчиков. Показано, что Sal1p является мишенью для глюкозоиндуцированных кальциевых сигналов, участвует в осуществлении переноса АТФ и АДФ, что приводит к быстрому росту митохондриальных уровней АТФ. Увеличение уровня кальция влечет за собой активное поступление АТФ при росте дрожжей на глюкозе [2].

В то же время при перегрузке кальцием митохондрии подвергаются митоптозу (т.е. процессу запрограммированной смерти митохондрий, приводящего к удалению поврежденных митохондрий, что может привести к дальнейшей интоксикации клетки и апоптозу), в механизмах которого большую роль играют активные формы кислорода, значительный рост количества которых наблюдается при аэробном дыхании. Кроме того, накопление кальция в митохондриях регулируется активностью пор высокой проницаемости (mPTP) [1].

Известно, что процесс открытия пор высокой проницаемости в клетках *S. cerevisiae* активируется дыханием, поступлением цитозольной АТФ в отсутствие фосфата или АДФ. При вышеназванных условиях добавление дыхательного субстрата (этанол, глицерин) вызывает открытие этих пор [2]. Открытие данных пор опосредовано повышением значения рН матрикса митохондрий. В различных экспериментах было показано, что при наличии в среде ионов Ca^{2+} , происходит их поглощение, а также последующий их выход и набухание митохондрий. Выяснено, что фосфат является ингибитором пор высокой проницаемости. При этом известно, что быстрый приток кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану может уменьшить скорость транспорта фосфата, что в конечном счете приводит к открытию mPTP [2].

Кроме того, снижение уровня мембранного потенциала, вызванное быстрым поглощением Ca^{2+} , стимулирует активность дыхательной цепи, приводя к увеличению разности рН и открытию пор высокой проницаемости без влияния фосфата. Увеличение ионов кальция в матриксе вызывает связывание или осаждение фосфатов, что также благоприятствует открытию пор высокой проницаемости. Интересным является то, что в результате кратковременного открытия mPTP, через них может высвобождаться часть ионов Ca^{2+} , что предотвращает набухание и разрушение митохондрий и является защитным механизмом [2].

Таким образом, поскольку при переходе клеток дрожжей от одного типа метаболизма к другому наблюдаются динамические ассоциированные с колебаниями кальция изменения различных параметров митохондрий, перспективным является дальнейшее исследование механизмов участия митохондрий в регуляции кальциевого гомеостаза клеток дрожжей с целью разработки способов направленной регуляции метаболизма *Saccharomyces cerevisiae* для биотехнологических целей.

Список использованных источников

1. Скулачёв, В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачёв. // Соросовский образовательный журнал. – Том 7. – № 6, 2001. – С. 5.
2. Bradshaw, D. C. Characterization of the Respiration-Induced Yeast Mitochondrial Permeability Transition Pore / Bradshaw D. C., Pfeiffer D. R. // Yeast. 2013, Dec; 30(12). P. 471-483.

3. Contreras, L. Mitochondria: The calcium connection / Contreras L., Drago I., Zampese E., Pozzan T. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. Vol. 1797, Issues 6–7, June–July 2010, P. 607-618.

4. Gasmi, N. The Switch from Fermentation to Respiration in *Saccharomyces cerevisiae* is Regulated by the Ert1 Transcriptional Activator/Repressor / Gasmi N., Jacques P.-E., Klimova N., Guo, X [and etc.] // *GENETICS*. October 1, 2014 vol. 198. P. 547-560.

5. Uzhachenko, R. Mitochondria, calcium, and tumor suppressor Fus1: At the crossroad of cancer, inflammation, and autoimmunity / Uzhachenko R., Shanker A., Yarbrough W. G., Ivanova A. // *Oncotarget*. 2015; P. 20754-20772.

УДК 579.222+577.15+57.083

СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ КОМПЛЕКСА ЭКЗОГИДРОЛАЗ, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ РАСЩЕПЛЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

САПУНОВА Леонида Ивановна, к.б.н., доцент, главный научный сотрудник

ТАМКОВИЧ Ирина Олеговна, к.б.н., старший научный сотрудник

ЛОБАНЮК Анатолий Георгиевич, академик, заведующий лабораторией

КУЛИШ Светлана Анатольевна, старший научный сотрудник

Институт микробиологии НАН Беларуси

Устойчивая мировая тенденция к увеличению объемов потребления продукции животноводства при сокращении производства кормов и роста цен на них неизбежно ведет к увеличению затрат в комбикормовой и, как следствие, в пищевой промышленности, а также обуславливает возрастание роли кормовых добавок, в т.ч. ферментов, в животноводстве и птицеводстве.

Известно, что комбикорма растительного происхождения содержат так называемые антипитательные вещества – целлюлозы, гемицеллюлозы, в т.ч. бета-глюканы и пентозаны, лигнины, фитат, пектины и др., которые плохо усваиваются организмом животных и птицы. Как следствие, снижается их продуктивность, повышается расход кормов, в рационах возрастает удельный вес зернофуража, что влечет за собой, удорожание животноводческой продукции, снижение ее количества, качества и конкурентоспособности.

Введение в рационы животных экзогенных деполимераз позволяет в качестве ингредиентов комбикормов использовать разнообразное растительное сырье, включая дешевые отходы его переработки – жмыхи и шроты подсолнечника, рапса, сои, гороха, нута, отруби, свекловичный жом, спиртовую барду, пивную дробину и т.п. Это повышает питательную ценность и усвояемость кормов, снижает их расход, нормализует микробиоценоз кишечника, что уменьшает количество помета и обедняет его состав, улучшает эпидемиологическую и экологическую обстановку в районах ведения животноводства [1–3].

В рационы животных включают, как правило, мультиэнзимные комплексы микробного происхождения с различным, в зависимости от компонентного состава растительных кормов, соотношением ферментных составляющих [1]. Микроорганизмы, за редким исключением, продуцируют одновременно ограниченное количество ферментов, участвующих в гидролизе полимеров растительного сырья. Поэтому полиферментные комплексы получают, как правило, смешиванием отдельных компонентов, продуцируемых различными микроорганизмами, в исключительных случаях – путем синтеза комплекса ферментов одним штаммом-продуцентом в рамках одного технологического процесса, что экономически наиболее предпочтительно.

Известен, например, штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1.1111, который синтезирует комплекс ферментов, включающих преимущественно протеазу, манна(на)зу, амилазу и глюкоамилазу и, в меньшей мере, ксиланазу, целлюлазу, фитазу, пектиназу и липазу [4]. Однако невысокое содержание именно последних из перечисленных ферментов при отсутствии бета-глюканазы ограничивает применение ферментного комплекса в животноводстве, особенно в качестве добавки к комбикормам с высоким содержанием липидов, фитата, некрахмалистых полисахаридов – пектинов, целлюлоз, гемицеллюлоз.

Цель настоящей работы – скрининг штамма-продуцента комплекса ферментов, гидролизующих широкий спектр растительных полимеров.

Объекты исследования – культуры микроорганизмов, которые выделяли с поверхности контаминированного посторонней микрофлорой сквашенного молока, из почвы, разлагающихся растительных остатков методом накопительных культур. Всего изолировано 75 различных по морфологии культур, из которых 52 (69,3 %) отнесены к бактериям, 23 (30,7 %) – к грибам.

Изучение ферментативной активности изолированных культур проводили на агаризованных средах, содержащих субстраты соответствующих ферментов. Бактерии выращивали на агаризованной среде Луриа-Бертани (28-30 °С, 48 ч), грибы – на сусло-агаре (24-26 °С, 96 ч). По окончании роста анализировали способность культур синтезировать протеазу, альфа-амилазу, глюкоамилазу, ксиланазу, бета-глюкканазу, целлюлазу, фитазу, пектаглиязу, альфа- и бета-галактозидазу, липазу по наличию и размеру (мм) зон просветления или зон специфического окрашивания конечных продуктов ферментативных реакций вокруг их колоний, образующихся в результате гидролиза соответствующих субстратов. Об активности альфа- и бета-галактозидазы судили соответственно по желтой или синей окраске колоний, выросших на средах с р-нитрофенил- α -D-галактозидом или 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозидом в качестве хромогенных субстратов. Повторность опытов трехкратная.

Анализ полученных данных показал, у наибольшего числа отобранных культур обнаруживалась активность протеолитических (71), амилолитических (альфа-амилазы – 69, глюкоамилазы – 60), целлюлолитических (ксиланазы – 67, целлюлазы – 65, бета-глюкканазы – 63) и пектолитических (64) ферментов (рисунок). В меньшей мере исследуемые культуры проявляли свойство синтезировать фитазу (47) и липазу (41). При этом доля культур с относительно высоким уровнем продукции альфа-амилазы и протеазы составляла 25,3–28,0 %, пектиназы – 20,0 %, глюкоамилазы, липазы и бета-глюкканазы – 12,0–13,3 %, тогда как фитазы, целлюлазы и ксиланазы – всего 2,7–5,3 %. Активность альфа- и бета-галактозидазы была обнаружена соответственно у 4 (5,3 %) и 7 (9,3 %) из 75 изученных культур.

Среди дрожжевых грибов активное образование протеазы, пектиназы, целлюлазы, липазы при-суще изоляту ФПСК-17, который в условиях опыта синтезирует также внеклеточные полисахариды и каротиноиды.

Высоким уровнем продукции одновременно всех исследуемых ферментов характеризовалась только одна культура, МФ-1, которая на основании культурально-морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических особенностей идентифицирована как *Bacillus amyloliquefaciens*.

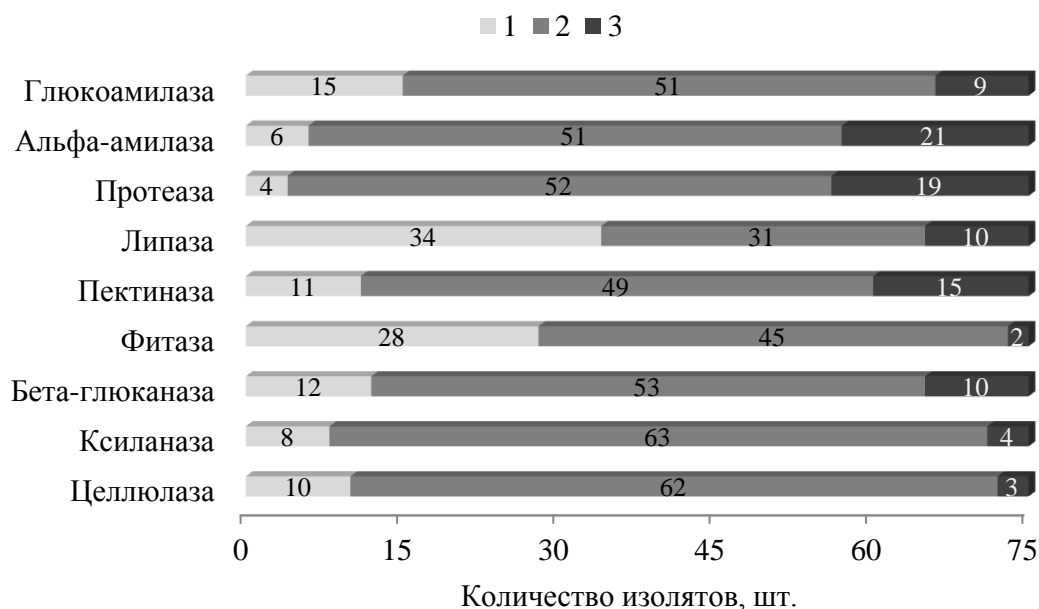


Рисунок – Ферментативная активность изолированных культур, определяемая по зонам гидролиза субстратов: 1 – 0 мм, 2 – 0,1-20,0 мм, 3 – > 20,0 мм

Таким образом, из числа выделенных из природных источников микробных культур отобран новый бактериальный штамм *Bacillus amyloliquefaciens* МФ-1 – продуцент мультиферментного комплекса, катализирующего гидролиз полимеров растительного происхождения. Кроме того, об-

наружен дрожжевой гриб ФПСК-17 – продуцент комплекса биологически активных веществ, представленных протеазой, пектиназой, целлюлазой, липазой, внеклеточными полисахаридами и каротиноидами. Отобранные микроорганизмы найдут применение при разработке технологий получения новых кормовых добавок.

Список использованных источников

1. Ravindran, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities / V. Ravindran // J. Appl. Poult. Res. – 2013. – Vol. 22, No. 3. – P. 628-636.
2. Kiarie, E. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry / E. Kiarie, L. F. Romero, C. M. Nyachoti // Nutr. Res. Rev. – 2013. – Vol. 26, No. 1. – P. 71-88.
3. Sujani S. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: a review / S. Sujani, R. T. Seresinhe // Asian J. Anim. Sci. – 2015. – Vol. 9, No. 3. – P. 85-99.
4. One-bacterium multiple-enzyme bacterial strain as well as screening method and application thereof : pat. No. 102864091 (B) (CN), IC A23K1/165; C12N1/20; C12N9/56; C12Q1/04; C12R1/1252013 / Liu Y.; Zhang Q.; Li H.; Zhang C.; Wang Y.; Guan S.; Gong T.; Ding K.; Li X.; Wu T.; Li Y.; Wang C. ; applicant: UNIV HENAN SCIENCE & TECH. – Appl. No. CN 2012110890 ; prior. date 15.01.2012 ; publ. date 09.01.2013.

БИОТЕХНОЛОГИИ В ГЕНЕТИКЕ И МЕДИЦИНЕ

УДК 616.12 – 008.331.1

МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ЕЁ ОСЛОЖНЕНИЙ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ЛОГОЙСКОГО РАЙОНА

¹БУБЫРЬ Ирина Валерьевна, *ст. преподаватель*¹

²ЛЕМЕСШЕВСКИЙ Виктор Олегович, *к.с.-х.н., доцент*²

¹НАТЫНЧИК Татьяна Михайловна, *ст. преподаватель*¹

¹ГОРЕЛИК Сергей Валерьевич, *студент*¹

¹Полесский государственный университет

²Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета

По данным статистики в настоящее время отмечается неуклонный рост заболеваний сердечно-сосудистой системы, среди которых артериальная гипертензия (АГ) остаётся одной из самых актуальных медицинских проблем [3], что так же связано с достаточно большой распространённостью заболевания [2].

АГ является важнейшей медико-социальной проблемой и занимая особое место среди заболеваний сердечно-сосудистой системы часто приводит к таким осложнениям как гипертензивный криз, инфаркт миокарда, инсульт, острая левожелудочковая недостаточность, которые являются причинами летального исхода (смерти) [1].

АГ страдает примерно 35-40 % взрослого населения. Среди лиц старше 55 лет распространённость заболевания увеличивается и достигает 50-65 %. Чаще всего наблюдается заболевания у лиц трудоспособного возраста. Около 50 % всех случаев смерти от сердечно-сосудистых заболеваний приходится на долю АГ. Даже при употреблении антигипертензивных препаратов средняя продолжительность жизни составляет 20-30 лет. Диагностика, лечение и профилактика АГ и ее осложнений не могут быть эффективными без активного участия в нем пациента. Потому он должен быть ориентирован в этом заболевании и при первых симптомах обращаться к врачу.

Цель работы – изучить АГ и ее осложнения, и произвести мониторинг заболеваемости артериальной гипертензии на территории Логойска и Логойского района в период за 2010-2015 гг.

При проведении исследования была изучена отчетная документация и изучены показатели деятельности Логойской ЦРБ за 2010-2015 годы. Выполнен анализ отчетной документации и статистических показателей по заболеваемости населения АГ и ее осложнений на территории Логойска и Логойского района.

При анализе статистических данных по заболеваемости на территории Логойска и Логойского района выявлено следующее. Заболевания дыхательной системы составляют 27 % от общей заболеваемости; заболевания системы кроветворения – 25 %; заболевания органов пищеварения – 19 %; травмы – 16 %; онкологические заболевания – 13 %; инфекционные заболевания – 3 %.

