ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ҚазҰУ ХАБАРШЫСЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК КазНУ

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

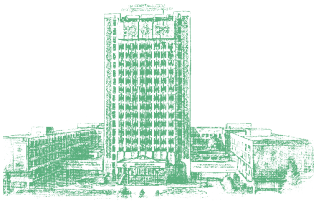
KazNU BULLETIN

Biology series

№2 (67)

Алматы
«Қазақ университеті»
2016

ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866



ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №2 (67)

25.11.1999 ж. Қазақстан Республикасының Мәдениет, ақпарат және қоғамдық келісім министрлігінде тіркелген

Куәлік №956-Ж.

Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ
Оразова С.Б. – б. ғ. к. *(Қазақстан)*

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:
Заядан Б.К., б.ғ.д., профессор – ғылыми редактор (*Қазақстан*)
Бисенбаев А.К., б.ғ.д., ҚР ҰҒА корреспондент мүшесі – ғылыми редактордың орынбасары (*Қазақстан*)
Тулеуханов С.Т., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Айташева З.Г., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Канаев А.Т., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Кистаубаева А.С., б.ғ.к. (*Қазақстан*)
Жубанова А.А., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Иващенко А.Т., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Мухитдинов Н.М., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Нуртазин С.Т., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Шулембаева К.К., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Берсимбай Р.И., б.ғ.д., профессор, ҚР ҰҒА академигі (*Қазақстан*)
Туруспеков Е.К., б.ғ.к., ассоциацияланған профессор (*Қазақстан*)
Бекманов Б.О., б.ғ.к., доцент (*Қазақстан*)
Омаров Р.Т., б.ғ.к., доцент (*Қазақстан*)
Искаков Б.К., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Сарбасов Д., PhD докторы, профессор (*АҚШ*)
Абжанов А., PhD докторы, профессор (*АҚШ*)
Рацкакуэ М., PhD докторы, профессор (*АҚШ*)
Орынбаева З.С., PhD докторы (*АҚШ*)
Поляк Б., PhD докторы (*АҚШ*)
Фридман Г., PhD докторы (*АҚШ*)
Курмашева Р.Т., PhD докторы (*АҚШ*)
Сапарбаев М., PhD докторы, профессор (*Франция*)
Партон С., PhD докторы, профессор (*Ұлыбритания*)
Дигель И., PhD докторы, профессор (*Германия*)
Даниленко М.П., PhD докторы (*Израиль*)
Тургай Т., PhD докторы (*Түркия*)
Лось Д., б.ғ.д., профессор (*Ресей*)
Маторин Д.Н., б.ғ.д., профессор (*Ресей*)

ҚАЗАҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БАСПА ҮЙІ

Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы
Гульмира Шаккозова
Телефон: +77017242911
E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

Компьютерде беттеген:
Айша Қалиева

Жазылу мен таратуды үйлестіруші
Мөлдір Өміртайқызы
Телефон: +7(727)377-34-11
E-mail: Moldir.Omirtaikyzy@kaznu.kz

ИБ №10071

Басуға 26.08.2016 жылы қол қойылды.
Пішімі 60x84 $^{1}/_{8}$. Көлемі 13,75 б.т. Офсетті қағаз. Сандық басылыс.
Тапсырыс №4569. Таралымы 500 дана. Бағасы келісімді.
Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің
«Қазақ университеті» баспа үйі.
050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.
«Қазақ университеті» баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2016

1-бөлім

БОТАНИКА

Раздел 1

БОТАНИКА

Section 1

BOTANY

Курбатова Н.В.,
Каржаубекова Ж.Ж.,
Гемеджиева Н.Г., Букина Е.Л.

РГП «Институт ботаники
и фитоинтродукции» КН МОН РК,
Казахстан, г. Алматы

Анатомо-морфологические и фитохимические исследования *Peganum harmala* L.

Представлены результаты по анатомо-морфологическим и фитохимическим исследованиям гармалы обыкновенной Peganum harmala L. (сем. Peganaceae (Engl.) Tiegh.) из Южного Прибалхашья.

Выявлены особенности анатомо-диагностических признаков листовой пластинки, стебля и корня у средневозрастных генеративных растений, собранных в фазы цветения и плодоношения. Качественный анализ сырья показал наличие 33 веществ различной природы, из которых идентифицировано более 20 соединений: 3 углевода, 1 фенол, 4 фенолокислоты, 2 флавоноида, 7 аминокислот и др. Количественный анализ на содержание некоторых групп БАВ выявил высокое содержание дубильных веществ, амино-, свободных органических кислот в подземной и надземной частях, а также высокое содержание алкалоидов в подземной части исследуемого образца. В надземной части отмечено большее содержание полисахаридов, чем в подземной, в следах обнаружены кумарины.

Ключевые слова: *Peganum harmala L.,* анатомо-морфологические особенности корня, стебля, листа, фитохимический анализ.

Kurbatova N.V.,
Karzhaubekova Zh.Zh.,
Gemejyieva N.G., Bukina E.L.

Institute of Botany and Phytointroduction KS MES RK, Kazakhstan, Almaty

Anatomo-morphological and phytochemical studies of *Peganum harmala* L.

This investigation presents the results of analyses ofanatomical, morphological and phytochemcial properties of Peganum harmala L. from southern Balkhash area. Anatomical, morphological features of the lamina, stem and the root were identified in middle-aged generative plants which have been collected during blooming and fructification phase. It was determined that some cells of the lamina contained raphides and mucous, the vein was surrounded by the major tissue of the leaf, and cells of the stem's skin had thickened walls. In addition, a row of cells of hypodermis contained calcium oxalate, a belt of sclerenchyma cells was identified, the structure of which was flaky.

Qualitative analysis of the raw materials showed 33 different types of compounds, out of which 20 were identified: 3 carbohydrates, 1 phenol, 4 phenolic and 7 amino acids, 2 flavonoids and etc. Quantitative analysis of the main groups of biologically active BAS revealed high amount of tannins, amino and free organic acids in the underground and aboveground parts, as well as the high content of alkaloids in the underground part. The aboveground part was characterized with high content of polysaccharides, in comparison to roots, and trace amount of coumarines.

Key words: Peganumharmala L., anatomo-morphological features of root, stem and leaf, phytochemcal analysis.

Курбатова Н.В.,
Қаржаубекова Ж.Ж.,
Гемеджиева Н.Г., Букина Е.Л.

ҚР Білім және ғылым министрлігі
«Ботаника және фитоинтродукция
институты» РМҚК,
Қазақстан, Алматы қ.

Peganum harmala L. анатомиялық-морфологиялық және фитохимиялық зерттеулер

Бұл мақалада Оңтүстік Балхаш аймағында өсетін Peganaceae (Engl.) Tiegh. тұқымдасының кәдімгі адыраспан Peganum harmala L. анатомиялық морфологиялық және фитохимиялық зерттеулері бойынша нәтижелері көрсетілген. Тамыр, сабақ және жапырақ тақташыларынан ерекше анатомиялық-диагностикалық белгілер анықталды. Гүлдену және жемістену кезеңінде вегетативтік мүшелерін көлденең кесу жүргізілді. Түрлерді зерттеу кезінде шикізаттың негізгі массасын беретін белгілі жас – орта жастағы генеративті өсімдіктер алынды. Анатомиялық морфологиялық зерттеулер нәтижесінде P.harmala келесі ерекше өзгерістер анықталды, кейбір жапырақ тақшасының жасушасы рафидтер және сөлді құрайды, жапырақтың негізгі ұлпасы жіпшелермен қоршалған өте қалың қабырғалы ұзын сабақ қабығының жасушасы оксалат кальцимен жинақталған бір қатар жасуша гиподермалар белгіленді, түтікшетамиықты байлам каллоиды, бірінші қабық және орталық цилиндр жасушаларында майда кристалдар кездеседі.

Сапалы фитохимиялық талдау нәтижелері 33 әртүрлі табиғи зат оның ішінде 20-дан астам қосылыс идентификацияланды: 3 көмірсу, бір фенол, 4 фенолқышқылы, 2 флавоноид, 7 аминқышқылы және тағы басқа. Сандық талдау кезінде ББЗ-ның бірқатар тобының құрамынан жоғарғы дубильді зат, өсімдіктің жер асты және жер үсті бөліктерінен амино-, бос органикалық қышқылдар табылды, сондай-ақ зерттеу үлгісінің жер асты бөлігінде жоғарғы құрамында алкалоидтар анықталды. Полисахаридтер жер үсті бөлігін жер асты бөлігімен салыстырғанда бірқатар жоғары артынша кумариндер табылды.

Түйін сөздер: Peganum harmala L., тамыр, сабақ және жапырақ тақташыларының анатомиялық-диагностикалық ерекшелері және фитохимиялық зерттеулер.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 581.84:581.19

*Курбатова Н.В., Каржаубекова Ж.Ж.,
Гемеджиева Н.Г., Букина Е.Л.

РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК,
Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: kurbatova_nv77@mail.ru

АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *PEGANUM HARMALA* L.

Введение

Для профилактики и лечения многих заболеваний в настоящее время широко используются лекарственные растения, а более 70% населения предпочитают использовать фитопрепараты, обладающие широким спектром биологического действия. В связи с этим, всесторонние и углубленные исследования лекарственных растений, применяемых в официальной и народной медицине, сохраняют актуальность по сей день [1].

Для выявления новых методологических подходов в выполнении анализов контроля и качества лекарственных растенийактуальным является проведение анатомо-морфологических и фитохимических исследований растительного сырья, которые позволяют выявить как теоретически и экспериментально обоснованные методики, так и усовершенствовать существующие. Так, определение анатомо-морфологическихособенностейлекарственного растительного сырья необходимодля систематизации терминологии анатомо-диагностических признаков, для теоретического обоснования и разработки единых требований к микроскопическому описанию сырья лекарственного вида.

Объект нашего исследования – официально признанное лекарственное алкалоидоносное растение *Peganum harmala* L. из семейства *Peganaceae* (Engl.) Tiegh. exTakht.) из Южного Прибалхашья.

Литературный скрининг изученности исследуемого вида выявил наличие данных по применениюгармалы у народов Средней и Восточной Азиипри окуривании помещений и при ревматизме и болях в ногах. Регулярное использование масла семян при артрозе коленного сустава снимает симптоматические боли [1]. Кроме того, в народной медицине уйгуров, проживающих на территории Китая, семена гармалы используются при лечении расстройств гемиплегии и амнезии. Так, например китайскими исследователями вышесказанное послужило основанием для более детального исследования химического состава семян гармалы, в результате которого были выделены минорные вещества: производные гармина, индола, хиназолина и методом биотестирования определена их высокая ингибирующая активность на ацетилхолинэстеразы (AChE) и бутирилхолинэстеразы (BChE) [2].

Предпринятые ранее фитохимические исследования казахстанского вида *P. harmala*были посвящены изучению и выделению алкалоидов [3], синтезу производныхна основе доступного растительного алкалоида гармина (как например, водорастворимая четвертичная соль), который могут применять при лечении заболеваний ЦНС, а также других производных, проявляющих антимикробную и противоопухолевую активность, результаты которых подтверждены рядом патентов РК [4-6].

На основе гармина, выделенного из семян *P.harmala,* получены новые производные изоксазолового ряда и проведена оценка влияния синтезированных соединений на некоторые клеточные линии рака, показавших выраженную активность показали против AChE, при (IC50=1,9±1,5 M) [7]. Из метанольного экстракта растения выделены новые производные хиназолинового ряда и изучено их влияние на пролиферативное действие линии клеток желудочного рака [8].

Изучению анатомо-морфологических особенностей гармалы обыкновенной была посвящена работа Л.К. Сафиной [9].

Нами продолжены фитохимические и анатомо-морфологические исследования *Peganum-harmala* из Южного Прибалхашья.

Материалы и методы

Во время экспедиционного обследования природных популяций гармалы обыкновенной в Южном Прибалхашье на территории Балхашского района Алматинской области в июне 2015 года были собраны образцы растительногосырья для последующего анатомо-морфологического и фитохимического изучения вида.Было исследовано три популяции. Вид *Peganumharmala*L. был определён доктором биологических наук Гемеджиевой Н.Г.

Микроскопические исследования были проведены на растительном материале, который был зафиксированв смеси спирта, глицерина и воды в соотношении 1:1:1.

При изготовлении и описании препаратов использовались общепринятые в анатомии растений методы [10-12].

Придерживаясь методических указаний, поперечные срезы вегетативных органов проводили в фазу цветения, так как именно в эту фазу структурные анатомические элементы органов растений имеют наибольшую целостность.

Микроскопические исследования проводили при определении морфологических и анатомических особенностей корней, стеблей и листьев. При характеристике корней особое значение имеют следующие признаки: на поперечном срезе, при малом увеличении (10^x) необходимо выделить первичную кору, чаще всего занимающую большую часть сечения корня, и относительно узкий центральный цилиндр. Описывается их общее очертание, форма и строение клеток, а также распределение элементов ксилемы и флоэмы.

Срезы корней делали в их базальной части по всей их длине через каждые 2-3 см. Для изучения брали растения определенного возраста, но основное внимание было уделено средневозрастным генеративным растениям, дающим основную массу сырья при исследовании видов.

Анатомические препараты были изготовлены с помощью микротома с замораживающим устройством ОЛ-ЗСО (Инмедпром, Россия), а также делались вручную – с помощью обыкновенных бритв, с двояковогнутым лезвием. Толщина анатомических срезов составляла 10-15 мкм. Для количественного анализа проведено измерение морфометрических показателей с помощью окуляр-микрометра МОВ-1-15 (при объективе х 9, увеличении х 10,7). Микрофотографии анатомических срезов были сделаны на микроскопе МС300 (Micros, Австрия)с видеокамерой CAMV400/1.3M(jProbe, Япония).

Описание внешних признаков выполнено в соответствии с требованиями ГФ XI [13,14].

Для фитохимических исследований заготовленные образцы отделяли по органам. Сушку осуществляли воздушно-теневым способом, разложив нарезанное сырье одним слоем, периодически перемешивая. Полученное сухое сырье измельчали и просеивали. Фитохимические исследования были проведены. Фитохимические исследования были проведены в РГП «Институте ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК.

Количественный анализ алкалоидов, флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот, сапонинов, свободных органических кислот, полисахаридов, фенолов, кумаринов и проводили по общепринятым методикам [15, 16].

Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом, оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 410 нм. Метод основан на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. Около 1 г сырья помещали в круглодонную колбу (100 мл), прибавляли 30 мл спирта этилового 70%, колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, далее охлаждали, фильтровали в мерную

колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли 2 раза, далее доводили объём фильтрата тем же растворителем до метки (раствор А). 5 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95% и доводили объём раствора тем же растворителем до метки; через 20 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре(«Ломо», Россия) при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведённого спиртом этиловым 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Количественное содержание алкалоидов определяли титриметрическим способом. Около 10 г измельченного сырья экстрагировали смесью хлороформа и раствора аммиака, встряхивали на вибрационном аппарате в течение 2 часов. Хлороформное извлечение отфильтровывали и отгоняли досуха. К полученному экстракту прибавляли минимальный объем 0,1 М раствора едкого натра, затем добавляли 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, встряхивали в течение 10 минут и отфильтровывали через тройной бумажный фильтр. Избыток кислоты в фильтрате определили раствором гидроксида натрия 0,01 М в присутствие индикатора метилового красного до появления желтого окрашивания.

Содержание сапонинов определяли спектрофотометрическим методом, оптическую плотность измеряли при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Извлечение сапонинов проводили ацетоном в присутствии 3% азотной кислоты в течение часа. Экстракцию проводили трижды, извлечения объединяли и отфильтровывали.

Содержание дубильных веществ проводили методом перманганатометрии. Около 3 г измельчённого сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл горячей воды и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Водное извлечение декантировали, к сырью в колбе прибавляли 50 мл горячей воды и повторно экстрагировали сырьё. Извлечения объединяли и фильтровали. 10 мл полученного раствора переносили в коническую колбу (500 мл), добавляли 100 мл воды очищенной, 10 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании 0,02 М раствором перманганата калия до появления золотисто-жёлтого окрашивания.

Количественное определение аминокислот проводили,руководствуясь следующим методом. Около 1 г сырья заливали 20 мл воды очищенной, настаивали при комнатной температуре в течение 24 часов, фильтровали. К 10 мл извлечения добавляли 10 мл нингидринового реактива, нагревали в течение 15 минут на водяной бане, охлаждали, отмечали цвет полученного раствора и измеряли его оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве контрольного раствора использовали воду очищенную с нингидриновым реактивом [16].

Результаты и их обсуждение

Данные анатомо-морфологического анализа представлены описанием анатомических особенностей в строении вегетативных органов исследуемого вида.

Строение листовой пластинки: снаружи лист покрыт толстым слоем кутикулы, под кутикулой в один ряд располагаются клетки эпидермиса. Толщина клеток верхнего эпидермиса 14,21±2,66мкм, толщина клеток нижнего эпидермиса 10,81±1,67мкм, имеет округло-четырехгранную форму с утолщенными наружными стенками. Мезофилл листа представлен ясно выраженной палисадной паренхимой, толщина которой в среднем составляет 37,03±1,35 мкм, опоясывающей со всех сторон рыхло лежащие клетки губчатой паренхимы (12,40±2,01мкм). Клетки палисадной ткани имеют цилиндрическую форму и располагаются в 2-3 ряда перпендикулярно к поверхности листа. В некоторых клетках губчатой ткани видны кристаллические иголочки оксалата кальция – рафиды. Отдельные клетки содержат слизь. Срединная жилка представляет один крупный проводящий пучок и имеет типичное строение; ксилема её обращена к морфологически верхней стороне листа. Для проводящих пучков листа гармалы характерно отсутствие механической обкладки. Жилка окружена основной тканью листа. В листе имеются также от 5 до 8 боковых жилок (рисунок 1).

По совокупности анатомо-морфологических признаков листа гармала обыкновенная относится к ксерофитам. Ксероморфная структура листа гармалы сочетается с некоторыми признаками суккулентности: с выносом солевых отложений в периферийные ткани и содержанием слизи в клетках эпидермиса и мезофилла. Эти анатомические особенности листьев наряду с расположением их в вертикальной плоскости способствуют снижению транспирации.

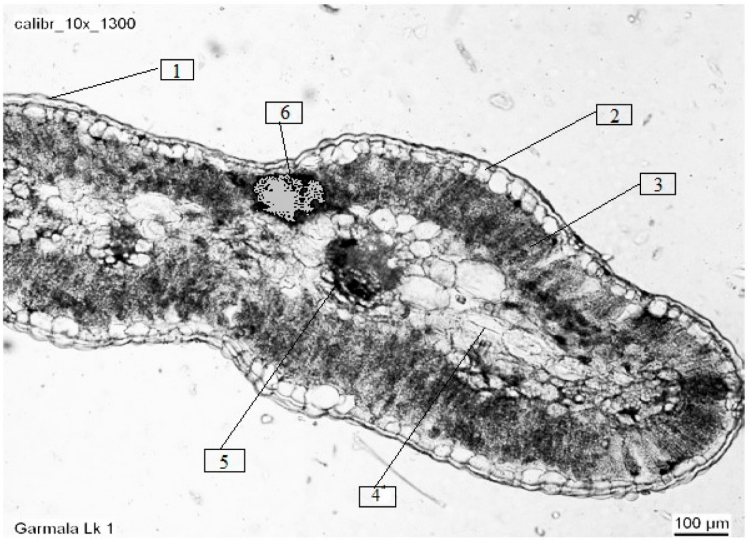


Рисунок 1 – Анатомическое строение листа Peganum harmala:1 – кутикула, 2 – эпидермис, 3 – палисадная паренхима, 4 – губчатая паренхима, 5 – центральный проводящий пучок, 6 – скопление рафид.Увеличение: окуляр – 10х22, объектив – 10х0,25.

На поперечном срезе стебель гармалы обыкновенной имеет следующее строение:снаружи стебель покрыт кожицей с толстой кутикулой, сильное развитие кутикулы связано с засушливыми условиями произрастания гармалы. Клетки кожицы в поверхностном срезе длинные с сильно утолщенными стенками. Устьица крупные, овальной формы с 3-4 сопровождающими клетками. Под кутикулой залегает один ряд более крупных клеток эпидермиса, за которым следует ряд мелкозернистых клеток гиподермы. В клетках кожицы и гиподермы часто встречаются скопления кристаллического песка оксалата кальция. Под гиподермой располагается хлорофиллоносная ткань, состоящая из 2-4 рядов однородных изодиаметрических клеток. В клетках хлорофиллоносной ткани находятся крахмальные зерна. Лежащие под хлорофиллоносной тканью клетки основной паренхимы – более крупные, округлой или овальной формы с тонкими стенками. нижний ряд клеток, примыкающих к склеренхимному поясу, имеет утолщенные одревесневшие стенки. В утолщенных стенках клеток механической ткани наблюдается слоеватость, а также видны поровые каналы. Основную часть центрального цилиндра занимают частично слившиеся сосудисто-волокнистые пучки коллатерального типа. Между вторичной флоэмой и вторичной ксилемой видна прослойка камбия. Вторичная флоэма на продольных срезах представлена крупными ситовидными трубками и тонкостенной лубяной паренхимой. Вторичная ксилема состоит из сетчатых сосудов, трахеид с окаймленными порами и древесных волокон с простыми порами. Сосуды первичной ксилемы, непосредственно прилегающие к сердцевине, имеют кольчатые и спиральные утолщения стенок.К основным биометрическим показателям стебля относятся: толщина первичной коры 39,91±0,53 мкм, диаметр центрального цилиндра 183,17±10,01 мкм, площадь ксилемных сосудов 23,78±6,95 кв.мкм (рисунок 2).

Следует отметить, что на кожице стебля изредка встречаются железистые волоски. В некоторых эпидермальных клетках откладывается кристаллический песок щавелевокислого кальция. Кожица подстилается гиподермой, её клетки по размерам значительно меньше эпидермальных и сплошь выполнены кристаллическим песком. Многие клетки основной паренхимы заполнены слизью и отличаются более крупными размерами и округлыми контурами.

Анатомо-морфологическое строение корня гармалы обыкновенной: снаружи кора покрыта многослойной пробковой тканью, за которой следует несколько рядов клеток феллодермы. Под феллодермой в основной ткани лежит склеренхимный пояс. На поперечном срезе видно, что полость склеренхимных волокон заполнена воздухом. Стенки сильно утолщены. В клетках первичной коры, окружающих группы склеренхимных волокон, в клетках сердцевинных лучей, пронизывающих луб и древесину, и в клетках феллодермы заметны серые

пятна, представляющие скопления мельчайших кристаллов (кристаллический песок). К склеренхимному поясу примыкает широким слоем вторичная флоэма. Между флоэмой и ксилемой рассматривается камбиальный слой. В центре корня располагается сердцевинная паренхима с включениями, представленная крупными средне- и широкопросветными сосудами ксилемы. В центральной части центрального цилиндра располагаются крупные клетки сердцевинной паренхимы.Биометрические показателя корня: толщина первичной коры корня в среднем составляет 54,49±3,16 мкм, диаметр центрального цилиндра 312,854±22,9 мкм, площадь ксилемных сосудов 67,97±5,45мкм^2 (рисунок 3).

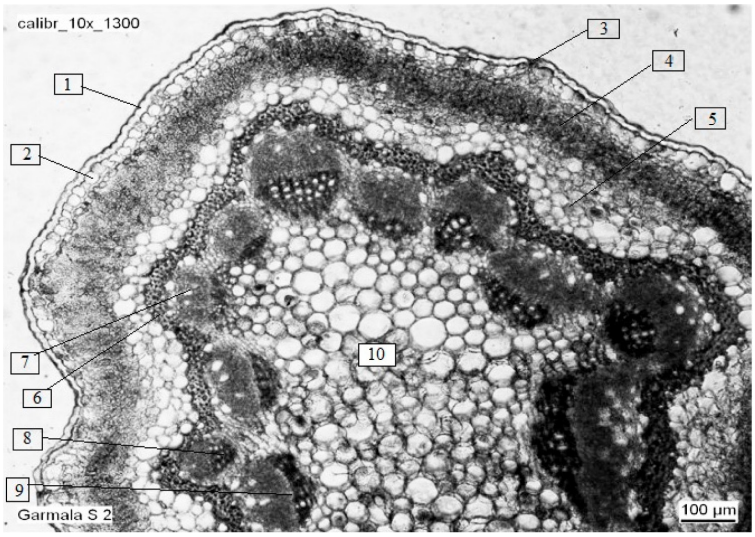


Рисунок 2 – Анатомическое строение стебля Peganum harmala: 1 – кожица с кутикулой, 2 – слой эпидермиса и гиподерма, 3 – устьице,4 – хлорофиллоносная ткань (хлоренхима), 5 – клетки основной паренхимы, 6 – склеренхимная обкладка, 7 – вторичная флоэма, 8–вторичная ксилема, 9–камбий, 10–сердцевина.Увеличение: окуляр – 10х22, объектив – 10х0,25.

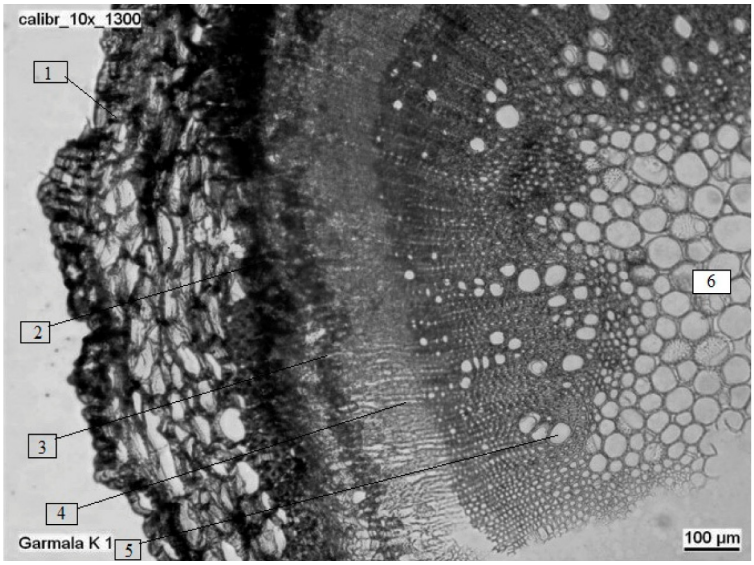


Рисунок 3 – Анатомическое строение корня Peganum harmala. 1–кора с многослойной пробковой тканью, 2–феллодерма, 3–склеренхимный пояс, 4–луб, 5–сосуды ксилемы, 6–сердцевина. Увеличение: окуляр – 10х22, объектив – 10х0,25.

Проведённые анатомо-морфологические исследования согласуются с литературными источниками по гармале обыкновенной в плане экологических признаков, которые характеризуют растение как ксерофит. Лист имеет центрическую структуру, указывающую на глубокую адаптацию растения к аридным условиям. Однако отмечено, что гармала не обладает всем арсеналом ксерических приспособлений. Такие признаки, как значительное число устьиц на обеих сторонах пластинки листа, их непогружённость, отсутствие опушения, слабая утолщённость эпидермальных клеточных стенок, сильное развитие палисадной ткани, способствуют обеспечению интенсивной транспирации, связанной с наличием у растения глубокоразвитойкорневой системы, достигающей грунтовых вод и в то же время являющейся приспособлением, защищающим его от перегрева. Отмеченные признаки указывают на то, что гармала принадлежит к числу гемиксерофитов. Анализ элементарного состава древесины стебля и корня гармалы показал довольно высокую степень её специализации. Среди трахеальных элементов стебля имеются сосуды с более совершенным типом поровости, чем у корня. Структурные изменения в корне затрагивают водопроводящие и механические элементы древесины [9].

Для углубленного фитохимического анализа и полноты извлечения основных группБАВ в исследуемых образцах проведена его количественная оценка, переменным фактором, которого являлись определение оптимального растворителя, время экстракции, температурный режим, а также соотношение сырья к растворителю(таблица 1). Наиболее приемлемым растворителем, обеспечивающим выход максимального количества БАВ из растительного сырья в ряду использованных,явился водно-этиловый спирт при соотношении вода–этиловый спирт 1:1.

Таблица 1 – Влияние растворителей на полноту извлечения экстрактивных веществ из Peganum harmala

№	Растворитель	Содержание экстрак-тивных веществ, %	Экстрагируемая группа природных соединений
1	Хлороформ, бензол, гексан	8-12 11-13	Неполярные соединения (смолы, предельные и непредельные углеводороды), стеролы, жирные кислоты.
2	Вода	18-24	Соли неорганических и органических веществ, алкалоиды,белки, углеводы, аминокислоты,водорастворимые витамины,гидролизуемыедубильные вещества, гликозидированные формы флавоноидов, кумаринов.
3	Этиловый спирт	23-26	Флавоноиды, терпеноиды, кумарины, дубильные вещества и их производные.
4	Водно-этиловый спирт (10-30%)	25-28	Соли неорганических и органических веществ, углеводы аминокислоты, полисахариды, соли алкалоидов, гликозидированные формы флавоноиды, кумаринов и др.
5	Водно-этиловый спирт (50%)	28-32	Соединения полифенольной природы, и их гликозиды, тритерпеновые сапонины и др.
6	Водно-этиловый спирт (70%)	26-29	Моно-, бигликозидированные производные терпеноидов, флавоноидов, кумаринов и др.

Для определения оптимального объема экстрагента изменяли объем растворителя от 2 до 10-кратного его избытка при постоянстве массы воздушно сухого сырья (5 г), времени и однократной экстракции. Полнота извлечения экстрактивных веществ достигалась при соотношении сырья и растворителя 1:5.

При оценке влияния времени на полноту экстракции определили, что максимальное экстрагирование основных групп БАВ достигается при комнатной температуре и 48 часовом настаивании 50%-водно-этиловым спиртом.

Известно, что время экстракции возможно сократить,влияя на температурный режим

процесса, так нами проведено получение экстрактивных веществ при температурах в пределе от 25°С до 50°С.Установили, что при увеличении температуры до 30-35°С выход экстрактивных веществсоставил 33,4 %. Методом двумерной и одномерной хро-матографии на бумаге (БХ) в различных системах растворителей и проявителей установили наличие основных групп БАВ в надземной части обнаружены33 вещества (таблица2):фенолокислоты (1, 7, 9, 14, 16); дубильные вещества (3, 6); флавоноиды (11, 13, 15, 17 – 20), алкалоиды (2, 4, 5, 8).