При анализе заболеваемости сердечно-сосудистой системы в условиях Логойска и Логойского района установлено, что 50 % всех случаев составляют гипертонические кризы; 23 % - острый коронарный синдром (ОКС) (инфаркт миокарда и стенокардии); 21 % - острая недостаточность мозгового кровообращения (ОНМК); 6 % - острая левожелудочковая недостаточность (ОЛЖН) (сердечная астма, отек легкого).

По данным мониторинга за период за 2010-2015 годы выявлено, что заболевание АГ отмечается в более раннем возрасте и связано это с внешними факторами и вредными привычками. Частыми осложнениями АГ встречаются ОКС и ОНМК и ОЛЖН. С ОКС чаще встречаются мужчины в возрасте от 40-49 лет, что связано с игнорированием первых симптомов и откладыванием похода к врачу и лечения. Немного реже переносят ОКС мужчины в возрасте от 70 и старше, что связано с привыканием к препаратам и появлением других заболеваний с похожей симптоматикой.

Наибольшая частота встречаемости летального исхода от ОКС приходится на возраст 70 лет и старше. Самым частым осложнением ОКС является острая левожелудочковая недостаточность.

Максимальная частота встречаемости перенесенного ОНМК наблюдается у женщин в возрасте от 60 лет и старше, что обусловлено привыканием к гипотензивным препаратам и несвоевременной корректировкой схемы лечения.

Основную долю пациентов, страдающих АГ, составляют лица от 40 лет и старше, поэтому вероятность заболевания с возрастом увеличивается.

По результатам теоретического и практического исследования можно отметить, что в группу риска по развитию АГ следует отнести следующие категории лиц:

- мужчин в возрасте старше 40 лет;
- людей с избыточной массой тела;
- ведущих малоактивный образ жизни;
- лиц, имеющих вредные привычки: курение и употребление алкоголя;
- имеющих атеросклероз, сахарный диабет, ишемическую болезнь сердца.

С учетом вышеизложенного можно отметить, что АГ страдают около 40 % взрослого населения Беларуси. Хотя за последние годы количество пациентов, которые знают о своем заболевании и принимают гипотензивные препараты, увеличилось, но стабильной нормализации артериального давления (АД) добиваются только 21,5 % пациентов. Как известно, повышенное АД приводит к поражению сердца, периферических сосудов и сосудов головного мозга, почек. Пациенты при АГ погибают от органических осложнений заболевания: инсультов, инфарктов, сердечной и почечной недостаточности. АГ может привести к развитию деменции.

Особенно важно, чтобы гипотензивная терапия позволяла достигать и стабильно поддерживать артериальное давление на целевом уровне. Это позволяет добиться максимального снижения сердечно-сосудистого риска и защиты органов-мишеней.

Лекарственная терапия обязательно должна сочетаться с немедикаментозными мерами, направленными на модификацию факторов риска: снижением массы тела, отказом от курения, ограничением употребления в пищу поваренной соли, алкоголя, повышением содержания в пище калия и увеличением физических нагрузок. Причем подобные рекомендации должны даваться как с целью профилактики АГ у пациентов с факторами риска и коррекции АД у пациентов низкого и среднего риска, так и на фоне лекарственной терапии для увеличения ее эффективности.

Список использованных источников

1. Бубнова, М.Г. Современные принципы профилактики и лечения артериальной гипертонии. Анализ основных положений международных рекомендаций / М.Г. Бубнова // Справочник поликлинического врача. – 2005. – № 4. – С. 8-14.
2. Бурмистрова, Е.К. Развитие артериальной гипертонии у лиц, подверженных влиянию хронического стресса: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.К. Бурмистрова. – Самара, 2009. – 16 с.
3. Кузнецова, Н.В. Клиническая фармакология: учебник / Н.В. Кузнецова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 272 с.

УДК 577

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА DNA-COMET ASSAY ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa, ВЫЗВАННЫХ ОСНОВАНИЯМИ ШИФФА И ИХ КОМПЛЕКСАМИ С ИОНАМИ МЕДИ(II)

DZEIKALA Aliaksandr, *MSc. (in Biology) PhD student,*
NOWAK Adriana, *PhD (in Biology), Adiunct;*
SYKUŁA Anna, *PhD (in Chemistry), Adiunct;*
ŁODYGA-CHRUŚCIŃSKA Elżbieta, *Prof. (in Chemistry)*
Poland, Lodz University of Technology

Введение. Попытки, направленные на изучение ядерных структур клетки и количественное определение нитевых повреждений ДНК в одиночных клетках организмов, были предприняты еще в 1978г. такими учеными, как Cook и Brazell [1]. Однако лишь в 1984г. шведские исследователи Ostling и Johanson разработали новый метод определения повреждений ДНК [2].

Именно они, в публикации 1984г., заметили, что изображения фрагментов ДНК, мигрировавших в электрическом поле, напоминали астрономические кометы. «Кометы», полученные учеными из Швеции, обладали главными характеристиками космических комет: они имели «голову» и «хвост» [3]. Отсюда и пошло название – метод ДНК-комет (DNA-comet assay).

«Голова» кометы состоит из клубка ДНК, а «хвост» из мигрировавшей ДНК [1], для визуализации генетического материала препараты окрашивают флуоресцентными красителями (бромистый этидий, акридиновый оранжевый и др.), а затем визуализируют с помощью флуоресцентного микроскопа [3]. Впоследствии метод неоднократно модифицировался и совершенствовался с целью его упрощения и повышения чувствительности выявления повреждений клеточной ДНК.

Надо четко представлять, что «комета» образуется не из клетки живого организма, а именно из ее ДНК. Помещенная в агарозный слой суспензия клеток образует полости, которые в процессе лизиса занимает ДНК этих клеток. Все дальнейшие манипуляции в методе ДНК-комет осуществляются именно с ДНК.

Материалы и методы исследования. В настоящей работе представлены результаты оценки уровня повреждений ДНК раковых клеток линии HeLa, вызванных основаниями Шиффа на основе гесперетина (hesperetin) и их комплексов с ионами меди(II), структуры исследуемых соединений представлены на рисунке 1. Гесперетиновые основания Шиффа синтезированы в результате реакции флавоноида с *N*-бензоил гидразином (*N*-benzoyl hydrazine) – HHSB и иониазидом (isoniazid) – HIN. Получение основания Шиффа являлись основой для синтеза их комплексов с ионами меди(II). Структура и физико-химические свойства лигандов и их комплексов охарактеризованы с помощью, спектроскопии ядерного магнитного резонанса ядер ^1H и ^{13}C , инфракрасной спектроскопии, абсорбционной спектрофотометрии, элементного анализа (Lodyga-Chruscinska et al. 2015).

Культура клеток. Клеточная линия аденокарциномы шейки матки человека (HeLa) использовалась в качестве модельной клеточной линии в исследовании. Клетки культивировали в течение 7 дней при 37°C в атмосфере 5% CO_2 с использованием модифицированной Дульбекко среды (DEME, Sigma), дополненной 10% фетальной сывороткой телят (FBS, Gibco), 4 mM GlutaMAXTM (Gibco), 25 mM HEPES (Sigma), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ стрептомицина и 100 IU/mL пенициллина (Sigma).

Метод ДНК-комет (comet assay). Конечную концентрацию клеток HeLa в каждом образце доводили до 10^5 клеток/mL. 900 μL клеток инкубировали с 100 μL каждого соединения при 37°C в течение 1 часа. Все концентрации тестируемых соединений были свежеприготовлены непосредственно перед добавлением в культуру клеток линии HeLa. Конечные концентрации соединений: 1, 10 и 50 μM .

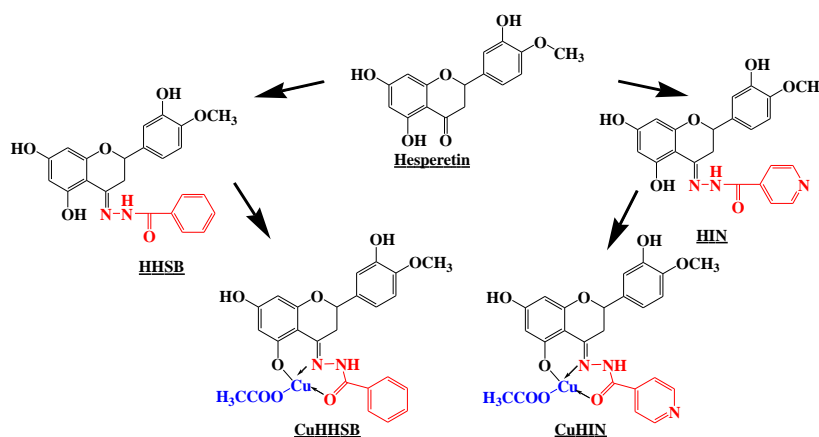


Рисунок – Химическая структура гесперетиновых производных оснований Шиффа HHSB, HIN и комплексов меди (II) CuHHSB, CuHIN.

Анализ комет проводили в щелочных условиях ($\text{pH} > 13$) в соответствии с процедурой Singh et al. 1988 с некоторыми изменениями (Klaude et al. 1996; Błasiak & Kowalik 2000). После инкубации клетки центрифугировали (182×g, 15 мин), декантировали, суспендировали в 0,75% LMP (низкая температура плавления агарозы), по истечению 10 мин наносили на слайды, предварительно покрытые 0,5% NMP (нормальная температура плавления агарозы) и лизировали. После часовой обработки в лизирующем буфере [2,5 M NaCl, 1% Triton X-100, 0,1 M EDTA и 10 mM Tris

(рН 10)] при 4⁰С, препараты помещены в электрофорезную камеру на 20 мин при 4⁰С в щелочной буфер [300 μМ NaOH и 1 μМ EDTA], а затем подвергнуты электрофорезу в течение 20 мин при напряженности электрического поля 0,73 В/см (300 мА) при той же температуре. После электрофореза проводили нейтрализацию дистиллированной водой. После чего слайды слегка подсушили и фиксировали.

Для окраски ДНК использовали 2,5 μg/mL пропидиевый йодид (propidium iodide). Визуализацию ДНК-комет проводили с помощью флюоресцентного микроскопа с использованием объектива × 200 (Nikon, Япония) и видеосистемы на основе цифровой камеры с программой анализа изображений – Lucia-Comet v. 7.0 (Laboratory Imaging, Прага, Чешская Республика). В качестве критерия поврежденности ДНК использовали % ДНК в хвосте комет.

Результаты и обсуждение. генотоксическую активность лигандов ННСВ и НИН, а также комплексов CuННСВ и CuНИН тестировали на опухолевых клетках линии HeLa в трех концентрациях: 1, 10 и 50 μМ, результаты исследований представлены в таблице. Положительным контролем в данной серии экспериментов были клетки линии HeLa, инкубировавшиеся в течение 1 часа в присутствии цисплатины (cisplatinum) при 37⁰С.

Таблица – Повреждение ДНК (± S.E.M.) в клетках линии HeLa после электрофореза для исследуемых соединений, выраженных в % ДНК в хвосте кометы. Количество клеток, проанализированных в каждом повторении, составляло не менее 50 ДНК-комет для каждого соединения.

Соединение	Концентрации соединений		
	50 μМ	10 μМ	1 μМ
	% ДНК в хвосте кометы (± S.E.M.)		
Cisplatin	66.1 ± 4.2	43.1 ± 5.1	21.9 ± 4.4
ННСВ	68.8 ± 4.1	43.8 ± 2.4	28.8 ± 4.1
CuННСВ	47.8 ± 3.8	27.1 ± 3.5	30.3 ± 4.6
НИН	46.7 ± 3.3	35.5 ± 4.7	28.9 ± 3.5
CuНИН	33.2 ± 4.0	17.4 ± 2.9	15.6 ± 1.8

Из таблицы следует, что генотоксичность цисплатина и ННСВ была самой высокой в сравнении с исследуемыми соединениями: от 21,9%±4,4% до 66,1%±4,2% и от 28,8%±4,1% до 68,8±4,1% для цисплатина и ННСВ, соответственно. Как ННСВ, так и его комплекс с медью показали генотоксическую активность, однако лиганд ННСВ показал большую генотоксическую активность, чем его комплекс CuННСВ, что было лучше продемонстрировано в случае более высоких концентраций – 10 и 50 μМ. В случае 1 μМ различия не были заметны, 28,8±4,1% и 30,3%±4,6% для ННСВ и CuННСВ, соответственно. Более низкую генотоксичность к клеткам линии HeLa, проявлял комплекс CuНИН, чем НИН. % повреждения ДНК в хвосте кометы, вызванный при концентрации 1 μМ CuНИН, был почти в два раза ниже (15,6±1,8%), чем в присутствии НИН (28,9±3,5%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что гесперетиновые производные оснований Шиффа и комплексов с ионами металлов являются перспективным классом органических соединений, которые могут использоваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Список использованных источников

1. Cook, P. R. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA / P. R. Cook., I. A. Brazell // J. Cell Sci. – 1976. – V. 22. – P. 303-324.
2. Ostling, O. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells / O. Ostling, K. J. Johanson // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – V. 123. – P. 291-298.
3. Liao, W. *The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells* / W. Liao, M. A. McNutt, W.-G. Zhu // Methods. – 2009. – V. 48. –P. 46-53.

NOVEL INHIBITORS OF FACTOR Xa REVEALED FROM VIRTUAL SCREENING STUDIES

DEMENKO Daryna, *student*

BOYKO Olexandr, *DrSc., senior scientist*

National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine

PLATONOV Maxym, *DrSc., senior scientist*

Enamine LTD

CHERNYSHENKO Volodymyr, *PhD., fellow scientist*

GORNITSKAYA Olga, *PhD., fellow scientist*

CHERNYSHENKO Tamara, *junior scientist*

PLATONOVA Tetyana, *Dr. Sc., senior scientist*

Palladin Institute of biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Introduction. Cardiovascular related diseases are the major cause of mortality in the developed countries. Intensive biological studies were devoted to the blood coagulation cascade in order to find the key enzymes responsible for the formation of the blood clots. Currently, treatment of strokes or infarctions caused by thromboembolism of vessels is carried out using thrombolytic therapy or by anticoagulant drugs.

Factor X is the calcium-binding, gamma carboxyglutamyl(Gla)-containing, vitamin K dependent glycoprotein [1, p. 241-280]. The activity of Factor Xa is dependent on its inclusion in the prothrombinase complex. The prothrombinase complex converts the prothrombin into the active procoagulant thrombin. It is therefore clear that Factor Xa catalyzes the pre-final step in the blood coagulation cascade, namely the formation of the thrombin. In turn, thrombin cleaves-off fibrinogen fibrinopeptides provoking fibrin formation and self-assembling to fibrin clot. It has been suggested that compounds which selectively inhibit Factor Xa may be useful as *in vitro* diagnostic agents, or can be used as therapeutic agent being administered in certain thrombotic disorders.

Selective Factor Xa inhibitors decrease risk of bleedings and improved safety/efficiency ratio at the preclinical stages of drug development, in comparison to thrombin inhibitors. The Factor Xa inhibitors are classified as direct and indirect inhibitors depending on the mechanism of action. Direct inhibitors interact directly with the Factor Xa active site and block it. These inhibitors bind efficiently to clot-bound and prothrombinase-associated forms of Factor Xa, unlike the indirect inhibitors. The action mode of indirect inhibitors is based on Factor Xa inactivation by antithrombin [2, P. 671-698].

Methods. The amidolytic activity of Factor Xa was determined by measuring the amount of p-NA released upon hydrolysis of chromogenic substrate. The hydrolysis rate of chromogenic substrate was evaluated by measuring the absorbance at 405 nm at 37 °C at 5 min incubation in Tissue Culture Plate 96-Well Flat Bottom (Sterile) with a microplate reader (Multiscan EX). The reaction mixture in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.45) with 0.13 M NaCl and 10^{-3} M CaCl_2 with total volume 0.25 ml contained: *for blood plasma*: referent blood plasma – 0.04 ml/ml; Factor Xa activator – 0.02 ml of 1 mg/ml solution – snake venom *Vipera russelli* (RVV) [3, p. 211-217]; inhibitor – $5 \cdot 10^{-6}$ M; S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) – 0.16 mM; *for purified Factor Xa*: purified bovine Factor Xa (Hemolab Heparichrom) – 0.27 nkat/ml; inhibitor $5 \cdot 10^{-6}$ M, S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA 2HCl) – 0.16 mM.

The rate of the reaction was measured as the change of absorbance per minute.

For K_i calculation the equation of competitive type inhibition was used:

$K_i = [I]/(K_p/K_m - 1)$, where K_p and K_m – the effective Michaelis constants calculated from Lineweaver-Burk plot at 4 presence and absence of the inhibitors respectively.

Results. All the selected 1400 compounds have been subjected to test with use of RVV-test modified assay (RVVT). We have monitored inhibition activity of the compounds at 5 minutes. We observed the exponential-like regression of the compounds number of along the potency increase (Fig. 1). To assess activity of the most active compounds we selected 59 compounds that have exhibited activity more than 70 % and subjected them to further biological screening on purified Factor Xa. The screening was performed with a 5 μM inhibitor concentration. Most of the selected compounds possess activity ranging from 40 % to 60 %. We selected only 17 compounds that inhibited the activity of Factor Xa on 60-100 % (Fig.).

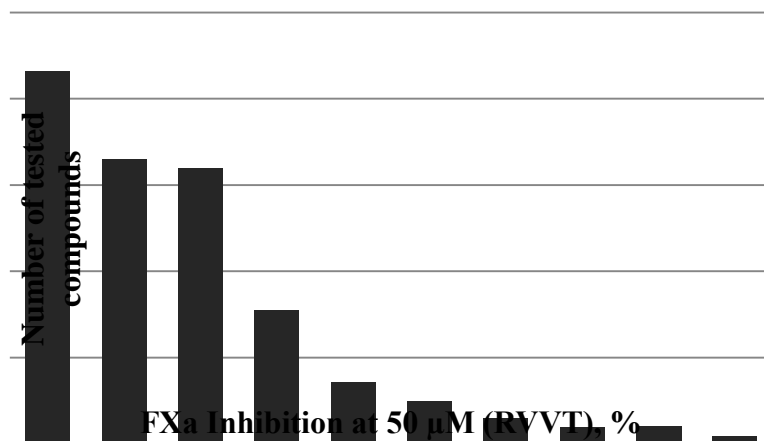


Fig. – Activity distribution of the factor Xa targeted library. Activity distribution of the 1400 compounds subjected to modified RVVT assay at 50 μM inhibitor concentration. Exponential regression is observed.

All samples were tested in 2 model systems as it is described in Materials and methods. The data analysis indicated highest inhibitory activity of two components. The Lineweaver-Burk plot was built according to experimental data to confirm inhibition type and calculate the inhibition constant for the most active inhibitor. The intersection of the curves on the Y-axis suggested the competitive character of inhibition ($K_i=13,9 \cdot 10^{-6}$ M). This value of the inhibition constant demonstrated the high affinity of the inhibitor to the enzyme.

Conclusions. We used virtual screening to select from the stock virtually generated library those compounds which effectively inhibited Factor Xa activity. The composed set consisted of 1400 compounds that all were subjected to RVVT *in vitro* screening. Two compounds with prominent inhibitory activity towards Factor Xa were selected. Their scaffold easily allows us to synthesize water soluble derivatives without any lose in other properties.

Acknowledgement. Publication is based on the research provided by the grant support of the State Fund For Fundamental Research (project N 76/69-2017)

Literature

1. Kalafatis M. The regulation of clotting factors / M. Kalafatis, J.O. Egan, C. van Veer, K.M. Cawthern, K.G. Mann // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1997; 7: 241-80.
2. Patel, N.R. Contemporary developments in the discovery of selective factor Xa inhibitors: A review / N.R. Patel, D.V.Patel, P.R. Murumkar, M.R. Yadav // *Eur J Med Chem.* – 2016. – Vol. 121. – P. 671-698.
3. Marsh N.A. Diagnostic uses of snake venom / N.A. Marsh // *Haemostasis.* 2001. – Vol. 3-6. – P. 211-217.

УДК 577.11+577.112.6+615.46+615.456

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КОМПОЗИТНЫХ НАНОВОЛОКОН НА ОСНОВЕ ПУЛЛУЛАНА И НАНОСТРУКТУР БАВ С ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ

¹КАПУСТИН Максим Александрович, науч. сотрудник

¹ЧУБАРОВА Анна Сергеевна, к.б.н., ст. науч. сотрудник

¹КУРЧЕНКО Владимир Петрович, к.б.н., доцент, зав. НИЛ

²ЛОДЫГИН Алексей Дмитриевич, д.т.н., доцент, зам. директора института живых систем по научной работе, зав. кафедрой прикладной биотехнологии

²РЖЕПАКОВСКИЙ Игорь Владимирович, к.б.н., доцент, вед. науч. сотрудник

¹Белорусский государственный университет

²Северо-Кавказский федеральный университет

Введение. Технология электроспиннинга может быть использована для получения разнообразных биосовместимых материалов, целесообразных к применению в медицине в процессе лечения

различных травматических повреждений, ожогов, обморожений и пр.; в качестве основы для выращивания стволовых клеток, при производстве имплантантов, при послеоперационной терапии онкологических заболеваний. В качестве основы для таких структур можно использовать различные биополимеры белковой (коллаген, желатин) и углеводной природы (хитозан, пуллулан). При добавлении к раствору полимера различных биологически активных веществ (БАВ), в процессе электроформования происходит включение частиц БАВ в структуру полимерных нановолокон, и образуется композитный нетканый наноструктурированный материал. При этом возможно получать нановолокна с несколькими совмещенными БАВ, различными по своей химической природе [1, 2]. Включение в состав нановолокон наноструктурированных форм БАВ, полученных при их взаимодействии с циклодекстринами в водных системах, приводит к увеличению их стабильности, водорастворимости, биодоступности, предотвращает образование нежелательных продуктов деструкции и пр. Использование биологически активных веществ в виде наноструктур позволяет сформировать в структуре нановолокон 3D-скаффолдов фармацевтические композиции из ранее несовместимых, вследствие особенностей физико-химических свойств, соединений. При этом увеличивается их растворимость при физиологических параметрах в водных системах, а также стабильность и биодоступность, что приводит к потенцированию биологических активностей этих соединений и значительно ускоряет процессы регенерации ран различного генеза. Методом электроформования получение нановолокон можно проводить из раствора биополимеров. При наличии высоковольтного потенциала, из раствора, подаваемого в иглу-капилляр, происходит вытягивание тонкого волокна. При этом происходит испарение растворителя и формируется тонкая полимерная нить, которая, укладываясь на подложку, формирует покрытие из нанонитей – скаффолды. Толщина нитей регулируется использованием различных режимов нанесения покрытия и концентраций полимеров [1, 2].

Целью исследования являлось получить нетканые композитные нанопокрывтия на основе пуллулана с комплексами включения куркумина и циклических олигосахаридов и исследовать структуру полученных скаффолдов.

Материалы и методы. Для получения скаффолдов нами использовалась установка для электроформования Yflow® StartUp Electrospinning Machine (Испания). Процесс электроформования проходил при следующих рабочих параметрах системы: напряжение на инжекторе – 20.8 kV, напряжение на коллекторе – 0 kV. Расстояние между инжектором и коллектором – 0.2 м, внутренний диаметр иглы – 0.5 мм. Скорость подачи рабочего раствора – 2.8 мл*ч⁻¹. В качестве рабочих растворов использовали 20% раствор пуллулана в деионизированной воде, а также 20% раствор пуллулана с добавлением β-циклодекстрина в соотношении 3:1, 20% раствор пуллулана с добавлением 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина в соотношении 3:1 и 20% растворы пуллулана с добавлением суммарного препарата куркумина и комплексов включения куркумина с β-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином при соотношении 3:1. Нанесение нановолокон проводилось на алюминиевую фольгу толщиной 9 мкм (ТУ У 74.8-21509860-001-2002), закрепленную на коллекторе. Наноструктурированные комплексы были получены с использованием комбинированного метода комплексообразования – сорастворение с последующим замораживанием и лиофилизацией [3]. Исследование структуры нановолокон проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-5610 LV с системой химического анализа EDX JED-2201 (JEOL, Япония), рабочее напряжение – 20 kV, увеличение в диапазоне x100 – x5000.

Результаты и обсуждение. Анализ фотографий поверхности полученных 3-D скаффолдов показал, что в процессе электроспиннинга во всех случаях происходит образование нановолокон. На рисунке 1 приведены электронные фотографии полученных скаффолдов. Толщина образующихся нанофибрилл находится в диапазоне 0.5–1 мкм. Размер включений наноконструкций β-циклодекстрина с куркуминоидами на поверхности нанонитей находится в диапазоне 1–3 мкм. Добавление к раствору пуллулана β-циклодекстрина и 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина сопровождается их включением в структуру нитей и не приводит к формированию агрегатов на поверхности нанофибрилл. Микроструктура формирующихся фибрилл мало отличается от нитей пуллулана. При добавлении к пуллулану комплекса β-циклодекстрин/куркумин происходит образование на поверхности нанофибрилл крупных гетерогенных наноструктур БАВ, в то время как при электроформовании раствора пуллулан:комплекс 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин/куркумин образуется однородная структура нитей без видимых гетерогенных образований.

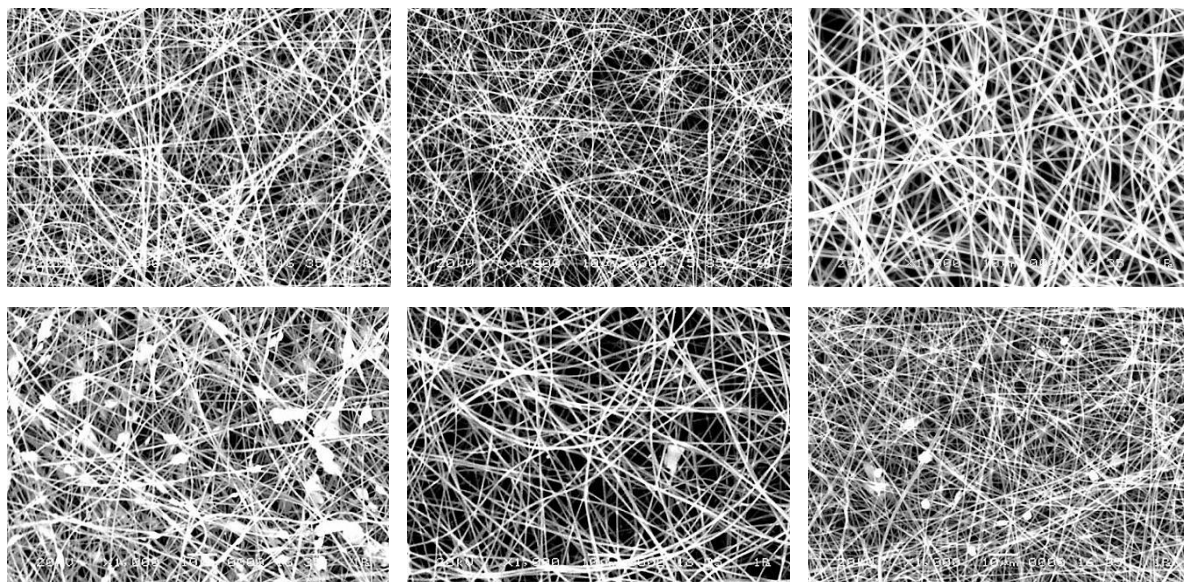


Рисунок – Фотографии композитных 3D-скаффолдов на основе пуллулана и комплексов куркумина, полученные методом сканирующей электронной микроскопии

Слева направо, сверху вниз: 3D-скаффолды из пуллулана; композитные 3D-скаффолды пуллулан:β-циклодекстрин в соотношении 3:1; композитные 3D-скаффолды пуллулан:2-гидроксипропил-β-циклодекстрин 3:1; композитные 3D-скаффолды пуллулан:комплекс β-циклодекстрин/куркумин в соотношении 3:1; композитные 3D-скаффолды пуллулан:комплекс 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин/куркумин в соотношении 3:1; композитные 3D-скаффолды пуллулан:куркумин в соотношении 3:1; увеличение x1000

Добавление к раствору пуллулана препарата куркуминоидов также приводит к формированию гетерогенной структуры композитного скаффолда, при этом агрегаты частиц препарата куркумина располагаются гетерогенно на поверхности нанонитей, а также в порах формирующегося нетканого материала.

Таким образом, предложенная технология позволяет получать композитные нановолокна с включением наноструктурированных биологически активных веществ.

Список использованных источников

1. Zhang, C.-L. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects / C.-L. Zhang, S.-H. Yu // *The Royal Society of Chemistry*. – 2014. – Vol. 43, №13. – P. 4423-4448.
2. Северюхина, А.Н. Композитные нетканые материалы с включением микрочастиц для нужд регенеративной медицины / А. Н. Северюхина, Ю. И. Свенская, Д. А. Горин // *Известия Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. – 2013. – Т. 13, № 2. – С. 69-79.
3. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами / М.А. Капустин [и др.] // *Инновации в пищевой технологии, биотехнологии, и химии: сб. статей Междунар. науч.практ. конф., г. Саратов, 13–15 июня 2017 г.* – Саратов: Изд. Центр «Наука», 2017. – С. 240-246.

УДК 612.3

ОСОБЕННОСТИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ СЕРОТИПОВ SALMONELLA ENTERICA, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ПИНСКОГО РЕГИОНА

МИСЮК Ольга Николаевна, магистрант
БЕЗРУЧЕНОК Николай Николаевич, к.б.н, доцент
Полесский государственный университет

Заболееваемость, вызванная сальмонеллами, продолжает оставаться актуальной во всем мире. В связи с увеличением числа штаммов с приобретенной резистентностью очевидна необходимость

осуществления мониторинга за уровнем и динамикой устойчивости к антибиотикам. Нерациональное использование антибактериальных препаратов приводит к возникновению и распространению резистентных микробов, вследствие чего эти лекарства становятся неэффективными.

Всемирная организация здравоохранения включила возбудителя сальмонеллеза в список патогенов, устойчивых к антибиотикам. По утверждению ВОЗ, возбудители сальмонеллеза являются патогенами высокого риска развития антибиотикорезистентности [1].

Целью исследований явилось изучение особенностей антибиотикорезистентности серотипов *Salmonella enterica*, циркулирующих среди населения Пинского региона.

На чувствительность к антибактериальным препаратам было исследовано 176 изолятов бактерий вида *Salmonella enterica*, из них 172 культуры *S. enteritidis* и 4 культуры *S. typhimurium*. Штаммы были выделены от пациентов с диагнозом «острая кишечная инфекция», госпитализированных в УЗ "Пинская центральная больница", филиал «Инфекционная больница «Молотковичи».

Анализ динамики заболеваемости сальмонеллезом в Пинском регионе в период с 2012 г. по 2016 г. показал, что с 2014 года прослеживалась умеренная тенденция к росту выявленных больных со 145 до 172 человек (рисунок 1). Среднегодовой темп прироста составил 9,4%.

Микробный пейзаж был представлен тремя серотипами *Salmonella enterica*. В указанный период преобладал серовар *S. enteritidis* – 97,46%, доля *S. typhimurium* составила 2,41%. В 2016 году был отмечен единичный случай сальмонеллеза, вызванный серологическим вариантом *S. derby*.

В возрастной структуре заболевших сальмонеллезом доминировали лица 18 лет и старше (44,8%), более трети заболевших (42,2%) составляли дети до 12 лет, из них 31,7% – дети 0-6 лет. Среди дошкольников наибольший удельный вес заболевших имели дети от 1 до 2 лет (15,5%), затем следовали дети от 3 до 6 лет (12,9%), дети 0-1 год составляли 7,3% заболевших дошкольников.