Таблица 2 – Результаты качественного анализанадземной части Peganum harmala из Южного Прибалхашья

№ пятна	Rf_1 (2% уксусная кислота), мл.	Rf_2 (бутанол: уксусная кислота: вода) 40:12,5:29, мл.	Видимый свет	УФ -свет	Пары NH_3	Диазотированный п-нитроанилин (ДзПНА)	1% водный раствор железо – аммониевых квасцов (ЖАК)	Реактив Драгендорфа
1	0,920	0,373	–	слаб. фиол.	–	фиол.	корич.	–
2	0,880	0,682	–	роз	–	–	–	кирп.
3	0,684	0,619	–	светящ	–	–	темно-корич	–
4	0,718	0,555	желт.	светящ	–	–	–	оранж.
5	0,708	0,532	–	–	–	–	–	оранж.
6	0,712	0,460	–	светящ	–	–	тёмно-корич	–
7	0,629	0,413	–	светящ	–	розов.	–	–
8	0,690	0,262	–		–	–	корич	желт.
9	0,808	0,342	желт	–	–	фиол.	–	–
10	0,693	0,498		светящ	–	–	корич	–
11	0,594	0,513	–	–	желт.	корич.	–	–
12	0,580	0,679	св. желт	светящ	–	ярко-желт	–	–
13	0,552	0,769	–	светящ	–	желт	–	–
14	0,489	0,786	–	-	–	оранж	–	–
15	0,412	0,812	–	светл. корич	–	желт	корич	–
16	0,301	0,427	–	светящ	–	сирен	–	–
17	0,078	0,752	–	светящ	–	желт	–	–
18	0,699	0,360	–	светящ	–	–	корич	–
19	0,652	0,420	–	светящ	ярко-желт	желт.	–	–
20	0,715	0,400	–	светящ	ярко-желт	желт.	корич	–
21	0,535	0,350	желт	светящ	–	–	корич	–

Таблица 3 – Результаты качественного анализа надземной части Peganum harmala из Южного Прибалхашья

№ пятна	Rf_1 (2% уксусная кислота), мл.	Rf_2 (БУВ) 40:12,5:29	Видимый свет	УФ -свет	Пары NH_3	Диазотированный п-нитроанилин (ДзПНА)	1% водный раствор железо – аммониевых квасцов (ЖАК)	Реактив Драгендорфа
1	0,632	0,563	св. желт	Светящ.	желто-корич.	фиол.	тёмно-корич	–
2	0,630	0,558	св. желт	светящ	–	–	корич.	корич
3	0,614	0,486	–	светящ	желт.	розов.	зелёно-чёрн.	–
4	0,672	0,363	св. желт	светящ	желт.	–	корич.	желт.
5	0,569	0,742	желт	–	желто-корич.	фиол.	–	–
6	0,493	0,803	св. желт	светящ	желт.	–	корич.	корич
7	0,411	0,621	св. желт	светящ	желт.	корич.	–	–
8	0,574	0,724	св. желт	светящ	желт.	ярко-желт.	зелёно-чёрн.	–
9	0,387	0,598	–	светящ	желто-корич.	желт.	–	–
10	0,289	0,469	св. желт	–	желто-корич.	оранж.	зелёно-чёрн.	–
11	0,291	0,465	св. желт	–	–	–	–	корич

В подземной части (таблица 3) обнаружено 11 веществ, из которых соединения 1, 3, 5 отнесены к фенолокислотам; 1, 3, 8, 10 кдубильным веществам; 7, 9 – к флавоноидам и 2, 4, 6, 11 – к алкалоидам.

Результаты количественных определений на содержание некоторых групп БАВ, а также потери массы при высушивании представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты количественного анализа основных групп БАВ в гармале обыкновенной, % а.с.с.

Показатели доброкачественности сырья	Исследуемая часть	
	надземная	подземная
Потеря массы при высушивании	6,3	7,5
Аминокислоты	3,1	4,3
Свободные органические кислоты	1,1	2,2
Фенолы	0,1	1,3
Флавоноиды	1,2	1,6
Кумарины	0,02	0,4
Алкалоиды	0,7	2,8
Сапонины	1,6	1,5
Дубильные вещества	2,4	5,2
Полисахариды	1,2	0,2

Вид *P. harmala* известен как алкалоидоносное растение, которое также характеризуется высоким содержанием дубильных веществ, что согласуется с литературными данными [17]. В надземной части содержание кумаринов значительно ниже (0,02 %) по сравнению с содержанием их в подземной части (0,4 %). Содержание аминокислот варьируетв пределе 3,1 – 4,3%; незначительно отличается содержание флавоноидов и сапонинов.

Таким образом, в результате проведенных анатомо-морфологических и фитохимических исследований вида *P. harmala* из Южного Прибалхашья выявлены анатомо-диагностические признаки листовой пластинки, стебля, корня и установлено для:

– листовой пластинки, гденекоторые клетки губчатой паренхимы содержат кристаллические структуры – рафиды, отдельные клетки содержат слизь, для проводящих пучков характерно отсутствие механической обкладки, жилка окружена основной тканью листа,отмеченоот 5 до 8 боковых жилок;

– стебля, гдеклетки кожицы в поверхностном срезе длинные с сильно утолщенными стенками. Под кожицей залегает ряд клеток гиподермы, в клетках которой встречаются скопления оксалата кальция. Имеется – склеренхимный пояс с утолщенными одревесневшими стенками, в структуре которых отмечена слоистость. Сосудисто-волокнистые пучки – коллатеральные.

– корня, в котором полость склеренхимных волокон заполнена воздухом, стенки сильно утолщены. В клетках первичной коры, сердцевинных лучей, феллодермы заметны серые пятна, мельчайших кристаллов.

В результате качественного фитохимического анализавыявлены 33 вещества различной природы, из которых идентифицировано более 20 соединений из: углеводов – глюкоза, мальтоза и сахароза; фенолов: флороглюцин; фенолокислот: кофейная, коричная, оксикоричная, о-кумаровая и сиреневая; флавоноидов: кверцетин, мирицетин; аминокислот: гистидин, пролин, триптофан, фенилаланин, тирозин, аспарагин, аргинин.

Количественный анализ на содержание некоторых групп БАВ выявил высокое содержание дубильных веществ, амино-, свободных органических кислот в подземной и надземной частях растения.Обнаружено высокое содержание алкалоидов в подземной части исследуемого образца. Содержание полисахаридов в надземной выше по сравнению с подземной частью, в следах обнаружены кумарины.

Проведенная количественная оценка на полноту извлечения основных групп БАВ позволила выявить оптимальный растворитель, обеспечивающий выход максимального количества БАВ из растительного сырья.

Настоящая работа выполнена в рамках гранта 0939/ГФ4 «Ресурсная характеристика некоторых хозяйственно-ценных растений (солодка, гармала, ревень) Прибалхашья».

Литература

1 Abolhassanzadeh Z., Aflaki E., Yousefi G., Mohagheghzadeh A. Randomized clinical trial of peganum oil for knee osteoarthritis // J Evid Based Complementary Altern Med.- 2015. – 20(2). – P. 126-131. doi: 10.1177/2156587214566867.

2 Yadi Y., Xuemei Cheng, Wei Liu, Guixin Chou, Zhengtao Wang, Changhong Wang.Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of *Peganumharmala* Linn by a bioassay-guided fractionation //Journal of Ethnopharmacology. – 2015. – Vol. 168. – P. 279–286.

3 ТурмухамбетовА.Ж. АлкалоидырастенийКазахстана. Строениемолекул, свойстваиприменение. – Дисс.… канд. хим.наук, – СПб.,2009, – 341 с.

4 Сариев А.К., Адекенов С. М., Турмухамбетов А.Ж., Анаев А.А., Арыстан Л.И., Нурмаганбетов Ж.С. Применение 7-Метокси-1метил-9Н-пиридо [3,4-b]индол-2N-гидрохлорида в качестве антидепрессивного, противогипоксического и антипаркинсонического средства //Инновационный патент РК №29584 от 16.03.2015.

5 Мукушева Г. К., Адекенов С. М., Турмухамбетов А. Ж., Нурмаганбетов Ж.С., Исмагулова Н.М. Гидрохлорид 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3.4-b]индола, обладающий высокой цитотоксичностью и эффективным влиянием на апаптоз опухолевых клеток // Инновационный патент РК № 23473 от 15.12.2010.

6 Жарылгасина Г.Т., Нурмаганбетов Ж.С.,Турмухамбетов А.Ж., Сейдахметова Р.Б., Адекенов С.М. 1-Метил-7-метокси-2-(2-оксо-2-фенилэтил)-9Н-пиридо[3,4-b]индол-2-иний бромид, обладающий выраженной антимикробной активностью // Патент № 29197 от 17.11.2014.

7 Filali I., Romdhane A., Znati M., Jannet H.B., Bouajila J. Synthesis of New HarmineIsoxazoles and Evaluation of their Potential Anti-Alzheimer, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362768.

8 Wang C.H., Zeng H., Wang Y.H., Li C., Cheng J., Ye Z.J., He X.J. Antitumor quinazoline alkaloids from the seeds of *Peganumharmala* // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2015. – 17(5). – P. 595-600. doi:10.1080/10286020.2015.1042373.

9 Сафина Л.К. Гармала обыкновенная. – Алма-Ата: Наука, 1977. – С. 23-50.
10 Пермяков А.И. Микротехника. – М.: МГУ, 1988. – С. 11-29.
11 Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: МГУ, 1960. – 260 с.
12 Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. Справочник по ботанической микротехнике.- М.: МГУ, 2004.- 313 с.
13 Государственная фармакопея СССР, XI изд., вып.1., – М.: Наука, 1987. – 334 с.
14 Государственная фармакопея СССР, XI изд., вып.2., – М.: Наука,1990. – 250 с.
15 Мамонов Л.К., Музычкина Р.А. Введение в фитохимические исследования и выявление биологической активности веществ растений. – Алматы: Школа XXI века, 2008. – 216 с.
16 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Методология исследования растительных метаболитов. – Алматы:MV-Print, 2012. – 324 с.
17 Кучинская Н.С. К изучению содержания дубильных веществ, органических кислот и микроэлементов в дикорастущих растениях Алма-атинской области //Труды института физиологии, Москва. – 1964. – С.59-64.

References

1 Abolhassanzadeh Z., Aflaki E., Yousefi G., Mohagheghzadeh A. Randomized clinical trial of peganum oil for knee osteoarthritis // J Evid Based Complementary Altern Med. – 2015. – 20(2). – R. 126-131. doi: 10.1177/2156587214566867.
2 Yadi Y., Xuemei Cheng, Wei Liu, Guixin Chou, Zhengtao Wang, Changhong Wang. Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of Peganumharmala Linn by a bioassay-guided fractionation //Journal of Ethnopharmacology. – 2015. – Vol. 168. – R. 279–286.
3 TurmuhambetovA.Zh. AlkaloidyirasteniyKazahstana. Stroeniemolekul, svoystvaiprimenenie. – Diss. … kand. him. nauk, – SPb., 2009, – 341s.
4 Sariev A.K., Adekenov S. M., TurmuhambetovA.Zh., Anaev A. A., Aryistan L.I., NurmaganbetovZh.S. Primenenie 7-Metoksi-1metil-9N-pirido [3,4-b]indol-2N-gidrohlorida v kachestveantidepressivnogo, protivogipoksicheskogoiantiparkinsonicheskogosredstva // Innovatsionnyiy patent RK № 29584 ot 16.03.2015.
5 Mukusheva G. K., Adekenov S. M., Turmuhambetov A. Zh., NurmaganbetovZh. S., Ismagulova N. M. Gidrohlorid 7-metoksi-1-metil-9N-pirido[3.4-b]indola, obladayuschiyvyisokoytsitotoksichnostyuieffektivnyimvliyaniemnaapaptozopuholevyihkletok // Innovatsionnyiy patent RK № 23473 ot 15.12.2010.
6 Zharyilgasina G. T., Nurmaganbetov Zh. S., Turmuhambetov A. Zh., Seydahmetova R. B., Adekenov S. M. 1-Metil-7-metoksi-2-(2-okso-2-feniletil)-9N-pirido[3,4-b]indol-2-iniy bromid, obladayuschiy vyirazhennoy antimikrobnoy aktivnostyu // Patent № 29197 ot 17.11.2014.
7 Filali I., Romdhane A., Znati M., Jannet H.B., Bouajila J. Synthesis of New HarmineIsoxazoles and Evaluation of their Potential Anti-Alzheimer, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362768.
8 Wang C.H., Zeng H., Wang Y.H., Li C., Cheng J., Ye Z.J., He X.J. Antitumor quinazoline alkaloids from the seeds of Peganumharmala // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2015. – 17(5). – P. 595-600. doi:10.1080/10286020.2015.1042373.
9 Safina L.K. Garmalaobyiknovennaya. – Alma-Ata: Nauka, 1977. – S. 23-50.
10 Permyakov A.I. Mikrotehnika. – M.: MGU, 1988.- S. 11-29.
11 Prozina M.N. Botanicheskayamikrotehnika. – M.: MGU, 1960. – 260 s.
12 Baryikina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G. Spravochnikpobotanicheskoymikrotehnike.- M.: MGU, 2004.- 313 s.
13 Gosudarstvennayafarmakopeya SSSR, XI izd., vyip.1., – M.: Nauka, 1987. – 334 s.
14 Gosudarstvennayafarmakopeya SSSR, XI izd., vyip.2., – M.: Nauka, 1990. – 250 s.
15 Mamonov L.K., Muzyichkina R.A. Vvedenie v fitohimicheskieissledovaniyaivyiyavleniebiologicheskoyaktivnostiveschestvrasteniy.-Almatyi: Shkola XXI veka, 2008.- 216 s.
16 Muzyichkina R.A., KorulkinD.Yu. Metodologiyaissledovaniyarastitelnyihmetabolitov.-Almatyi: MV-Print, 2012.- 324 s.
17 Kuchinskaya N.S. K izucheniyusoderzhaniyadubilnyihveschestv, organicheskihkislotimikroelementov v dikorastuschihrasteniyah Alma-atinskoyoblasti // Trudyiinstitutafiziologii, Moskva. – 1964. – S.59-64.

[1]Нестерова С.Г.,
[1]Инелова З.А., [2]Ерубаева Г.К.
[1]Запарина Е.Г., [1]Сейткадыр К.А.

[1]Казахский национальный университет
имени аль-Фараби,
Казахстан, Алматы
[2]Университет «Туран»,
Казахстан, Алматы

Анализ разнообразия семейства *Lamiaceae* Lindl. Заилийского Алатау

В статье приводится анализ видового состава семейства Lamiaceae Заилийского Алатау. Выявлено, что на территории исследований из семейства Lamiaceae распространено 78 видов, относящихся к 29 родам. Лидирующее положение в данном таксономическом составе занимают крупные рода Dracocephalum (13 видов), Nepeta (8 видов), Lagochilus (6 видов). Анализ жизненных форм растений Заилийского Алатау показал, что преобладающими являются многолетники (61 видов, или 78 %), затем следуют однолетники (11 видов, или 14%), а наименьшая часть видов из семейства Lamiaceae относится к полукустарничкам (6 видов, или 8%). Выявлено, что во флоре Заилийского Алатау из семейства Lamiaceae встречаются 57 хозяйственно значимых видов. Среди полезных групп растений были найдены лекарственные, медоносные, эфирномасличные, пищевые, технические и другие. Из них наибольшее количество видов – это лекарственные, медоносные и эфирномасличные растения. Во флоре Заилийского Алатау из семейства Lamiaceae встречаются 3 эндемичных (Nepetatransiliensis, Phlomoideszenaidae, Lagochilusbungei) вида, в числе которых 2 вида (Nepetatransiliensisи Phlomoideszenaidae) относятся также к редким видам.

Ключевые слова: флора, семейство Lamiaceae, род, вид.

---

[1]Nesterova S.G.,
[1]InelovaZ.A., [2]Yerubayeva G.K.,
[1]Zaparina E.G, [1]Seitkadyr K.A.

[1]Al-farabi kazakh national university,
Republic of Kazakhstan, Almaty
[2]«Turan» University,
Kazakhstan, Almaty

Analysis of diversity of the family *Lamiaceae* Lindl. Of Trans-Ili Alatau

The article provides an analysis of the species composition of the family LamiaceaeTrans-Ili Alatau. Revealed that the study area from the family Lamiaceae common 78 species belonging to 29 genera. Leading position in the taxonomic composition occupy large genus Dracocephalum (13 species), Nepeta (8 species), Lagochilus (6 species). Analysis of the types of life forms Trans-Ili Alatau showed predominant are perennials (61 species or 78%),then follow annuals (11 species or 14%),the lowest part of the species refers to dwarf shrubs (6 species or 8%). It was revealed that in the flora of the Trans-Ili Alatau of the family Lamiaceae found 57 economically important species. Among the groups of useful plants were revealed medicinal plants, honey plants, essential-oil plants, food plants, technical plants and others. Of these, the largest number of species – it is medicinal plants, honey plants, essential-oil plants. In the flora of the Trans-Ili Alatau of the family Lamiaceae were found 3 endemic species (Nepeta transiliensis, Phlomoides zenaidae, Lagochilus bungei) including 2 species (Nepeta transiliensis,Phlomoideszenaidae) belong to rare species.

Key words: flora, the family Lamiaceae, genus, species.

---

[1]Нестерова С.Г.,
[1]Инелова З.А., [2]Ерубаева Г.К.,
[1]Запарина Е.Г., [1]Сейтқадыр Қ.Ә.

[1]Әл-Фараби атындағы
Қазақ ұлттық университеті
Қазақстан, Алматы
[2]«Тұран» университеті
Қазақстан, Алматы

Іле Алатауының *Lamiaceae* Lindl. тұқымдасының алуантүрлілігін талдау

Мақалада Іле Алатауының Lamiaceae тұқымдасының түрлік құрамына талдау жасалынған. Зерттелген аймақ бойынша Lamiaceae тұқымдасында 29 туысқа жататын 78 түр таралғаны анықталған. Dracocephalum (13 түр), Nepeta(8түр), Lagochilus (6 түр) ірі туыстар көрсетілген таксономикалық құрамында жетекші орын алады. Іле Алатауы түрлерінің тіршілік формаларын талдау нәтижесінде көп жылдық өсімдіктер (61 түр немесе 78 %) басым болып келетінін, келесісі бір жылдық өсімдіктер (11 түр немесе 14%) және олардың аз бөлігі бұташаларға (6 түр немесе 8%) жататындығын көрсетті. Іле Алатауы флорасында Lamiaceae тұқымдасынан шаруашылық маңызды 57 түр кездесетіні анықталған. Пайдалы өсімдіктер топтары арасында дәрілік, балды, эфир майлы, азықтық, техникалық дақылдар және тағы да басқалары табылған. Осы топтардың ішіндегі түрлердің саны бойынша ең көп – бұл дәрілік, балды және эфир майлы өсімдіктер болып табылады. Іле Алатауы флорасында Lamiaceae тұқымдасынан 3 эндемикалық (Nepeta transiliensis, Phlomoides zenaidae, Lagochilus bungei) түр кездеседі. Соның ішінде 2 түр (Nepetatransiliensis және Phlomoideszenaidae) сирек кездесетін түрлердің қатарына жатады.

Түйін сөздер: флора, Lamiaceae тұқымдасы, туыс, түр.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 581.9

[1]Нестерова С.Г., [1*]Инелова З.А., [2]Ерубаева Г.К.
[1]Запарина Е.Г., [1]Сейткадыр К.А.

[1]Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Университет «Туран», Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: zarina.inelova@ kaznu.kz

АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ СЕМЕЙСТВА *LAMIACEAE* LINDL. ЗАИЛИЙСКОГО АЛАТАУ

Введение

В целях сохранения биологического разнообразия в Казахстане необходима реализация мер по оценке состояния и инвентаризации объектов видового разнообразия [1, 2]. Одним из объектов биоразнообразия является флора Заилийского Алатау, которая нуждается в инвентаризации. Учитывая важность этой проблемы, Казахстан присоединился и ратифицировал Конвенцию о биологическом разнообразии и борьбе с опустыниванием [1-3].

В современных условиях инвентаризация флоры и естественных растительных ресурсов является фундаментом для разработки научно-обоснованного алгоритма рационального использования растительных богатств [4].

Заилийский Алатау – самый северный хребет Тянь-Шаня – протянулся в широтном направлении на 400 км, образовав дугу, несколько вытянутую в южную сторону. Высота вершин достигает5017 м над уровнем моря. Территория Заилийского Алатау характеризуется сложным сочетанием форм и типов рельефа различного происхождения. М.Ж. Жандаев [5] выделяет здесь 7 типов рельефа, объединенных в 2 комплекса: эрозийно-тектонический (горный) и аккумулятивно-тектонический (равнинный). В целом весь Тянь-Шань представляет собой сравнительно молодую горную страну, созданную глыбовыми поднятиями и складкообразованием на месте старой, уже существовавшей, но сильно выровненной и пенепленизированной [6]. По данным С.С. Шульца [7], завершение пенепленизации произошло в конце палеогена и только затем начались альпийские и новейшие четвертичные поднятия, вновь сделавшие Тянь-Шань горной страной.

Геологическое строение Заилийского Алатау характеризуется широким распространением как древнейших, так и молодых пород [8]. Геологическая молодость современного рельефа Тянь-Шаня подтверждается рядом биологических факторов. Так, характер флоры и растительности высокогорий данной горной страны свидетельствует о том, что поднятие хребтов на современные гипсометрические уровни прои-

зошло в геологическом смысле недавно, быть может в плиоцен-плейстоцене. Об этом свидетельствует отсутствие сколько-нибудь значительного морфологического обособления у большинства видов, обитающих одновременно в высокогорных поясах и на равнине, ибо для обособления необходим больший отрезок времени [9, 10].

Полупокровное раннечетвертичное оледенение явилось основной причиной образований предгорных шлейфов, сложенных флювиогляциальными отложениями. Позже в них были вложены аллювиально-пролювиальные конусы. У подножий хребта преобладает грубообломочный материал, сменяющийся в сторону Илейской долины песчано-глинистыми отложениями. На севере конусы выноса выполаживаются и переходят в аллювиально-пролювиальные аккумулятивные равнины. В пределах восточной части Илейской впадины кроме аллювиально-пролювиальных равнин сформировалась вогнутая озерная равнина. Мощность мезокайнозойских отложений во впадине достигает 6000 м. [11].

Основные закономерности климата Заилийского Алатау обусловлены внутриконтинентальным положением Тянь-Шаня и, в частности Заилийского Алатау, расположенных в зоне горных территорий, где атмосферный термический режим определяется в основном средней географической широтой и значительной инсоляцией, а режим увлажнения западным циклоническим переносом атлантической атмосферной влаги и барьерным влиянием гор. Барьерные воздействия гор, вызывающие усиленную конденсацию влаги на склонах передовых хребтов, а также изменение термического режима с высотой обуславливают проявление вертикальной климатической зональности. Она проявляется в том, что с увеличением высоты местности понижаются средние (месячные, годовые) температуры воздуха, но возрастает количество атмосферных осадков [12].

Каждый пояс растительности Заилийского Алатау характеризуется определенными климатическими условиями. На высоте от 600 до 1700 метров над уровнем моря средняя годовая температура составляет +7,5^0 С, а самого теплого месяца июля – +19^0. Наиболее холодный месяц – декабрь со средней температурой около – 7^0, среднегодовое количество осадков – около 850 мм.

От 1800-2700 м над уровнем моря простирается елово-лесной пояс. Здесь ярко выражен горный климат – зима мягкая с большим количеством солнечных дней. Отрицательная температура сохраняется с ноября по март. Наиболее холодный месяц – декабрь со средней температурой – 6,3^0, в то время как средняя годовая – 3,6. Самый теплый месяц – июль со средней годовой температурой +15 [10].

На высоте 2700-3360 метров над уровнем моря, снеговой покров лежит 8 месяцев. Средняя температура самого холодного месяца февраля – 12^0. Лето короткое, нередки заморозки даже в самый теплый период года. Средняя температура июля +7,7^0, а годовая -2^0. С высотой климат становится ещё более суровым, а погода изменчивой. Средняя годовая температура – 6,4^0, а самого холодного месяца – 15,5^0. Морозы достигают – 35^0. Лето короткое.

Характерен континентальный аридный тип климата. Годовое количество осадков составляет 269-276 мм. В течение года осадки выпадают неравномерно.

Имеются два максимума – первый весенне-летний (апрель-июнь) и второй осенне-зимний (октябрь-ноябрь) – и один летний минимум (июль-сентябрь). Среднегодовые температуры воздуха колеблются от +8 (на юге) до 10.3 °С (на севере). Самый жаркий месяц – июль (25-26°), самый холодный – январь (–5, –10°). Снежный покров устанавливается в декабре и сходит в конце февраля–начале марта, высота его составляет 10-20 см. [11, С. 151].

Почвенный покров Заилийского Алатау имеет хорошо выраженную ярусность. Сверху вниз распределены следующие типы почв: горно-луговые, высокогорные лугово-степные, высокогорные степные, высокогорные темноцветные, горно-лесные темноцветные, горно-лесные темно-серые, горно-лесные черноземовидные, горные лесо-луговые, горные лугово-степные, горностепные термоксероморфные, горные и предгорные черноземы степные, горные и предгорные каштановые, предгорные сероземы, предгорные бурые и пустынные почвы [12].

Для субальпийского и елового поясов характерны следующие типы почв:

1. Горно – луговые субальпийские почвы. Развиваются в нижнем поясе высокогорной зоны на высоте 2800-3000 м.

2. Высокогорные лугово-степные почвы. Они формируются на крутых и покатых склонах южных и приближенных к ним экспозиций. Встречаются на высотах от 2400-2500 до 3300-3400 м.

3. Высокогорные степные почвы развиваются в сравнительно более ксеротермических условиях, чем соответствующие высокогорные лугово-степные почвы.

4. Высокогорные темноцветные почвы.

5. Горно-лесные темноцветные почвы имеют широкое распространение. Они формируются в поясе сильно расчлененного среднегорного рельефа, где занимают наиболее влажные и прохладные склоны северных экспозиций и близких к ним экспозиций на высотах от 1600 до 2400 (2500) м.

6. Горные лесо-луговые почвы встречаются в области среднегорий в поясе хвойного леса, преимущественно на менее крутых склонах северных экспозиций [12, 13].

Южное положение и сухость климата окружающих районов отличают эти горы от других горных систем стран СНГ присутствием в нижнем поясе пустынной и степной растительности.

В пределах Заилийского Алатау есть сухие склоны с мезоксерофитной растительностью, характерные в основном для восточных и западных отрогов хребта; лиственные леса, которые особенно хорошо развиты в северных предгорьях центральной части хребта между Кастеком и рекой Чилик; хвойные леса различного увлажнения; альпийские луга; высокогорные сазы; выходы родников с окружающей мезогигрофитной растительностью и высокогорные озера, лишенные в большинстве животной и растительной жизни. Горный хребет рассекается с юга на север горными реками, среди которых наиболее многоводны Чилик, Тургень, Талгар и др., образующие речные долины с богатым растительным покровом. Для характеристики вертикального распределения растений Заилийского Алатау в основу принята схема поясности Н.В.Павлова. Согласно схеме все разнообразие растительности Заилийского Алатау распределяется между пятью вертикальными поясами:

1) Пустынный, до 600 метров абсолютной высоты.

2) Кустарниково-разнотравной степи с участием древесных и кустарниковых лиственных пород, до 1700-1800 метров.

3) Елово-лесной из PiceaSchrenkianaFisch. EtMey., до 2700 метров с пятнами зарослей приземистого можжевельника у верхней границы со скалистыми выходами и обнажениями, где по склонам южной экспозиции поселяется растительность кустарниково-степного пояса.

4) Гемикриофитный собственно субальпийский, от 2500-2800 (3000) метров.

5) Эукриофитный альпийский – 2800-3300 метров [14].

Сравнение растительности разных поясов выявляет следующие закономерности: при движении снизу вверх происходит изменение в составе и структуре сообществ, в спектре жизненных форм господствующих и согосподствующихсинузий. Полукустарниковые и полукустарничковые пустыни с участием пустынных злаков и эфемероидов сменяются эфемероидно-дерновиннозлаково-полукустарничковыми пустынями, на смену которым приходят эфемероидно-полукустарничково-дерновиннозлаковыеопустыненные степи, где происходит замещение синузии эфемероидов синузиейгемиэфемероидов.

Заилийский Алатау характеризуется богатым генофондом и разнообразными запасами полезных растений.

Работа выполнена в рамках проекта ««Биоразнообразие сосудистых растенийЗаилийского Алатау и разработка рекомендаций по рациональному использованию хозяйственно ценных растений и сохранению редких и исчезающих видов».

Материалы и методы

Применялись классические, современные методы флористики. Основным методом исследования был маршрутно-рекогносцировочный (рисунок 1).

Гербарные образцы растений определяли с использованием в качестве источников многотомные сводки «Флора СССР», «Флора Казахстана», «Определитель растений Средней Азии», «Иллюстрированный определитель растений Казахстана», «Флора Казахстана» М.С. Байтенова [15-19]. Расположение видов и надвидовых категорий во флористическом спектре проведены согласно системе А.Л. Тахтаджяна [20].

Написание латинских названий, номенклатурные изменения таксонов были выверены в соответствии с С.К. Черепановым [21].

Так как представители семейства *Lamiaceae* Заилийского Алатау имеют большое хозяйственное значение, нами проведен анализ биразнообразия данного семейства.