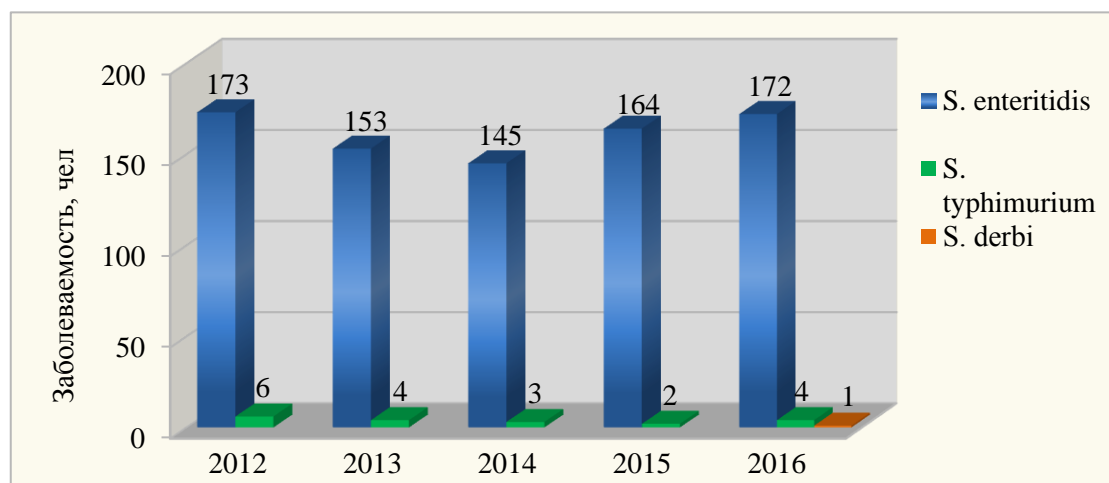


Рисунок – Динамика заболеваемости сальмонеллезом и спектр серотипов, циркулирующих на территории Пинского региона (2012-2016 гг.)

Анализ заболеваемости сальмонеллезом в Пинском регионе среди городского и сельского населения показал, что на протяжении последних шести лет превалировало число зарегистрированных больных городского населения (76,5%).

Изучение чувствительности серотипов *S. enterica* к антибиотикам проводили путем интерпретации размеров зон задержки роста вокруг диска с АБП на питательной среде согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов CLSI (NCCLS) [2].

Согласно данным таблицы 1, штаммы *S. enteritidis* характеризуются очень высокой частотой устойчивости к пенициллиновым препаратам (бензилпенициллину – 95,7%, амоксициллину – 91%).

Умеренную устойчивость к цефалоспорином 3-го поколения (цефтриаксон, цефотаксим, цефтазидим) отмечали на уровне 18,6%, средний показатель резистентных штаммов данной группы составил 13,3%.

Сохраняется высокая чувствительность *S. enteritidis* к аминогликозидам (гентамицин – 82,6%, амикацин – 82,6%) и сульфаниламидам (ко-тримоксазол – 88,7%).

В группе фторхинолонов наибольшую активность в отношении *S. enteritidis* проявила налидиксовая кислота – чувствительность 86,2%. К левофлоксацину и ципрофлоксацину были устойчивы, соответственно, 21,9% и 28% штаммов.

К карбапенемам (меропенем) за исследуемый период чувствительность была на уровне 100%.

Среди исследованных изолятов внутрибольничных штаммов *S. typhimurium* не было обнаружено устойчивых к амикацину, меропенему, левофлоксацину, ципрофлоксацину. По отношению к ампициллину, бензилпенициллину, амоксициллину, цефотаксиму и цефтазидиму число резистентных штаммов составило 100%. Высокая устойчивость была отмечена к гентамицину (75%), ко-тримоксазолу (75%), хлорамфениколу (75%), цефтриаксону (75%), и налидиксовой кислоте (50%).

Таблица – Антибиотикорезистентность доминирующих серотипов *Salmonella enterica* к антибактериальным препаратам (Пинский регион, 2016 г.)

Антибиотик	Доза, мкг/мл	Распределение штаммов по категориям чувствительности, %					
		<i>Salmonella enteritidis</i>			<i>Salmonella typhimurium</i>		
		Ч	УР	Р	Ч	УР	Р
Амикацин	30	82,6	6,6	10,8	100	0	0
Гентамицин	30	82,6	4,3	13,1	25	25	50
Меропенем	10	100	0	0	100	0	0
Ампициллин	10	65,0	16,9	18,1	0	0	100
Бензилпенициллин	10 ед*	4,3	13,0	82,7	0	0	100
Амоксициллин	30	12,0	25,3	65,7	0	33,3	66,7
Ко-тримоксазол	1.25/23.75	88,7	0	11,3	25	25	50
Офлоксацин	5	86,6	6,7	6,7	75	0	25
Хлорамфеникол	30	85,7	7,1	7,2	25	0	75
Цефотаксим	30	57,5	25,8	16,7	0	25	75
Цефтриаксон	30	54,8	22,2	13,0	25	25	75
Цефтазидим	30	82,2	7,7	10,1	0	25	75
Левофлоксацин	5	78,1	7,2	14,7	75	25	0
Ципрофлоксацин	30	72,0	17,0	11,0	75	25	0
Налидиксовая кислота	30	86,2	7,6	6,2	50	25	25

Примечания: Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные; *единиц

Таким образом, исследования показали необходимость строгого и адекватного использования антимикробных препаратов при лечении сальмонеллеза. Это позволит улучшить эффективность антибактериальной терапии, предотвратить быстрое развитие и распространение резистентных к существующим антибиотикам бактерий и как можно дольше сохранить резерв антимикробных препаратов.

Список использованных источников

1. Список патогенов, устойчивых к антимикробным препаратам [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed.html>. – Дата доступа: 06.11.2017.
2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests. CLSI. - 2010. - Vol. 30, №. 1. – P. 45-48.

УДК 664.871.335.5

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОИЗВОДСТВА РЫБНЫХ ФОРМОВАННЫХ ИЗДЕЛИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ПОПКО Юлия Игоревна, магистрант
 САК Юлия Игоревна, магистрант
 ЦВИРКО Лидия Сергеевна, д.б.н., профессор
 Полесский государственный университет

На современном этапе развития общества одной из наиболее глобальных проблем для населения является обеспечение социально стабильной продовольственной безопасности. Одной из

главных задач в настоящее время является создание условий для увеличения ресурсов продовольствия и сельскохозяйственного сырья, улучшения снабжения населения республики качественными продуктами питания. Рыба и рыбопродукты относятся к числу важных продуктов питания и занимают значительное место в биологически полноценном белковом рационе.

Как пищевой продукт рыба содержит ценные для организма человека компоненты, в первую очередь, полноценные белки, в состав которых входят почти все аминокислоты, а также липиды и значительное количество микро- и макроэлементов. Рыбопродукты обладают регулирующим действием в холестеринном обмене в организме человека, повышают стойкость организма к сердечно-сосудистым заболеваниям и служат источником почти всех групп витаминов. Нормами рационального потребления пищевых продуктов предусмотрено среднегодовое потребление рыбы и морепродуктов (в зависимости от возраста и физической активности) от 16 до 24 кг в год на человека. При этом морская рыба должна составлять 75% от этой нормы [1].

Страны, в которых средняя продолжительность жизни выше, потребляют и значительно больше рыбы. Для сравнения, среднедушевое потребление рыбы в год в Японии составляет 65 кг, в странах Северной Америки – 24 кг, в странах ЕС – 21 кг. Постоянно растет потребление рыбы на душу населения в Китае [2].

Для Беларуси ежегодная потребность внутреннего рынка в рыбной продукции, включая мороженую, сушеную, соленую, копченую рыбу и филе, а также консервы и пресервы из рыбы и морепродуктов, составляет 120 - 150 тыс. тонн или 13-16 кг на человека [1]. В связи с этим в стране имеется большой потенциал для развития рыбной отрасли и насыщения внутреннего рынка.

Для успешного развития рыбного хозяйства необходимо рациональное использование биологических ресурсов, создание новых способов глубокой переработки сырья с использованием безотходных технологий, совершенствование методов хранения и транспортировки рыбной продукции. Наличие в уловах и поступающем сырье малопригодной для переработки по традиционным технологиям рыбы пониженной товарной ценности несет дополнительную экономическую нагрузку на перерабатывающие предприятия и обуславливает возможность ее использования для производства фаршевых продуктов. Развитие рыбного кулинарного производства способно решить проблему комплексной переработки сырья с пониженной товарной ценностью, традиционно не используемого населением в пищу, а также вторичных продуктов переработки рыбы и выпуска из них пищевой высокопитательной, биологически полноценной продукции [3].

По данным национального статистического комитета Республики Беларусь в первом полугодии 2017 года было произведено 60 тыс. тонн рыбы и пищевых морепродуктов, включая рыбные консервы. Через организации торговли (без учета микроорганизаций) увеличились продажи рыбы на 11,4 % до 25,53 тыс. тонн, а сбыт рыбных консервов и пресервов уменьшился на 8,8 % до 8,2 тыс. тонн.

Товарный рынок рыбной продукции Беларуси представлен продуктами премиум-класса из рыб ценных видов высокого ценового сегмента и эконом-класса для потребителей среднего уровня доходов. Пищевые предпочтения населения страны определяются как общим уровнем культуры питания, так и национальными традициями и приоритетами [4].

Рост объемов потребления рыбы и изменение пищевых предпочтений обусловлен осведомленностью населения о пользе и ценности рыбы и рыбных продуктов, а также связан с популяризацией регулярного потребления рыбы в рационе питания населения.

Переработкой рыбы и рыбных продуктов в республике занимаются более 60 рыбоперерабатывающих предприятий, крупнейшие из них: СП "Санта Бремор" ООО, СП "Леор Пластик", ОАО "Белрыба", ИП "Вкус Рыбы Плюс", КПУП "Минскрыбпром", ОДО "Виталюр", ООО "Просма", ГП "ПТЦ г. Браслав", ООО "Баренцево" и др.

Например, СП "Санта Бремор" ООО, ООО "Баренцево", СП "Леор Пластик" из кулинарной продукции выпускают салаты из морской капусты и морских водорослей с добавлением различных ингредиентов, салаты овощные, коктейли, закуски и салаты из рыбы и морепродуктов, продукты сурими, охлажденные и замороженные полуфабрикаты и т.п.

ОАО "Белрыба", СП "Санта Бремор" ООО, ИП "Вкус Рыбы Плюс" помимо различных салатов выпускают несколько видов котлет рыбных, рыбные палочки, фарш рыбный с добавками и пряностями и т.п.

Из вышеприведенного видно, что в Беларуси присутствует достаточный ассортимент рыбо-овощной кулинарной продукции (салаты, рыба с овощами, коктейли), но производство фаршевых рыбных изделий недостаточно распространено, что дает возможность дальнейшего развития рыбной отрасли.

Рыбные фарши вырабатывают из мороженой или охлажденной морской и океанической рыбы всех семейств (кроме осетровых и лососевых) I сорта, II сорта (наличие механических повреждений или отклонений от правильной разделки), а также малоценных пород рыб. Рыбный фарш может быть из одного вида рыбы, либо его можно изготавливать из смеси разных видов рыб. Из фарша могут быть изготовлены фрикадели, тефтели, котлеты, рыбомучные изделия (пельмени, расстегаи, пирожки, кулебяки, беляши, чебуреки с рыбной начинкой, пончики рыбные) с разнообразными добавками, улучшающими вкусовые качества и повышающими пищевую ценность продукции.

Таким образом, кулинарное производство наряду с производством консервов и копченой продукции является одним из основных в рыбной промышленности по выпуску пищевой продукции. Однако небольшой ассортимент данной продукции в настоящее время требует расширения.

Список использованных источников

1. Бруцкая, О.Н. Перспективы переработки рыбы на предприятии филиал "Браславрыбак" ОАО "Глубокский МКК" / О.Н.Бруцкая, Е.А.Коваль, И.В.Бубырь // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов I международной научно-практической конференции, УО "Полесский государственный университет", Пн., ПолесГУ, 2014. – С. 42-45.
2. Обзор рынка рыбной продукции для издания "Мир продуктов" / Информационно-аналитическое издание для операторов продовольственного ранка / №6 (135), 2017. – С. 4.
3. Коробейник, А.В. Технология переработки и товароведение рыбы и рыбных продуктов / А.В. Коробейник // Ростов–на–Дону: Феникс, 2002. – С. 40-43.
4. Бубырь, И.В. Кулинарная переработка рыбы и перспективы её развития в Республике Беларусь / И.В.Бубырь, А.И.Козлов, Т.И.Козлова // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук: научно-практический журнал – Пн., ПолесГУ, 2013. – №2. – С. 38-43.

УДК 636.082:636.1

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ЛОШАДЕЙ SSR-МАРКЕРЫ В КОНТРОЛЕ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЛОШАДЕЙ

¹ПРИЛОВСКАЯ Екатерина Игоревна, *м.б.н.*

¹ГЛИНСКАЯ Наталья Анатольевна, *к. с.-х.н., доцент*

²ЕПИШКО Ольга Александровна, *к. с.-х.н., доцент*

²ЧЕБУРАНОВА Екатерина Сергеевна, *аспирант*

¹Полесский государственный университет,

²Гродненский государственный аграрный университет

На сегодняшний день, в связи с быстрым развитием ДНК-технологий, использование генных маркеров при проведении селекционно-племенной работы конных заводов многих стран стало одним из обязательных критериев отбора и подбора. Поэтому изучение возможностей маркерно-вспомогательной селекции в коневодстве и использование его результатов в практике конных заводов Беларуси является назревшей необходимостью, а проведение исследований генетического полиморфизма лошадей – актуальной [1, с.106].

Еще одним важнейшим аспектом является применение ДНК-технологий для проведения мониторинга с целью предотвращения снижения генетического разнообразия, использование его результатов при создании селекционных программ совершенствования существующих и выведения новых пород и внутривидовых типов лошадей [2, с.32]. В связи с чем, целью нашего исследования явилось изучение особенностей полиморфизма лошадей заводских пород по SSR-локусам.

Исследования были проведены в научно-исследовательской лаборатории «Прикладной и фундаментальной биотехнологии» на базе УО «Полесский государственный университет», а также в научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий на базе УО «Гродненский государственный аграрный университет».

Объектом исследования являлась популяция лошадей, разводимых в СПК «Прогресс-Вертилишки» Гродненской области (n=50). Генотипирование лошадей проводили по 17 SSR- локусам, с использованием набора для генотипирования лошадей «StockMarks for Horses» на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems.

По 17-ти изученным SSR-локусам идентифицировано от 6 до 15 аллелей. Среднее число аллелей на локус (NV) варьировало от 3,875 до 9,000. Средний показатель уровня полиморфности локуса (Ae) составил 3,771 единицы, в связи с чем все локусы были разделены на две группы. В первую группу вошли локусы, которые имеют значение уровня полиморфности ниже среднего уровня – это локусы HTG4, HTG7, HMS6, HMS1, HTG6, АНТ4, СА425, HMS2. Минимальным значением характеризовался локус HTG4 – 2,609. Вторую группу составили локусы, имеющие значение уровня полиморфности превышающие средние показатели: ASB2, ASB17, ASB23, HTG10, LEX3, VHL20. Максимальным уровнем полиморфности обладает локус ASB2 – 5,131.

Наибольшим уровнем наблюдаемой (Ho) гетерозиготности характеризовался локус VHL 20, а ожидаемой (He) гетерозиготности – локус ASB2 (0,818 и 0,787 соответственно), в то время как наименьшим наблюдаемым уровнем гетерозиготности характеризовался локус LEX 3 (0,575), а наименьшим ожидаемым уровнем гетерозиготности локус HTG4 (0,592). Анализ значений показателя индекса фиксации (Fis) показал, что локусы АНТ5, ASB2, СА425, HMS2, HMS3, LEX 3 отличались смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот.

Все изученные SSR-локусы имели PIC>0,5, что указывает на их высокую информативность в качестве молекулярно-генетических маркеров для оценки достоверности происхождения животных.