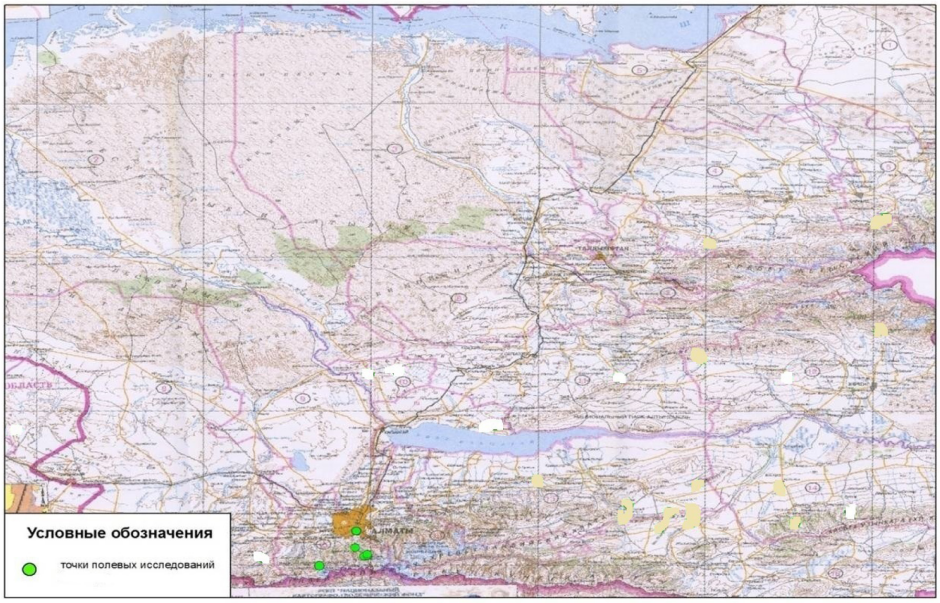


Рисунок 1 – Карта-схема полевых исследований Заилийского Алатау

Результаты и их обсуждение

На территории исследований из семейства *Lamiaceae* распространено 78 видов, относящихся к 29 родам.

Из десяти ведущих родов первое место занимает род *Dracocephalum*, который содержит 13 видов. Второе место занимает род *Nepeta* –8 видов, на третьем месте расположился род *Lagochilus*, который содержат 6 видов (рисунок 2).

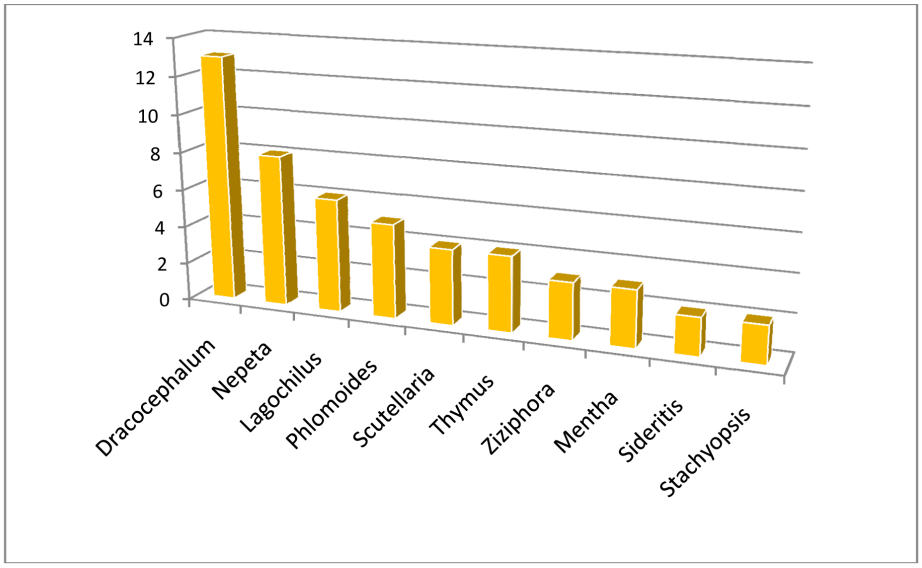


Рисунок 2 – Родовой спектр семейства *Lamiaceae* Заилийского Алатау

Нами были проанализированы жизненные формы флоры семейства *Lamiaceae*Заилийского Алатау. Под жизненной формой подразумевается совокупность взрослых особей данного вида в определенных условиях произрастания, обладающих своеобразным общим обликом

(габитусом), включая надземные и подземные органы (подземные побеги и корневую систему) [22]. Анализ жизненных форм видов Заилийского Алатау представлен на рисунке 3. По количеству видов, преобладающими являются многолетники (61 вид или78%), затем однолетники (11 видов или 14%), а наименьшая часть видов относится к полукустарничкам (6 видов или 8%) (рисунок 3).

Во флоре Заилийского Алатау из семейства *Lamiaceae* встречаются 57 хозяйственно значимых видов.

Среди полезных групп растений имеются лекарственные, медоносные, эфирномасличные, пищевые, технические, декоративные, а также ядовитые и сорные. Из них наибольшее количество видов – это лекарственные (*Nepetamicrantha* Bunge.,*Clinopodiumintegerrimum* Boriss., *Dracocephalumstamineum* Kar.&Kir., *Scutellariagalericulata*L., *Sideritismontana*L., *Phlomoidespratensis* (Kar. etK.) Adyl., R. Kam. &Machmedov, *Ziziphoraclinopodioides* Lam. (*Z. bungeana*Juz.), *Origanumvulgare* L., *Lamiumamplexicaule* L., *Lallemantiaroyleana* (Benth.) Benth. идр.) имедоносные (*Nepetacataria L., Dracocephalumgrandiflorum* L., *D.imberbe* Bunge., *Phlomoidesspeciosa* (Rupr.) Adyl., R. Kam. &Machmedov, *Paraeremostachysphlomoides* (Bunge) Adil., R.Kam. & Machmedov, *Eremostachysmoluccelloides* Bunge, *Betonicafoliosa*Rupr., *Menthainterrupta* Boriss., *Stachyssylvatica*L., *Stachyopsis oblongata* (Schrenk.) M. Pop.&Vved. идр.) растения – по 42 видакаждый, иэфирномасличные – 13 видоврастений (*Nepetapannonica* L., *Dracocephalumruyschiana* L., *Ziziphoravichodceviana* V. Tkatsch. Ex Tuljaganova, *Thymusdmitrievae*Gamajun., *Menthalongifolia* (L.) Huds. идр.). Они являются противовоспалительными, тонизирующими, сердечно-сосудистыми,кровоостанавливающими и т.д.

Эти растения применяют как в официальной медицине так и в народной.Например: *Thymusmarschallianus*Willd.(Чабрец (Тимьян) Маршалла) – Полукустарничек с почти неразвитыми стволиками и приподнимающимися, реже прямостоящими деревянистыми ветвями, годичные бесплодные и цветоносные ветви большей частью прямостоящие, 12 – 25 (37) см выс., под соцветием опушенные отстоящими волосками, в остальной части с коротким, вниз отогнутым опушением; листья сидячие, продолговато-эллиптические, 12,5 – 30 мм дл., 2,5 – 5 (8) мм шир., с клиновидным основаниеми несколько заостренной верхушкой, зеленые, тонкие, у основания по краю с редкими ресничками, по поверхности неясно точечно-железистые, голые или шероховатые от кратчайших щетинок, боковые жилки неясные; соцветия удлиненные, от 4 до 20 см дл., с отодвинутыми 2-7 нижними мутовками, верхними же сближенными, иногда почти головчато; цветоножки волосистые, почти равные чашечке; чашечка колокольчатая, 2-3 мм, чаще 2,5мм дл., при плодах немного крупнее, до 3,5 мм дл., с короткой волосистой трубкой, зубчики верхней губы чашечки остроконечные, почти одинаковые, по краю длиннoресничатые; венчик бледно-филетовый, с короткой трубкой, ворончатый, около 5 мм дл. Цветет в мае-августе. Плодоносит в июне-сентябре [16].

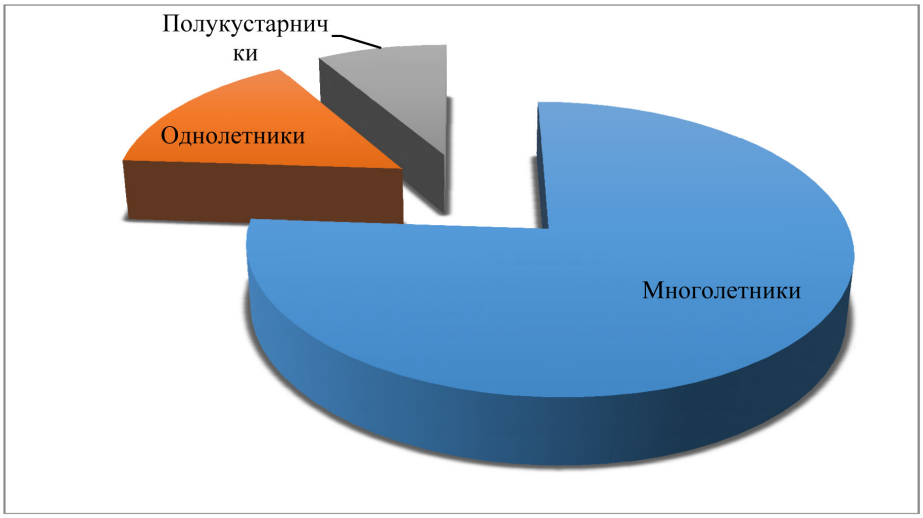


Рисунок 3 – Жизненные формы видов семейства *Lamiaceae* Заилийского Алатау

Распространение: Встречается повсеместно на территории Казахстана.Сбор и заготовка сырья: Сырье: надземная часть.Химический состав: Содержит фенолкарбоновые кислоты и их производные, флавоноиды, антоцианы, эфирное масло.Применение:Используется как ранозаживляющее, болеутоляющее, седативное, спазмолитическое, отхаркивающее [23]. А также *Origanumvulgare*L. (Душица обыкновенная) Многолетнее травянистое растение с ветвистым корневищем, дающим в течение лета по нескольку стеблей высотой до 60 см. Стебли четырехгранные, листья супротивные. Цветки пурпуровые, сидячие в пазухах прицветников, собраны в метельчатый щитковидный тирс. Плод -ценобий состоит из 4 долей (эремов), заключенных в остающуюся чашечку. Цветет с июля по сентябрь. **Распространение:** Произрастает в Южной Сибири, горных районах Центральной Азии. Предпочитает сухие открытые места, степные луга, между кустарниками, на лесных полянах. **Сбор и заготовка сырья:** Смесь листьев, цветков и стеблей до 20 см. Листья коротко-черешковые, продолговато-яйцевидные, цельнокрайние, длиной 1–5см. Сверху листья темно-зеленые, снизу бледно-зеленые, очень ароматичные, на вкус горьковато-пряные, слегка вяжущие. Прицветники эллиптические, темно-фиолетовые. Цветки длиной около 5 мм, чашечка правильная, колокольчатая, пяти зубчатая, в зеве с кольцом белых волосков; венчик бледно-пурпуровый, двугубый. ГФ XI допускает использование измельченного сырья.Химический состав: эфирное масло (0,1–1,2 %), содержащее до 40% фенолов карвакрола и тимола (первого больше). В нефенольную фракцию входят моно- и сесквитерпены и их кислородные производные; присутствует геранилацетат (до 5 %) (согласно ГФXI эфирного масла, – не менее 0,1 %*)*. Листья богаты аскорбиновой кислотой – до 0,5%. В них имеется немного дубильных веществ.Применение:Входит в состав грудного, потогонного, ветрогонного и других сборов. Настои назначают при атонии кишечника. Экстракт травы душицы обыкновенной входит также в препарат “Уролесан”. [24-26]. Многие виды являются лекарственными и медоносными одновременно (*Galeopsis bifida* Boenn., *Dracocephalum integrifolium* Bunge., *D.nutans* L., *D.nodulosum* Rupr., *D.bipinnatum* Rupr., *D.diversifolium* Rupr*., Prunella vulgaris* L., *Phlomoides oreophila* (Kar.& Kir.) Adyl., R. Kam. & Machmedov*, Leonurusturkestanicus* V. Krecz. & Kuprian., *Salvia nemorosa* L., *Ziziphora ten*uior L. и др.)

Во флоре Заилийского Алатау из семейства *Lamiaceae*встречаются 3 эндемичных растения (*Nepetatransiliensis, Phlomoideszenaidae, Lagochilusbungei)*, 2 из которых также являются и редкими (*Nepetatransiliensis, Phlomoideszenaidae)* видами.

Таким образом, в результате наших исследований было выявлено, что вЗаилийского Алатау представители семейства *Lamiaceae*представлены 78 видами, относящихся к 29 родам. Лидирующее положение из родов семейства занимает род *Dracocephalum*.

Литература

1 Концепция экологической безопасности Республики Казахстан на 2004-2015 годы. – Астана, 2005. – 43 с.

2 Конвенция о биологическом разнообразии. – ЮНЕП, 1992. – 39 с.

3 Конвенция ООН по борьбе с опустыниванием. – ЮНЕП, 1995.– 21 с.

4 Романова Э. П., Куракова Л. И., Ермаков Ю. Г. Природные ресурсы мира. Учеб. пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1993. – 304 с.

5 Жандаев Ж.Ж. Природа Заилийского Алатау. – Алма-Ата, 1978. – 160 с.

6 Станюкевич К.В. Растительность гор СССР. – Душанбе, 1973. – 416 с.

7 Шульц С.С. Анализ новейшей тектоники и рельеф Тянь-Шаня.- М.,1948. – 223 с.

8 Шлыгин Е.Д. Геологическая история и геологическое строение Казахстана. // В кн.: Очерки по физической географии Казахстана. – Алма-Ата., 1952. – С. 59-127.

9 Рубцов Н.И. Северо-Тянь-Шанская геоботаническая провинция и её растительные ресурсы: автореф...кан.биол. наук: – Л., 1953. – 39 с.

10 Храмцов В.Н. Закономерности Растительности почвенного покрова Чу-Илийских гор // Бот. журн. Т. 71, № 11, 1985. – С. 1519 – 1526.

11 Физическая география Республики Казахстан: Учебное пособие. – Астана: Евр.Нац. уни. им. Л. Н. Гумилева, «Аркас», 2010. – С. 317-318.

12 Насыров Р.М., Науменко А.А., Соколов А.А. География почв Заилийского Алатау. – Алма-Ата.:КазГУ, – 1991. – 70 с.

13 Ассинг И.А., Полузеров Н.А. Почвенно-геохимические исследования в казахстанской части Тянь-Шаня. Алма-Ата. 1973. 134 с.

14 Нестерова С.Г. Экология растений среднегорья Заилийского Алатау: (водный режим). Изд. Наука, – Алматы 1984. – 132 с.

15 Флора СССР. – М-Л., 1934-1964. – Т. 1-30.
16 Флора Казахстана. – Алма – Ата: Наука, 1956-1967. – Т.Т. 1-9.
17 Определитель растений Средней Азии. – Ташкент: ФАН, 1968-1996. – Т.Т. 1-10.
18 Иллюстрированный определитель растений Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1969-1972. – Т.1-2.
19 Байтенов М.С. Флора Казахстана. – Алматы: Ғылым, 2001. – Т. 1-2.
20 Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. – Л.: Наука,1987. – 439 с.
21 Черепанов С.К. Сосудистые растения СССР. – Л.: Наука, 1981. – 509 с.
22 Серебряков И.Г. Экологические группы и жизненные формы растений // Ботаника (Анатомия и морфология растений). – М., 1978. – С. 431-461.
23 Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г., Нелина Н.В., Каржаубекова Ж.Ж. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана, том 20 (1): Справочное издание. – Алматы, 2014. – 200 с.
24 Ушбаев К.У., Курамысова И.И., Аксенова В.Ф. Целебные травы. Алма – Ата, «Кайнар», 1975. 200 с.
25 Волынский Б.Г., Бендер К.И., Фрейдман С.Л., Богословская С.И., Воронина К.В., Глазырина Г.А., Капрелова Т.С., Клоскова И.Г., Кузнецова С.Г., Мартынов Л.А. Лекарственные растения в научной и народной медицине (4-е издание). – Саратовский университет, 1975. – 381 с.
26 Муравьева Д.А. Фармакогнозия. М., «Медицина», 1978, 656 с.

References

1 Concept of Environmental Safety of the Republic of Kazakhstan for 2004-2015. (2005) [KontseptsiyaekologicheskoybezopasnostiRespublikiKazahstanna 2004-2015 godyi] Astana: 43(In Russian)
2 The Convention on Biological Diversity. UNEP (1992) [Konventsiya o biologicheskomraznoobrazii] 39.(In Russian)
3 The United Nations Convention to Combat Desertification. UNEP (1995) [Konventsiya OON poborbe s opustyinivaniem] 21.(In Russian)
4 Romanova E.P., Kurakova L.I., Ermakov Y.G. (1993) World's natural resources. [Prirodnyieresursyimira] Moscow, MGU: 304. (In Russian)
5 Jandaia J.J. (1978) Nature Trans-Ili Alatau. [PrirodaZailiyskogoAlatau] Almaty: 160. (In Russian)
6 Stanyukevich K.V. (1973) Vegetation USSR mountains. [Rastitelnostgor SSSRP] Dushanbe: 416. (In Russian)
7 Schultz S.S. (1948) Analysis of recent tectonics and relief Tien Shanya. [AnaliznoveysheytektonikiirelefTyan-Shanya] Moscow: 223. (In Russian)
8 Shlygin E.D. (1952) Geological history and geological structure of Kazakhstan. Physical Geography of Kazakhstan Essays. [GeologicheskayaistoriyaigeologicheskoestroenieKazahstana.OcherkipofizicheskoygeografiiKazahstana] Almaty: 59-127 (In Russian)
9 Rubtsov N.I. (1953) North Tien Shan geobotanical province and its plant resources. Abstract …kan.biol.nauk. [Severo-Tyan-Shanskayageobotanicheskayaprovintsiyaieyorastitelnyieresursyi. Avtoreferatkanditatabiologicheskihnauk] Leningrad: 39. (In Russian)
10 Hramtsov V.N. (1985) Patterns of Vegetation soil Chu-Ili mountains . Bot. Zh. [Zakonomernostirastitelnostipochvennogopokrova Chu-Iliyskihgor. Botanicheskiyzhurnal] 71: 11: 1519 – 1526. (In Russian)
11 Physical Geography of the Republic of Kazakhstan. Textbook. [FizicheskayageografiyaRespublikiKazahstan. Uchebnoeposobie] (2010) Astana. Evr.Nats. uni. them. Gumilyov L.N. Arkas: 317-318. (In Russian)
12 Nasyrov R.M., Naumenko A.A., Sokolov A.A. (1991) Geography Soil Trans-Ili Alatau. [GeografiyapochvZailiyskogoAlatau] Alma-Ata: 70. (In Russian)
13 Assing I.A., Poluzerov N.A. (1973) Soil-geochemical studies in the Kazakh part of the Tien Shan. [Pochvenno-geohimicheskieissledovaniya v kazahstanskoychastiTyan-Shanya] Alma-Ata: 134 (In Russian)
14 Nesterova SG (1984) Plant ecology midlands Trans-Ili Alatau (water regime). [EkologiyarasteniysrednegoryaZailiyskogoAlatau: (vodnyiyrezhim)] Almaty, Science: 132 . (InRussian)
15 Flora of the USSR. [Flora SSSR] (1934-1964) Moscow: 1-30 (In Russian)
16 Flora of Kazakhstan. [Flora Kazahstana] (1956-1967) Alma – Ata. Science, 7. (In Russian)
17 Guide to the Plants of Central Asia. [OpredelitelrasteniySredneyAzii] (1968-1996) Tashkent: 1-10 (In Russian)
18 Illustrated Manual of the plants in Kazakhstan. [IllyustrirovannyiyopredelitelrasteniyKazahstana] (1969-1972) Alma-Ata: 1-2. (In Russian)
19 Baitenov M.S. (2001) Flora of Kazakhstan. [Flora Kazahstana] Almaty: 1-2. (In Russian)
20 Takhtadzhyan A.L. (1987) Magnoliofitov system. [Sistema magnoliofitov] Leningrad: 439. (In Russian)
21 Cherepanov S.K. (1981) Vascular plants of the Soviet Union. [Sosudistyierasteniya SSSR] Leningrad: 509 (In Russian)
22 Serebryakov I.G. (1978) Environmental groups and plant life forms. Botany (anatomy and morphology of plants). [Ekologicheskiegruppyiizhiznennyieformyirasteniy. Botanika.Anatomiyaimorfologiyarasteniy] Moscow: 431-461 (In Russian)
23 Grudzinskaya L.M., Gemedzhieva N.G., Nelina N.V., Karzhaubekova J.J. (2014) Annotated list of medicinal plants in Kazakhstan. Reference book. [AnnotirovannyiyspisoklekarstvennyihrasteniyKazahstana. Spravochnoeizdanie.] Almaty:20 (1),200. (In Russian)
24 Ushba K.U., Kuramysova I.I., Aksyonov V.F. (1975) Herbs. [Tselebnyietravyi] Alma – Ata: 200. (In Russian)
25 Volyn B.G., Bender K.I., Freidman S.L. Theological S.I., Voronin K.V., Glazyrina G.A., Kaprelova T.S., Kloskova I.G., Kuznetsov S.G., Martynov L.A. (1975) Medicinal plants in science and medicine (4th edition). [Lekarstvennyierasteniya v nauchnoyinarodnoymeditsine] Saratov University: 381. (In Russian)
26 Muraveva D.A. (1978) Pharmacognosy. [Pharmacognosya] Medicine, Moscow: 656. (InRussian)

[1]Туякова А.Т., [1]Иманбаева А.А., [1]Ишмуратова М.Ю., [2]Джумахан Д.М.,[2]Оразова С.Б.

[1]РГП «Мангышлакский экспериментальный ботанический сад», Казахстан, г. Актау
[2]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Анатомические особенности надземных органов *Crataegus ambigua* C.A. Mey., произрастающих в ущельях Западного Каратау полуострова Мангышлак

В статье приведены результаты изучения анатомического строения однолетних побегов, листьев и семян редкого в Казахстане вида – боярышника сомнительного (Crataegus ambigua C.A. Mey.), произрастающего в трех ущельях Западного Каратау Мангистауской области: Акмыш, Самал и Жемсемсай. Отмечена достоверная разница в анатомических показателях листа и годичных побегов боярышника. Сравнение метрических показателей побегов боярышника из 3-х ущелий показало, что растения отличаются по размерам клеток и толщине растительных тканей. Лист боярышника сомнительного плоский, имеет дорзо-вентральное строение. Клетки верхнего и нижнего эпидермиса тонкостенные, снаружи покрытые тонким слоем кутина, поверхность гладкая, не содержит трихом, мезофилл дифференцирован на столбчатую и губчатую ткани. Анализ метрических показателей поперечного среза листа показал сходную картину. Наибольшие показатели выявлены для растений из ущелья Самал, наименьшие – для ущелья Жемсемсай. Значительной разницы в анатомических показателях семян боярышника по 3-м точкам произрастания не обнаружено. Наибольшее отличие отмечено по толщине перикарпия, тогда как по толщине эндоспермы и семядолей достоверной разницы не наблюдается.

Ключевые слова: боярышник сомнительный, анатомическое строение, Западный Каратау, ущелье Акмыш, Самал, Жемсемсай.

---

[1]Tuyakova A.T., [1]Imanbaeva A.A., [1]Ishmuratova M.Yu., [2]DzhumakhanD.M.,[2]OrazovaS.B.

[1]Mangyshlak experimental botanycal garden, Kazakhstan, Aktau
[2]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Anatomical features of overground organs of *Crataegus ambigua* C.A. Mey., native to Western Karatau Gorges of the Mangyshlak Peninsula

The article presents results of a study of anatomical structure of annual shoots, leaves and seeds of the rare species in Kazakhstan-Crataegusambigua C.A. Mey. growing in three gorges Western Karatauof Mangistau region: Akmysh, Samal and Zhemsemsay. It was marked by credible difference in anatomical indicators worksheet and annual shoots of hawthorn, growing in different valleys. Young shoots of plants on transversal cut have the same plan. Comparison of metric indicators shoots of plant's3 gorges showed that plants differ in the size of cells and the thickness of plant tissues. Hawthorn leaf questionable flat, has a dorzo-ventral structure. Upper and lower epidermis cells, thin-walled, outside covered with a thin layer of cutin. The surface is smooth, does not contain trichomes. Mesophyll differ by the bar and spongy tissue.Analysis of metrics worksheet cross-section shows a similar picture as for metric indicators annual shoots. The biggest indicators identified for plants from the valley bottom for Samal, Zhemsemsay Gorge. Significant differences were detectedin anatomical indicators of seed by 3 points of growth. The greatest difference observed in thickness of pericarp thickness, while endosperm and cotyledon reliable difference.

Key words: Crataegusambigua, anatomical structure, Western Karatau, Akmysh, Samal, Zhemsemsay gorges.

---

[1]Тұяқова А.Т., [1]Иманбаева А.А., [1]Ишмұратова М.Ю., [2]Жұмахан Д.М.,[2]Оразова С.Б.

[1]РМК Маңғышлақ тәжірибелік ботаникалық бағы», Қазақстан, Ақтау қ.
[2]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Маңғышлақ түбегіндегі Батыс Қаратау шатқалдарында өсетін *Crataegus ambigua* C.A. Mey. жерүсті мүшелерінің анатомиялық ерекшеліктері

Мақалада Батыс Қаратаудың Ақмыш, Самал және Жемсемсай атты үш шатқалында өсетін, Қазақстанда сирек кездесетін түр – күмәнді долананың (Crataegus ambigua C.A. Mey.) біржылдық өркендері, жапырақтары мен тұқымдарының анатомиялық құрылысын зерттеу нәтижелері келтірілген. Әртүрлі шатқалдарда өсетін долананың біржылдық өркендері мен жапырақтарының анатомиялық көрсеткіштерінің арасында нақты айырмашылықтары болатындығы анықталды. Үш шатқалда өсетін долана өркендерінің метриялық көрсеткіштерін өзара салыстыру өсімдіктер клеткасының өлшемдері мен ұлпасының қалыңдығы бойынша ерекшеленетіндігін көрсетті. Жапырақтары – жалпақ, дорзовентралды құрылымды, үстіңгі және астыңғы эпидермистерінің клеткалары – жіңішке қабырғалы, сырты жұқа кутин қабатымен қапталған, беткейі тегіс, түктері жоқ, мезофиллі бағаналы және борпылдақ ұлпаларға дифференциалданған. Жапырақтың көлденең кесіндісінің метриялық көрсеткіштеріне жасалған талдау біржылдық өркендердің метриялық көрсеткіштеріне жүргізілген зерттеулер сияқты ұқсас нәтиже берді. Ең жоғары көрсеткіштер Самал шатқалының өсімдіктеріне, ал ең кіші көрсеткіштер Жемсемсай шатқалының өсімдіктеріне тән екендігі анықталды. Тұқымдарының анатомиялық көрсеткіштерінде айтарлықтай айырмашылықтар байқалмады, перикарпий қалыңдығы бойынша ерекшеліктер болғанымен, эндосперм мен тұқым жарнақтарының қалыңдығы бойынша нақты айырмашылықтары байқалған жоқ.

Түйін сөздер: күмәнді долана, анатомиялық құрылыс, Батыс Қаратау, Ақмыш, Самал, Жемсемсай шатқалдары.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 581.8:581.446.1

[1*]Туякова А.Т., [1]Иманбаева А.А., [1]Ишмуратова М.Ю., [2]Джумахан Д.М.,[2]Оразова С.Б.

[1]РГП «Мангышлакский экспериментальный ботанический сад», Республика Казахстан, г. Актау
[2]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: ainura_kosai@mail.ru

АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ *CRATAEGUS AMBIGUA* C.A. MEY., ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В УЩЕЛЬЯХ ЗАПАДНОГО КАРАТАУ ПОЛУОСТРОВА МАНГЫШЛАК

Боярышник сомнительный в Казахстане изучен недостаточно, в литературе имеются только сведения о его распространении [1-4]. Популяционным изучением и отбором форм, всесторонним морфолого-анатомическим изучением никто не занимался. Проведение комплексного исследования генетического материала боярышника сомнительного из естественных мест произрастания позволит выделить доноров ценных хозяйственно-биологических признаков.

Для боярышника сомнительного ранее проведены исследования по фитоценотическим особенностям, морфологии вегетативных и генеративных органов [5], интродукции в условиях Мангышлака [6].

Целью настоящего исследования являлось – изучить в сравнении особенности анатомического строения некоторых надземных органов боярышника сомнительного из различных мест произрастанияв ущельях Западный Каратау.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись вегетативные (годичные побеги, листья) и генеративные (семена) органы боярышника сомнительного, собранного в ущельях Западного Каратау: Акмыш, Самал и Жемсемсай.

При определении анатомических особенностей листовой пластинки изучаемых видов отбирали неповрежденные максимально развитые листья в средней части побегов. Анализировали фрагменты листа в средней части, между главной жилкой и краем. Поперечные срезы годичных побегов делали по всей его длине, через каждые 2-3 см.

Анатомическое исследование растений проведено согласно методических указаний А.А. Долговой, Е.Я. Ладыгиной, В.Н. Вехова и Л.И. Лотовой [7,8]. Изготовление временных препаратов производилась по общепринятым методикам [9-11] с использованием замораживающего микротома «МЗП-01 Техном» («КБ Техном», Россия).

Полученные препараты изучали при помощи сканирующего микроскопа «MT 4310 L» («Melji-TechnoCO., Ltd», Япония), камера VisionCamV 500B («Tested To Comply With FCC Stan-

dards», Канада). Цифровые фотографии получены при увеличении окуляра и объектива 10x4, 10x10 при использованиипрограммы VisionBio («WestMedica», Австрия).

При описании анатомического строения использовалась терминология, предложенная К.Эзау [12,13], Л.И. Лотовой [14].

Статистическую обработку проводили по методике Г.Ф. Лакина[15], с использованием также пакета статистических программ Excel-2003.

Результаты и их обсуждение

Ущелье Акмыш имеет узкую извилистую форму с обрывистыми склонами и многочисленными ответвлениями со всех сторон, вытянут в длину на 2,3 км при ширине 30-70 м. Склоны гор – каменисто-щебнистые, у подножия хребта выходят песчаные и глинистые почвы. По дну ущелья протекают многочисленные родники и временные водотоки. Режим питания – родниковый и снеговой. Горы ущелья прорезаны на многочисленные мелкие ущелья с очень крутыми, каменистыми склонами с большим количеством выходов коренных пород и осыпями.