Среднее значение минимальной эффективности при контроле происхождения всех изученных пород лошадей по Джемисону составило – 0,353 (для локуса HTG4), а максимальной эффективности – 0,602 (для локуса ASB2). Эффективность контроля происхождения по 17-ти SSR-локусам у ахалтекинской и тракененской пород составила 99,999%, а у чистокровной верховой – 99,991%, именно поэтому для данной породы оценка достоверности является наиболее востребованной.

Таким образом, обнаруженные особенности SSR-полиморфизма исследуемой популяции лошадей позволяет более эффективно использовать отдельные локусы для различных целей генетико-популяционных исследований.

Список использованных источников

1. Зайцева, М.А. Использование микросателлитных маркеров ДНК в контроле происхождения лошадей / М.А. Зайцева // Вклад молодых ученых в развитие аграрной науки 21 века : материалы междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов, Рязань, 2–3 марта, 2004 г. / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Ряз. гос. с.-х. акад. им. П.А. Костычева. – Рязань, 2004. – С. 105-107.
2. Храброва, Л.А. Генетическая дифференциация чистокровных пород лошадей по микросателлитным локусам / Л.А. Храброва, М.А. Зайцева, Л.В. Калинкова // С.-х. биология. Сер. Биология растений. – 2008. – № 2. – С. 31-34.

УДК 595.122; 616-002.951

ТРЕМАТОДОФАУНА БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ В ВОДОЕМАХ ПИНСКОГО РЕГИОНА

РУСКО Дарья Игоревна, *магистр биологических наук*

ЦВИРКО Лидия Сергеевна, *д. б. н., профессор*

Полесский государственный университет

Церкариальный дерматит – это паразитарное заболевание, возникающее в результате проникновения в кожные покровы человека личинок птичьих гельминтов семейства *Schistosomatidae*.

Возникновение в конце XX столетия ряда устойчивых очагов церкариоза в Беларуси, в частности в озерах Нарочанской группы, вызвало быстрый рост исследований по экологическим, эпидемиологическим и медико-санитарным аспектам данной проблемы в условиях Беларуси [3, 4]. На сегодняшний день выявлено более 500 водоемов в республике, которые являются опасными по церкариальному дерматитам. Тем не менее, многие важные вопросы остаются недостаточно изученными. В их числе – распространенность очагов церкариоза на территории Беларуси, в частности в регионе Полесья.

Целью исследования явилось изучение видового разнообразия малакофауны и трематодофауны в водоемах Пинского региона, а также выявление опасных для человека видов трематод.

Исследование проводилось в летний период 2016 г. в литоральной зоне 5 водоемов Пинского региона: р. Пина, оз. Городищенское, вдхр. Погост, вдхр. Жидче, оз. Кончицкое. Было собрано и исследовано 357 экземпляров брюхоногих моллюсков. Паразитологические исследования проводились в соответствии с общепринятыми методами [1, 2]. Для количественной оценки инвазированности моллюсков использовали показатель экстенсивности инвазии (ЭИ). Обработка полученных данных проводилась с использованием методов биологической статистики.

В результате проведенных исследований было установлено, что видовое разнообразие малакофауны Пинского региона представлено 5 видами брюхоногих моллюсков: *Lymnaea auricularia*, *L. corvus*, *L. stagnalis*, *Planorbium corneum*, *Viviparus contectus*, являющихся потенциальными промежуточными хозяевами возбудителей церкариальных дерматитов. Доминирующим видом в сборах являлся *L. stagnalis* (57,4%); субдоминантными видами – *L. auricularia* (13,7%) и *Pl. corneum* (16,8%). Плотность моллюсков в исследованных водоемах варьировала в пределах 5 – 17 экз./м². Наибольшая плотность моллюсков отмечена в озерах Городищенское (около 17 экз./м²) и Кончицкое (около 15 экз./м²).

Трематодофауна брюхоногих моллюсков в исследованных водоемах представлена 5 видами: *Diplostomum pseudospathaceum*, *Tylodelphus clavata*, *Haplometra cylindracea*, *Notocotylus attenuatus*, *Moliniella anceps*, из 4 семейств – *Diplostomatidae*, *Plagiorchiidae*, *Notocotylidae*, *Echinostomatidae*.

Обнаруженные виды гельминтов являются непатогенными для человека, однако 4 вида на стадии мариты вызывают тяжелые заболевания у домашней птицы и наносят существенный экономический ущерб птицеводству. Для рыбоводческого хозяйства наибольшую опасность представляют трематоды сем *Diplostomatidae*, которые на стадии метацеркарий вызывают диплостомоз рыб.

Трематоды сем. *Schistosomatidae*, патогенные для человека и вызывающие церкариальные дерматиты, выявлены не были.

Суммарная зараженность брюхоногих моллюсков церкариями трематод составила 21,0%. Наиболее высокий процент зараженных моллюсков был отмечен среди лимнейд и булинейд. При этом, ЭИ гастропод фуркоцеркариями трематод составила 16,5%, однохвостыми церкариями – 4,8%.

Максимальная зараженность брюхоногих была отмечена для церкарий семейства *Diplostomatidae* (ЭИ = 16,2%), при этом показатель инвазированности диплостоматидами у отдельных видов моллюсков варьировал в пределах от 6,1% (у *L. auricularia*) до 21,0% (у *L. stagnalis*). Вид *Notocotylus attenuates* характеризуется минимальным показателем экстенсивности инвазии, что в 27 раз меньше ЭИ диплостоматидами. Зараженность моллюсков церкариями трематод семейств *Plagiorchiidae* и *Echinostomatidae* не превышает 2,5%, что говорит о довольно низкой пораженности брюхоногих моллюсков данными паразитами в водоемах Пинского региона.

В 2016 году была отслежена сезонная (летняя) динамика зараженности моллюсков фуркоцеркариями сем. *Diplostomatidae*. Выявлено, с июня по август наблюдается рост экстенсивности инвазии моллюсков с 15,7% до 17,1% соответственно ($P < 0,05$).

Суммарно наиболее высокая инвазированность моллюсков личиночными стадиями трематод характерна для р. Пина (31,0%) и оз. Городищенское (30,2%), где зараженность моллюсков *L. stagnalis* выше (32,6% и 51,3% соответственно), чем в остальных исследованных водоемах. Наименьшая зараженность отмечена в популяции моллюсков, обитающих в вдхр. Погост (9,5%). В вдхр. Жидче зараженных моллюсков обнаружено не было. Инвазированность отдельных видов моллюсков в исследованных водоемах колебалась от 5,9% (*L. auricularia*, оз. Городищенское) до 75% (*L. auricularia*, оз. Кончицкое).

Таким образом, анализ показателей инвазированности моллюсков церкариями трематод позволил оценить риск заражения людей церкариальными дерматитами в водоемах Пинского региона. Водохранилища Жидче и Погост являются благополучными по церкариозам водоемами. Оз. Кончицкое, оз. Городищенское, р. Пина, характеризуются высокими показателями зараженности моллюсков фуркоцеркариями, а также присутствием потенциальных промежуточных и дефинитивных хозяев шистосоматид и нуждаются в постоянном контроле за паразитологической ситуацией.

Список использованных источников

1. Акимова, Л.Н. Видовое разнообразие личинок трематод брюхоногих моллюсков водоемов Беларуси / Л.Н. Акимова, В.В. Шималов, Е.И. Бычкова // Паразитология. – 2011. – Т. 45, вып. 4. – С. 287–305.

2. Гомель, К.В. Кряква (*Anas platyrhynchos* L.) и легочные моллюски (Gastropoda: Pulmonata) как потенциальные источники шистосоматидного дерматита в г. Минске / К.В. Гомель // Вес. БДПУ. Сер. 3, Фізика. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія. – 2013. – № 3. – С. 30–35.

3. Гомель, К. В. Анализ зараженности легочных моллюсков церкариями шистосоматид на территориях с различной степенью антропогенной нагрузки / К. В. Гомель // Современные экологические проблемы устойчивого развития Полесского региона и сопредельных территорий: наука, образование, культура : материалы VI междунар. науч.-практ. конф. – Мозырь, 2014. – С. 72–74.

4. Хейдорова, Е.Э. Шистосоматидный паразитарный фон как основа формирования локальных очагов церкариоза на примере озера Нарочь / Е. Э. Хейдорова // Экология и животный мир : международный научно-практический журнал. – 2012. – № 1. – С. 17–26.

UDK 577

CORRELATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES WITH THEORETICAL STUDIES FOR HESPERETIN SCHIFF BASES

SYKULA Anna, *PhD (in Chemistry), Adiunct*

DZEIKALA Aliaksandr, *MSc. (in Biology), PhD student*

KOWALSKA-BARON Agnieszka, *PhD (in Chemistry), Adiunct*

ŁODYGA-CHRUŚCIŃSKA Elżbieta, *Prof. (in Chemistry) Lodz University of Technology Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Institute of General Food Chemistry*

BODZIOCH Agnieszka, *PhD (in Chemistry), Adiunct, Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Lodz*

Schiff bases are a class of compounds with unique biological, analytical and industrial properties. The active pharmacophore (-N=CH-) of Schiff bases plays a major role in these significant biological activities. However, the attached neighbouring groups may also affect the activity.

Hesperetin (5,7,3'-trihydroxyl-4'-methoxyl-flavanone) is a kind of flavonoid which occurs ubiquitously in plants, fruits, flowers and foods of plant origin. Hesperetin has

multiple biological and pharmacological activities, including inhibition of cancer development, effects on the blood-brain barrier, signal transduction pathways, etc. However, antioxidant activity of hesperetin is insignificant, therefore three hesperetin hydrazones (HTSC, HIN and HHSB) (Fig. 1) were synthesized in order to increase the biological properties including antioxidant activity.

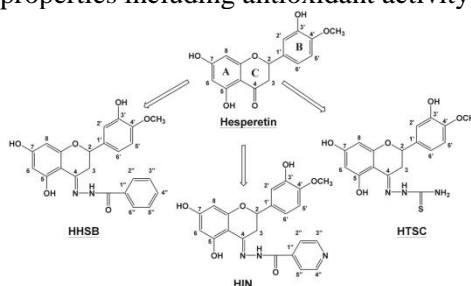
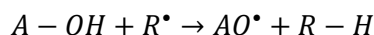


Fig. 1. The studied compounds: hesperetin, Schiff bases (HHSB, HIN, HTSC)

Free radical scavenging capacity of (poly)phenols is generally attributed to the hydrogen atom lability of the OH groups attached to aromatic rings (A-OH). However in some other antioxidants such as Schiff bases, NH and SH groups may provide labile hydrogen [1]. The formal H-atom abstraction from standard (poly)phenols described by:



is known to involve complex processes. It has been recognized that this reaction proceeds via at least three different mechanisms: single-step hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT) and sequential proton loss electron transfer (SPLET). These mechanisms may co-exist, and they depend on solvent properties and radical characteristics. The net result from all mechanisms is the same, i.e., as given in reaction.

DPPH[•] assay is routinely practised for assessment of free radical scavenging potential of an antioxidant molecule and considered as one of the standard and easy colorimetric methods for the evaluation of

antioxidant properties of the compounds. DPPH[•] is a stable radical in solution and appears purple colour absorbing at 515-520 nm in different solvent systems. In contact with antioxidant molecule, the radical DPPH[•] reduces to DPPH₂ and the purple colour changes to yellow. The colour is monitored by spectrophotometrically and utilised for determination of parameters for antioxidant properties. The original DPPH[•] assay procedure has been adopted in different labs but with modifications for convenience. However, the most of the studies are based on fixed reaction time ranging from 20-30 min instead of total reaction time that is actually required to attain steady state to complete this redox reaction. Thus, the DPPH[•] assay appears simple in nature but due to its stable nitrogen radical and, many antioxidants might react with different kinetics or might not react at all.

The aim of the present work was to ascertain correlations between the experimental radical scavenging activity of hesperetin Schiff bases by using DPPH[•] assay and the geometry optimizations of parent molecules, radicals and radical cations were using PM3/DFT(B3LYP) method with the use of 6-31G(d,p) basis set. In the presented study the two methods in methanol medium, (a) steady state reaction time and (b) fixed reaction time, to simultaneously estimate kinetics and effective concentration of DPPH[•] scavenging by a number of antioxidants were performed. The comparison of these two methods in this study revealed expected noticeable differences. The biological measurements on mitochondrial cells were also performed.

The reaction between DPPH[•] and antioxidant is basically a kinetic driven process. Kinetic spectra were performed for individual compounds till steady state saturation was attained. The steady state analysis were performed in an excess of DPPH[•] radical in order to exhaust the H-donating capacity of (poly)phenols as it is performed in fixed reaction time method. Fig. 2 presents the kinetic scans of hesperetin and its derivatives.

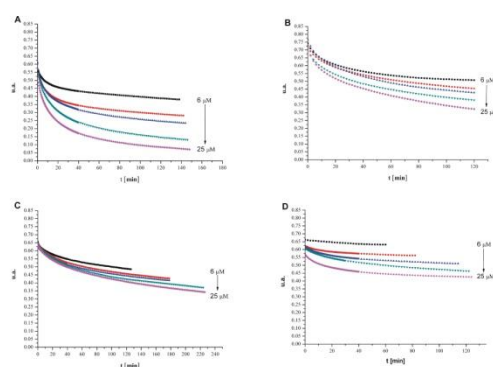


Fig. 2. The dependence of absorbance at 516 nm at a different concentration of antioxidant in the reaction mixture of DPPH[•] (56 μM) in MeOH:DMSO medium (97.5%:2.5% (v/v))

None of the studied compounds did not reach the completion of the reaction in 30 min. This time duration (20-30 min) is usually considered by most authors in fixed reaction time mode for estimation of antioxidant properties. All tested compounds were considered under slow kinetics.

EC₅₀ values at fix time for HTSC, HIN, HHSB and hesperetin were 25.66±2.03, 29.89±2.77, 57.46±3.65 and 32.28±4.31 μM respectively. While, at steady state, EC₅₀ for HTSC, HIN, HHSB and hesperetin were 19.03±2.66, 59.63±10.86, 228.41±11.22 and 68.99±15.72 μM respectively.

The DFT(B3LYP)/6-31G(d,p) calculations of reaction enthalpies related to several possible mechanisms for free radical scavenging by hesperetin and its derivatives (HTSC, HIN, HHSB): HAT, SET-PT and SPLET indicated that the compounds studied can react with DPPH[•] via at least two mechanisms: HAT and SPLET. SPLET mechanism is more preferable in polar solvents that support ionization, while in nonpolar solvents and in the gas phase the HAT mechanism is thermodynamically more preferable. Our calculations showed that the HAT and SPLET mechanism are both associated with the most stable 3'-O[•] radicals. These radicals may be formed by single hydrogen atom abstraction from 3'-OH group (HAT) or they may be formed as a result of charge redistribution and resonance stabilization of the 7-OH phenoxide anions in methanol (SPLET). It is assumed that in DMSO the additional reaction pathway involving radicals formed by the N-H cleavage of the keto form of HIN, HHSB and HTSC may also contribute to the complex mechanism of DPPH[•] radicals scavenging by the compounds studied.

HIN and HTSC prevented the development of oxidative stress and protected mitochondrial membranes from oxidative damage more effectively than HHSB and hesperetin, significantly reducing levels of TBARS and partially restoring the content of GSH.

Table – Reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation products (TBARS) levels in rat liver cell mitochondria.

Parameters	Control	tBHP	Compounds [average \pm SD]				Control+HIN
			Hesp	HHSB	HIN	HTSC	
GSH [nmol/mg protein]	14.04 \pm 0.68	3.57 \pm 0.214*	3.47 \pm 0.19*	3.46 \pm 0.21*	4.20 \pm 0.12*#	3.83 \pm 0.18*	13.19 \pm 0.19
TBARS [nmol/mg protein]	0.028 \pm 0.003	0.084 \pm 0.004*	0.063 \pm 0.009*	0.062 \pm 0.010*	0.043 \pm 0.007*#	0.050 \pm 0.005*#	0.022 \pm 0.002

The list of references

1. Anouar, E. H., Raweh, S., Bayach, I., Taha, M., Baharudin, M. S., Di Meo, F., Hazizul Hasan, M., Adam, A., Hadiani, Ismail N., Weber, J.-F. F., Trouillas, P., Antioxidant properties of phenolic Schiff bases: structure–activityrelationship and mechanism of action. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2013. – V. 27. – P. 951-964.