В ущелье Акмыш боярышник образует боярышниково-жостерово-разнотравные (*Crataegus ambigua-Rhamnus sintenesii-Herba varia*) сообщества. Доминирует *Crataegus ambigua,* содоминант *Rhamnus sintenesii*. Виды сообщества распределены в 3 яруса: древесный, образованный *Crataegus ambigua*; кустарниковый, сформированный кустами *Rhamnus sintenesii*, молодыми растениями боярышника сомнительного и *Caragana grandiflora*; а также травянистый, в котором принимают участие *Centaurea squarossa, Teucrium polium, Prangos odontalgica, Gallium humifusum, Mentha longifolia*, *Marrubium vulgare*, *Nepeta cataria*,*Crambe edentula*, *Ephedra distachya*, *Plantago lanceolata*, *Veronica amoena*, *Cynanchum sibiricum*, *Scandix stellate, Verbascum songaricum* и др.

Ущелье Самал находится в 3 км от ущелья Акмыш. Представляет собой узкое слабо-извилистое ущелье высотой около 500 м и длиной до 1 км. По дну ущелья на протяжении около километра протекает обильный ручей с пресной водой.

В ущелье Самал боярышник формирует боярышниково-разнотравное сообщество. В сообществе выделено 3 яруса: древесный, состоящий из ивы белой, яблони Сиверса, взрослых особей боярышника сомнительного и карагача; кустарниковый, образованный молодыми особями боярышника, в небольшом количестве *Atraphaxis spinosa*; травянистый, сложенный остальными компонентами сообщества, как *Mentha longifolia*, *Nepeta cataria*, *Teucrium polium*, *Artemisia austriaca*, *Meristotropis triphylla*, *Lagochilus acutilobus*и др.

Ущелье Жемсемсай – небольшое извилистое, высотой 253 м. Почвы каменистые, склоны пологие. Имеются питание в виде небольших пресных родников. Для ущелья характерна своеобразная по видовому составу растительность. В ущелье Жемсемсай боярышник формирует ивово-боярышниково-разнотравное сообщество, боярышник является доминантом. В сообществе выделено 3 яруса: древесный, состоящий из ивы белой и взрослых особей боярышника сомнительного; кустарниковый, образованный из *Convolvulus fruticosus, Atraphaxis replicata, Caragana grandiflora, Rhamnus sintenisii*, молодыми особями боярышника; травянистый, сложенный остальными компонентами сообщества, как *Mentha longifolia*, *Teucrium polium*, *Artemisia austriaca*, *Meristotropis triphylla*, *Lagochilus acutilobus* и др. видами. На внешних грядах сопок, сложенных засоленными почвами по всем склонам и вершинам широко распространены *Nanophyton erinaceum, Anabasis aphylla*, *Eremopyrum triticeum*, *Plantago lanceolata*, *Medicago sativa*. В равнинах отмечаны многолетники – *Echinops ritro, Inula brittanica, Peganum garmala, Ceratocarpus arinarius, Alhagi pseudalhagi, Lagochilus acutilobus, Teucrium polium, Cynodon dactylon*и др.

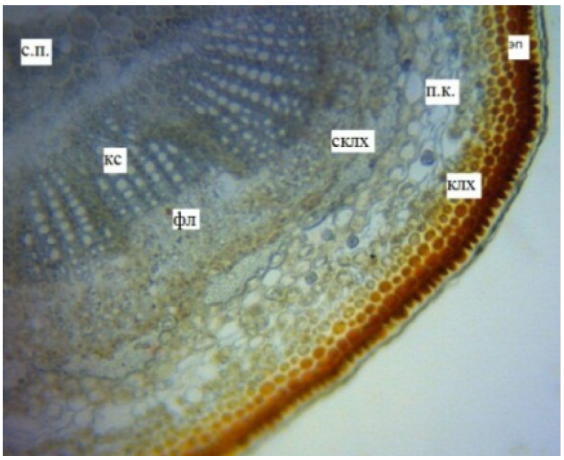
Анатомическое строение годичных побегов боярышника сомнительного

Молодые побеги боярышника сомнительного на поперечном срезе имеют одинаковый план строения (рисунок 1). Снаружи стебель покрыт однослойным эпидермисом, клетки которого имеют округло-прямоугольное строение, сверху клетки покрыты толстым слоем кутикулы. Под эпидермисом залегает темноокрашенная, 3-слойная, пластинчатая колленхима – механическая ткань, характерная для молодых растущих органов растений.

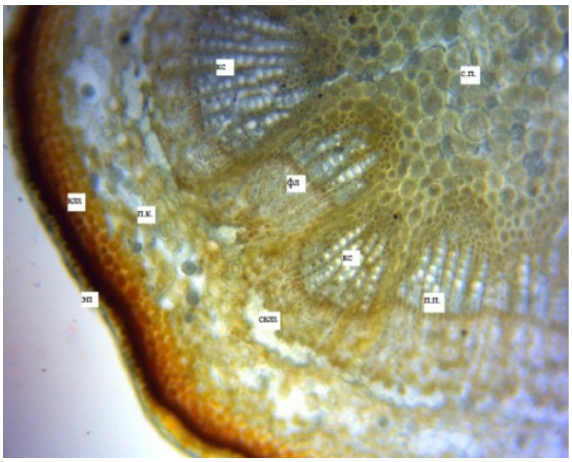
Зона между эндодермой и коровой частью заполнена рыхлыми паренхимными клетками в 5-6 рядов. Эндодерма размещена в один ряд, клетки ее тангентально утолщенные.

Проводящие пучки многочисленные, наблюдается переходный тип между первичным и вторичным анатомическим строением. Пучки коллатеральные открытого типа. Количество проводящих пучков 16-18 штук. Первичная кси-

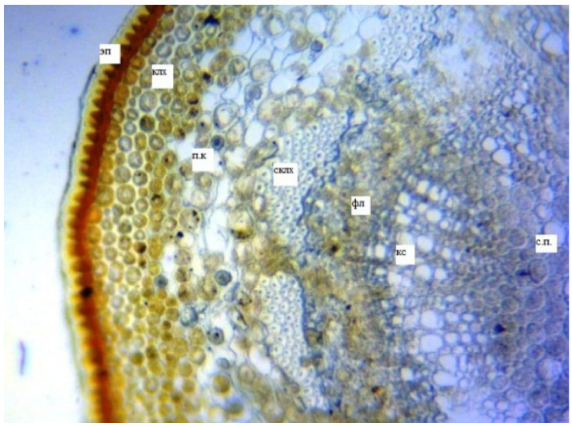
лема расположена в виде ровных столбцов, вторичная – в виде неравномерных участков с более мелкими просветами. Кнаружи от ксилемы размещены мелкие клетки флоэмы, на которыми в виде «шапки» размещены участки склеренхимы. Центральная часть заполнена рыхло расположенными округлыми клетками сердцевинной паренхимы.



а



б



в

А – ущелье Акмыш, Б – ущелье Самал, В – ущелье Жемсемсай; с.п. – сердцевинная паренхима, кс – ксилема, фл – флоэма, склх – склеренхима, клх – колленхима, эп – эпидермис, п.к. – первичная кора

Рисунок 1 – Анатомическое строение годичных побегов боярышника сомнительного из различных мест произрастания. Поперечный срез. Ув. 10х10

Сравнение метрических показателей побегов боярышника из 3-х ущелий (табл. 1) показало, что растения отличаются по размерам клеток итолщине растительных тканей.

По основным показателям максимальные результаты получены для растений, произрастающих в ущелье Самал, минимальные – для растений из ущелья Жемсемсай. Так, толщина эпидермиса составила 23,06±0,34 мкм, тогда как для ущелья Акмыш– 21,50±0,01 мкм, для ущелья Жемсемсай– 19,27±0,07 мкм. Толщина колленхимы в ущелье Акмыш составила 86,60±0,15 мкм, в ущелье Самал и Жемсемсай– 98,67±0,60 и 83,88±1,04 мкм соответственно. Наибольшая разница установлена для площади проводящих пучков. Так, в ущелье Акмыш она составила 376,81±0,13 мкм^2, для ущелья Самал– 531,91±0,10 мкм^2, для ущелья Жемсемсай– 361,88±0,09 мкм^2. Единственным показателем, по которому растения в ущелье Самал уступали аналогичным побегам из ущелий Акмыш и Жемсемсай, был диаметр сердцевинной паренхимы. Для ущелья

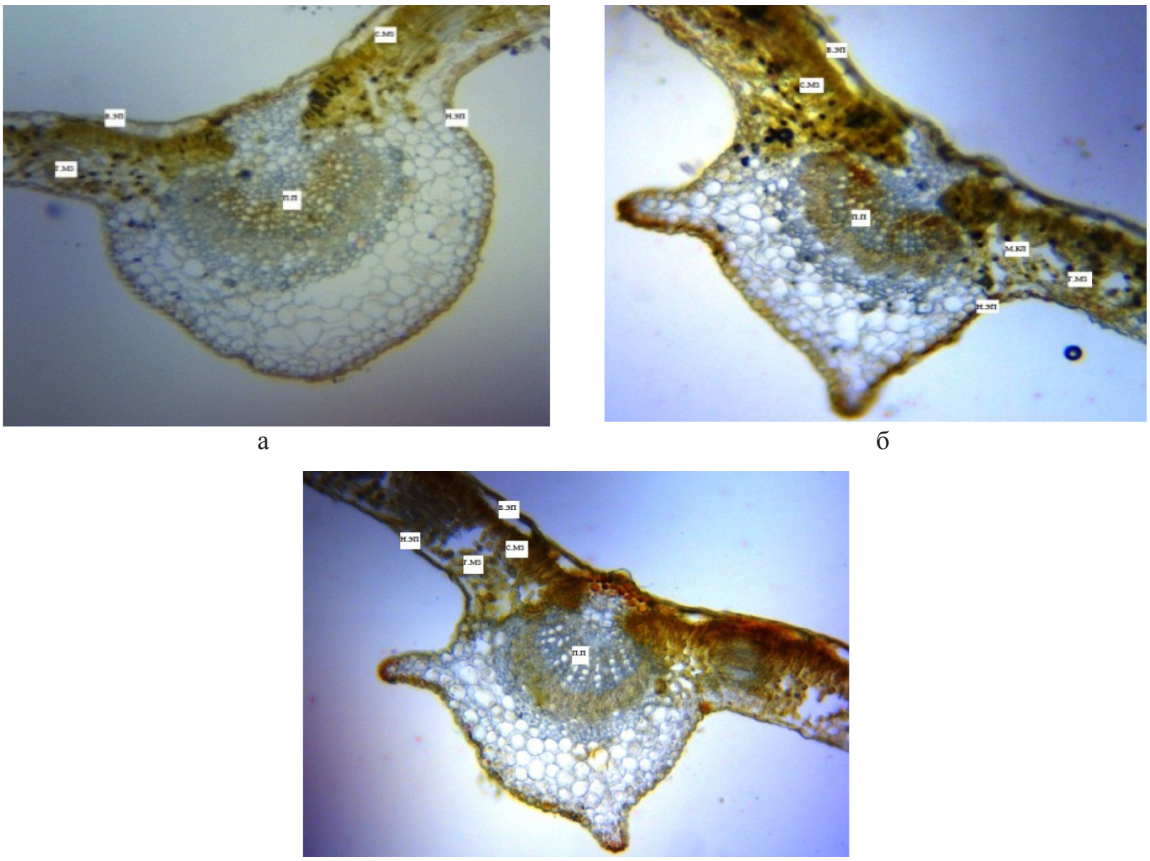
Акмыш данный показатель составил 60,93±0,02 мкм, для ущелья Самал 56,62±0,01 мкм, в ущелье Жемсемсай– 56,99±0,09 мкм. Стоит отметить, что у многих побегов боярышника из ущелья Жемсемсай наблюдается постепенное разрушение сердцевины с образованием воздушной полости.

Таблица 1 – Биометрические показатели анатомической структуры стебля Crataegus ambigua из различных мест произрастания

Место сбора	Толщина эпидермиса, мкм	Толщина колленхимы, мкм	Толщина первичной коры, мкм	Площадь проводящих пучков, x10^{-3} мм^2	Диаметр сердцевинной паренхимы, мкм
ущелье Акмыш	21,50±0,01	86,60±0,15	221,18±0,24	376,81±0,13	60,93±0,02
ущелье Самал	23,06±0,34	98,67±0,60	237,03±0,73	531,91±0,10	56,62±0,01
ущелье Жемсемсай	19,27±0,07	83,88±1,04	148,50±0,03	361,88±0,09	56,99±0,09

Анатомическое строение листа боярышника сомнительного

Лист боярышника сомнительного плоский, имеет дорзо-вентральное строение, светового типа. На поперечном срезе хорошо просматриваются клетки верхнего и нижнего эпидермиса (рисунок 2), тонкостенные, снаружи покрытые тонким слоем кутина. Поверхность гладкая, не содержит трихом.



а б

в

А – ущелье Акмыш, Б – ущелье Самал, В – ущелье Жемсемсай; в.эп. - верхний эпидермис, н.эп. – нижний эпидермис, с.мз. – столбчатый мезофилл, г.мз. – губчатый мезофилл, п.п. – проводящий пучок

Рисунок 2 – Поперечный срез листа боярышника сомнительного из различных мест произрастания. Ув. 10х10

Мезофилл дифференцирован на столбчатую и губчатую ткани. Клетки столбчатого мезофилла расположены в 1-2 ряда, межклетники не выражены. Переход в губчатый мезофилл четкий, межклетники –аэренхимного типа. Коллатеральные пучки закрытого типа (камбий отсутствует), формируются только по жилкам; состоит из 10-15 рядов ксилемы и 5-8 рядов флоэмы. Со стороны флоэмы проводящий пучок как шапкой обложен 2-3 рядами склеренхимы.

Для растений из ущелья Акмыш выступающая снизу средняя жилка не имеет выростов, тогда как листовые пластинки из ущелий Самал и Жемсемсай в области средней жилки имеют выраженное утолщение с нижней стороны с боковыми тупо-заостренными «ушками».

Анализ метрических показателей поперечного среза листа показывает сходную картину, как и для метрических показателей годичных побегов (табл.2). Наибольшие параметры клеток и тяжей тканей отмечены для растений, собранных из ущелья Самал, тогда как минимальные для растений из ущелья Жемсемсай.

Таблица 2 – Биометрические показатели анатомической структуры листа Crataegus ambigua из различных мест произрастания

Место сбора	Толщина эпидермиса, мкм		Столбчатый мезофилл		Губчатый мезофилл		Площадь проводящих пучков, $x10^{-3}мм^2$
	верхний	нижний	кол-во рядов	толщина слоя, мкм	кол-во рядов	толщина слоя, мкм	
ущелье Акмыш	25,46± 0,1	18,19± 0,1	1-2	47,70± 0,1	4-5	78,43± 0,1	428,92± 0,1
ущелье Самал	26,14± 0,1	20,43± 1,0	1-2	51,20± 1,0	4-5	89,98± 0,2	453,21± 0,1
ущелье Жемсемсай	23,75± 0,1	19,11± 0,1	1-2	45,17± 0,6	4-6	79,86± 0,1	405,63± 0,2

Так, толщина верхнего и нижнего эпидермиса листа растений из ущелья Самал составила 26,14± 0,07 и 20,43±1,04 мкм, тогда как для ущелья Акмыш 25,46±0,01 и 18,19±0,05 мкм, для ущелья Жемсемсай – 23,75±0,04 и 19,11±0,10 мкм. Толщина столбчатого мезофилла для листьев, собранных в ущелье Акмыш, Самал и Жемсемсай составила 47,70± 0,03; 51,20±1,03 и 45,17±0,56 мкм соответственно. Наибольшая разница между метрическими параметрами отмечена для показателей толщины губчатого мезофилла и площади проводящих пучков.

Анатомическое строение семян боярышника сомнительного

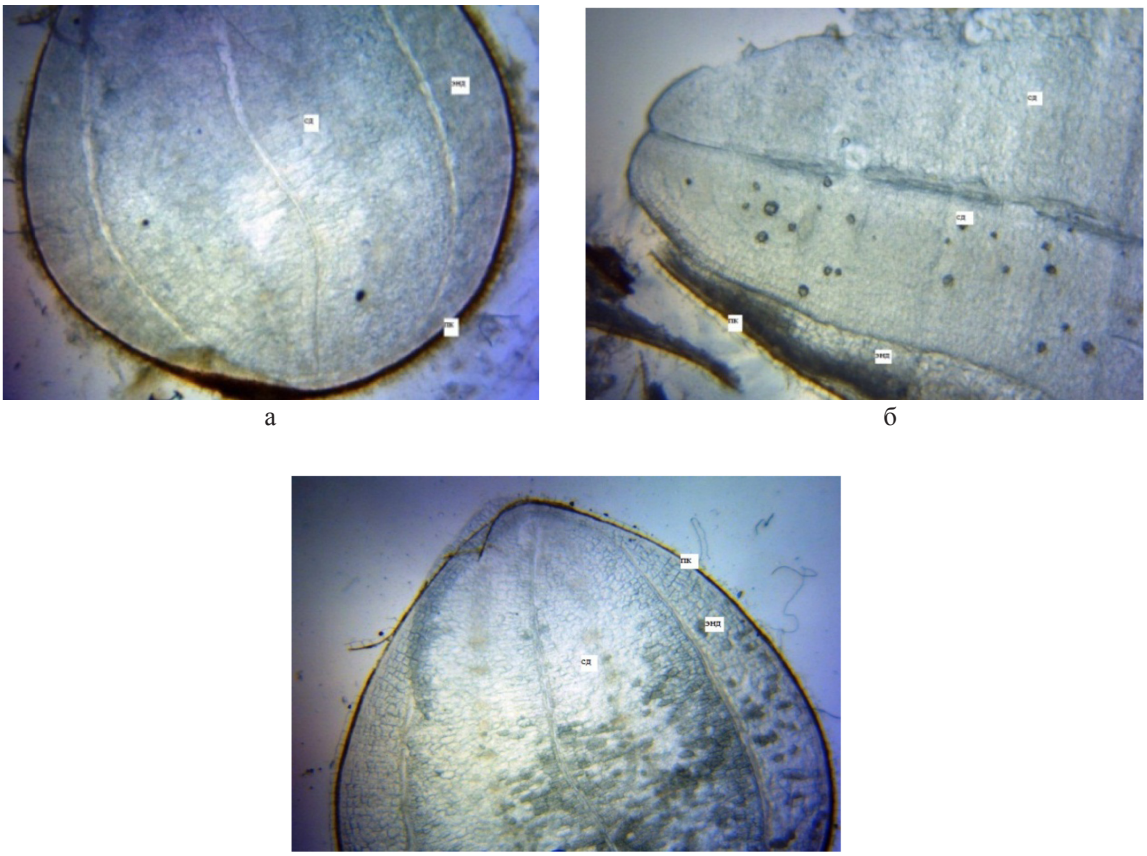
В анатомической структуре семени можно четко различить перикарпий, эндосперм и семядоли (рис. 3). Перикарпий семян состоит из 3-х слоев (экзокарпий, мезокарпий и эндокарпий). Экзокарпий тонкий, покрыт кутикулой. Состоит из одного слоя мертвых клеток. Клетки мезокарпия тонкостенные, плотно расположенные, паренхимные. Эндокарпий очень слабый, состоит из расположенных в один слой тонкостенных живых клеток. Клетки эндоспермы одинаковой формы, округлые, расположены в 8-10 рядов.

Клетки эпидермиса семядоли удлиненные, крупные, расположены в один слой. Зародыш 2-семядольный, удлиненный, в форме диска, на срезе полностью захватывает внутреннюю полость.

Таблица 3 – Биометрические показатели анатомической структуры семян Crataegus ambigua

Место сбора	Анатомические показатели, мкм		
	толщина перикарпия	толщина эндосперма	толщина семядолей
ущелье Акмыш	15,58±0,02	109,55±0,02	576,62±0,03
ущелье Самал	15,88±0,02	113,39±0,07	571,50±0,05
ущелье Жемсемсай	10,90±0,07	112,83±0,15	574,03±0,08

На анатомическом строении семена имеют низкую вариабельность. Наибольшее отличие отмечено по толщине перикарпия (от 10,09 до 15,88 мкм), тогда как по толщине эндосперма (от 109,55 до 113,39 мкм) и семядолей (от 571,50 до 576,62 мкм) достоверной разницы не наблюдается (табл. 3).



А – ущелье Акмыш, Б – ущелье Самал, В – ущелье Жемсемсай
энд. – эндокарпий, сд – семядоли, пк – перикарпий

Рисунок 3 – Поперечный срез семян Crateagus ambigua. Ув. 10х4

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. По результатам изучения анатомического строения однолетних побегов, листовой пластинки и семян боярышника сомнительного в 3 исследуемых ущельях выявлено, что в ущельеСамал боярышник имеет самые высокие биометрические показатели (толщина эпидермиса, колленхимы и площади проводящих пучков побега), а также толщина верхнего и нижнего эпидермиса, тканей мезофилла и площади проводящих пучков в листе. Это объясняется экологическим условиям мест произрастания боярышников. В ущелье Самал по дну ущелья на протяжении почти всего ущелья протекает обильный ручей с пресной водой.

2. По результатам изучения анатомического строения листа выявлено, что для растения из ущелья Акмыш выступающая снизу средняя жилка не имеет выростов, тогда как листовые пластинки на поперечном срезе из ущелий Самал и Жемсемсай в области средней жилки имеют выраженное утолщение с нижней стороны с боковыми тупо-заостренными «ушками».

Литература

1 Каталог редких и исчезающих видов растений Мангистауской области (Красная книга). – Актау, 2006. – С. 32.
2 Конспект высших сосудистых растений. – Актау, 2006. – С. 82, 229.
3 Красная книга Казахской ССР. – Алма-Ата: Наука, 1981. – С. 99.
4 Флора Казахстана. – Алма-Ата, 1961. – 4 т. – С. 410.
5 Иманбаева А.А., Копбаева Г.Б., Гасанова Г.Г. Популяция редкого и исчезающего вида *Crataegusambigua*С.А. Меу. в условиях Мангистау // Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Ведение региональных красных книг:достижения, проблемы и перспективы». – Волгоград,2015. – С. 160-163.
6 Иманбаева А.А., Косарева О.Н., Туякова А.Т. Древесные растения Мангышлакского экспериментального ботанического сада КН МОН РК: 40 лет интродукции. Актау, 2012. – 244 с.
7 Долгова А.А., Ладыгина Е.Я. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии. – М.: Медицина, 1977. – 255 с.
8 Вехов В.Н., Лотова Л.И., Филин В.Р. Практикум по анатомии и морфологии высших растений. – М.: МГУ, 1980. – 560 с.
9 Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высшая школа, 1960. – 206 с.
10 Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике (Основы и методы). - М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312с.
11 Пермяков А. И. Микротехника. - М., 1988. – 120 с.
12 Эзау К. Анатомия семенных растений. - М.: Мир, 1980. - Т. 1. - 580 с.
13 Эзау К. Анатомия семенных растений. - М.: Мир, 1980. - Т. 2. - 350 с.
14 Лотова Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений. – М.: КомКнига, 2007. – 512 с.
15 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Наука, 1990. – 352 с.

References

1 Catalogue of rare and endangered plants of Mangistau region (2006) In The Red Data Book, Aktau [KatalogredkikhiischezaiushchikhvidovrasteniiMangistauskoioblasti. Krasnaiakniga. Aktau] pp. 32.
2 Transcript of higher vascular plants (2006) Aktau [Konspektvysshikhsosudistykhrastenii. Aktau]pp. 82, 229.
3 The Red Book of the Kazakh SSR (1981), Almaty, Science [KrasnaiaknigaKazakhskoi SSR. Alma-Ata.Nauka] pp. 99.
4 Flora of Kazakhstan (1961) Almaty, Science [Flora Kazakhstana. Alma-Ata.Nauka] 4: 410.
5 Imanbayev AA, Kopbaeva GB, Hasanova GG (2015)Population of rare and endangered species Crataegus ambigua C.A. Mey. in Mangistau. Proceedings of IIthAll-Russia Scientific-Practical Conference "Regional Red Books: Achievements, Problems and Perspectives", Volgograd [PopuliatsiiaredkogoiischezaiushchegovidaCrataegusambigua C.A. Mey. vusloviiakhMangistau. Sbornikmaterialov II Vserossiiskoinauchno-prakticheskoikonferentsii«Vedenieregionalnykhkrasnykhknig:dostizheniia, problemyiperspektivy. Volgograd] pp. 160-163.
6 Imanbayev AA,Kosareva A,Tuyakova AT (2012) Woody plants of Mangyshlaksky experimental Botanical Garden: 40 years of introduction. Aktau [DrevesnyerasteniiaMangyshlakskogoeksperimental'nogobotanicheskogosada: 40 let introduktsii. Aktau] pp. 244.
7 Dolgova AA, Ladygina EYa (1977) Guide to practical exercises on pharmacognosy. Moscow, Medicine [Rukovodstvo k prakticheskim zaniatiiam po farmakognozii. Moskva. Meditsina] pp. 255.
8 VehovVN, Lotova LI, Phylyn VR (1980) Workshop on anatomy and morphology of higher plants, Moscow, Moscow State University [Praktikumpoanatomiiimorfologiivysshikhrastenii.Moskva. Moskovskiigosudarstvennyiuniversitet] pp. 560.
9 ProzinaMN (1960) Botanical microtechnics, Moscow, High school [Botanicheskaiamikrotekhnika. Moskva. Vysshaiashkola] pp. 206.
10 Barykina RP, VeselovaTD, DevyatovAG (2004) Handbook of botanical microtechnics: principles and methods,Moscow, Moscow State University [Spravochnikpobotanicheskoimikrotekhnike: osnovyimetody.Moskva. Moskovskiigosudarstvennyiuniversitet] pp. 312.
11 PermyakovAI (1988)Microtechnics, Moscow [Mikrotekhnika. Moskva. Vysshaiashkola] pp. 120.
12 Ezau K (1980) Anatomy of seed plants, Moscow, World [Anatomiiasemennykhrastenii] 1: 580.
13 Ezau K (1980) Anatomy of seed plants, Moscow, World [Anatomiiasemennykhrastenii] 2:350.
14 Lotova LI (2007) Botany: Morphology and Anatomy of higher plants, Moscow,KomBook [Botanika: Morfologiiaianatomiiavysshikhrastenii. Moskva.KomKniga]pp. 512.
15 LakinGPh(1990) Biometrics, Moscow, Science [Biometriia. Moskva. Nauka] pp. 352.

2-бөлім

ӨСІМДІКТЕР ФИЗИОЛОГИЯСЫ ЖӘНЕ БИОХИМИЯСЫ

Раздел 2

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Section 2

PLANTS PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

[1]Абугалиева А.И., [2]Абугалиева С.И., [3]Чудинов В.А., [2]Туруспеков Е.К.

[1]Казахский НИИ земледелия и растениеводства, Казахстан, Алматинская область, п. Алмалыбак
[2]Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы
[3]Карабалыкская сельскохозяйственная опытная станция, Казахстан, Костанайская область, с. Научное

Фенотипирование сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана по показателям качества зерна

Стабильное увеличение производства высококачественного зерна, в том числе мягкой пшеницы, основной стратегической и экспортной зерновой культуры, является одним важных направлений для обеспечения продовольственной безопасности страны. Коллекция яровой мягкой пшеницы Triticum aestivum L., состоящая из 96 перспективных и допущенных к производственному использованию на территории Республики Казахстан сортов, проанализирована по показателям качества зерна: твердозерность, содержание протеина и клейковинных фракций (глиадина и глютенина), состав ВМС и НМС-глютенина, качество и количество клейковины, натурная масса, стекловидность, седиментация муки, содержание крахмала, число падения. Изученный блок яровой мягкой пшеницы характеризовался по содержанию протеина как класс «сильная», по стекловидности и седиментации как класс «ценная» и по качеству клейковины нестабилен в условиях увлажнения. Полученные результаты по многолетним данным свидетельствуют о широком диапазоне признаков качества зерна в коллекции яровой пшеницы Казахстана, выращенной в Костанайской области. Полученная информация будет использована для ассоциативного картирования качества зерна мягкой пшеницы.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, показатели качества зерна, твердозерность, содержание протеина, клейковина.

---

[1]Abugalieva A.I., [2]Abugalieva S.I., [3]Chudinov V.A., [2]Turuspekov Y.K.

[1]Kazakh Research Institute of Agriculture, Kazakhstan, Almaty region
[2]Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty
[3]Karabalyk station, Kazakhstan, Kostanai region

Phenotyping of spring bread wheat cultivars from Kazakhstan based on grain quality traits

Kazakhstan is ninth largest country in the World by territory and one of the leading exporter of wheat on the World market. Therefore a stable improvement of high quality grain productivity, including wheat, which is a major strategic commodity, is one of the main directions for food security both within the country and in the World. The collection of bread wheat Triticum aestivum L. consisting from 96 cultivars and promising lines, including those that officially registered in the Republic of Kazakhstan, were analyzed by a number of grain quality traits. The list of traits included grain hardness, protein and gluten content, high and low molecular subunits of glutenin, quantity and quality of gluten, plumpness, glassiness, sedimentation, starch content, and falling number. The description of each studied trait, assessment and interpretation of grain quality in wheat breeding, methods and protocols for grain quality tests and their products in state and international competitive trials were provided. Studied panel of accessions grown in wet conditions was characterized as strong wheat according to their protein content, high valuable group according to their glassiness and sedimentation, and as unstable group of wheat according to gluten quality. Obtained results confirm wide range of grain quality traits in the collection of wheat from Kazakhstan that tested in multiple years in Kostanai region (Karabalyk breeding station). The information will be used for the genome wide association mapping study of grain quality of wheat.

Key words: spring bread wheat, grain quality, grain hardness, protein content, gliadin, glutenin, gluten, sedimentation.

---

[1]Әбуғалиева А.І., [2]Әбуғалиева С.І., [3]Чудинов В.А., [2]Тұрыспеков Е.К.

[1]Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми зерттеу институты, Қазақстан, Алматы облысы, Алмалыбақ а.
[2]Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы
[3]Қарабалық ауылшаруашылық станциясы, Қазақстан, Қостанай облысы

Қазақстандық жұмсақ жаздық бидай сорттарын дән сапасының көрсеткіштері бойынша фенотиптеу

Сапалы дәнді өндірістің, соның ішінде стратегиялық және экспорттық маңызды дәнді дақылдың, яғни жұмсақ бидайдың тұрақты ұлғаюы бүкіл әлемде ғана емес, сонымен қатар мемлекет ішіндегі сауда саттық қауіпсіздік бағыты аса маңызды болып табылады. Қазақстан Республикасы аумағында өндірістік қолдануға рұқсат берілген және келешегі зор 96 сорттан тұратын Triticum aestivum L. жұмсақ бидайының әлемдік коллекциясы дән сапасының көрсеткіштері: дәннің қаттылығы, құрамындағы протеинмен ұлпа фракциялары (глиадин және глютенин), глютениннің ЖМС және ТМС құрамы, 1B/1R транслокациясы, ұлпа сапасы мен мөлшері, болмыстық массасы, дәннің жылтырлығы, ұн седиментациясы, крахмалдың болуы және төмендеу көрсеткіші бойынша сараланған. Зерттелген жаздық жұмсақ бидай топтамасы ылғалданған жағдайда дән сапасы протеин құрамы бойынша «күшті», дәннің жылтырлығымен седиментациясы бойынша «құнды» және ұлпа сапасы бойынша тұрақсыз классымен сипатталды. Қостанай облысында (Қарабалық АШТС) өсірілген жаздық бидай топтамасының көп жылдық мәліметтері бойынша алынған нәтижелер дән сапасының кей ауқымды көрсеткіштерге тән екендігін көрсетеді. Алынған нәтижелер аса маңызды және жұмсақ бидай сапасын карталауда қолданылады.

Түйін сөздер: жұмсақ жаздық бидай, дән сапасы, дәннің қаттылығы, протеин құрамы, глиадин, глютенин, ұлпа, седиментация.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 633.11

[1*]Абугалиева А.И., [2] Абугалиева С.И., [3] Чудинов В.А., [2]Туруспеков Е.К.

[1] Казахский НИИ земледелия и растениеводства,
Республика Казахстан, Алматинская область, п. Алмалыбак
[2] Институт биологии и биотехнологии растений,
Республика Казахстан, г. Алматы
[3] Карабалыкская сельско-хозяйственная опытная станция,
Республика Казахстан, Костанайская область, с. Научное
*E-mail: kiz_abugalieva@mail.ru

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КАЗАХСТАНА ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ КАЧЕСТВА ЗЕРНА

Введение

Казахстан является одним из мировых экспортеров зерна хлебопекарной пшеницы. Устойчивое и эффективное производство пшеницы обуславливается определенным уровнем урожайности и качеством зерна, диктуемым рынком импортеров, т.е. производимое зерно должно соответствовать стандартам и критериям различных стран с учетом специфики их потребления. В мире казахстанское зерно известно как высокопротеиновое, однако, зачастую в экспортных операциях имеют место проблемы по сочетанию высокого протеина с другими показателями качества. В связи с этим, исследования, направленные на повышение качества зерна путем международного испытания, отбора и внедрения сортов, конкретизированные в соответствии со спецификой экспорта и внутренних запросов, вопросы генетики качества, определяют актуальность и важность устойчивого производства зерна.

Описание показателей и критериев качества

В селекции перечень показателей качества, подвергающихся отбору, определяется целями и задачами конкретных селекционных программ и широко варьирует в зависимости от конечного использования зерна и традиций различных стран [1, 2]. Отбор наиболее качественных форм хлебопекарной пшеницы имеет определенные ограничения и трудности, связанные с комплексностью оценки (13-14 показателей) и необходимостью значительного объема селекционного материала в аналитических целях. Поэтому, с ранних этапов селекции необходимы тесты максимального предсказания качества зерна на малых выборках селекционного материала (таблица 1).

Ключевыми параметрами качества зерна для хлебопекарной пшеницы, позволяющими распознавать ее с ранних этапов являются твердозерность, содержание белка в зерне, и седиментация.

Определение твердозерности и типа развития необходимы для выявления класса пшеницы. Содержание белка является контрольным показателем в реализации генетического потенциала и в значительной степени зависит от условий среды, следовательно, должен оцениваться практически на всех стадиях селекции.

Таблица 1 – Тесты прогноза и оценки хлебопекарного качества пшеницы в селекции США, Европы и Казахстана

США	Европа	Казахстан
Протеин Твердозерность SDS Седиментация Выход муки Содержание протеина в муке Сила муки (альвеограф) Фаринограф Хлебопекарная оценка Миксограф	Протеин ВМС-глютенина Седиментация Зелени Глютен индекс Альвеограф Экстенсометр Хлебопекарная оценка Число падения (*Falling Number*)	Протеин Стекловидность Седиментация в 2% уксусной кислоте Выход муки Количество и качество клейковины Сила муки (альвеограф) Фаринограф Хлебопекарная оценка

Показатель седиментации является высокоинформативным критерием предсказания хлебопекарных пшениц, эффективно работающим в совокупности с содержанием белка.

Значения показателей количества и качества клейковины зависят от условий выращивания, они важны в характеристике сбалансированности клейковины, теста по их упругости/растяжимости и являются информативными при оценке конкретного генотипа в конкретных условиях. Отбор в селекции возможен на основе многократности (условий и репродукций) по стабильности формирования.

Различают три этапа в селекции на качество зерна:

1. Определение класса и прогнозирование (протеин, твердозерность, седиментация)

Главным на этом этапе является показатель твердозерности по определению исходного класса. При наличии аналитических баз данных и экспресс-анализаторов, например ИК- (NIR), работающих в ближней инфра-красной области (NIR) спектра, возможен анализ качества белка по генетически детерминированным соотношениям: глиадин/глютенин; $\alpha+\beta+\gamma/\omega$ – глиадины как S-богатые/S-бедные белки; НМГ/ВМГ (глютенины), в пределах классов, типов пшениц, возможна оценка генетического потенциала отдельных признаков качества, например, по ВМ-субъединицам глютенина. На основе уравнений возможен прог-ноз качества хлеба по содержанию белка и твердозерности [3].

2. Технологическая оценка адекватности прогноза, по содержанию белка, твердозерности, седиментации на основе анализа физических свойств теста: альвеограф, фаринограф.

3. Отбор по совокупности показателей с учетом селекционной программы и оптимиза-ции: урожай – качество.

Конкурсное (КСИ) и экологическое сортоиспытание (ГСИ) предполагает полную схему технологического анализа по совокупности всех показателей для окончательной передачи в Государственное сортоиспытание.

ГСИ после соответствующих испытаний предопределяет предназначение сорта по ко-нечному типу использования (end-use) – классификация по семи классам от отличных улуч-шителей до филера и слабой пшеницы.

Ранее [4] нами (Авторское свидетельство ИНСО) разработана система оценки качества зерна в селекции пшеницы, включающая биологический (генетический потенциал и феноти-пическая его реализация по данным о белковых системах) и технологический уровень (характеристика пригодности зерна как сырья мукомольной, хлебопекарной промышленнос-ти). Обоснована перспектива развития оценки качества зерна по двум параллельно прогрес-сирующим направлениям, не исключающим друг друга: создание и внедрение экспрессных аналитических систем, позволяющих в значительной степени улучшить 1) экспрессность традиционных трудоемких, массовых и длительных методов; 2) поиск и адаптация новых методов прогнозирования качества, в том числе и маркерных.

Принципиально выбор уровня интерпретации данных по качеству зерна определяется целями и задачами селекционной программы. В свою очередь, они обуславливают набор ме-тодов и оптимальную регламентацию их использования по этапам процесса браковки и от-бора в селекции. Для каждого уровня интерпретации характерны свои признаки, методы их определения и селекционные параметры (таблица 2).

В данной работе осуществлен анализ показателей качества зерна коллекции яровой мягкой пшеницы, состоящей из 96 сортов, выращенной в Костанайской области, для дальнейшего ассоциативного картирования для поиска надежных ДНК-маркеров изученных признаков мягкой пшеницы.

Таблица 2 – Система оценки и интерпретации качества зерна в селекции пшеницы

	Уровень оценки и интерпретации	Показатели, определяющие качество зерна	Методы определения и использование
БИОЛОГИЧЕСКИЙ	1. Генетический	Состав компонентов глиадина, состав ВМ субъединиц глютенина гены и хромосомы	метод белковых маркеров [5-9], QTL [10-13], моносомный анализ [14]
	2. Фенотипический	- пуроиндолины (фриабилины) - содержание белка, - содержание фракций белка, - компонентов глиадина, - субъединиц глютенина, - содержание аминокислот в белке зерна, - содержание крахмала, - содержание амилозы	спектрофотометрия, количественный электрофорез, ИК-спектроскопия, полярография, аминокислотный анализ
	Статистический	Пластичность генотипов, стабильность генотипов, биплот	[15-16]
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ	3. Технологический	- (твердозерность) твердые/ мягкие зерна - количество и качество клейковины, - упругость и растяжимость теста, - сила муки, - ВПС, устойчивость теста, разжижение, валометрическая оценка, - объем хлеба, - общая хлебопекарная оценка	Методы ГОСТ, СТ РК, ИСО, ICC, AACC
	Статистический	Интегральная оценка, ранг качества, кластеры качества	[17-18]

Материалы и методы

Материал исследований: 96 сортов яровой мягкой пшеницы, в том числе официально допущенных к производству в Республике Казахстан [19, 20]. Данная коллекция выращивалась в 2012-2015 годы на опытных участках Карабалыкской СХОС (Костанайская область) [21, 22], по общепринятой агротехнологии, в трехкратной полевой повторности. Определение показателей качества зерна осуществляли с использованием соответствующих ГОСТов (таблица 3).

Таблица 3 – Методы и стандарты определения показателей качества зерна и продуктов его переработки для характеристики сортов на этапе конкурсного и экологического (международного) испытаний

Показатель качества зерна	Нормативные документы (стандарты, методы)	
	отечественные	международные
Натурная масса, г/л	ГОСТ 10840-64	AACC 55-10
Твердозерность (Индекс твердозерности), ед. SKCS	–	AACC 3970 AACC 55-30
Стекловидность, %	ГОСТ 10987-76	-
Содержание протеина в зерне	ГОСТ 10846-91	AACC 46-30
Содержание протеина в муке	ГОСТ 10846-91	ИСО 1871-1975 AACC
Содержание глиадина	Къельдаль (N)	–
Содержание глютенина	Къельдаль (N)	–
Количество клейковины (зерно, мука)	ГОСТ 13586.1-68, СТ РК	–

Продолжение таблицы 3

Качество клейковины (зерно, мука)	ГОСТ 13586.1-68	–
Содержание клейковины в муке	ГОСТ 13586.1-68	ИСО 7495:1900; ИСО 5531:78 (глютоматик), ICC 137
Седиментация Зелени	ГОСТ 30043-93	ИСО 5529:1992
Седиментация в уксусной кислоте	–	Синицин, Зелова, 1971 [23]
ВМС и НМС-глютенина	–	Pena (СИММИТ) [8]

В работе использованы статистические программы, в том числе для определения интегральной оценки качества [17-18].

Результаты и их обсуждение

Твердозерность и определение класса пшениц

Согласно международным классификаторам и стандартам стран-экспортеров зерна хлебопекарные пшеницы выделяют в классы: твердозерная красная (Аргентина), твердозерная белая (Австралия), твердозерная красная яровая (Канада), твердозерная красная яровая (озимая) (США) в зависимости от специфики страны. Сортовой стандарт в разных странах устанавливается от абсолютно жесткой регламентации, как например, в Канаде: «качество, равное сорту Маркиз», до установления их для каждого штата (Австралия) или ежегодно (Аргентина), или вообще не оговаривается. Показатель твердозерности как признак разделения технологического типа использования мягких пшениц присутствует в классификации хлебопекарных сортов в Республике Казахстан и СНГ. Важность определения этого показателя связана с дифференциацией сортов и соответственно стратегией селекции; спецификой помола и составления помольных смесей; оптимизацией зон районирования и возделывания конкретных типов пшениц, и в итоге с адекватным маркетингом зернового бизнеса в целом.

Для классификации сортов по технологическому типу использования индекс твердозерности определяли на приборе SKCS 4100 (Perten Instrument, USA) при одновременном анализе диаметра массы и влажности зерна, а также на ИК-основе [2].

Представленные образцы яровой мягкой пшеницы характеризовались изменчивостью по индексу твердозерности от 58 ед. до 103 ед. SKCS-4100, что отражает их принадлежность к классам среднетвердозерная (53-65 е.) и твердозерная (>65 ед.), соответственно.

Как стабильно высокотвердозерные отмечены сорта Казахстанская раннеспелая, Казахстанская 25, Алтайская 100, Отан 1, Арай, Юго-Восточная 2, Карабалыкская 2 (95-107 ед. SKCS). В основном анализированный блок мягкой пшеницы, состоящий из 96 сортов в 4-х репродукциях представлен генотипами класса «среднетвердозерная» (20%) и твердозерная (80%) и далее оценивался по хлебопекарной системе.

Состав глютенина в прогнозировании потенциала качества зерна яровой мягкой пшеницы

Сорта данного блока яровой мягкой пшеницы проанализированы по составу высокомолекулярных субъединиц (ВМС) и низкомолекулярных субъединиц (НМС) глютенина и по наличию 1B/1R пшенично-ржаной транслокации (таблица 4).

Таблица 4 – Классификация сортов яровой мягкой пшеницы по составу ВМС и НМС-глютенина, 1B/1R транслокации

Сорт яровой мягкой пшеницы	ВМС-глютенин			НМС-глютенин			Статус	Ранг, Payne, балл
	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Glu-A3	Glu-B3	Glu-D3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Актюбинка	0	7+9	2+12	a	g	-	1B/1B	5
Акмола 2	2*	7+9	2+12	e	f	g	1B/1B	7
Алтай	2*	7+9	2+12	e	e	a	1B/1B	7

Продолжение таблицы 4

Алтайская 325	0/2*	7+9	5+10	e/c	e	a	1B/1B	7/9
Алтайская 98	2*	7+9	5+10	e/c	g	a	1B/1B	9
Астана	2*	7+9	2+12	a	g		1B/1B	7
Альбидум 188	2*	7+9	2+12	e	g	c/b	1B/1B	7
Алтайская 50	2*	7+9	5+10	-	-	-	1B/1B	9
Алтайская 100	2*	7+9	5+10	e	b	a	1B/1B	9
Алтайская 110	1	7+9	2+12/5+10	e	e	b	1B/1B	7/9
Алтайская степная	2*	7+9	2+12	d	b	b	-	7
Астана 2	2*	7+9	5+10	e/c	g/e	b/a	1B/1B	9
Байтерек	2*	7+9	2+12/ 5+10	-	-	-	-	7/9
Бражинская	2*	7+9	5+10	c	g	b	1B/1B	9
Вера	2*	7+9	5+10	-	-	-	1B/1B	9
Волгоуральская	2*	7+9	2+12	a	b/g	g	1B/1B	7
Дауыл	2*	7+9	5+10	e	g	b	1B/1B	9
Дарина	1	7+9	5+10	c/g	b	b	1B/1B	9
Ертис 97	2*/1	7+9	5+10	e/c	e	a	1B/1B	9
Казахстанская 4	1	7+8	5+10	a	d	g	1B/1B	10
Казахстанская 15	2* (1/2*)	7+9	5+10	d/a	b	g?	1B/1B	9
Казахстанская 25	1	7+9	2+12/ 5+10	a/d	b/g	g	1B/1B	7/9
Казахстанская раннеспелая	2*	7+9	2+12	c/e	f/g	g/a	1B/1B	7
Карабалыкская 2	2*	7+8/ 7+9	5+10	c	j	a	1B/1B	10/9
Карабалыкская 3	2*	7+8/ 7+9	5+10	c	j/e/g	a	1B/1B	10/9
Карабалыкская 90	2*	7+9	5+10	a	g	g	1B/1B	9
Карабалыкская 92	2*	7+9	5+10/2+12	e/c	e/f	a/g	1B/1B	9/7
Карагандинская 25	2*	7+9	2+12	e	g	a	1B/1B	7
Карагандинская 70	2*	7+9	5+10	a	g	g	1B/1B	9
Карагандинская 22	2*	7+9	2+12	a/c	b	g?/a/b	1B/1B	7
Корнеевка	2*	7+9	5+10	e	h/g	a	1B/1B	9
Кенжегали	2*	7+9	5+10	e	f	g	1B/1B	9
Кутулукская	1/2*	7+9	2+12	-	-	-	1B/1B	7
Любава	2*	7+9	5+10	-	-	-	1B/1B	9
Любава 5	2*	7+8/ 17+18	2+12	c	e	a	1B/1B	8
Лютесценс 32	1	7+8/ 7+9	5+10	a	b	g?	1B/1B	10/9
Лютесценс 90	1	7+9	2+12	a	g/f	g	1B/1B	7
Лютесценс 521	2*	7+9	5+10	-	-	-	1B/1B	9

Продолжение таблицы 4

Мирас	2*/1	7+9	5+10	c	c/e	c	1B/1B	9/9
нива 2	2*	7+9	2+12	e	b		1B/1B	7
Омская 18	2*	7+9	2+12 (5+10/2+12)	c	e	c	1B/1B	7
Омская 19	1/2*	7+9	2+12	e/c	e	a	1B/1B	7
Омская 24	2*	7+9	5+10	e	e	c	1B/1B	9
Омская 28	2*	7+9	2+12	e	e	c/b	1B/1B	7
Омская 29	2*	7+9	5+10	c	e	a/b	1B/1B	9
Омская 30	2*	7+9	5+10/ 2+12	c	e	a/b	1B/1B	9/7
Омская 33	2*	7+8	5+10	c	g	a	1B/1B	10
Омская 35	2*	7+9	5+10 (2+12/5+10)	c/a	e/g	a/c	1B/1B	9/7
Прохоровка	2*	7+9	5+10	e	j	a	1B/1B	9
Павлодарская 93	2*	7+9	5+10	e/a	e/g	a/g	1B/1B	9
Павлодарская 93	0	7+9	2+12	c	g	c	1B/1B	5
Предгорная 70	2*	7+9	2+12	b	j/e	v	1B/1R1B/1B	7
Памяти Азиева	2*	7+9	2+12	c	e	a	1B/1B	7
Саратовская 29	2*	7+9	2+12	e/c	e/g	a	1B/1B	7
Саратовская 42	2*	7+9	2+12	-	-	-	1B/1B	7
Саратовская 55	2*	7+9	2+12	-	-	-	1B/1B	7
Саратовская 58	2*	7+9	2+12/ 5+10	c	e	a	1B/1B	7/9
Саратовская юго-восточная	2*	7+9	2+12	e	j	a	1B/1B	7
Степная 1	2*	7+9	5+10	a	g		1B/1B	9
Ульбинка 25	2*	7+9	5+10/2+12	c	g	g	1B/1B	9/7
Чернява 13	2*	7+9	5+10	a	b		1B/1B	9
Целинная 3С	2*	7+9	2+12	c	f	g	1B/1B	7
Целинная 24	2*	7+9	5.5+10	e	f	g	1B/1B	(9)
Целинная 24	2*	7+9	2+12/ 5.5+10	e	f	g	1B/1B	(7/9)
Целинная 26	2*	7+9	5+10	a	f	g	1B/1B	9
Целинная 26	0	7+9	5+10	a	f	g	1B/1B	7
Целинная юбил.	2*	7+9	5+10	e	f	g	1B/1B	9
Шортандинская 95 ул.	2*	7+9	2+12	e	g	g	1B/1B	7
Эритроспермум 35	2*	7+9	5+10	e	f	g	1B/1B	9
Юго-Восточная 2	2*	7+9	2+12	e	j/e/b	a	1B/1B	7
Юго-Восточная 3	2*	7+9	2+12	c	g	a	1B/1B	7
Арай	1	7+8	5+10	c/b	d/c	g/a	1B/1B	10
Ертис 7	2*	7+9	2+12/ 5+10	c	e	b	1B/1B	7/9

Продолжение таблицы 4

Женис	2*	7+9	5+10	e/c	b	a	1B/1B	9
Карабалыкская 9	1	7+8	5+10	d	e	a	1B/1B	10
Ляззат	2*	7+9	5+10	c	e/g	c/b	1B/1B	9
Наргиз	1/2*	7+9	5+10/ 2+12	e/c	b/e	a	1B/1B	9/7
Надежда	1	7+8	5+10	a	d/i	g	1B/1B	10
Надежда	2*/1	7+8/7+9	5+10	c/a	b/d	a/g	1B/1B	10/9
Омская 36	2*	7+9	5+10	c	e/g	a	1B/1B	9
Омская 36	0	7+9	5+10	c	c	b/a	1B/1B	7
Отан 1	1/2*	7+9/7+8	5+10/ 2+12	c	e/b	a	1B/1B	9/8
Северянка	2*	7+9	2+12	d	j	c/b	1B/1R	7
Секе	1	7+9	2+12	e	e	c	1B/1B	7
Целина 50	2*	7+9	2+12	c	g/e	a	1B/1B	7
Росинка 3				b	c	a		

Разнообразие генотипов было обусловлено следующими вариациями субъединиц:

Glu-A1: «0», «1», 2* и их смеси;

Glu-B1: «7+9», «7+8», «17+18», их смеси;

Glu-D1: «5+10», «2+12», их смеси и 5.5-10.

Наличие 1B/1R было обнаружено только для сортов Предгорная 70 и Северянка.

Аллели, понижающие качество, определены по Glu-A1 (нулевая) в единичных случаях для сортов: Актюбинка; Алтайская 325 (в смеси 0/2*); Павлодарская 93 (в смеси); Целинная 26 (в смеси); Омская 36 (в смеси); а по Glu-D1 –для сортов и в смесях для 12 сортов. Таким образом, 47% от всех исследованных генотипов прогнозно характеризуется как высококачественные (таблица 4), т.е. ранг 9-10 баллов по шкале Payne. 24 сорта из 85 представлены смесями ВМ-субъединиц глютенина по 1-3 хромосомам и почти по всем для НМС-глютенина.

Характеристика качества зерна сортов яровой мягкой пшеницы: натурная масса и стекловидность

Натурная масса зерна определяется как вес 1 л зерна и связана с его размерами и выполненностью. В стандартах на пшеницу при заготовках зерна обозначены базовые значения для различных технологических классов, и прежде всего, для хлебопекарного – 750 г/л. Для данного блока мягкой пшеницы характерен широкий диапазон изменчивости натурной массы от 650 г/л до 820 г/л в 2012-2015 гг. Судя по натуре, зерно формировалось в условиях увеличения увлажнения с 2012 по 2015 гг. от 725 г/л до 798 г/л по среднефоновому значению; от 650 г/л до 762 г/л – по минимальным и по максимальным значениям от 775-820 г/л (таблица 5). Максимальное качество высоконатурного зерна класса «сильная» было отмечено для сортов пшеницы, выращенных в 2015 году (47%). Как видно из таблицы 5, показатель натуры значительно варьировал в зависимости от климатических условий года.

Стабильно максимальный ранг (лучший в год и по их совокупности) был характерен для сортов: Павлодарская 93, Авангард, Омская 28, L-249 kz, Казахстанская 15, Алтайская 325, L-282 kz, Актюбе 39, Карабалыкская 9, Волгоуральская, Женис. Требованиям минимум 2-го класса (ценная) по натурной массе независимо от года отвечали следующие сорта: Байтерек, Казахстанская раннеспелая, Омская 28, Павлодарская 93, Саратовская 60, Целиная, Юбилейная, Алтайская 100, Ертыс-7, Женис, L-244 kz, L-249 kz, L-279 kz. Они могут быть выделены как стабильные высокоценные генотипы.

В существующей системе оценки и классификации хлебопекарных пшениц физические кондиции зерна определяются не только по натурной массе, но и по стекловидности. Для данного блока яровой мягкой пшеницы в условиях Карабалыка стекловидность варьировала от 22% до 45% в минимальных значениях (Целинная 26, Карагандинская 25, Целинная) от 76% (Алтайская 100, Шортандинская 95 улучшенная, Казахстанская 25) до 92% (Авандард)

по максимальным значениям и от 57% до 66% по средним значениям. В основном весь блок по стекловидности был представлен классами ценная + сильная. Порядка 7-20% образцов были представлены классом филер + слабая. В данном случае целесообразней выделить образцы с относительно низкой стекловидностью для их идентификации.

Таблица 5 – Характеристика сортов яровой мягкой пшеницы по натурной массе и стекловидности

Показатель и класс пшеницы	Натура, г/л			Стекловидность, %		
	2012 г.	2014 г.	2015 г.	2012 г.	2014 г.	2015 г.
min	650	701	762	36	45	22
среднее	725	764	798	57	59	66
max	775	800	820	76	80	92
Процент встречаемости генотипов, относящихся к классу, %						
1 класс	-	1	47	40	40	75
2 класс	14	77	53	40	55	8
3 класс	29	18	-	15	5	4
4 класс	57	4	-	5	-	3

Как стабильно низкостекловидные в условиях Карабалыка были отмечены сорта преимущественно класса филер: Целинная 24 (32-45% стекловидности) и Целиная 26 (22-47%), Степная 1 (36-45%). Стекловидность класса «слабая» стабильно формировали сорта Целинная 3с (46-46%); Саратовская 66 (40-50%).

Содержание протеина и клейковинных фракций

Содержание протеина является контрольным в реализации показателем генетического потенциала и в значительной степени зависит от условий выращивания. Первым фактором, который наиболее адекватно объясняет изменчивость содержания белка, являются сорта (генотипы). Вся специфика (или ее большая часть) различного качества сортов заключена в информации о белке: его количестве и качестве.

Содержание протеина в данном блоке колебалось от 11,6 % до 19,9 % (таблица 6), т.е. за исключением только одного образца репродукция в пределах класса «сильная» с градацией на: отличный улучшитель (с содержанием протеина >16%) – 50% от всех изученных; хороший улучшитель 39% и удовлетворительный улучшитель 7%.

Таблица 6 – Характеристика яровой мягкой пшеницы по содержанию протеина

Показатели и класс пшеницы	Содержание протеина, %				Содержание клейковины, %	
	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2014 г.	2015 г.
Минимальные	15,0	12,1	14,6	11,6	21,0	17,0
Средние	16,9	14,2	15,4	13,0	28,0	22,0
Максимальные	19,9	16,5	16,8	14,4	34,0	28,0
	Процент встречаемости генотипов класса, %					
1 класс (14,1-16,0)	100	59	100	12	31	0
2 класс (13,1-14,0)	0	34	0	30	63	42
3 класс (11,1 – 13,0)	0	7	0	58	6	29
4 класс (8,0-11,0)	0	0	0	0	0	29

Содержание протеина в зерне в значительной степени зависит от условий выращивания (таблица 6) и, как правило, отрицательно связано с урожайностью. Весьма затруднительно было выделить стабильно высокопротеиновые и низкопротеиновые генотипы. По максимальной степени выраженности этого признака в конкретный год по рангам были выделены следующие сорта: Дарина (14,3-19,9%); Чернява 13 (13,5-18,5%); Лютесценс 32 (13,3-18,9%); Авангард (14,2-18,1%); Омская 36 (13,5-18,2%); Астана (14,2+18,1%); Памяти Азиева (13,8-17,2%); Алтайская 100 (14,3-17,4%); Саратовская 42 (14,1-17,5%). Качество зерна по протеину класса «сильная» стабильно формировалось для сортов: Авангард, Астана, Алтайская 50, Алтайская 60, Дарина, Карабалыкская 2, Карабалыкская 3, Саратовская 42, Алтайская 100, Арай и Ертыс 7. Как видно из таблицы 6, еще 30% сортов снизили класс качества до ценной в условиях 2015 года, в остальных репродукциях к классу-сильная относятся: Актюбе 39; Алтайская 325; Карагандинская 25; Лютесценс 32; Лютесценс 90; Омская 29; Прохоровка; Памяти Азиева, Саратовская 58; Саратовская 56; Ульбинка 25; Чернява 13; Шортандинская 95 улучшенная; Эритроспермум 35; Юго-Восточная 2; Алмакен; L-244 kz; Карабалыкчкая 9; Наргиз.

низкопротеиновые генотипы (3 класс) выделены в урожае 2013 и 2015 г. Альбидум 188 (12,0-12,1%); Байтерек (12,5-12,8%); Волгоуральская (11,8-12,3%); Омская 33 (12,3-12,9%); Предгорная 70 (12,8-12,9%).

Известно, что технологическое качество определяется не только наличием белка, но и его составом, т.е. содержанием и соотношением клейковинных белков глиадина и глютенина. Адекватный прогноз качества не всегда возможен в связи с неоднородностью состава клейковинных белков.

Содержание глиадина в % к суммарному протеину варьировало в значительных пределах как между сортами в пределах блока, так и по годам репродукции (таблица 7), максимально в 2013 году.

Таблица 7 – Характеристика яровой мягкой пшеницы по содержанию глиадина и глютенина (в % к суммарному протеина в зерне)

Показатели	2012 г.		2013 г.		2014 г.		2015 г.	
	глиадин	глютенин	глиадин	глютенин	глиадин	глютенин	глиадин	глютенин
Минимальные	17,9	20,1	29,0	23,6	20,5	22,4	14,9	23,6
Средние	27,0	22,9	34,4	25,4	25,4	23,2	22,4	25,0
Максимальные	39,2	24,4	48,2	29,3	31,5	24,3	29,1	27,0

Сорта анализируемой коллекции были проранжированы по максимальной степени выраженности данного показателя в каждой репродукции. Сорта, получившие ранг от 1 по 10, были отобраны нами как стабильно высокоглиадиновые: Дарина (28,6-39,2%); Лютесценс 32 (23,5-37,6%); Алтайская 325 (27,1-36,7%); Алтайская 98 (27,2-36,8%); Астана (24,8-36,1%); Кутулукская (26,8-363,0%); Алтайская 100 (22,1-37,8%); Арай (23,0-34,5%); Омская 36 (21,7-38,5%). Максимальными значениями в отдельные годы выделялись сорта, представленные в таблице 8.

Таблица 8 – Сорта яровой мягкой пшеницы с максимальным содержанием глиадина

Год	Сорта яровой мягкой пшеницы				
	1 ранг	2 ранг	3 ранг	4 ранг	5 ранг
2012	Дарина	Лютесценс 32	Кутулукская	Астана	Дауыл
2013	Юго-Восточная 3	Омская 35	Алтайская 60	Волгоуральская	Омская 30
2014	Чернява 13	Павлодарская 93	Алтайская 100	Памяти Азиева	Арай
2015	Алтайская 325	Дарина	Алтайская 60	Алтайская 98	Саратовская 55

Содержание глютенина варьировало в менее узком диапазоне – от 20,1% к суммарному протеину (Ульбинка 25) до 29,3% (Волгоуральская). Ранжирование сортов по содержанию глютенина также зависело от условий года. Выделены стабильно высокоглютениновые сорта: Алтайская 100 (23,9-28,2%); Казахстанская раннеспелая (23,5-26,8%); Карабалыкская 25 (23,5-26,65%); Астана 2 (23,8-27,5%); Алтайская 50 (23,5-26,2%); Казахстанская раннеспелая (23,4-26,7%); Целиная 3С (23,5-26,5%); Алтайская 325 (23,7-25,5%); Саратовская 55 (23,0-27,0%); Волгоуральская (23,4-29,0%).