УДК 664.951.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОБАВОК ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ПРЯНОЙ РЫБЫ

САК Юлия Игоревна, *магистрант*
 ПОПКО Юлия Игоревна, *магистрант*
 ЦВИРКО Лидия Сергеевна, *д.б.н., профессор*
 БУБЫРЬ Ирина Валерьевна, *старший преподаватель*
Полесский государственный университет

Сегодня на продовольственном рынке Республики Беларусь присутствует большое разнообразие рыбы пряного посола. Для расширения ассортимента и улучшения потребительских характеристик готовой продукции была разработана пряно-солёная смесь, по трем рецептурам, представленным в таблице 1.

Таблица 1 – Рецептуры пряно-солёной смеси на 1 л воды

Добавка, г	Рецептура № 1	Рецептура № 2	Рецептура № 3
Соль	200	200	200
Сахар, г	100	100	100
Перец душистый	1,5	1,5	1,5
Гвоздика	1,5	1,5	1,5
Лавровый лист	1,5	1,5	1,5
Корица	1,5	-	--
Мускатный орех	-	1,5	-
Кардамон	-	-	1,5

В воду, нагретую до кипения, загружали помещённые в холщовый мешок пряности, согласно рецептуре, и варили при температуре 90-95 °С в течение 15-20 мин, затем мешок вынимали и закладывали сахар. После растворения сахара заливку охлаждали до 15-20 °С.

Осуществляли пряный посол рыбы, после которого были отобраны образцы, причем образцам форели № 1, 2, 3 соответствует рыба, посоленная с использованием пряно-солёной смеси рецептур № 1, 2, 3, соответственно.

После созревания рыбы, в течение двух недель были проверены органолептические показатели качества пряной форели. По результатам исследования составлена сводная таблица оценки качества образцов (таблица 2).

Анализируя данные таблицы 2 можно сделать вывод, что в среднем, по всем органолептическим показателям образец № 2 имеет высшее качество, затем следует образец № 1, уступая по

вкусу, запаху и консистенции образцу № 2. На третьем месте расположился образец № 3, уступая по всем показателям образцам № 1, 2.

Таблица 2 – Дегустационная оценка образцов форели пряного посола

Показатели	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Внешний вид	5	5	4
Вкус	4	5	3
Запах	4	5	3
Интенсивность вкуса за счёт введения пряности	4	5	3
Консистенция мяса рыбы	4	5	3
Средний оценочный балл	4,3	5	3,3

Образец № 2 готовили по рецептуре пряно-солёной смеси, в которую входил мускатный орех, благодаря его присутствию рыба приобрела жгуче-пряный вкус и своеобразный аромат.

Кроме органолептических были исследованы физико-химические показатели, характеризующие качество пресервов: массовая доля поваренной соли, массовая доля жира, кислотность мяса.

Исследования проводились в соответствии с ГОСТ 7453-86, ГОСТ 31339-2006 [1, 2].

Химические показатели определялись в соответствии с НТПА:

- содержание соли – ГОСТ 27207-87 [3];
- массовая доля жира – ГОСТ 26829-86 [4];
- общая кислотность – ГОСТ 27082-2014 [5].

Результаты исследования качественных показателей образцов пряной форели представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Физико-химические показатели образцов пряной форели

Показатели	Норма	Образец пресервов		
		Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Содержание соли, %	6,0-9,0	7,1	7,7	8,5
Содержание жира, %	9,0	9,7	9	8,1
Общая кислотность, %	0,6-1,0	0,8	0,7	1,2

Следует отметить, что образец № 3 превышает норму по содержанию общей кислотности. По содержанию соли исследуемые образцы различаются между собой незначительно и соответствуют норме.

По содержанию жира лишь образец № 2 соответствуют норме, а образцы № 1, 3 незначительно отклоняются от неё.

В целом, почти все рассмотренные физико-химические показатели (общая кислотность, содержание соли и жира) форели пряного посола соответствуют ГОСТ 3945-78 [6].

Исследовав органолептические и физико-химические показатели образцов форели пряного посола можно утверждать, что по совокупности свойств лидирует второй образец, который был изготовлен с добавлением мускатного ореха, благодаря этой пряности образец рыбы приобрёл жгуче-пряный вкус и своеобразный аромат, плотную, сочную, нежную консистенцию.

На втором месте образец № 1 с добавлением корицы, со слабо выраженным ароматом и сладким вкусом, консистенция которого оказалась плотной, сочной.

Образец № 3 (3 место) имел в своей рецептуре кардамон и обладал слабо выраженным запахом, слегка кисловатым вкусом, и имел ослабленную консистенцию.

Таким образом, при пряном посоле форели предпочтение необходимо отдавать рецептуре № 2, в состав которой входит такая пряность, как мускатный орех.

Использование всевозможных пряно-соленых смесей позволит рыбоперерабатывающим предприятиям расширить ассортимент пряной продукции, разнообразить вкусовую гамму, тем самым способствуя удовлетворению различных предпочтений потребителей.

Список использованных источников

1. ГОСТ 7453-86 Пресервы из разделанной рыбы. Технические условия. Введ. 01.01.1988 г. – М.: Изд-во стандартов, 1988
2. ГОСТ 31339-2006. Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб. Введ. 30.06.2008. – М.: Изд-во стандартов, 2010 г. – 16 с.
3. ГОСТ 27207-87. Консервы и пресервы из рыбы и морепродуктов. Метод определения поваренной соли. Введ. 01.01.1988. – М.: Изд-во стандартов, 2010 г.
4. ГОСТ 26829-86. Консервы и пресервы из рыбы. Методы определения жира. Введ. 01.07.1987 г. – М.: Изд-во стандартов, 1987 г.
5. ГОСТ 27082-2014. Консервы и пресервы из рыбы, безпозвоночных, водных млекопитающих и водорослей. Методы определения общей кислотности. Введ. 29.07.2014 г. – М.: Изд-во стандартов, 2014 г. – 8 с.
6. Пресервы рыбные. Рыбапряного посола. Технические условия: ГОСТ 3945-78. – Взамен ГОСТ 10980-64, ГОСТ 3945-68 ; введ. РБ 01.01.1979. – Минск: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 1979. – 12 с.

УДК 577.152.1+543.068.8

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

СЕМАШКО Татьяна Владимировна, к.б.н., *вед. научн. сотр.*

ЖУКОВСКАЯ Людмила Александровна, к.б.н., *научн. сотр.*

ДЕМЕШКО Ольга Дмитриевна, *научн. сотр.*

ЛОБАНЮК Анатолий Георгиевич, д.б.н., *профессор, зав. лаб.*

Институт микробиологии НАН Беларуси

Решение медико-социальных задач, обусловленных проблемой сахарного диабета, в значительной степени связано с разработкой современных методов контроля уровня глюкозы в крови – одного из самых распространенных тестов, выполняемых клинико-диагностическими лабораториями. Наиболее перспективные направления развития диагностических и биоаналитических методов исследования основаны на биосенсорных технологиях. Сегодня на мировом рынке биосенсорных систем доля глюкозных анализаторов составляет 85 %. Исследования разработчиков и производителей глюкозных биосенсоров сконцентрированы на улучшении их эксплуатационных характеристик [1, 2].

В настоящее время инновационным направлением в технологиях биосенсоров являются нанотехнологии, позволяющие улучшить характеристики биорецепторных элементов датчиков с помощью новых наноматериалов. Спектр наноматериалов, используемых в сенсорах, достаточно широк. Благодаря своим размерам (1-100 нм), наночастицы обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые необходимы для создания нового поколения сенсорных устройств. При разработке биосенсоров на глюкозу широко используются наночастицы металлов, поскольку они обладают хорошими электрокаталитическими свойствами. Это наноструктуры на основе инертных металлов, металлических сплавов, и оксидов металлов. Биосенсоры, сконструированные на основе вышеуказанных наночастиц, характеризуются высокой селективностью, быстрым временем отклика и стабильностью. Наночастицы используют как для модификации трансдьюсера, так и для иммобилизации фермента. Чаще всего при конструировании биосенсоров используют наночастицы золота [3].

Ранее в Институте микробиологии НАН Беларуси с использованием методов индуцированного мутагенеза и генетической инженерии получены продуценты – *Penicillium adametzii* и *P. funiculosum*; определены закономерности биосинтеза ферментов продуцентами; разработаны технологии получения глюкозооксидаз, организовано их производство; продемонстрирована эффективность их использования как компонента амперометрических, кондуктометрических, потенциометрических тест-полосок и биотопливных ячеек; совместно с ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» разработана и внедрена в производство технология получения индикаторного слоя тест-полосок «Глюкосен» для определения концентрации глюкозы в крови [4].

С 2005 года в Институте микробиологии НАН Беларуси произведено более 100 млн. ед. ферментного препарата Глюкозооксидаза и на его основе в ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» изготовлено и реализовано больным сахарным диабетом более 4 млн. тест-полосок к экспресс-анализаторам глюкозы в крови больных сахарным диабетом.

В настоящее время сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси и ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» разрабатываются глюкозные тест-полоски нового поколения, основанные на использовании наноматериалов в составе рецепторного элемента сенсоров для повышения их стабильности, чувствительности, селективности, что обеспечит улучшение качества проводимых анализов.

Цель данного исследования - изучение влияния наночастиц золота и серебра на каталитические свойства глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*.

Для проведения экспериментов были синтезированы наночастицы серебра (6 ± 2 нм) и золота (6 ± 2 нм и 13 ± 3 нм). Препараты глюкозооксидаз *P. adametzii* и *P. funiculosum* были получены методом ультрафильтрации. Отмечено, что, несмотря на более низкие показатели удельной активности (в 1,1-1,7 раза), ферменты грибов рода *Penicillium* по сравнению с коммерческими глюкозооксидазами фирм Roche, Biozyme, Fluka характеризовались более высокой эффективностью связывания глюкозы ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}=1,1-1,4 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}\text{с}^{-1}$) (в 1,3-2,1 раза).

Иммобилизацию ферментов на наночастицы осуществляли с использованием глутарового альдегида. Анализ влияния наночастиц на каталитические характеристики ферментов показал, что иммобилизация ферментов на наночастицы практически не влияет ни на скорость окисления глюкозы (V_{max}), ни на эффективность окисления данного субстрата ферментами ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$), но уменьшает сродство ферментов к субстрату ($K_{\text{м}}$). По сравнению с показателем нативного фермента $K_{\text{м}}$ глюкозооксидазы *P. funiculosum* ниже в 1,2-1,5 раза, для глюкозооксидазы *P. adametzii* – в 2,5-3,0 раза, для глюкозооксидаз *A. niger* – в 3,4-4,1 раза.

При последующей проверке влияния медиаторов (ферроцена, 1,10-фенантролин-5,6-диола, феназин метилсульфата) на каталитические и спектральные свойства иммобилизованных на наночастицы ферментов установлено, что все медиаторы повышают сродство иммобилизованного фермента к глюкозе ($K_{\text{м}}$) на 2-44 %, эффективность окисления глюкозы ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$) при этом увеличивается на 1,15-67,63 %. Максимальное повышение достигнуто при комбинациях глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*, иммобилизованных на наночастицы золота размером 6 ± 2 нм, с 1,10-фенантролин-5,6-дионом и ферроценом ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}=1,9-2,3 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}\text{с}^{-1}$).

Согласно данным, полученным при анализе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих глюкозооксидазы *P. funiculosum* и *P. adametzii*, 1 субъединица каждого из ферментов, содержит большое количество природных флуорофоров (58 аминокислотных остатков), что легко позволяет провести флуоресцентный анализ, и путем измерения поляризации выявить влияние различных соединений на структуру белка. Спектр возбуждения белка изучали в диапазоне 240-300 нм (при λ испускания 330), спектр испускания - 300-400 нм (при λ возбуждения 290).

Спектрофлуориметрически определено, что медиаторы и наночастицы практически не влияют на спектры возбуждения белков. При исследовании спектров испускания композитов, содержащих глюкозооксидазы и наночастицы, наблюдалось уменьшение его интенсивности на 3,2-14,1 %. Дополнение биокомпозитов медиаторами приводило к снижению данного показателя на 18,8-82,8 %. Полученные результаты свидетельствуют о конформационных изменениях в структуре апофермента.

Сравнение операционной стабильности исследуемых композитов, показало, что минимальная стабильность (2 суток) характерна для композитов, включающих глюкозооксидазы *P. adametzii* или *P. funiculosum*, наночастицы серебра и в качестве медиатора феназин метилсульфат. Операционная стабильность 20-27 суток получена для композитов, состоящих из глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*, иммобилизованных на наночастицах золота различного размера, и медиаторов 1,10-фенантролин-5,6-диола или ферроцена.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности конструирования глюкозных сенсоров на основе глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium* с использованием наночастиц золота размером 6 ± 2 нм.

Список использованных источников

1. Сахарный диабет [Электронный ресурс] / Сайт Министерства здравоохранения РБ. – 2016. – Режим доступа: http://minzdrav.gov.by/ru/static/for-populetion/new_url_75635544. – Дата доступа: 01.08.2017.

2. Зинов, В.Г. Биосенсерные технологии: мировые драйверы развития направления / В. Г. Зинов, О. В. Черченко // Экономика науки. – 2016. – Т. 2, № 1. – Р. 46-56.
3. Scognamiglio, V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years / V. Scognamiglio // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – Vol. 47. – P. 12-25.
4. Семашко, Т.В. Некоторые аспекты применения глюкозооксидаз *Penicillium adametzii* и *Penicillium funiculosum* / Т. В. Семашко, Р. В. Михайлова // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов : сб. ст. / Под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – М.: ВНИИПБТ, 2016. – С. 110-121.

UDC 577.112:612.151-083:616.151-056.7

POLYCLONAL ANTIBODIES TO DOMAIN B-FREE RECOMBINANT ANTI-HEMOPHILIC FACTOR VIII: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND POSSIBLE BIOMEDICAL APPLICATIONS

¹TYKHOMYROV Artem, PhD, Senior Researcher

^{2,3}NEDZVETSKY Victor, Dr. Sci., Professor

⁴SHEMET Sergiy, Research Assistant

³AGCA Can Ali, PhD, Senior Researcher

¹Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Enzyme Chemistry & Biochemistry Dept., Kyiv, Ukraine

²Dnipro National University, Dept. Biophysics & Biochemistry, Dnipro, Ukraine

³Bingöl University, Dept. Molecular Biology & Genetics, Bingöl, Turkey

⁴Ukrainian Hemophilia Association, Dnipro Regional Chapter, Ukraine

Introduction. Factor VIII (FVIII, anti-hemophilic factor) is an essential blood-clotting protein. FVIII gene mutations result in hemophilia A. The mature FVIII protein is a single polypeptide with M_m of 320 kDa containing three different domains (A1, A2, A3, B, C1, and C2) (Fig. 1, A). B domain does not affect FVIII activity in the process of blood coagulation, and B domain-deleted natural or recombinant FVIII heterodimers show significant activity.

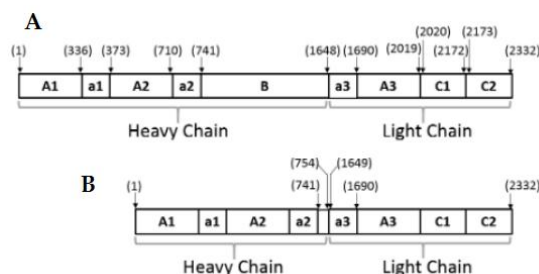


Fig. 1. Schematic structure of the full-length FVIII molecule (A) and its B-domain truncated form (moroctocog alpha) (B) [1].

Both plasma-derived FVIII concentrates and recombinant FVIII can be given to hemophiliac patients to restore hemostasis. Although various techniques for further concentrating and purifying the coagulation factors from donor plasma have been introduced, the problem of control of the quantity and quality of plasma-derived FVIII products has not been fully resolved. In screening tests during the manufacturing process immunoassays are used to quantify or detect the target antigen related to the disease in patient's blood. Quantitative analysis based on the use of highly specific antibodies to FVIII is required in order to distinguish factor deficiency from factor inhibition or defects. The use of recombinant immunogenic proteins that are maximally structurally and immunologically analogous to native target molecules is considered to be state-of-the-art industrial antigen/antibody manufacturing. Moroctocog alpha, which is also referred to as BDDrFVIII (B domain deleted rFVIII), represents a family of third-generation FVIII products, which are free of vWF and other protein impurities. Moroctocog alpha is a glycoprotein with an approximate M_m of 170 kDa consisting of 1438 amino acid residues and has functional characteristics comparable to those of endogenous FVIII [2]. In the present study, we used for the first time BDDrFVIII (moroctocog alpha) to produce polyclonal antibodies specifically recog-

nizing human native FVIII. Also, we describe main immunochemical characteristics of these antibodies and highlight their potential biomedical applications.

Materials and methods. ReFacto[®] AF (Wyeth Farma S.A., Madrid, Spain) containing 250 IU moroctocog alpha was used as immunogen. Commercially-available plasma-derived FVIII concentrates were used in this study as sources of FVIII-related antigens for immunochemical assays. Male New Zealand rabbits were immunized intracutaneously with antigen in two regimes: 1) BDDrFVIII (100 µg) as a suspension with complete Freund's adjuvant followed by repeating boost with the half-dose of antigen emulgated with incomplete Freund's adjuvant; 2) BDDrFVIII (50 µg) entrapped in 10% polyacrilamide gel (PAAG) after electrophoretic separation with the repeating boost with the half-dose of antigen as a PAAG suspension. Blood from the rabbits of the both groups was taken on 5-th, 7-th, 9-th, and 11-th days after the last antigen boost. At each time point, equal volumes of sera from each of the rabbits were analyzed by ELISA for antigen titers, using non-immune sera as a negative control. Electrophoretically homogenous IgG fraction was purified by affine chromatography with the use of Protein A-sepharose, and titers were measured by ELISA. Samples of moroctocog alpha, plasma-derived FVIII concentrates, human plasma from healthy donors and hemophilic volunteers, and human platelet lysates were used as sources of the FVIII-related antigens in immunoblotting. FVIII-specific IgG was used for FVIII-producing human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) immunostaining followed by visualization with the use of LSM510 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Results and discussion. Serological analysis (ELISA) of immune sera indicates that rabbits injected with PAAG-immobilized BDDrFVIII had 4-fold higher antibody titers than did the rabbits immunized in accordance with conventional procedure (1/12000 and 1/3000, respectively). As seen in Fig. 2, ELISA data indicates that rabbits injected with PAAG-immobilized BDDrFVIII had higher antibody titers compared to the rabbits immunized in accordance with conventional procedure. Evaluation of the purified IgG titer showed the significant difference between the signal from immune IgG and non-specific control threshold baseline at the minimal IgG concentration of ~ 50 ng per well.

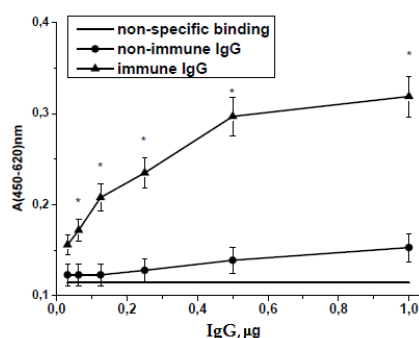


Fig. 2. ELISA absorbance profiles of specific IgG purified from serum of rabbits injected with PAAG-encapsulated antigen or BDDrFVIII in the form of emulsion with Freund's adjuvant. * - P < 0.05

Antisera taken from both groups of rabbits reacted with the moroctocog alpha, which they produced against (170 kDa), FVIII-related polypeptides in both plasma-derived concentrates and human serum (Fig. 3, A). With that, antisera of rabbits immunized with PAAG-immobilized BDDrFVIII appeared to recognize intact native FVIII molecule (320 kDa) in the samples of commercial FVIII concentrates as well as whole human serum. However, antisera obtained from conventionally immunized rabbits were not capable of such detection. Immunoblotting with the use of purified IgG as the primary antibodies showed the densities of immunostaining of the major polypeptide 320 kDa as well as FVIII-related polypeptides with the lower molecular masses to be much lesser abundant in the samples of hemophilia A persons than in healthy controls (Fig. 3, B). IgG purified from PAAG-BDDrFVIII-injected rabbits were able to recognize FVIII-related antigens in lysates of human platelets, which bear antihemophilic factor in the tenase complex or α -granules [1].

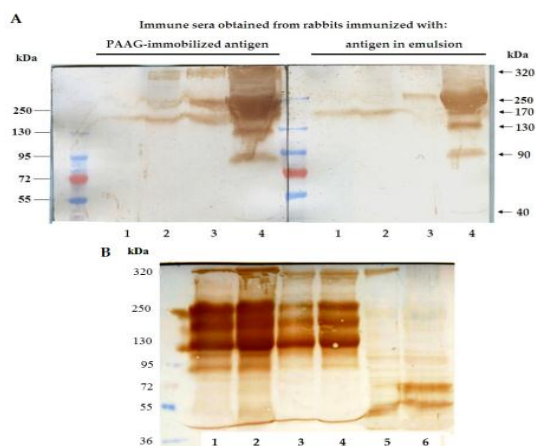


Fig. 3. Immunoblotting of FVIII-related antigens with the use of immune sera (A) or specific IgG (B) as primary antibodies (A: 1 – moroctocog alpha – 15 µg protein; 2 – BioClot A – 25 µg; 3 – Octanate – 25 µg; 4 – serum of a healthy donor – 100 µg; B: 1 – healthy volunteer 1; 2 – healthy volunteer 2; 3 – person with hemophilia A 1; 4 – person with hemophilia A 2; 5 – platelet lysate 1; 6 – platelet lysate 2).

There is uncertainty about the site of FVIII synthesis, however it has been postulated that endothelial cells are generally responsible for FVIII production [3]. According to this, we performed immunofluorescence assay of HUVECs as potential FVIII producers. Fluorescence microscopy confirmed the specific binding of anti-FVIII antibodies with HUVECs, but not glioblastoma cells, which were used as a negative control (Fig. 4).

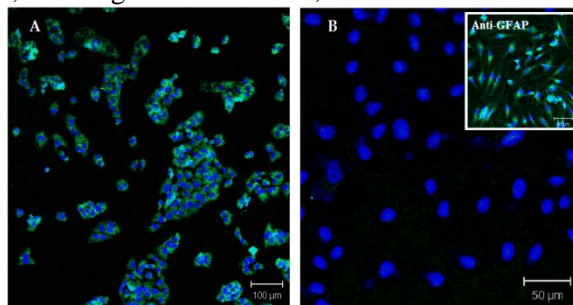


Fig. 4. FVIII immunofluorescence assay of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (A) (green – FVIII; blue – nuclear staining with Hoechst-33342). Content of immune Ig G – 20 µg/mL. B – glioblastoma U373 cell line (negative control), inset: immunostaining for GFAP, the specific marker of glial cells).

Conclusions. An optimized procedure for the production of polyclonal antibodies against FVIII with the use of PAAG-encapsulated BDDrFVIII (moroctocog alpha) was proposed and successfully validated. Human recombinant B-domainless FVIII (moroctocog alpha) appeared to be suitable for the production of highly specific and affine polyclonal antibodies, capable of recognizing of native whole FVIII molecule as well as FVIII-related truncated polypeptides. The antibodies produced can be applied for the development of novel protocols of highly sensitive and specific immunoassay approaches for FVIII detection in blood and serum-derived concentrates and further clarifying of FVIII intracellular expression and localization.

References

1. Mazurkiewicz-Pisarek, A. The factor VIII protein and its function / A. Mazurkiewicz-Pisarek et al. // *Acta Biochim. Pol.* – 2016. – V. 63, No. 1. – P. 11-16.
2. Recht, M. Clinical evaluation of moroctocog alfa (AF-CC), a new generation of B-domain deleted recombinant factor VIII (BDDrFVIII) for treatment of haemophilia A: demonstration of safety, efficacy, and pharmacokinetic equivalence to full-length recombinant factor VIII / M. Recht et al. // *Haemophilia.* – 2009. – V. 15. – P. 869-880.
3. Turner, N.A. Factor VIII is synthesized in human endothelial cells, packaged in Weibel-Palade bodies and secreted bound to ULVWF strings / N.A. Turner and J.L. Moake // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – e0140740.

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ФЛАВОНОИДОВ НА КАЛЬЦИЙ-ИНДУЦИРУЕМОЕ НАБУХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ

ЧЕЩЕВИК *Нина Григорьевна, ассистент*
ЧЕЩЕВИК *Виталий Тадеушевич, к.б.н., доцент*
Полесский государственный университет

Флавоноиды принадлежат к классу полифенольных соединений растительного происхождения, проявляющие свойства прямых и непрямых антиоксидантов, а также прооксидантов [1].

В настоящее время продемонстрировано, что биологические эффекты флавоноидов обусловлены следующими механизмами: регуляция клеточной сигнализации и уровня транскрипционных факторов, непосредственная модуляция активности ферментных систем, а также регуляция экспрессии генов путем эпигенетических изменений ДНК [2]. Кроме того, продемонстрировано, что многие эффекты флавоноидов реализуются на уровне митохондрий.

Митохондриальные эффекты флавоноидов обусловлены их химической структурой и воздействием на редокс-баланс митохондрий, и электрон-транспортную цепь. [3]. Изменения многих параметров митохондрий под действием флавоноидов, в свою очередь, оказывает влияние на протекание клеточных процессов, в первую очередь, апоптоз [3].

Цель работы – выяснить влияние флавоноидов на формирование пор высокой проницаемости митохондрий печени крыс.

Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий печени крыс, характеризующее формирование пор высокой проницаемости, определяли спектрофотометрически по скорости изменения оптической плотности суспензии митохондрий (0,5 мг/мл) на длине волны 540 нм. Набухание митохондрий индуцировали добавлением CaCl_2 в концентрации 60 мкМ [4]. Для исследования эффектов флавоноидов на Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий использовали флаванон гесперетин, флавонолы фисетин и кверцетин; экстракт плодов клюквы, представляющий собой смесь флавоноидов следующих классов: флаван-3-олов, антоцианидинов, проантоцианидинов, флавонолов. Концентрация флавоноидов в пробе – 25 мкг/мл

На рисунке представлены результаты исследований. Природные флавоноиды фисетин, кверцетин и гесперетин усиливают набухание митохондрий, стимулируя образование пор высокой проницаемости. При этом эффект в наибольшей степени выражен в случае гесперетина. Большой эффект фисетина на набухание митохондрий по сравнению с кверцетином, вероятно, обусловлен его структурными отличиями: меньшим количеством и различием в ортоположении гидроксильных групп на кольце В. Присутствие гидрофобной метильной группы на кольце В, как у гесперетина, вероятно, способствует ускорению набухания митохондрий. В то же время экстракт плодов клюквы, представляющий собой комбинацию природных флавоноидов, наоборот, полностью тормозил процесс набухания митохондрий.

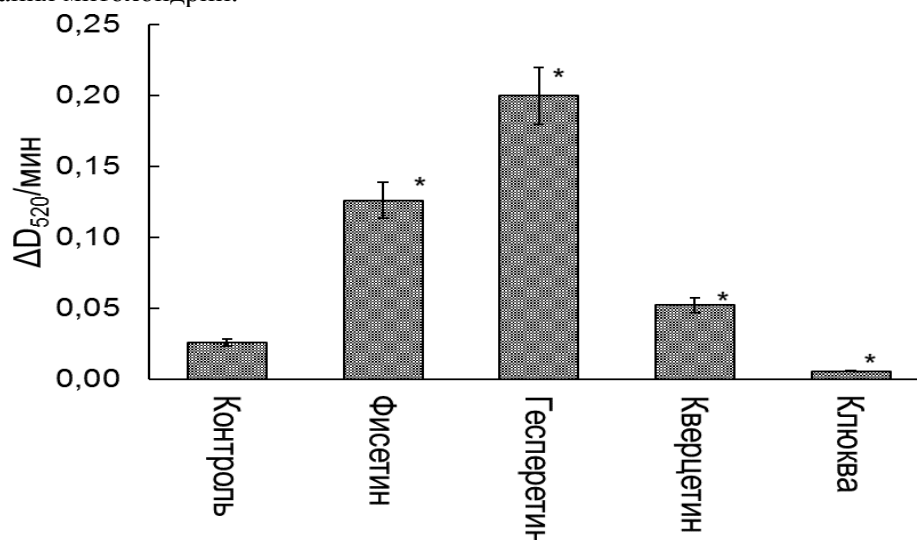


Рисунок – Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий печени крыс при действии природных флавоноидов

Таким образом, природные флавоноиды (гесперетин, фисетин, кверцетин) индуцируют формирование пор высокой проницаемости в митохондриях и, следовательно, могут вызывать апоптоз клетки. Можно предположить, что данная способность флавоноидов обусловлена их прооксидантными свойствами. Величина воздействия природных флавоноидов на формирование пор высокой проницаемости митохондрий определяется структурными особенностями их молекул. Экстракт плодов клюквы, сочетающий в себе ряд природных флавоноидов флован-3-олов, антоцианидинов, проантоцианидинов, флавонолов, оказывал выраженное ингибирующее действие на поры высокой проницаемости митохондрий, что, вероятно, будет приводить к ингибированию гибели клетки по апоптотическому пути.

Список использованных источников

1. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids / B.H. Havsteen // *Pharmacol Ther.* – 2002. – Vol. 96, № 2. – P. 67-202.
2. Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats / X. Wang [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2011. – Vol. 117. – P. 129-138.
3. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes / D.J. Dorta [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2005. – Vol. 152. – P. 67-78.
4. Baranov S.V. [et al.] Kinetic model for Ca²⁺-induced permeability transition in energized liver mitochondria discriminates between inhibitor mechanisms // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 2. – P. 665-676.

УДК 579.222

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОВТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СРЕДЫ ЗАРРУКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СПИРУЛИНЫ

ШАЛЫГО Николай Владимирович, д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси

МАНАНКИНА Елена Евгеньевна, к.б.н., науч. сотрудник

ВЯЗОВ Евгений Викторович, мл. науч. сотрудник

ГОНЧАРИК Руслан Геннадьевич, мл. науч. сотрудник

ФИЛИПЧИК Елена Александровна, стажер мл. науч. сотрудник

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

Сине-зеленая водоросль спирулина является одним из наиболее перспективных микроорганизмов, применяемых в промышленной биотехнологии, так как активно используется в странах дальнего и ближнего зарубежья в качестве пищевой и кормовой добавки, в медицине для лечения и профилактики ряда заболеваний, а также в производстве косметики. Спирулина содержит белок высокого качества, в состав которого входят незаменимые аминокислоты, пигменты, липиды, ненасыщенные жирные кислоты (в том числе и 3-омега-жирные), витамины, антиоксиданты и другие соединения, обладающие высокой биологической активностью [1].

В настоящее время в Республиканском центре альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси реализуется проект «Разработать и внедрить технологию производства биомассы спирулины как сырья для фармацевтической промышленности» в рамках подпрограммы «Инновационные биотехнологии-2020» государственной программы «Научно-технологические инновации» на 2016 – 2020 годы. Планируется организация собственного участка по производству биомассы спирулины. Полученная биомасса спирулины будет использоваться РУП «Белмедпрепараты» как источник хлорофилла *a* (хлорофилл *b* в спирулине отсутствует) для получения хлорина еб – активного вещества отечественного препарата «Фотолон», применяемого для фотодинамической терапии в онкологии и офтальмологии [2].

Цель данной работы – изучение возможности многократного использования питательной среды Заррука при культивировании спирулины для снижения затрат на ее производство.