Количество и качество клейковины – основной показатель в заготовке зерна. Качество клейковины соответствовало классам «сильная», ценная и филер. Количество клейковины варьировало в пределах от 17,7% (Степная 1) до 33,6% (L-244 kz) при среднеблоковом 28,0% в 2014 г и 22,0% в 2015 г. К стабильно высококлейковинным отнесены сорта: Астана (27,0-34,4%, при среднем 31,0%); Дарина (27,0-33,3%); Лютесценс 90 (27,7-31,7%); Памяти Азиева (25,4-32,8%); Ульбинка 25 (27,3-30,4%); Шортандинская 956 улучшенная (25,6-30,5%); L-244 kz (24,4-33,6%); Чернява 13 (24,4-32,4%); Любава (24,0-32,5 %); Казахстанская 25 (24,8-29,9 %); Лютесценс 32 (23,7-34,0%).

По качеству клейковины отбор целесообразней на фоне увлажнения и повышенной урожайности. Интерес представляют генотипы, сформировавшие 1 класс качества в этих условиях: Алтайская 50 (при прогнозе в 9 баллов по Payne); Карабалыкская 2 (10/9 баллов); Саратовская 42 (7 баллов); Эритроспермум 35 (9 баллов); Ертыс (7/9 баллов) и ряд образцов с пограничным значением ИДК (80) между классом «сильная» и ценная: Алтайская 98 (9 баллов); Астана (7 баллов); Алтайская 60, Алтайская 100 (9 баллов); Дарина (9 баллов); Омская 30 (9/7 баллов); Предгорная 70 (7 баллов); Саратовская 29 (7 баллов); Саратовская 58 (7/9 баллов); Степная 1 (9 баллов); Алтайская 110 (7/9 баллов); Арай (10 баллов); Омская 36 (9/7 баллов); Отан 1 (9/8 баллов).

Седиментация муки

На ограниченном количестве аналитического материала адекватному определению качества зерна и муки помогает анализ седиментации муки, в т.ч. в 2%-ной уксусной кислоте с градацией: 0-30 мл – слабая; 31-50 мл – филер; 51-70 мл – ценная; > 70 мл – сильная пшеница, соответственно.

Таблица 9 – Характеристика яровой мягкой пшеницы по седиментации и качеству клейковины

Показатели и класс пшеницы	2012 г.	2014 г.		2015 г.	
	Седиментация	Седимен-тация	Клей-ковина	Седимен-тация	Клей-ковина
Минимальные, мл	42	41	35	34	70
Средние, мл	53	57	59	50	100
Макисмальные, мл	70	73	90	70	87
	Процент встречаемости генотипов класса, %				
1 класс (70 мл)	2	1	94	3	5
2 класс (69-50 мл)	83	94	3	53	45
3 класс (49-30 мл)	15	5	3	44	50
4 класс (29 мл)	0	0	0	0	0

По максимальным значениям в каждой репродукции и во всех по седиментации в 2%-ной уксусной кислоте выявлены генотипы: Дауыл (66-70 мл при среднем 69 мл); Алтайская 98 (67-70 мл); Саратовская 42 (62-67мл); Алтайская 50 (62-65 мл); Алтайская 60 (54-70 мл); Карабалыкская 25 (61-66 мл); Алтайская 100 (60-698 мл); Целиная 26 (60-65 мл); Акмола 2 (52-64 мл) и Дарина (50-73 мл). Стабильно низкой седиментацией характеризовались сорта: Бражинская (39-50 мл); Казахстанская 25 (35-46 мл); Казахстанская раннеспелая (34-42 мл); Прохоровка (39-47 мл). В основном весь блок яровой мягкой пшеницы был представлен по седиментации уровнем класса ценная (53-94% в зависимости от условий года). В 2015 году уве-

личилась доля класса «филер», что может быть связано с увлажнением во время налива зерна. В этом плане был эффективен отрицательный фон для выявления генотипов пшеницы с худшим качеством кроме тех, которые характеризовались стабильно низким качеством: Актюбинка, Алтайская 325, Лютесценс 521, Мирас, Омская 20, Ульбинка 25 и L-244 kz.

Таким образом, сорта анализированной коллекции дифференцированы по седиментации как дающие стабильно высокое качество, стабильно низкое, класс «ценная» и нестабильные по качеству между классом ценная и филер.

Прогноз качества по составу ВМС-глютенина совпадал (коррелировал) с таковым по уровню седиментации 1+2 класса для сортов: Алтайская 98 (9 баллов при седиментации 67-70 мл класса сильная + ценная); Дауыл (9 баллов при средней седиментации 69 мл класса сильная + ценная); Алтайская 50; Алтайская 100; Дарина. Высокое прогнозное качество (9 баллов) подтверждено уровнем 2-го класса «ценная» для сортов Алтайская 100; Астана 2; Казахстанкая 4; Карабалыкская 2; Карабалыкская 3; Карабалыкская 90; Карагандинская 70; Корнеевка; Кенжегали; Степная 1; Целиная1; Целиная Юбилейная; Эритроспермум 35; Арай;Женис; Ляззат; Надежда.

Низкое прогнозное качество по составу ВМС-глютенина (5-7 баллов) подтверждено стабильным уровнем седиментации класса «филер» для сортов Казахстанская раннеспелая (7 баллов – 34-42 мл); Актюбинка (5 баллов – 36-47 мл); Саратовская Юго-Восточная (7 баллов – 48 мл); Омская 28 (7 баллов – 39-47 мл).

Для ряда анализированных сортов было отмечено частичное подтверждение относительно низкого прогнозного качества (7 баллов) на провокационном фоне (высокого увлажнения, а значит и урожайности): Алтай (7 баллов – 39 мл0; Альбидум 188 (47 мл); Алтайская степная (45 мл); Волгоуральская (40 мл); Лютесценс 90 (40 мл); нива 2 (44 мл); Омская 18 (44 мл) Омская 190 (43 мл); Шортандинская 95 улучшенная (48 мл); Юго-Восточная 3 (49 мл); Северянка (48 мл); Секе (40 мл); Целина 50 (43 мл); Карагандинская 22 (49 мл). Все перечисленные сорта относятся к ряду генотипов, где генетический потенциал реализуется полностью или на провокационных фонах.

Часть генотипов (18% их всех исследованных) по составу ВМС-глютенина отнесены к смесям, соответственно подтвердилась их характеристика в качестве смеси по классам качества по седиментации для сортов: Алтайская 325 (7-9 баллов – ценная + филер, 70%); Байтерек (7/ баллов – 2 + 3 класс, 30%); Казахстанская 25 (7-9 баллов – филер, 100%); Карабалыкская 92 (9/7 баллов – ценная); Любава (9/8 баллов – ценная + филер, 50/50%); Омская 30 (9/7 баллов – 50-61 мл, класс ценная); Омская 35 (9/7 баллов – филер, 30%); Павлодарская 93 (9/5 баллов – 50-57 мл); Саратовская 58 (7/9 баллов – 52-64 мл, класс ценная); Ульбинка 25 (9/7 баллов – 70% филер); Целиная 26 (9/7 баллов – 60-65 мл – класс ценная); Ертыс 7 (7-/9 баллов – 50-67 мл – класс ценная); Наргиз (9/7 баллов -30% филера); Омская 36 (9/7 баллов – 60-62 мл) и невозможность адекватного прогноза качества.

Для сортов Акмола 2, Астана, Карагандинская 25, Кутулукская, Предгорная 70, Памяти Азиева, Саратовская 29, Саратовская 42, Саратовская 55, Целинная 3с (ранг по Payne – 7 баллов) отрицательный отбор по белковым маркерам не был оправдан, так как их качество расценивается стабильно как класс «ценная». Возможно, условия возделывания не способствовали раскрытию генетического потенциала. Но многолетние данные в условиях Карабалыка позволяют констатировать возможность получения хорошего качества при прогнозе среднего уровня.

Обратная картина наблюдалась для сортов с прогнозным высоким качеством (ранг по Payne – 9-10 баллов) и реальным качеством класса филер, или смеси «филер + ценная»: Бражинская (9 баллов – филер 70%); Вера (9 баллов – 50% филер); Ертыс 97 (9 баллов – 30% филер); Казахстанская 15 (9 баллов – 30% филер); Лютесценс 32 и Омская 29 (10 баллов – 50% филер); Омская 24, Лютесценс 521 и Мирас (9 баллов – 30% филер); Чернява 13 (9 баллов – 30% филер); Карабалыкская 9 (10 баллов – 30% филер); Омская 33 (10 баллов – 30% филера); Прохоровка (9 баллов – 100% филер).

Таким образом, положительная эффективность прогноза составляет (11 сортов полностью + 30 сортов частично) – 52 %, отрицательная эффективность – 29% и смеси 19%. Вероятность совпадения прогноза по ВМС – глютенина и качества составляет порядка 70% (52% совпадения + 19% смеси).

Крахмальный комплекс был охарактеризован по качеству крахмала, т.е. по содержанию амилозы и активности α-амилазы по данным числа падения.

Содержание амилозы варьировало у анализированных сортов яровой мягкой пшеницы от 8,4% до 22,8% при среднем 17,5% в урожае

2014 г и от 22,8% до 29,4% при среднем 26% (рисунок 2) в урожае 2015 г. Анализ по двум разным по увлажненности года позволил провести разнонаправленный отбор: в 2014 г – фон позволил выделить низкоамилозные формы – важное сырье для не черствеющего хлеба. Это сорта: Алтайская 100, Арай, Алмакен (8,4%) и L-244 kz (11,3%). Сорта Арай и Алтайская 100 сохранили минимальный уровень амилозы среди всего блока. Максимальный стабильный ранг высокого содержания амилозы отмечен для сортов: Лютесценс 32 (22,1-28,4%); Мирас (21,8-28,4%); Лютесценс 521 (21,3-28,9%); Кутулукская (21,3-28,1%); Кенжегали (21,8-27,7%); Ертыс 97 (21,3-27,7%); Саратовская 66 (20,8-28,1%); Целинная 3С (21,8-27,3%); Саратовская 55 (20,4-28,1%); Алтайская 50 (19,1-28,1%). Интерес представляют также формы, стабильно сохраняющие абсолютные значения содержания амилозы: Карабалыкская 3 (22,1-23,1%); Карагандинская 70 (21,8-24,8%); Корнеевка (22,8-25,1%).

Число падения характеризует α-амилазную активность зерна. Важен контроль признака в процессе уборки как индикатора прорастания на корню и в процессе хранения. Нормы при заготовке предпочтительны в рамках 250-300 сек. Для пшеничной муки не менее 160 сек. Специальная селекция на этот признак не велась. Это одно из первых системных исследований районированных и перспективных сортов в зоне возделывания яровой мягкой пшеницы в достаточно увлажненных условиях особенно при уборке.

В целом сорта для Севера Казахстана используются краснозерные, у которых ингибируется α-амилаза. По среднеблоковому значению ситуация выглядела вполне удовлетворительно – на уровне 309-317 сек. Однако, минимальные значения от 62 сек до 67 сек. показывали наличие сортов с проблемным числом падения.

Выделена часть сортов, которые имели потенциал прорастания: Алтайская 50, Саратовская 56, Саратовская Юго-Восточная, Саратовская 60 – как правило белозерные сорта, имеющие распространение только на засушливом Западе. Обращали на себя внимание сорта с очень низким ЧП 60-75 сек: Актюбинка, Карабалыкская 2, Омская 29, Отан 1, Юго-Восточная 2, Актюбинка, Надежда, Алтайская 98, Павлодарская 93, Саратовская 29. В группу риска попали также сорта с ЧП до 160-180 сек: Наргиз, Омская 36, Северянка, Саратовская 60, Эритроспермум 35, Омская 33. Необходимо проанализировать генетику данного признака для этих сортов. Диапазон изменчивости отдельных показателей различен, что приводит к различной разрешающей способности дифференциации генотипов.

Таблица 10 – Диапазон и коэффициент изменчивости признаков качества зерна мягкой пшеницы

Показатель	Внутри года		Между годами		значения
	Диапазон	Коэффициент	Диапазон	Коэффициент	
Натурная масса, г/л	650-775	1,19	650-762	1,17	min
	701-800	1,14	725-798	1,10	среднее
	762-820	1,08	775-820	1,06	max
Стекловидность, %	36-76	2,11	22-45	2,05	min
	45-80	1,78	57-66	1,16	среднее
	22-92	4,18	76-92	12,1	max
Протеин, %	15,0-19,9	1,33	11,6-15,0	1,29	min
	12,1-16,5	1,36	13,0-16,9	1,30	max
	14,6-16,8	1,15	14,4-19,9	1,38	среднее
Клейковина, %	21-34	1,62	17-21	1,23	min
	17-28	1,65	22-28	1,27	max
	-	-	28-34	1,21	среднее

Продолжение таблицы 10

ИДК, ед.	35-90	2,57	35-70	2,0	min
	70-100	1,43	90-100	1,11	max
	-	-	59-87	1,47	среднее
Седиментация, мл	42-70	1,67	34-42	1,23	min
	41-73	1,78	50-57	1,14	max
	34-70	2,06	70-73	1,04	среднее
Амилоза, %	8,4-22,8	2,71	8,4-22,8	2,71	max
	22,8-29,4	1,29	22,8-29,4	1,29	min
	15,6-26,3	1,69	17,5-26,3	1,50	среднее
Число падения, сек.	62-701	11,3	62-67	1,08	среднее
	67-453	6,8	433-701	1,62	max
	62-434	7,0	312-330	1,06	min
Глиадин, %	17,9-39,2	2,19	17,9-29,2	1,63	max
	29,2-48,2	1,65	31,5-48,2	1,53	среднее
	20,5-31,5	1,54	25,6-34,8	1,36	min
Глютенин, %	20,1-24,4	1,21	20,1-23,6	1,17	среднее
	23,6-29,3	1,24	24,3-29,3	1,21	max
	22,4-24,3	1,08	23,1-25,7	1,11	min

Изменчивость внутри года и между годами была в одних пределах для таких показателей качества зерна как натурная масса, содержание протеина, глиадина и глютенина по всем значениям (минимальным, средним и максимальным), что свидетельствует о равном влиянии генотипа (внутри года) и среды (между годами). Высокая вариабельность внутри года показателей числа падения (k изменчивости=6,8-11,3), седиментация, (k=1,7-2,06), стекловидность (k=1,78-4,18) позволяют констатировать преобладающее значение генотипа. Для показателей содержание клейковины и ИДК отмечена разнонаправленность k-изменчивости, что связано с наличием взаимодействий генотип-среда.

Таким образом, изученный блок яровой мягкой пшеницы характеризовался по качеству зерна по содержанию протеина как класс «сильная», по стекловидности и седиментации как класс «ценная» и по качеству клейковины нестабилен в условиях увлажнения. Полученные результаты свидетельствуют о широком диапазоне признаков качества зерна в коллекции яровой пшеницы Казахстана, выращенной в регионе Костанайской области (Карабалыкская СХОС) по многолетним данным. Полученные результаты по показателям качества будут использованы для картирования QTL-маркеров, связанных с качеством зерна мягкой пшеницы.

Работа выполнена в рамках проекта 1784/ГФ4 «Разработка ДНК-маркеров для селекции пшеницы на повышение урожайности и качества зерна на основе использования новых геномных технологий» *по бюджетной программе* МОН РК «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

Литература

1 Asseng S., Milroy S.P., Poole M.L. Systems analysis of wheat production on low water-holding soils in a Mediterranean-type environment I. Yield potential and quality // Field Crops Res. – 2008. – 105. – P.97-106.

2 Савин В.Н., Абугалиев И.А., Абугалиева А.И. Оптимизация аналитических исследований в растениеводстве // Доклады РАСХН. – 1998. – №2. – С.13-15

3 Драчева Л.М. Твердозерность мягких пшениц и селекция на качество. – Дисс. … канд.с.-х. наук, А., 1999. – 24 с.

4 Абугалиева А.И., Савин В.Н. Принцип и система ведения баз данных по маркерным и селективным признакам зерновых культур. – А.с. Агенства ИНСО РК №346 – 23.08.1995.

5 Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. – Москва: Колос – 1983. – 320 с.

6 Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – Москва: Наука. – 1985. – 327 с.

7 Перуанский Ю.В., Абугалиева А.И., Булатова К.М., Нехорошева Л.М. Глиадин-глютениновые биотипы пшеницы // Доклады ВАСХНИЛ. – 1986. – №6. – С.4-5.

8 Jin H., Yan j., Peña-Bautista R.J., Xia X.C., Morgounov A.I., Han L.M., Zhang Y., He Z.H. Molecular detection of high- and low-molecular-weight glutenin subunit genes in common wheat cultivars from 20 countries using allele-specific markers // Crop and Pasture Science. – 2011. – Vol. 62. – N.9 – P.746-754. DOI: 10.1071/CP11134

9 Abugalieva A., Pena R.J. Grain Quality Spring and Winter Wheat in Kazakhstan // J.: Asian and Australian of Plant Science and Biotechnology. – V.4. (Special Issue 1). Print JSSN 1752-3818. – 2010. – P.87-90.

10 Li H.M., Tang Z.X., Zhang H.Q., Yan B.J., Ren Z.L. Major quality trait analysis and QTL detection in hexaploid wheat in humid rain-fed agriculture // Genet Mol Res. – 2013. – Vol.12. – N.2. – P.1740-1751. doi: 10.4238/2013.May.21.5.

11 Conti V., Roncallo P.F., Beaufort V., Cervigni G.L., Miranda R., Jensen C.A., Echenique V.C. Mapping of main and epistatic effect QTLs associated to grain protein and gluten strength using a RIL population of durum wheat // J Appl Genet. – 2011. – Vol. 52. – N.3. – P.287-298.
doi: 10.1007/s13353-011-0045-1

12 Абугалиева С.И. Генетическое картирование локусов количественных признаков (QTL) у зерновых культур // Биотехнология. Теория и практика. – 2004. – №4. – С. 31-37.

13 Abugalieva S., Ledovskoy Y., Abugalieva A., Quarrie S., Turuspekov Y. Mapping of quantitative traits loci for grain protein content in common wheat // Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2010. – Vol.4. (Special Issue 1). Print JSSN 1752-3818. – P.21-26.

14 Берсимбаев Р.И., Шулембаева К.К. Цитологические исследования мягкой пшеницы в Казахстане // Вестник ВОГиС. – 2005. – Т.3. – С. 317-323.

15 Eberhart S.A., Russell W.A. Stability parameters for comparing varieties //Crop Sci. – 1996. – Vol.6. – P.36-40.

16 Tai G.C. Genotypic stability analysis and its application to potato regional trials //Crop Scince. – 1971. – Vol.11. – N. 2. – P.184-190

17 Мартынов С.П. Оценка экологической пластичности сортов с/х культур //Сельскохозяйственная биология. – 1989. – Vol.3. – С.124-129.

18 Абугалиева А.И., Савин В.Н. Метод определения экологической адаптивности генотипов по комплексу признаков в многомерной системе. – Авт. св-во агенства ИНСО № 418 от 13.05.96.

19 Государственный Реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан. – Астана: Форма Плюс. – 2014. – 238 р.

20 Turuspekov Y., Kondybaev A., Volkova L., Plieske G., Ganal M., Chudinov V., Sereda G., Tokhetova L., Abugalieva S. DNA genotyping and phenotyping of spring wheat accessions from Kazakhstan // Abstr. of 12th International Wheat Genetics Symp. Japan. – 2013. – P.107.

21 Turuspekov Y, Chudinov V, Sereda G, Tokhetova L, Griffiths S, Plieske J, Ganal M, Akhunov E, Abugalieva S. Phenotpic and Genotypic variability of wheat in Kazakhstan // Proc. of 9th International Wheat Conf. Sydney. – 2015. – P. 62.

22 Turuspekov Y., Plieske J., Ganal M., Akhunov E., Abugalieva S. Phylogenetic analysis of wheat cultivars in Kazakhstan based on the wheat 90 K single nucleotide polymorphism array // Plant Genetic Resources. – 2015. available on CJO2015.
doi:10.1017/S1479262115000325.

23 Синицын С.С., Зелова Л.А. Массовое двукратное определение силы муки пшеницы навеска зерна от 0,5 до 0,15 г // Сибирский Вестник с/х науки. – 1978. – №3. – 39-44.

References

1 Asseng S, Milroy SP, Poole ML (2008) Systems analysis of wheat production on low water-holding soils in a Mediterranean-type environment I. Yield potential and quality, Field Crops Res, 105: 97–106.

2 Savin VN, Abugaliev IA, Abugalieva AI. (1998) Optimization of analytical researches in crop production, Reports of the Russian Academy of agricultural sciences [Optimizatsiia analiticheskikh issledovanii v rastenievodstve. Doklady RASKhN] 2:13-15. (In Russian)

3 Dracheva LM (1999) Hardness of bread wheat and breeding for the quality [Tverdozernost' miagkikh pshenits i selektsiia na kachestvo] PhD thesis, Almaty, Kazakhstan, 24 p. (In Russian)

4 Abugalieva AI, Savin VN (1995) Principle and system of maintaining databases on marker and selective traits in cereal crops [Printsip i sistema vedeniia baz dannykh po markernym i selektivnym priznakam zernovykh kul'tur – Avtorskoe svidetel'stvo INSO RK №346 – 23.08.1995]. (In Russian)

5 Konarev VG (1983) Proteins of plants as genetic markers [Belki rastenii kak geneticheskie markery]. Kolos, Moscow, Russia, 320 p. (In Russian)

6 Sozinov AA (1985) Polymorphism of proteins and its value in genetics and breeding [Polimorfizm belkov i ego znachenie v genetike i selektsii] Science, Moscow, Russia, 327 p. (In Russian)

7 Peruanskii YV, Abygalieva AI, Bulatova KM, Nekhorosheva LM (1986) Gliadin-glyutenin biotypes of wheat [Gliadin-gliuteninovye biotipy pshenitsy] Reports of VASHNIL, 6:4-5. (In Russian)

8 Jin H, Yan J, Peña-Bautista RJ; Xia XC; Morgounov AI, Han LM, Zhang Y, He ZH (2011) Molecular detection of high- and low-molecular-weight glutenin subunit genes in common wheat cultivars from 20 countries using allele-specific markers, Crop and Pasture Science, 62(9):746-754. DOI: 10.1071/CP11134

9 Abugalieva A, Pena RJ (2010) Grain Quality Spring and Winter Wheat in Kazakhstan // J.: Asian and Australian of Plant Science & Biotechnology, 4(1):87-90.

10 Li HM, Tang ZX, Zhang HQ, Yan BJ, Ren ZL (2013) Major quality trait analysis and QTL detection in hexaploid wheat in humid rain-fed agriculture. Genet Mol Res, 12(2):1740-51. doi: 10.4238/2013.May.21.5.

11 Conti V, Roncallo PF, Beaufort V, Cervigni GL, Miranda R, Jensen CA, Echenique VC (2011) Mapping of main and epistatic effect QTLs associated to grain protein and gluten strength using a RIL population of durum wheat, J Appl Genet, 52(3):287-98. doi: 10.1007/s13353-011-0045-1. Epub 2011 Apr 27.

12 Abugalieva SI (2004) Genetic mapping of quantitative traits loci in cereal crops [Geneticheskoe kartirovanie lokusov kolichestvennykh priznakov (QTL) u zernovykh kul'tur – Biotekhnologiia. Teoriia i praktika] 4: 31-37. (In Russian)

13 Abugalieva S., Ledovskoy Y., Abugalieva A., Quarrie S., Turuspekov Y. Mapping of quantitative traits loci for grain protein content in common wheat // Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. 2010. V.4. (Special Issue 1). Print JSSN 1752-3818. – P.21-26.

14 Bersimbaev RA, Shulembaeva KK (2005) Cytologic studies of common wheat in Kazakhstan [Tsitologicheskie issledovaniia miagkoi pshenitsy v Kazakhstane // Vestnik VOGiS, 9(3):317-323. (In Russian)

15 Eberhart SA, Russell WA (1996) Stability parameters for comparing varieties, Crop Sci, 6:36-40.

16 Tai G.C. Genotypic stability analysis and its application to potato regional trials //Crop Scince, 1971. – Vol.11. – N2. – P.184-190

17 Martynov SP (1989) Assessment of ecological plasticity of crop cultivars – Agricultural biology [Otsenka ekologicheskoi plastichnosti sortov s/kh kul'tur //Sel'skokhoziaistvennaia biologiia] 3:124-129. (In Russian)

18 Abugalieva AI, Savin VN (1996) Method of detection of ecological adaptability of genotypes on a complex of traits in multidimensional system [Metod opredeleniia ekologicheskoi adaptivnosti genotipov po kompleksu priznakov v mnogomernoi sisteme. – A. sv-vo agenstva INSO]. – Sertificate of Intellectual Properties Agence. Almaty, Kazakhstan. – N418. (In Russian)

19 State Register of Breeding Achievements Approved for use in the Republic of Kazakhstan [Gosudarstvennyi reestr selekcionnyh dostizhenii, dopushennyh k ispolzovaniyu v Respublike Kazakhstan]. Astana, Kazakhstan, 2014. P.238. (In Russian).

20 Turuspekov Y., Kondybaev A., Volkova L., Plieske G., Ganal M., Chudinov V., Sereda G., Tokhetova L., Abugalieva S. DNA genotyping and phenotyping of spring wheat accessions from Kazakhstan // 12th International Wheat Genetics Symposium, Japan, 2013, p.107.

21 Turuspekov Y, Chudinov V, Sereda G, Tokhetova L, Griffiths S, Plieske J, Ganal M, Akhunov E, Abugalieva S. Phenotpic and Genotypic variability of wheat in Kazakhstan. Proceedings of 9th International Wheat Conference, Sydney, Austarlia (20-25 September, 2015). P. 62.

22 Turuspekov Y., Plieske J., Ganal M., Akhunov E., Abugalieva S. Phylogenetic analysis of wheat cultivars in Kazakhstan based on the wheat 90 K single nucleotide polymorphism array. Plant Genetic Resources, 2015 available on CJO2015.
doi:10.1017/S1479262115000325.

23 Sinitsyn SS, Zelova LA (1978) [Massovoe dvukratnoe opredelenie sily muki pshenitsy naveska zerna ot 0,5 do 0,15 g. – Sibirskii Vestnik s/kh nauki] 3:39-44. (In Russian)

[1]Тажибаева Т.Л.,
[2]Абугалиева А.И.,
[2]Кожахметов К.К.,
[1]Полякова С.Е.

[1]Научно-исследовательский институт проблем экологии Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Казахстан, Алматинская область, п. Алмалыбак

Засухоустойчивость диких, культурных и интрогрессивных форм озимой пшеницы

В статье приводятся результаты полевых и лабораторных исследований по скринингу диких, культурных и интрогрессивных форм озимой пшеницы на засухоустойчивость. Интрогрессивные формы были получены путем межвидовой гибридизации сортов озимой мягкой пшеницы (Triticum aestivum L.) казахстанской селекции с дикими видами Triticum timopheevii, Triticum militinae, Aegilops cylindrical, Aegilops triaristata. В качестве критериев засухоустойчивости испытывали некоторые морфо-физиологические, физиолого-биохимические и селекционно-генетические показатели. Установлено, что по накоплению вегетативной массы в разные фазы роста пшеницы лидировали Эритроспермум 350 х T.kiharae, Прогресс х T.timopheevii. По содержанию свободного пролина в листьях определены перспективные в селекции на засухоустойчивость генотипы. Определена структура корневой системы, выявлены перспективные образцы на различных стадиях развития проростков. Выделены источники засухоустойчивости на фоне продуктивности. Наиболее четкие результаты сопряженности с засухоустойчивостью установлены по показателю «масса 1000 зерен», определены 6 интрогрессивных форм, превышающих сорт «стандарт».

Ключевые слова: пшеница, интрогрессивные формы, дикие виды, засухоустойчивость, вегетативная биомасса, корневая система, хлорофилл, пролин, продуктивность.

---

[1]Tazhibaeva T.L.,
[2]Abugalieva A.I.,
[2]Kozhakhmetov K.K.,
[1]Polyakova S.E.

[1]Scientific Research Institute of Ecology Problems Al-Farabi KazNU, Kazakhstan, Almaty
[2]Kazakh Scientific Research Institute Agriculture and Plant Growing, Kazakhstan, Almaty region, Almalybak

Drought resistance of wild, cultivars and introgressive forms of winter wheat

Results of field and laboratory researches on screening wild, cultuvars and introgressive forms of winter wheat on drought resistance are given in this paper.Introgressive forms obtained by interspecific hybridization of varieties of winter wheat (Triticum aestivum L.) of Kazakh selection with wild species Triticum timopheevii, Triticum militinae, Aegilops cylindrical, Aegilops triaristata. There are tested some morpho - physiological, physiology - biochemical, breeding and genetic indexes as a criteria of drought resistance. It is established that on accumulation of vegetative biomass in different growth phases were in the lead Eritrospermum 350 x T.kiharae, Progress x T.timopheevii. On biomass accumulation in different growth phases were in the lead Eritrospermum 350 x T.kiharae, Progress x T.timopheevii. Genotypes are determined by the content of free proline in seedlings for the breeding progresson to drought tolerance: Eritrospermum 350 x T.kiharae, (Bezostaya1 x T.militinae) x T.militinae (introgressive forms); T.kiharae, Ae.cylinrica (wild); Eritrospermum 350, Steklovidnaya 24 (wheat varieties). The structure of root system for wild is defined; cultivars and the introgressive forms, perspective samples at various stages of development of sprouts are revealed. Drought resistance sources against of crop productivity are allocated. The most legible results of correlation to drought resistance on an index “the mass of 1000 grains”, defined 6 introgressive forms exceeding a grade are established.