В опытах использовали спирулину (*Spirulina platensis* IBCE S-2) из альгологической коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Спирулину выращивали в стеклянных конических колбах объемом 300 мл в течение 7 сут при температуре 23 ± 2°С с фотопериодом 14 ч на стандартной свежеприготовленной питательной среде Заррука (контроль) и на многократно использованной среде Заррука (ИС1, ИС2, ИС3, ИС4), где номер указывает кратность ее по-

вторного использования (опыт). Культуру освещали белыми люминесцентными лампами Philips TD-36/765, освещенность на поверхности суспензии составляла 4500 лк. Плотность биомассы в исходной суспензии была одинакова для всех вариантов (0,2 г/л).

Продуктивность спирулины определяли по накоплению сухой биомассы в процессе ее роста. Для этого измеряли величину оптической плотности суспензии при 560 нм на спектрофотометре РВ 2201 (SOLAR, Беларусь). Количество сухой биомассы рассчитывали, принимая во внимание данные о том, что оптическая плотность культуры спирулины при 560 нм, равная единице, эквивалентна содержанию 699 мг сухой биомассы в 1 л суспензии [3]. Содержание хлорофилла *a* определяли спектрофотометрически, как описано в работе [4]. Анализ каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ [5]

Показано, что однократное повторное использование стандартной среды Заррука (вариант ИС1) не приводит к достоверному изменению продуктивности спирулины, в то время как при двух-, трех- и четырех- кратном повторном использовании питательной среды (варианты ИС2, ИС3 и ИС4, соответственно) содержание сухой массы в суспензии уменьшается на 20%, 28% и 31% по сравнению с контролем, соответственно (рисунок).

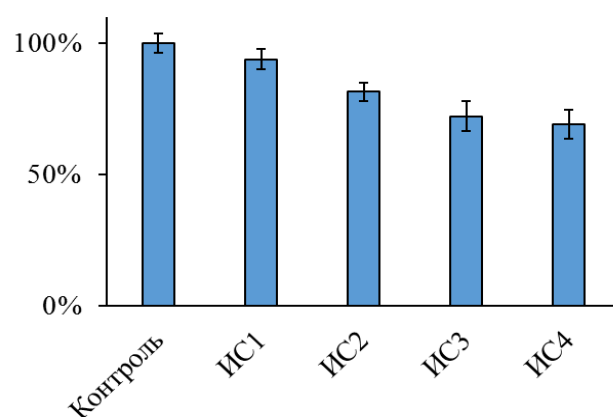


Рисунок – Изменение продуктивности культуры спирулины (% к контролю) при выращивании на многократно использованной среде Заррука.

Контроль – свежеприготовленная среда Заррука. ИС – использованная среда Заррука, номер указывает кратность повторного использования среды

Содержание хлорофилла *a* в контроле и в опыте с повторно (однократно) использованной средой составило $13,57 \pm 0,70$ и $13,00 \pm 0,67$ мг/г сухой массы соответственно. В отличие от хлорофилла *a* уровень каротиноидов в таких условиях снижался практически на 19%. Так, количество каротиноидов в биомассе спирулины, выращиваемой на свежеприготовленной среде Заррука, достигало значения равного $1,52 \pm 0,05$ мг/г сухой массы. При повторном использовании питательной среды их содержание составило $1,28 \pm 0,08$ мг/г сухой массы, что в принципе даже хорошо, так как каротиноиды считаются примесью в случае применения биомассы спирулины как источника хлорофилла *a*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для производства биомассы спирулины можно повторно использовать питательную среду Заррука, по крайней мере, однократно. При этом продуктивность водоросли и содержание хлорофилла *a* практически не изменяются, а содержание каротиноидов как сопутствующей примеси снижается по сравнению с выращиванием на свежеприготовленной питательной среде. Использование такого биотехнологического приема позволит сократить затраты на производство биомассы спирулины как источника хлорофилла *a* для фармацевтической промышленности.

Список использованных источников

1. Belay A. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina* / A. Belay [et all.] // Journal of Applied Phycology. – 1993. – Vol. 5. – P. 235-241.
2. Трухачева Т.В. Фотолон® – современный фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии / Т.В. Трухачева [и др.] – Мн.: Парадокс, 2013. – 103 с.

3. Sasaki K. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K.Sasaki [et al.] // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1995. – Vol. 79. – N. 5. – P. 453-457.
4. Мельников С.С. Влияние чередования световых и темновых периодов на продуктивность *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler / С.С. Мельников [и др.] // Альгология. – 2012. – Т. 22. № 2. – С. 121-130,
5. Forni E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // Chromatography. – 2012 – Vol. 1.– P. 120-124.

СОДЕРЖАНИЕ

БИОТЕХНОЛОГИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Водчиц Н.В., Кудряшова О.А., Вологович А.А. Молекулярно-генетическая идентификация сортов голубики на основе CAPS-маркеров.....	3
Голёта М.В. Влияние физических факторов и pH среды на активность амилолитических и протеолитических ферментов при производстве солода.....	5
Дитченко Т.И., Коробкина А.В., Юрин В.М. Получение каллусной культуры эхинацеи пурпурной корневого происхождения и оценка ее ростовой активности.....	6
Жатько К.И., Водчиц Н.В., Волкова Е.М., Вологович А.А. Способ стерилизации эксплантов земляники (<i>Fragaria L.</i>) на этапе введения в культуру <i>in vitro</i>	8
Ильчук И.А., Никандров В.Н., Жук О.Н. Изменения расщепления белков субстратов супернатантами гомогенатов мицелия <i>Pleurotus ostreatus</i> в присутствии АТФ <i>in vitro</i>	10
Каленчук Т.В., Чернецкая А.Г. Влияние регуляторов роста на морфометрические параметры мелкоцветковых сортов культуры <i>Chrysanthemum indicum (L.)</i> в условиях закрытого грунта.....	12
Калько Е.И., Жук О.Н. Сравнительная характеристика выращивания <i>Stereum hirsutum</i> и <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>in vitro</i>	15
Карунос А.С., Константинов А.В., Юрченко Е.О., Герасимович Т.В. Особенности размножения интродуцированных в Беларуси сортов актинидии острой <i>in vitro</i>	16
Ковзунова О.В. Суспензионная культура <i>Silybum marianum</i> красно- и белоцветковой рас: получение и анализ.....	18
Кондрацкая И.П., Столепченко В.А., Васько П.П., Мазур Т.В., Чижик О.В. Создание межродовых и межвидовых гибридов злаковых трав с использованием постгеномных технологий (<i>in vitro</i> , культура клеток и тканей).....	20
Константинов А.В., Карунос А.С., Грищенко И.В. Клональное микроразмножение декоративных водных растений семейств <i>Amaranthaceae Juss.</i> и <i>Acanthaceae Juss.</i> для аквариумов.....	22
Кулагин Д.В., Константинов А.В., Кирьянов П.С., Карунос А.С. Некоторые аспекты воспроизводства редких и декоративных представителей рода <i>Betula L.</i> <i>in vitro</i> для получения посадочного материала.....	24
Кутас Е.Н. Морфогенез интродуцированных сортов <i>Vaccinium vitis-idaea L.</i> в асептической культуре.....	26
Луконина Ю.Д., Кудряшова О.А., Потапова А.В., Борисевич Т.А., Вологович А.А., Жук О.Н. Регенерационная способность клёна серебристого <i>Acer saccharinum L.</i> на этапе асептического введения в культуру <i>in vitro</i>	29
Нестер Г.В., Дитченко Т.И. Стимуляция продукции фенолпропаноидов каллусными культурами эхинацеи пурпурной и эхинацеи бледной в условиях дефицита азота в питательной среде.....	30
Никонович Т.В., Кардис Т.В., Цвирко В.И. Влияние спектрального состава света на развитие растений картофеля в культуре <i>in vitro</i>	32
Олешук Е.Н., Янчевская Т.Г., Никонович Т.В., Французенок А.В., Цвирко В.И. Адаптация растений-регенерантов винограда на ионообменном субстрате триона при различных источниках искусственного освещения.....	34
Осочук И.М., Жук О.Н. Влияние брассиностероидов на развитие мицелия вешенки.....	36
Решетников В.Н., Шутова А.Г., Шиш С.Н., Матвеева Н.А., Дробот К.А., Шабуня П.С. Состав фенольных соединений «бородатых» корней <i>Artemisia annua L.</i>	37
Сакович В.В., Жук О.Н. Влияние питательных сред и условий глубинного культивирования на эффективность выращивания вешенки обыкновенной (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	39
Середич М.Н. Влияние температуры на плодоношение вешенки обыкновенной.....	42
Федоренко М.П., Вологович А.А. Влияние LED-освещения на рост растений <i>Vaccinium corymbosum L. ex vitro</i>	43
Филипцова Г.Г., Соколов Ю.А., Лущик А.Я., Юрин В.М. Синтетические пептидные элиситоры повышают устойчивость бобовых культур к стрессовым воздействиям.....	45
Фомина Е.А., Дмитриева Т.М., Урбанович О.Ю. Исследование коллекции линий озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum L.</i>) белорусской селекции по аллельному составу генов, влия-	

ющих на хлебопекарные качества зерна и высоту растений.....	47
Шиш С.Н., Шутова А.Г., Мазец Ж.Э., Спиридович Е.В. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на низкомолекулярные антиоксиданты в ювенильных растениях <i>Calendula officinalis</i> L.....	49
Шишлова-Соколовская А.М. Трансгенные растения ярового рапса, несущие в своем геноме гетерологичные гены животного и бактериального происхождения.....	51
Юхимук А.Н., Ле Нгуен Тхан, Спиридович Е.В. Молекулярно-генетический анализ некоторых видов рода чернушка (<i>Nigella</i> L.).....	53
Яхновец М.Н. Клен ясенелистный как опасный инвазионный вид.....	55

БИОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ И АКВАКУЛЬТУРЕ

Габрилевская Н.В. Тиреоглобулин в качестве маркера липидного обмена.....	57
Дмитрович Н.П., Козлова Т.В. Влияние условий культивирования на витаминный состав суспензии водорослей <i>Chlorella vulgaris</i> (Beijerinck) и <i>Scenedesmus acutus</i> (Meyen).....	58
Заяц О.В., Смок А.А. Оценка экстерьера молочных кобыл русской тяжеловозной породы.	60
Карат С.Б., Волкова Е.М. Перспективы использования брассиностероидов на млекопитающих, оказавшихся в условиях стресса.....	62
Кипень В.Н. Моделирование панели породоспецифичных SNP-маркеров для определения чистопородности домашних свиней породы дюрок.....	63
Козлова Т.В., Дмитрович Н.П. Возможности применения спектрофотометрического метода контроля численности клеток при культивировании водорослей для целей аквакультуры.....	65
Кредикова Я.В., Чигрин А.И. Обмен веществ и продукция молока у лактирующих коров при различном количестве рубцово-стабильных веществ в рационе.....	67
Куделич А.Э., Гук Е.С. Влияние аскорбиновой кислоты на темпы роста и скорость утилизации желточного мешка радужной форели (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) на этапе доинкубации....	69
Лемешевский В.О., Гмир В.С., Курепин А.А., Натынчик Т.М. Использование сапропелей в кормлении крупного рогатого скота.....	71
Натынчик Т.М. Применение системы чистой энергии лактации для оценки энергетической питательности объемистых кормов.....	74
Рыжковец К.В., Чигрин А.И. Биохимические и хозяйственно-биологические показатели у коров при различном уровне энергетического питания в объеме рациона в сухостойный период.....	76
Савчиц Т.Л., Алещенкова З.М. Скрининг азотфиксирующих микроорганизмов, перспективных для применения в прудовых хозяйствах.....	77

БИОТЕХНОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Грецкая Н.А., Римденко В.В., Дубовская Л.Ю., Дубоделова Е.В. Мониторинг санитарно-показательных микроорганизмов в производственной среде рыбоперерабатывающих предприятий.....	79
Игнатовец О.С., Леонтьев В.Н., Радченко Ю.С. Анализ путей деградации пестицидов на основе 2,4-Д-кислот бактериями-деструкторами.....	81
Королевич В.М., Жук О.Н. Выявление резистентности к метициллину с помощью метода полимеразной цепной реакции.....	83
Кулиш С.А., Сапунова Л.И., Ерхова Л.В. Выделение из природных источников дрожжевых грибов, синтезирующих полисахариды и экзодеполимеразы клеточных стенок растений.....	85
Подольский Д.Э. Кальциевая регуляция клеток <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при дыхании и брожении.....	86
Сапунова Л.И., Тамкович И.О., Лобанок А.Г., Кулиш С.А. Скрининг микроорганизмов – продуцентов комплекса экзогидролаз, катализирующих расщепление растительных биополимеров.....	88

БИОТЕХНОЛОГИИ В ГЕНЕТИКЕ И МЕДИЦИНЕ

Бубырь И.В., Лемешевский В.О., Натынчик Т.М., Горелик С.В. Мониторинг распространенности артериальной гипертензии и её осложнений среди населения Логойского района.....	91
Dzeikala A., Nowak A., Sykula A., Łodyga-Chruścińska E. Применение метода DNA-comet assay для оценки уровня повреждений ДНК раковых клеток линии HELA, вызванных основаниями шиффа и их комплексами с ионами меди(II).....	92
Demenko D., Boyko O., Platonov M., Chernyshenko V., Gornitskaya O., Chernyshenko T., Platonova T. Novel inhibitors of Factor Xa revealed from virtual screening studies.....	95
Капустин М.А., Чубарова А.С., Курченко В.П., Лодыгин А.Д., Ржепаковский И.В. Получение и свойства композитных нановолокон на основе пуллулана и наноструктур БАВ с циклодекстринами.....	96
Мисюк О.Н., Безрученко Н.Н. Особенности антибиотикорезистентности серотипов <i>Salmonella enterica</i> , циркулирующих среди населения Пинского региона.....	98
Попко Ю.И., Сак Ю.И., Цвирко Л.С. Перспективы производства рыбных формованных изделий в Республике Беларусь.....	100
Приловская Е.И., Глинская Н.А., Епишко О.А., Чебуранова Е.С. Оценка полиморфизма лошадей SSR-маркеры в контроле достоверности происхождения лошадей.....	102
Руско Д.И., Цвирко Л.С. Трематодофауна брюхоногих моллюсков в водоемах Пинского региона.....	103
Sykula A., Dzeikala A., Kowalska-Baron A., Łodyga-Chruścińska E., Bodzioch A. Correlation of antioxidant activities with theoretical studies for hesperetin schiff bases.....	105
Сак Ю.И., Попко Ю.И., Цвирко Л.С., Бубырь И.В. Использование различных добавок при изготовлении пряной рыбы.....	107
Семашко Т.В., Жуковская Л.А., Демешко О.Д., Лобанок А.Г. Влияние наночастиц золота и серебра на каталитические свойства глюкозооксидаз грибов рода <i>Penicillium</i>	109
Tykhomyrov A., Nedzvetsky V., Shemet S., Ağca Can Ali Polyclonal antibodies to domain b-free recombinant anti-hemophilic factor VIII: production, characterization and possible biomedical applications.....	111
Чешевик Н.Г., Чешевик В.Т. Влияние природных флавоноидов на кальций-индуцируемое набухание митохондрий.....	114
Шалыго Н.В., Мананкина Е.Е., Вязов Е.В., Гончарик Р.Г., Филипчик Е.А. Эффективность повторного использования среды Заррука при культивировании спирулины.....	115

Научное издание

**СБОРНИК
материалов II международной
научно–практической конференции**

«БИОТЕХНОЛОГИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»

**Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь,
7–8 декабря 2017 г.**

За содержание и достоверность информации
в материалах сборника отвечают авторы

Подписано в печать 23.11.2017. Бумага типографская
Формат 60x84/8 Гарнитура Times
Усл. печ. л. 14,06. Уч.–изд. л. 10. Тираж 50. Заказ № 415.

Отпечатано в учреждении образования «Полесский государственный университет»
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23