Key words: wheat, introgressive forms, wild species, drought resistance, vegetative biomass, root system, chlorophyll, proline, crop productivity.

[1*]Тәжібаева Т.Л.,
[2] Абугалиева А.И.,
[2] Қожахметов К.К.,
[1]Полякова С.Е.

[1]Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-дың Экология мәселелері ғылыми зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Егіншілік және өсімдік шаруашылығының Қазақ ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы облысы, Алмалыбақ

Күздік бидайдың жабайы, мәдени және интрогрессивті түрлерінің қуаңшылыққа төзімділігі

Мақалада күздік бидайдың жабайы, мәдени және интрогрессивті түрлерінің қуаңшылыққа төзімділігіне арналған скрининг бойынша далалық және зертханалық зерттеулердің нәтижелері келтірілген. Интрогрессивті түрлер қазақстандық селекциялық күздік жұмсақ бидайды (Triticum aestivum L.) жабайы түрлермен Triticum timopheevii, Triticum militinae, Aegilops cylindrical, Aegilops triaristata сұрыптардың тураралық гибридизациясын жасау арқылы алынды. Қуаңшылыққа төзімділік өлшемі ретінде кейбір морфологиялық-физиологиялық, физиологиялық-биохимиялық және селекциялық-генетикалық көрсеткіштер сынақтан өткізілді. Жапырақтардағы еркін пролин құрамы бойынша селекцияда қуаңшылыққа тұрақты генотиптер анықталды. Жабайы, мәдени және интрогрессивті түрлердің тамыр жүйесінің құрылымы анықталды, өсінділер дамуының әр кезеңіндегі келешектің үлгілері белгілі болды. Өнімділік аясында қуаңшылыққа төзімділік көздері анықталды. Негізгі көрсеткіш бойынша қуаңшылыққа төзімділіктің айқын нәтижесі «1000 дәннің массасы» бойынша стандарттан жоғары 6 интрогрессивті түрлер анықталды.

Түйін сөздер: бидай, интрогрессивті түрлер, жабайы түрлер, қуаңшылыққа төзімділік, вегетативті биомасса, тамыр жүйесі, хлорофилл, пролин, өнімділік.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 633.11:631.52

[1*]Тажибаева Т.Л., [2]Абугалиева А.И.,
[2]Кожахметов К.К., [1]Полякова С.Е.

[1]Научно-исследовательский институт проблем экологии Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Республика Казахстан, Алматинская область, п. Алмалыбак
*E-mail: Tamara.Tazhibayeva@kaznu.kz

ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ ДИКИХ, КУЛЬТУРНЫХ И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ФОРМ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Введение

Изучение засухоустойчивости сельскохозяйственных растений, в частности, такой производственной культуры Казахстана, как озимая пшеница, является концептуальным и стратегически обусловленным направлением в развитии современной биологической науки. Засухоустойчивость – сложный, полигенный признак, степень проявления которого зависит от адаптивности пшеницы. Растения обладают способностью к адаптации в засушливых условиях внешней среды в пределах, обусловленных их генотипом. Чем больше у растения возможностей изменять метаболизм в соответствии с окружающей средой, тем шире норма реакции данного генотипа и лучше способность к адаптации.

Стратегия биологической адаптации рассматривается с помощью различных механизмов: генетических, физиологических, биохимических и морфо-анатомических [1]. Представление о неспецифических и специфических факторах устойчивости растений развивается в работах Г.В. Удовенко, R.A. Fischer и др. [2-4]. Механизмы адаптивной стабильности оригинальным образом раскрываются в учении Д.М. Гродзинского о функционировании систем «надежности» растений [4]. Фундаментальную теоретическую и научно-практическую базу для ведения селекционных программ по распознаванию засухоустойчивых и высококачественных генотипов сельскохозяйственных культур заложили труды академика А.А. Жученко по изучению адаптационного потенциала культурных растений. Способность растений в процессе роста, развития противостоять изменяющимся условиям окружающей среды и формировать полноценное потомство зависит от их адаптивного потенциала, представляющего собой функцию взаимосвязи программ онтогенетической и филогенетической адаптации [5].

В литературе встречается немало противоречивых данных о связи физиолого-биохимических показателей метаболизма растений с засухоустойчивостью, где важнейшими медиаторами устойчивости выступают интенсивность ростовых процессов в стрессовых условиях, накопление зеленой массы и содержание хлорофилла, обеспечивающие фотосинтетическую активность, уровень свободного пролина и другие [6-9].

В связи с этим чрезвычайно важны работы по: поиску физиолого-биохимических критериев адаптационной способности пшеницы к засухе; выявлению генотипов, сочетающих устойчивость к засухе с высокой продуктивностью. Ценность предлагаемой методологии исследований заключается в обогащении отечественной коллекции озимой пшеницы интрогрессивным генетическим материалом с дикорастущими видами в качестве доноров природной засухоустойчивости, что находит подтверждение в работах [10-12]. Интрогрессия означает включение отдельных генов одного вида организма в генофонд другого вида. Достигается это одним из традиционных методов – межвидовой гибридизацией, дающей возможность получения высокопластичного нового в генетическом отношении исходного материала для селекции пшеницы.

Дикие сородичи пшеницы являются, как правило, «рекордсменами» устойчивости, т.к. селекцию их произвела сама природа путем естественного отбора. В Казахском научно-исследовательском институте земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) в течение последних 15 лет проводилась серия межвидовых скрещиваний с участием диких видов пшеницы *T.kiharae, T.timophevii, T.militinae* и других, как источников иммунности, устойчивости и высокого содержания белка в зерне [10].

Исследованиями различных авторов при участии профессора Hisashi Tsujimoto экспериментально доказано, что линии пшеницы *Chinese Spring* с добавление хромосом чужеродного генетического материала обладали богатыми генетическими ресурсами для повышения устойчивости к высоким температурам и улучшения показателей продуктивности [11, 12]. Результаты показали влияние нескольких хромосом *Leymus* на повышение адаптации пшеницы на последних стадиях репродукции к высоким температурам окружающей среды в условиях Судана. Три линии с интрогрессией хромосом от *Leymus* проявили высокий уровень устойчивости, тогда как две другие - толерантность к засухе. Еще две дополнительных линии отличались увеличением количества зерен в колосе [11]. В другой работе изучали морфо-физиологические и производственные характеристики 34 интрогрессивных линий пшеницы вышеуказанного сорта. Интрогрессия хромосом чужеродного посредника *Agropyron intermedium* G., *Elymus trachycaulus* T5HL5HL, *El. trachycaulus* 5SS и *Haynaldia villosa* 1V положительно сказалась на улучшение структуры урожая. ни одна из чужеродных хромосом не оказывала отрицательного эффекта на фотосинтетические свойства интрогрессивных форм [12].

Широкая вариабельность интрогрессивного генетического материала стимулирует исследователей использовать диких сородичей для улучшения ценных качеств пшеницы, определив их потенциальную возможность для повышения засухоустойчивости.

Цель исследований – скрининг ресурсного материала диких, культурных и интрогрессивных форм пшеницы по засухоустойчивости. В этой связи предстояло решить следующие задачи: изучить накопление вегетативной массы и содержание хлорофилла в листьях, состояние корневой системы; определить свободный пролин в проростках; сравнить показатели структуры урожая интрогрессивных форм озимой пшеницы и их засухоустойчивость; выделить источники засухоустойчивости на фоне продуктивности.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили 12 интрогрессивных форм озимой пшеницы поколения F6-F7, образованных от скрещивания сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) казахстанской селекции – Карлыгаш, Эритроспермум 350, Жетысу, Стекловидная 24, Комсомольская 1 и широко районированного в республике сорта Безостая 1 с дикими видами пшеницы – *Triticum timopheevii, Triticum militinae, Triticum kiharae, Aegilops cylindrical, Aegilops triaristata*, которые сравнивали по изучаемым показателям с вышеназванными сортами и дикими сородичами. В качестве сортов-стандартов использовали Алмалы (местная селекция) и Карахан (зарубежная селекция). Изучаемые интрогрессивные формы получены в КазНИИЗиР и идентифицированы цитологическими, селекционными методами, отобраны по гомозиготности. Для проведения полевых и лабораторных исследований использовали зерно, выращенное в одинаковых условиях на опытных полях КазНИИЗиР. Исследования проводили на растениях репродукции 2015 года, в ряде опытов их сравнивали с данными 2014 и 2016 годов.

О засухоустойчивости генотипов пшеницы в полевых опытах судили по абсолютному значению урожайности и признакам продуктивности, а также по степени снижения продуктивности в условиях засухи. Проводили анализ структуры урожая и общую продуктивность по общепринятой методике [10]. Определение засухоустойчивости в лаборатории поводили путем

проращивания семян на растворах сахарозы [13] с последующим определением свободного пролина в листьях проростков. Для количественного определения пролина применяли метод L.S. Bates et all [14].

Фенотипирование осуществляли на инструментальной основе: NDVI-технология измерения светоотражения вегетативной массой в красной и ближней инфракрасной области спектра для определения накопления биомассы, листового и зеленого индекса, идентификации абиотического стресса на приборе Greenseeker (N. TechInductries, США) [15]; фотосинтез в полевых условиях замеряли на портативном приборе Хлорофилл метр FP 100 (PSI, Чехия) и в лаборатории по известной методике [16]; полевые эксперименты на стационарах и теплицах КазНИИЗР и в климат контролируемых теплицах на приборе WinRHIZO-ROOT (Regent Instruments Inc., Канада) в лаборатории CIMMYT (Измир, Турция). Характеристика корневой системы осуществлена в почве в трех вариациях на уровне: 8-10 дневных проростков; надземная часть срезана, а корни росли три недели, определение вели на 21-дневных корнях; надземная часть не срезана, определение вели на 21 дневных проростках. Второй и третий варианты опытов соответствовали фазе кущения пшеницы. Определения на проростках проводили по следующим параметрам: длина корней, площадь, РА, объем, средний диаметр, кончики корней, длина вторичных корешков, число разветвлений, масса свежих листьев и масса корней определялась взвешиванием, масса сухих листьев и масса сухих корней после высушивания в термокамере до абсолютно сухого веса [17].

Результаты их обсуждение

Засухоустойчивость наряду с потенциалом зерновой продуктивности является важной характеристикой озимой пшеницы, определяющей наиболее благоприятные в селекционном плане генотипы и их генотип – средовые отношения. Степень засухоустойчивости различных видов и сортов растений, в том числе озимой пшеницы, зависит, в первую очередь, от соотношения площадей поверхности листового аппарата растения, расходующего влагу на транспирацию, и от развития корневой системы, поглощающей воду и элементы минерального питания из почвы [18].

Общая схема опытов по скринингу ресурсного материала озимой пшеницы на засухоустойчивость на основе морфо-физиологических, физиолого-биохимических и селекционно-генетических показателей приведена на рисунке 1.

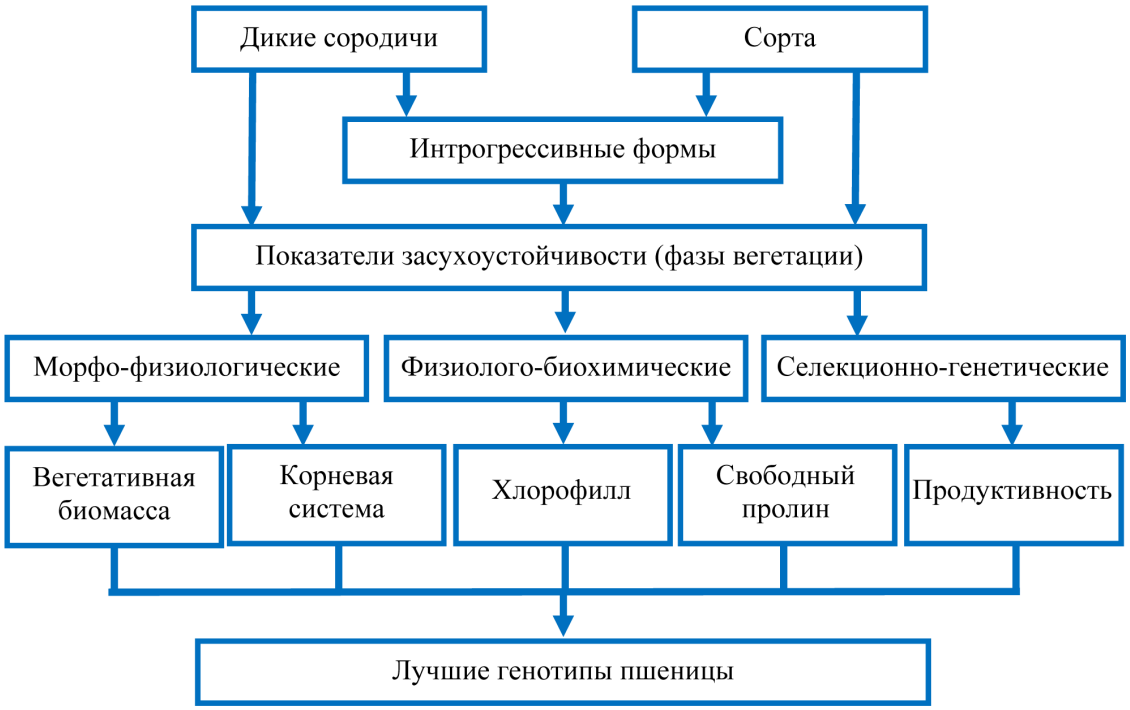


Рисунок 1 – Общая схема опытов по скринингу ресурсного материала озимой пшеницы на засухоустойчивость

Накопление вегетативной массы и содержание хлорофилла в листьях диких, культурных и интрогрессивных форм пшеницы

Одним из перспективных современных методов оценки развития листового аппарата и накопления зеленой массы растений для обеспечения фотосинтетической активности и в целом интенсивности ростовых процессов используется NDVI – технология, позволяющая определить стандартизированный индекс различий растительности. С помощью переносного датчики NDVI обеспечивается быстрое измерение уровня развития сельскохозяйственных культур путем оценки: индекса листовой поверхности и зеленого индекса площади, биомассы и содержания питательных веществ. Данные могут быть использованы для оценки прогноза урожая, накопления биомассы и темпов роста, эффективности усвоения почвенного питания для характеристики энергии прорастания, оценки старения и для обнаружения биотического и абиотического стресса [15]. В наших полевых опытах технология NDVI применялась для измерения накопления вегетативной массы в процессе вегетации по фенологическим фазам развития.

Скрининг ресурсного материала методом NDVI позволил выявить вариабельность в накоплении вегетативной массы от 0,174 до 0,239 в фазу кущения; от 0,184 до 0,437 в фазу трубкования в урожае 2014 года; от 0,23 до 0,76 в фазу кущения и от 0,63 до 0,82 в фазу трубкования в урожае 2015 года.

В 2014 году установлен ряд убывания по накоплению продуктивной биомассы в фазу цветения: *T.kiharae* (0,75) > *T.timopheevii* (0,66) > *T.militinae* (0,58) > *T.aestivum* (0,58–0,43). Среди интрогрессивных форм выделялся генотип Прогресс х *T.timopheevii* (0,72). Среди культурных сортов по индексу зеленой массы в фазу кущения и трубкования лидировали Комсомольская 1 (0,22 и 0,39) и Карлыгаш (0,21 и 0,40), соответственно. В 2015 году максимального результата по измеряемому показателю достиг сорт Эритроспермум 350 (0,62 и 0,79). В урожае следующих двух годов выращивания прослеживалась подобная тенденция, но иные количественные характеристики по накоплению биомассы в фазу цветения: *T.kiharae* (0,75) > *T.timopheevii* (0,65) > *T.militinae* (0,58) > *T.aestivum* (0,43) (урожай 2015 г.); *T.kiharae* (0,74) > *T.timopheevii* (0,80) > *T.militinae* (0,62) > *T.aestivum* (0,73) (урожай 2016 г.). Полученные данные в целом коррелируют и дополняют результаты селекционно-генетических характеристик диких сородичей пшеницы, полученные ранее [27, 28].

Анализ константных форм в фазу кущения позволил выявить изменчивость от 0,150 до 0,238 и от 0,106 до 0,280 при минимальном значений сорта – стандарта Карахан и максимальном для генотипа Эритроспермум 350 х *T.kiharae* (урожай 2015 г.). В 2016 году выявлена вариабельность показателя стандартизованного зеленого индекса от 0,34 до 0,68 в фазу кущения в сравнении с диапазоном 0,23 до 0,76 в урожае 2015 и от 0,17 до 0,24 в урожае 2014. Уровень изменчивости в фазу трубкования отмечен от 0,50 до 0,88 в более широком диапазоне по сравнению с 2015 годом (0,63–0,82 в 2015 г.). Прогресс х *T.timopheevii* и Эритроспермум 350 х *T.kiharae* отмечены как наиболее адаптивные генотипы.

В силу природно-климатических особенностей текущего 2016 года (высокий уровень осадков) развитие растений опережает динамику предыдущих лет и позволяет оценить засухоустойчивость по фенологическим фазам развития – раннего колошения (0,77–0,88) и цветения (0,74–0,88).

Известно, что лучшее использование климатических, почвенных ресурсов, а также приемов агротехнического воздействия происходит в посевах с оптимальной листовой поверхностью. Для многих зерновых культур оптимальный индекс листовой поверхности считается 4–5 $м^2/м^2$, а фотосинтетический потенциал – не менее 2 млн. $м^2$/га сут. Изучение взаимосвязи между показателями фотосинтетического аппарата сельскохозяйственных культур и урожайностью имеет важное значение, как для понимания закономерностей продукционного процесса, так и для разработки критериев селекции на высокую продуктивность и моделей прогнозирования урожайности в агроценозах [19].

В большинстве случаев максимальное значение содержания пигмента хлорофилла в средней пробе зеленых листьев пшеничных побегов отмечается в фазу молочной спелости, очевидно вследствие полного отмирания пластинок нижних ярусов [20].

В выполненных исследованиях хлорофилл замеряли в фазу трубкования пшеницы и выявили определенную тенденцию в характере его накопления среди диких и культурных родительских форм, их интрогрессивного селекционного материала.

На рисунке 2 представлены данные по генотипам озимой пшеницы в сравнении с сортом-стандартом Алмалы, содержание хлорофилла в листьях которого принято за 100 %.

Содержание хлорофилла у диких сородичей и интрогрессивных форм превышало стандарт

Алмалы в 1,1–1,3 раза, лидировали *Ae.cylindrica* и Стекловидная 24 х *Ae.cylindrica*, у культурных сортов – в пределах стандарта, с превышением в 1,1 у Эритроспермум 350.

В полевых условиях 2016 года хлорофилл замеряли в фазу трубкования пшеницы и выявили, что его содержание в средней пробе растений на 15–19 % было выше, чем в 2015 г., что объясняется высокой влагообеспеченностью текущего года, способствующей накоплению хлорофилла и повышению пластичности пшеницы, что подтверждается работами других авторов [7, 19, 20].

Обнаружена определенная тенденция в характере накопления хлорофилла среди диких и культурных родительских форм, интрогрессивного селекционного материала. В лабораторных опытах на проростках содержание хлорофилла было подвержено определенному диапазону изменчивости и превышало сорт-стандарт Алмалы для диких форм в пределах 1,3–1,5 раз. Выявлены образцы, которые характеризовались почти 2-х кратным увеличением содержания хлорофилла, например Эритроспермум 350 х *T.kiharae*, что не противоречит результатам 2015 года.

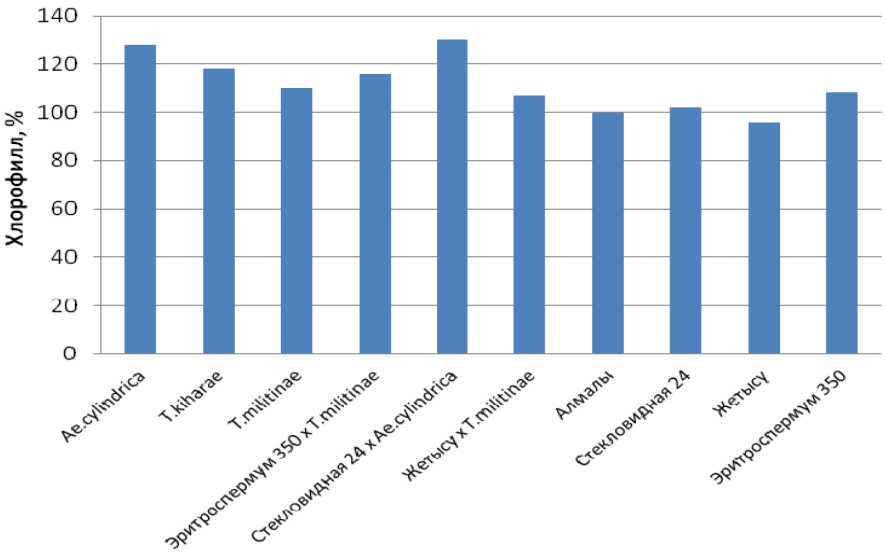


Рисунок 2 – Содержание хлорофилла в листьях генотипов пшеницы, % к сорту-стандарту Алмалы, полевые испытания, фаза трубкования , КазНИИЗиР, 2015 г.

В лабораторных опытах на проростках содержание хлорофилла было подвержено определенному диапазону изменчивости и превышало сорт-стандарт Алмалы для диких форм в пределах 1,3–1,5 раз. Однако с среди культурных сортов и интрогрессивных форм были образцы, которые характеризовались почти 2-х кратным увеличением содержания хлорофилла, например Эритроспермум 350 х *T.kiharae*, Эритроспермум 350 и Безостая 1.

В работе по изучению особенностей биохимических показателей у пшеницы и её диких сородичей, произрастающих в разных зонах Таджикистана выявлено, что содержание хлорофиллов «а» и «в», а также каротиноидов у *Ae.cylindrica, Ae.triuncialis и Ae.taushii* были выше, чем у пшеницы [21]. Другие исследователи констатировали факт повышения устойчивости трансгенных растений к УФ-облучению [22], различия в биохимических характеристиках пшениц, содержащих и не содержащих чужеродную гермоплазму [10].

Введение дополнительных хромосом от *Leymus* в геном пшеницы *Chinese Spring* выявил небольшое число линии с повышенной фотосинтетической активностью [11], что свидетельствует о стимуляции жизнеспособности гибридов чужеродным генетическим материалом. Самая высокая фотосинтетическая активность наблюдалась у линий пшеницы, содержащих интрогрессивный материал с дополнительными хромосомами от Aegilops *umbellulata* 5U, 5-й *El. trachycaulus* и ржи 1R [12].

2 Накопление пролина и засухоустойчивость

По мере возрастания температуры в июле 2015 года и в следующую критическую фазу

засухи к концу месяца наблюдалась отчетливая тенденция на увеличение количества свободного пролина в листьях изучаемых растений пшеницы. Содержание пролина возросло в среднем на 28–35 % у всех форм пшеницы. Однако, ожидаемый рост количества пролина у диких сородичей несколько приостановился, а культурные сорта Эритроспермум 350, Стек-ловидная 24 и интрогрессивные формы показали увеличение в содержании свободной ами-нокислоты в 1,4–1,6 раз, соответственно. По всей видимости, механизмы адаптации культурных пшениц, связанные с водоудерживающей способностью пролина более развиты. Критическими по засушливости в летний период вегетации озимой пшеницы были дни: с 26 по 30 июня, когда температура поднималась до 28–32 °С, что соответствует фазе цвете-ния пшеницы, а также с 17 по 26 июля, когда температура достигала 32–38 °С, что соответс-твует фазе налива зерна. В эти периоды определяли содержание свободного пролина в ве-гетативной массе пшеницы диких культурных и интрогрессивных форм одной репродукции.

Установлено, что содержание пролина в фазу цветения у культурных сортов пшеницы колебалось от 29 до 38 мг%, причем наибольшее количество пролина фиксировалось у сор-тов Стекловидная 24, Жетысу, которые являются родительскими формами для исследуемых интрогрессивных форм. Содержание свободного пролина диких сородичей значительно превышало культурные сорта (в 1,8–2,0 раза). Среди диких форм выделялись по уровню сво-бодного пролина T.kiharae и T.militinae. Интрогрессивные формы по содержанию пролина проявили вариабельность, наибольшее количество было отмечено у форм: Стекло-видная 24 х T.timopheevii (50 мг%), Эритроспермум 350 х T.kiharae (52 мг%) и Жеты-су х T.militinae (55 мг%). Сходные, но менее контрастные данные были получены в 2014 и 2016 годах.

Результаты данной серии опытов представлены на рисунке 3.

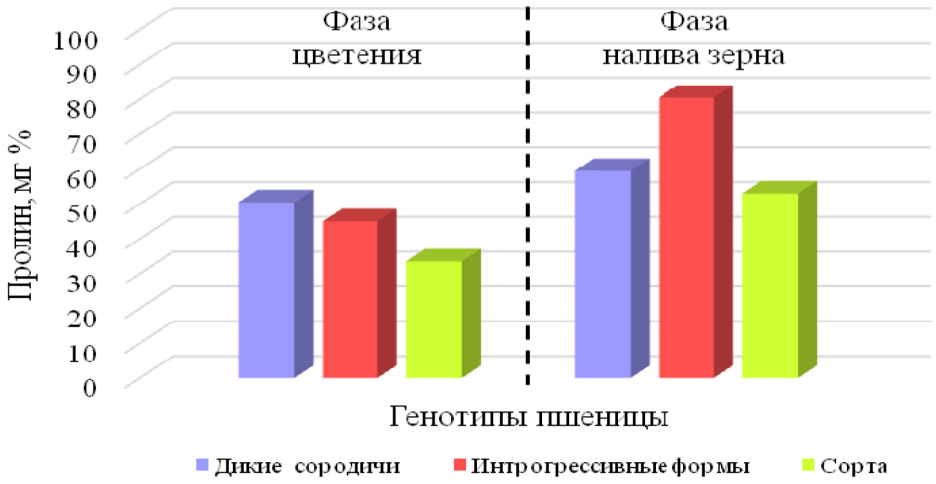


Рисунок 3 – Изменчивость в накоплении свободного пролина в листьях диких, культурных и интрогрессивных форм в различные фенологические фазы развития пшеницы

Выделились образцы, показавшие лучший результат в фазу кущения пшеницы внутри каждой из групп: дикие сородичи – T.kiharae, T.militinae, интрогрессивные формы – Стекловидная 24 х T.timopheevii, Эритроспермум 350 х T.kiharae, Жетысу х T.militinae, сорта – Стекловидная 24, Жетысу. В фазу налива зерна лидировали по накоплению пролина среди диких сородичей также T.kiharae и добавился Ae.cylindrica, среди интрогрессивных форм удерживала свои позиции Эритроспермум 350 х T.kiharae и выделилась (Бе-зостая 1 х T.militinae) х T.militinae, среди сортов – Стекловидная 24 и Эритроспермум 350. Интрогрессивные формы в фазу налива зерна показали максимальный уровень накопления свободного пролина, среди них выделились Эритроспермум 350 х T.kiharae (82 мг%) и (Бе-зостая 1 х T.militinae) х T. militinae-9 (85 мг%).

Полифункциональный биологический эффект пролина проявляется не только в осморе-

гуляторной и протекторной функциях, но также в антиоксидантной, энергетической и дру-гих, обеспечивающих у растений поддержание клеточного гомеостаза на стадии стресс-реакции и при переходе в новое адаптивное состояние – специализированную адаптацию

[2, 14]. Клеточный метаболизм составляет основу развития адаптивных механизмов, способствующих формированию общей адаптационной способности сельскохозяйственных культур [8, 9, 14, 17].

3 Корневая система

Анализ состояния корневой системы диких, культурных и интрогрессивных форм пшеницы показал, что наблюдалась значительная вариабельность анализируемых растений по изучаемым показателям. На стадии 8–10 дневных проростков наиболее развитой корневой системой с максимальной степенью по 7 из 10 проанализированным признакам выделяется генотип (Безостая 1 х Ae.triaristata) х Карлыгаш; по 4 из 10 признакам выделяются гибрид-ные комбинации: Жетысу х T.timopheevii (длина, площадь, РА и объем корней). По 3 из 10 признакам выделилась форма Жетысу х T.militinae (масса корней, свежих листьев, длина вто-ричных корешков).

Через три недели на уровне фазы кущения - трубкования характеристика корневой сис-темы осуществлена по 12 признакам (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика корневой системы интрогрессивных форм пшеницы (фаза кущения – трубкования), см

Показатель корневой системы	min	max	среднее	Сорт-стандарт Карахан
Длина, см	897,1	1731,4	1348,1	1196,8
Площадь, см^2	146,0	410,6	250,4	184,2
РА, см^2	46,5	130,7	79,7	58,6
Объем, см^3	1,8	8,8	4,0	2,3
Средний диаметр	0,47	0,80	0,58	0,49
Кончики корней	1337,0	3240,5	2265,5	2248
Длина вторичных корешков	7046,5	22702,5	13558,3	9073
Число разветвлений	1333,0	4018,0	2218,4	1639
Масса свежих листьев, г	5,1	14,0	9,1	10,3
Масса сухих листьев, г	0,68	2,45	1,40	1,50
Масса корней, г	2,65	8,56	4,66	3,13
Масса сухих корней, г	0,23	0,81	0,44	0,30

По развитию корневой системы на более поздних стадиях выделяются генотипы (Безостая 1 х *Ae.triaristata*) х Карлыгаш по 9 из 12 признаков, также как и на стадии 8-10 дневных проростков (по 7 из 10) и генотип (Безостая 1 х *T.militinae*) х *T.militinae* (по 10 из 12 признаков).

Известно, что срезание надземной части и анализ впоследствии корневой системы может быть косвенно связан с засухоустойчивостью и является дополнительной характеристикой интенсивности прорастания [6]**.** Считают, что показатель корнеобеспеченности растений в упрощенном виде можно представить также соотношением масс корней и надземной части растений. Степень засухоустойчивости различных видов и сортов растений, в том числе сортов озимой пшеницы, зависит, в первую очередь, от соотношения площадей поверхности корневой системы, поглощающей воду и элементы минерального питания из почвы, и листового аппарата растения, расходующего влагу на транспирацию – от так называемого показателя корнеобеспеченности растений [18].

Срезание надземной части рассматривается как стресс, который индуцирует развитие корне-

вой системы. Следует заметить, что длина вторичных корешков и разветвления характеризуют интенсивность развития корневого роста, свидетельствуют о мощности корневой массы пшеницы, что находит подтверждение в работах [3, 18]. В данной серии опытов отчетливо выделились генотипы (Безостая 1 х *T.militinae*) х *T.militinae-4*; (Безостая 1 х *T.militinae*) х *T.militinae-9* с наиболее развитой вторичной корневой системой. По всем показателям выделяются 2 генотипа с повышенной нормой реакции на стресс: Эритроспермум 350 х *T.kiharae*; Жетысу х *T. militinae*. Они значительно превосходили своих родителей и сорт-стандарт Карахан по массе корней, ветвлению и объему корневой системы.

4 Скрининг засухоустойчивости и показателей продуктивности

Засухоустойчивость и высокая урожайность редко сочетаются в одном генотипе. Для сельскохозяйственных растений принято оперировать понятием агрономической засухоустойчивости, сопряженной с хозяйственной ценностью посевов. Известно, что наиболее выраженная дифференциация между группой засухоустойчивых и менее засухоустойчивых сортов, наблюдается по биомассе растения, массе зерна главного колоса и растения [18, 23, 24]. По утверждению В.А. Драгавцева «масса зерна с растения» – результирующий признак, «число зерен на растении» – первый компонентный признак, закладывается в фазу кущения, а «масса одного зерна» – второй компонентный, формируется в период налива. Если известны лимитирующие факторы среды в период формирования этих признаков, а также адаптивные свойства генотипа, например, географическая точка его возникновения, то можно прогнозировать уровни компонентов и результирующего признака [24]. Для выживания в условиях засухи дикие растения используют сложный комплекс механизмов толерантности, определяющих полевую засуху [21]. Предполагается, что интрогрессивные формы пшеницы будут сочетать толерантность к засухе с продуктивностью и другими хозяйственно-ценными свойствами культурных сортов.

По показателю «масса зерна в главном колосе» в числе лидеров оказалась Стекловидная 24 х *Ae. cylindrica* (7,9 г), что незначительно превысило данный показатель сорта-стандарта Алмалы в 1,3 раза. По другой характеристике структуры урожая «высота растения» выделились Жетысу х *T. timopheevii* (127,8 см) и Безостая 1 х *Ae.cylindrica* (129,3 см), оказавшиеся на уровне сорта Карахан (128,4 см) и выше. Ранее установлено, что «высота растения» и «продуктивная кустистость» могут быть достаточно четкими индикаторами изменчивости внешней среды для озимого ячменя [25].

Наиболее четкие результаты сопряженности с засухоустойчивостью установлены по показателю «масса 1000 зерен». Интрогрессивные формы показали вариабельность в пределах 45,0–61,0 г, наибольшее значение зафиксировано у формы Стекловидная 24 х *Ae.cylindrica* (60,8 г),наименьшее – (Безостая 1 х *Ae.triaristata*) х Карлыгаш (45,0г). Следует отметить, что все испытуемые генотипы с интрогрессией гермоплазмы диких сородичей показали хорошие результаты. По «массе 1000 зерен» 6 интрогрессивных форм превысили сорт-стандарт Алматы (47,2 г), из них 2 интрогрессивные формы оказались выше другого сорта Карахан (52,1 г). В порядке возрастания данного показателя они расположены в последовательности: (Безостая 1 х *T.militinae*) х *T.militinae-4* < Жытысу х *T.timopheevii* < Эритроспермум 350 х *T.kiharae* < Безостая 1 х *Ae.cylindrica* < Жетысу х *T. militinae* < Стекловидная 24 х *Ae.cylindrica*.

Показано, что к признакам, наиболее стабильно проявляющимся у сортов при разных засухах, относятся «масса 1000 зёрен», «высота растения», «масса зерна главного колоса», а также коэффициент хозяйственного использования фотосинтеза, важным для которого является индекс зеленой массы, развитая корневая система [26].

В целом интрогрессивные формы в урожае 2015 года на богаре показали замечательные результаты по продуктивности и слагаемым урожая, проявив хорошую засухоустойчивость. Погодные условия этого года были достаточно благоприятными по водообеспечению, поэтому результаты по структуре урожая интрогрессивных форм, выращенных в условиях полива, имеют расхождения в среднем на 12–15 %. Следует отметить, что в условиях богары более четко прослеживаются преимущества интрогрессивных форм по сравнению с сортом-стандартом по ряду сопряженных с засухоустойчивостью количественных признаков, а также вариабельность их по элементам структуры урожая, что совпадает с выводами [12, 21, 26]. Интрогрессия хромосом чужеродного посредника *Agropyron Г*, *Elymus trachycaulus T5HL5HL*, *El.trachycaulus 5SS* и *Haynaldia villosa 1B* в геном пшеницы *Chinese Spring* положительно сказалась на улучшение структуры урожая [12].

В данной работе адаптационная способность пшеницы к засухе определялась по ключевым физиолого-биохимическим показателям метабо-

лизма – силе ростовых процессов и накоплению биомассы вегетативных органов и корней, интенсивности и направленности окислительно-восстановительных и фотосинтетических процессов, чем достигался интегральный характер исследований.

Полученные результаты по изучению засухоустойчивости интрогрессивных форм пшеницы, ее культурных и диких сородичей позволили:

– определить ряд морфо-физиологических, физиолого-биохимических и селекционно- генетических показателей для характеристики проявления этого признака у растений;

– считать перспективным комплексный подход для определения засухоустойчивости пшеницы, с использованием таких показателей, как накопление зеленой биомассы и хлорофилла в разные фазы вегетации по технологии NDVI, состояние корневой системы, способность к отрастанию корней после срезания вегетативной массы проростков, содержание свободного пролина, «масса 1000 зерен» и другие слагаемые продуктивности;

– выявить перспективные генотипы, сочетающие засухоустойчивость с показателями продуктивности.

Сравнительный анализ вышеназванных показателей в различных сортах и диких сородичах пшеницы, их интрогрессивных формах в условиях засухи является весьма полезным для оценки уровня проявления адаптационных возможностей растений при создании гибридных комбинаций, отборе ценных генотипов по ком-плексу хозяйственно-полезных признаков и свойств.

Работа выполнена по гранту МОН РК 2015-2017гг. по теме «Физиолого-биохимические критерии устойчивости к абиотическим факторам среды генотипов озимой пшеницы диких, культурных и интрогрессивных форм», по заданию 2011/ГФ 4.

Литература

1 Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 398с.

2 Удовенко Г.В. Физиологические механизмы адаптации растений к различным экстремальным условиям // Труды ВНИИ растениеводства по прикладной ботанике, генетике, селекции. – 1979. – Т.64. – №3. – С. 5–22.

3 Fischer R.A. Wheat Physiology: A review of recent developments // Crop and Pasture Science. – 2011. – V.62. – N 2. – P. 95–114.

4 Гродзинский Д.М. Надежность растительных систем. – Киев: Наукова Думка, 1983. – 368 с.

5 Жученко А.А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические аспекты): теория и практика. – М.: Агрорус, 2008. – Т.1. – 814 с.

6 Чикалова В.А., Даскалюк А.П. Ростовая реакция корней на действие теплового шока как показатель теплоустойчивости гексаплоидной пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. – 2013. – Т. 45. – № 1. – С. 70–76.

7 Ivanov L.A., Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Yudin P.K. Changes in the Chlorophyll and Carotenoid Contents in the Leaves of Steppe Plants along a Latitudinal Gradient in South Ural // Russian Journal of Plant Physiology. – 2013. – V.60. – № 6. – P. 812–820.

8 Varga B., Janda T., Laszlo E.,Veisz O. Influence of abiotic stresses on the antioxidant activity system of cereals // Acta Physiologiae Plantarum. – 2007. – V.29. – №.1. – P. 105–129.

9 Hove R.M., Bhave M. Cereals and abiotic stresses: Roles of aquaporins and potential in wheat improvement // Wheat: Genetics, Crops and Food Production. – 2011. – P. 121–151.

10 Kozhahmetov K.K., Abugalieva A.I. Using gene fund of wild relatives for common wheat improvement // International Journal of Biology and Chemistry. – 2014. – №2. – P. 41–43.

11 Yasir Serag Alnor Mohammed, Izzat Sidahmed Ali Tahir, Nasrein Mohamed Kamal, Amin Elsadig Eltayeb, Abdelbagi Mukhtar Ali3, and Hisashi Tsujimoto Impact of wheat-Leymus racemosus added chromosomes on wheat adaptation and tolerance to heat stress // Breeding Science. – 2014. – V.63. – P. 450–460. – DOI:10.1270/jsbbs.63.450.

12 Caiyun Liu A, Zhiyuan Yang A, Xiaojie Chen A, Hisashi Tsujimoto C, and Yin-Gang Hu A Phenotypic effects of additional chromosomes on agronomic and photosynthetic traits of common wheat in the background of Chinese Spring // Crop & Pasture Science. – 2015. – V.66 (Issue1). – P. 32–41. – DOI: 10.1071/CP14024.

13 Третьяков Н.Н. Определение засухоустойчивости растений путем проращивания семян на растворах сахарозы / Практикум по физиологии растений. – М.: Колос, 1982. – С. 235-236.

14 Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil – 1973. – V.39. – P. 205–207.

15 Verhulst N., Govaerts B. The normalized difference vegetation index (NDVI) GreenSeeker TM handheld sensor: Toward the integrated evaluation of crop management. Part A: Concepts and case studies. – Mexico: CIMMYT, 2010. – P. 37–39.

16 Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В., Фаттахова Н.Н. Практикум по физиологии растений. – М.: РГАУ-МСХА им. Тимирязева, 2012. – С. 29–30.

17 Tazhibayeva T., Abugalieva A., Morgunov A., Kozhakhmetov K. Introgressive forms - approach for biotechnology advance of winter wheat on environmental adaptability // 16 th International Scientific Earth & Geoscience Conference SGEM 2016.- June-07 July, 2016, Albena. – Bulgaria. – Conference Proceedings. – Book 6. – V.1. -P.607 – 614. – DOI: 10.5593/SGEM2016/B61/S25.080.

18 Ткачев В.И., Гуляев Б.И. Реакция растений разных сортов озимой пшеницы на кратковременную почвенную засуху //Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42. – № 6. – С. 522–529.

19 Семыкин В.А., Пигорев И.Я.Фотосинтетический потенциал озимой пшеницы в условиях черноземья России // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 2. – С. 42–47.

20 Прядкина Г. А., Стасик О. О., Михальская Л. Н. Швартау В. В. Связь между величиной хлорофилльного фотосинтетического потенциала и урожайностью озимой пшеницы (Ttriticum aestivum L.) при повышенных температурах // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 5.– С. 88–95.

21 Мамадюсуфова М.Г. Особенности биохимических показателей у пшеницы и её диких сородичей, произрастающих в разных зонах Таджикистана. Автореф. дис. … канд. биол. наук. – Душанбе: ТНУ, 2014. – 21 с.

22 Креславский В.Д., Кособрюхова А.А., Шмарев А.Н. Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Голяновская С.А., Романов Г.А. Введение гена PHYB арабидопсиса повышает устойчивость фотосинтетического аппарата трансгенных растений Solanus tuberosum к УФ-облучению // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 2. – С. 167-175. – DOI: 10.7868/S0015330315020116.

23 Крупнов В.А. Засуха и селекция пшеницы: системный подход // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 1. – С. 12–23.

24 Драгавцев В.А. О «пропастях» между генетикой и селекцией растений и путях их преодоления / Идентифицированный генофонд растений и селекция. – СПб.: ВИР, 2005. – С. 13–19.

25 Тажибаева Т.Л., Абугалиева А.И. Распознавание устойчивых к изменениям внешней среды и высококачественных генотипов ячменя // Журнал «Исследования, результаты» (Ізденістер, нэтижелер). – 2010. – № 6. – С. 191–197.

26 Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом Triticum timopheevii на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Том 16. – № 1. – С. 142–158.

References

1 Hochachka P, Somero Dzh (1977) Strategy of biochemical adaptation. M: World [Strategiya biohimicheskoj adaptacii. M: Mir] 398 (In Russian).

2 Udovenko GV (1979) Physiological mechanisms of adaptation of plants to various extreme conditions. Works of the All-Russian Research Institute of crop production on applied botany, genetics, selection [Fiziologicheskie mekhanizmy adaptacii rastenij k razlichnym ehkstremal'nym usloviyam. Trudy VNII rastenievodstva po prikladnoj botanike, genetike, selekcii] 64.N3:5-22 (In Russian).

3 Fischer RA (2011) Wheat Physiology: A review of recent developments. Crop and Pasture Science. 62. N 2: 95–114.

4 Grodzinsky DM (1983) Reliability of vegetable systems. Kiev: Naukova Dumka[Grodzinskij D.M. Nadezhnost' rastitel'nyh system.Kiev: Naukova Dumka] 368 (In Russian).

5 Zhuchenko AA (2008)Adaptive crop production (ecology and genetic aspects): theory and practice.M: Agrorus [Adaptivnoe rastenievodstvo (ehkologo-geneticheskie aspekty): teoriya i praktika.M: Agrorus]1:814 (In Russian).

6 Chikalova VA, Daskalyuk AP (2013) Growth reaction of roots to action of thermal shock as index of thermal stability of geksaploid wheat. Physiology and biochemistry of cultural plants [Rostovaya reakciya kornej na dejstvie teplovogo shoka kak pokazatel' teploustojchivosti geksaploidnoj pshenicy. Fiziologiya i biohimiya kul'turnyh rastenij] 45.N1:70-76 (In Russian).

7 Ivanov LA, Ivanova LA, Ronzhina DA, Yudin PK (2013) Changes in the Chlorophyll and Carotenoid Contents in the Leaves of Steppe Plants along a Latitudinal Gradient in South Ural. Russian Journal of Plant Physiology. 60. N 6: 812–820.

8 Varga B, Janda T, Laszlo E, Veisz O (2007) Influence of abiotic stresses on the antioxidant activity system of cereals. Acta Physiologiae Plantarum. 29. N 1: 105–129.

9 Hove RM, Bhave M (2011) Cereals and abiotic stresses: Roles of aquaporins and potential in wheat improvement. Wheat: Genetics, Crops and Food Production: 121–151.

10 Kozhahmetov KK., Abugalieva AI (2014) Using gene fund of wild relatives for common wheat improvement. International Journal of Biology and Chemistry. N 2: 41–43.

11 Yasir Serag Alnor Mohammed, Izzat Sidahmed Ali Tahir, Nasrein Mohamed Kamal, Amin Elsadig Eltayeb, Abdelbagi Mukhtar Ali3, and Hisashi Tsujimoto (2014) Impact of wheat-Leymus racemosus added chromosomes on wheat adaptation and tolerance to heat stress. Breeding Science. 63: 450–460. DOI:10.1270/jsbbs.63.450.

12 Caiyun Liu A, Zhiyuan Yang A, Xiaojie Chen A, Hisashi Tsujimoto C, and Yin-Gang Hu A (2015) Phenotypic effects of additional chromosomes on agronomic and photosynthetic traits of common wheat in the background of Chinese Spring Crop & Pasture Science.66 (Issue1): 32–41. DOI: 10.1071/CP14024.

13 Tretyakov NN (1982) Definition of drought resistance of plants by growing up of seeds on solutions a sucrose.Workshop on physiology of plants. M: Ear [Opredelenie zasuhoustojchivosti rastenij putem prorashchivaniya semyan na rastvorah saharozy. Praktikum po fiziologii rastenij. M: Kolos] 235 – 236 (In Russian).

14 Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil.39: 205 – 207.

15 Verhulst N, Govaerts B (2010) The normalized difference vegetation index (NDVI) GreenSeeker TM handheld sensor: Toward the integrated evaluation of crop management. Part A: Concepts and case studies. Mexico: CIMMYT. 37 – 39.

16 Panfilova OF, Pilshchikova NV, Fattakhov NN (2012) Workshop on physiology of plants. M: RGAU-MSHA of Timiryazev. 29 – 30 (In Russia).

17 Tazhibayeva T, Abugalieva A, Morgunov A, Kozhakhmetov K (2016) Introgressive forms - approach for biotechnology advance of winter wheat on environmental adaptability. 16 th International Scientific Earth & Geoscience Conference SGEM.June-07 July, 2016, Albena. Bulgaria. Conference Proceedings. Book 6:607 – 614. DOI: 10.5593/SGEM2016/B61/S25.080.

18 Tkachyov VI, Gulyaev BI (2010) Reaction of plants of different grades of winter wheat to a short-term soil drought.Physiology and biochemistry cultivars [Reakciya rastenij raznyh sortov ozimoj pshenicy na kratkovremennuyu pochvennuyu zasuhu. Fiziologiya i biohimiya kul't. rastenij]42.N 6: 522-529(In Russia).

19 Semykin VA, Pigorev IYa (2007) Photosynthetic potential of winter wheat in the conditions of the Black Earth of Russia. Basic researches [Fotosinteticheskij potencial ozimoj pshenicy v usloviyah chernozem'ya Rossii. Fundamental'nye issledovaniya] 2:42-47(In Russia).

20 Pryadkina GA, Stasik OO, Mikhalskaya LN, Shvartau VV(2014) Communication between the size of chlorophyll photosynthetic potential and productivity of winter wheat (Ttriticum aestivum L.) at high temperatures. Agricultural biology [Svyaz' mezhdu velichinoj hlorofill'nogo fotosinteticheskogo potenciala i urozhajnost'yu ozimoj pshenicy (Ttriticum aestivum L.) pri povyshennyh temperaturah . Sel'skohozyajstvennaya biologiya] 5: 88-95 (In Russia).

21 Mamadyusufova M G (2014) Features of biochemical indexes at wheat and its wild relatives growing in different zones of Tajikistan. Autoref. Theses.Cand. Biol. Sci. Dushanbe: TNU [Osobennosti biohimicheskih pokazatelej u pshenicy i eyo dikih sorodichej, proizrastayushchih v raznyh zonah Tadzhikistana. Avtoref. dis.… kand. biol. nauk. Dushanbe: TNU] 21 (In Russia).

22 Kreslavsky VD, Kosobryukhova AA, Shmarev AN, Aksenov NP, Konstantinov TN, Golyanovskaya SA, Romanov G A (2015) Introduction of a gene of PHYB of an arabidopsis increases stability of the photosynthetic device of transgene plants of Solanus tuberosum to UF-radiation. Plant Physiology [Vvedenie gena PHYB arabidopsisa povyshaet ustojchivost' fotosinteticheskogo apparata transgennyh rastenij Solanus tuberosum k UF-oblucheniyu.Fiziologiya rastenij] 62. N 2: 167-175.DOI: 10.7868/S0015330315020116 (In Russia).

23 Krupnov VA (2011) Drought and breeding of wheat: systems approach. Agricultural biology [Zasuha i selekciya pshenicy: sistemnyj podhod . Sel'skohozyajstvennaya biologiya] 1: 12-23 (In Russia).

24 Dragavtsev VA (2005) About "abysses" between genetics and breeding of plants and paths of their overcoming .The Identified gene pool of plants and selection. SPb: VIR [Zasuha i selekciya pshenicy: sistemnyj podhod . Sel'skohozyajstvennaya biologiya. SPb: VIR] 13-19 (In Russia).

25 Tazhibayeva TL, Abugaliyeva AI (2010) Detection of resistance against changes of the environment and high-quality genotypes of barley.Researches, Results (Izdenister, netizheler) [Raspoznavanie ustojchivyh k izmeneniyam vneshnej sredy i vysokokachestvennyh genotipov yachmenya. Zhurnal «Issledovaniya, rezul'taty» (Izdenister,nehtizheler)] 6:191-197(In Russia).

26 Timonova EM, Leonova IN, Belan IA, Rosseeva LP, Salina EA (2012) Influence of certain sites of chromosomes of Triticum timopheevii on formation of resistance to diseases and the quantitative signs of the common wheat.Vavilov's journal of genetics and selection [Vliyanie otdel'nyh uchastkov hromosom Triticum timopheevii na formirovanie ustojchivosti k boleznyam i kolichestvennye priznaki myagkoj pshenicy. Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii] 16. N1:142–158 (In Russia).

3-бөлім

АДАМ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР ФИЗИОЛОГИЯСЫ МЕН БИОХИМИЯСЫ

Раздел 3

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Section 3

HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

[1]Кайрат Б.К., [1]Жумалиева Г.Т., [1]Оразова С.Б., [1]Шалгимбаева С.М., [2]Койшибаева С.К.

[1]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Казахстан, г. Алматы

Влияние различных условий аквакультивирования на некоторые биохимические показатели молоди тилапии

Эффективность товарного рыбоводства во многом зависит от состояния и качества получаемой молоди. При современных методах рыборазведения складываются условия, отличающиеся от естественных и влияющие на физиологическое состояние и некоторые биологические особенности рыбы, что требует постоянного контроля за процессом выращивания, оценки физиологического состояния и, при необходимости, его корректировки. Исследования биохимических показателей являются одними из основных индикаторов физиологического состояния рыб. Целью работы являлось изучение влияния состава различных продукционных кормов отечественного и импортного производства, и условий выращивания (прямоток и замкнутое водоснабжение) на биохимические показатели печени и состав мышечной ткани молоди тилапии (р. Oreochromis). Биохимические исследования проводили каждые 15 суток, в течение 30 суток культивирования. Установлено, что в применение отечественных кормов способствовало накопление липидов в печени и усилению перекисного окисления липидов. На активность аланинаминотрансферазы в микросомальной фракции печени оказал влияние тип культивирования. Содержание общих белков в мышечных тканях молоди тилапии также зависело от типа культивирования.

Ключевые слова: молодь, тилапия, микросомальная фракция печени, малоновый диальдегид, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, биохимический состав спинных мышц.

---

[1]Kairat B., [1]Zhumalieva G., [1]Orazova S., [1]Shalgimbaeva S., [2]Koishybayeva S.

[1]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[2]Kazakh Research Institute of Fishery, Kazakhstan, Almaty

Influence of different aquaculture conditions on some biochemical indices of juvenile tilapia

Commercial fish farming efficiency largely depends on the condition and quality of recruits received. With modern methods of fish breeding conditions are emerging from a natural and affecting physiological condition and some biological features of fish. This, requires constant monitoring of the process of growing, evaluation of the physiological state and its adjustment. Until recently evaluated, mainly morphological and physiological, histological and hematologic indicators, however, studies of biochemical indicators are one of the main indicators of physiological status of fish. The aim of the research was to study the influence of various forage production of domestic and foreign manufacture, and growing conditions (direct and confined water) on biochemical indices of liver and muscle composition of juvenile tilapia Oreochromis. Biochemical studies conducted every 15 days, within 30 days of cultivation. It has been established that the application of domestic feed contributed to the accumulation of lipids in the liver and increased lipid peroxidation. Alanine aminotransferase activity in liver microsomal fraction was influenced by the type of cultivation. The content of common proteins in muscle tissue of juvenile tilapia also depended on the type of cultivation.

Key words: juvenile, tilapia, microsomal fraction of liver, malon dialdehyde, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, biochemical composition of the dorsal muscles.

---

[1]Қайрат Б.Қ., [1]Жұмалиева Ғ.Т., [1]Оразова С.Б., [1]Шалғымбаева С.М., [2]Қойшыбаева С.Қ.

[1]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Қазақ балық шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

Тиляпия шабақтарының кейбір биохимиялық көрсеткіштеріне әртүрлі аквакультура жағдайларының әсері

Тауарлық балық өсірудің тиімділігі көпшілік жағдайда алынатын шабақтардың сапасы мен күйіне байланысты. Балық өсірудің қазіргі заманғы әдістері табиғи ортамен салыстырғанда өзгеше жағдайлар жасайтындықтан ол балықтың кейбір биологиялық ерекшеліктері мен физиологиялық күйінде өзіндік із қалдырады. Бұл өз кезегінде балық өсіру процесін үнемі бақылауды, балықтардың физиологиялық жағдайын бағалап, керек кезінде оны түзетуді қажет етеді. Биохимиялық көрсеткіштерді зерттеу кәсіптік маңызы бар, себебі балықтардың физиологиялық жағдайын бағалауда негізгі индикаторларының бірі болып табылады. Жұмысымыздың мақсаты: тиляпия (Oreochromis туысы) шабақтарының бұлшық ет ұлпасының құрамы мен бауырының биохимиялық көрсеткіштеріне отандық және шетелдік өнімдік жемдердің құрамы мен өсіру жағдайларының (ағынды және тұйық жүйелі сумен қамтамасыз ету қондырғысы) әсерін зерттеу. Биохимиялық зерттеулер әр 15 тәулік сайын, 30 тәулік өсіру мерзімінде жүргізілді. Отандық жемдерді қолдану бауырда липидтердің жинақталуына және липидтердің асқын тотығуының күшеюіне әкелетіндігі анықталды. Тиляпия шабақтарының бұлшық ет ұлпасындағы жалпы белоктардың мөлшері де өсіру жағдайларына тәуелді болды.

Түйін сөздер: шабақтар, тиляпия, бауырдың микросомалық фракциясы, малон диальдегиді, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, арқа бұлшық еттерінің биохимиялық құрамы.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 577.11

[1]Кайрат Б.К., [1]Жумалиева Г.Т., [1*]Оразова С.Б., [1]Шалгимбаева С.М., [2]Койшибаева С.К.

[1]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: Saltanat.Orazova@kaznu.kz

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ АКВАКУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОДИ ТИЛАПИИ

В течение последних десятилетий аквакультура стала одним из быстро развивающихся направлений производства пищевой-продукции и играет большую роль в экономическом развитии многих стран. По темпу прироста продукции одно из первых мест занимают тиляпии. Если в 1974 г. мировое производство тилапии составляло около 300 тыс. тонн, то в 1990 г. оно достигло 800 тыс. тонн, а в 2005 г. выросло еще вдвое и превысило 1,6 млн. тонн.Согласно прогнозам экспертов, в 2016 г. мировое производство тилапии составит около 5,5 млн тонн, по сравнению с 5,339 млн тонн в 2015 г. [1].

Столь быстрое распространение тиляпии в мировой аквакультуре и значительный рост ее производства объясняется рядом ценных биологических особенностей и хозяйственно-полезных качеств, которые свойственны этим рыбам.Обладая ценными рыбоводными качествами – легкостью воспроизводства, быстрым ростом, высокой жизнеспособностью, широкой экологической пластичностью, отличными пищевыми качествами тиляпии представляют безусловный интерес и для аквакультуры Казахстана [2].

Следует отметить, что тиляпии являются не только перспективным объектом аквакультуры, но и в силу ряда особенностей биологии служат прекрасным модельным объектом для экспериментальных исследований.Тиляпии относятся к рыбам с непрерывным типом размножения, и при наличии оптимальных условий содержания нерест у них проходит регулярно с интервалом 45-60 суток. Раннее половое созревание (3-7 мес.), а также возможность круглогодичного получения потомства при культивировании в условиях рециркуляционных систем, сделали тиляпию незаменимой при изучении влияния различных экстремальных воздействий на гаметогенез, рост, развитие и выживаемость рыбы [3].

Природно-климатические условия нашей страны исключают возможность культивирования тиляпии в естественных водоемах. Возможной производственной базой могут служить водоемы-охладители при промышленных предприятиях и электростанциях, пруды, снабжаемые геотермальной водой, и рыбоводные установки с замкнутым циклом водоиспользования. Выращивание рыбы с внедрением новых ин-

дустриальных технологий позволяет получать экологически чистую продукцию при экономном расходовании земельных и водных ресурсов.

Успешная разработка интенсивных технологий выращивания отдельных видов тиляпий связана с необходимостью всестороннего изучения их биологических особенностей и адаптационных возможностей в зависимости от различных биотических и абиотических факторов [2, 3].

Условия современных методов рыборазведения отличаются от естественных, что отражается на физиологическом состоянии и некоторых биологических особенностях рыбы. Это требует постоянного контроля за процессом выращивания, оценки физиологического состояния и, при необходимости, его корректировки. Исследования биохимических показателей являются одними из основных индикаторов физиологического состояния промысловых рыб [4].

Цельданной работы заключалась в изучении влияния состава различных продукционных кормов и условий выращивания на биохимические показатели печени и состав мышечной ткани молоди тиляпии.

Материалы и методы

Объектом исследований являлась молодь тилапиир. *Oreochromis*, выращенной с исполь-зованием разных кормов и технологий на базе РГКП «Капшагайское нерестово-вырастное хозяйство» (Алматинская обл., Казахстан) (таблица 1). Отбор аналитического материала проводили каждые 15 суток, в течение 30 суток культивирования. В качестве контроля использовали пробы, взятые в начале эксперимента. Повторность пятикратная.

Каждую особь после вылова измеряли, взвешивали, затем препарировали.Образцы печени и спинных мышц замораживали в жидком азоте при -196 °С и хранили в сосуде Дюара для дальнейшей транспортировки.

Таблица 1 – Морфометрические показатели молоди тилапии, использованной в эксперименте

Тип аквакультуры	Вид корма	Дата отбора	Масса, г		Длина, см		$Q_{печени}$
			Q	q	L	l	
бассейновая технология, прямоток	контроль	1 отбор	30,5±2,3	26,6±3,6	12,5±1,1	10,3±0,9	0,53±0,3
	КазНИИ ППП	2 отбор	41,8±2,6	34,9±2,6	13,7±0,2	11,2±0,3	1,76±0,4
		3 отбор	61,±1,9	52,9±1,7	15,6±0,4	13,2±0,1	1,57±0,47
	Карагандинский	2 отбор	36,5±2,1	28,8±1,6	12,6±0,7	10,4±0,6	2,45±0,5
		3 отбор	59,5±3,3	49,5±3,8	15,2±0,6	12,6±0,5	3,27±0,7
	Aller aqua	2 отбор	56,2±1,8	46,7±4,3	14,9±1,0	12,4±0,9	2,56±0,4
		3 отбор	69,5±1,1	58,8±3,7	15,7±1,1	13,1±0,8	2,67±0,5
бассейновая технология, УЗВ	КазНИИ ППП	2 отбор	44,±1,6	37,7±1,4	13,83±0,3	11,3±0,3	1,94±0,01
		3 отбор	58,9±4,3	50,4±4,1	14,9±0,6	12,56±0,6	1,45±0,1
	Карагандинский	2 отбор	32,0±1,1	26,41±3,4	11,67±1,4	9,6±1,3	2,01±0,04
		3 отбор	65,9±7,4	55,38±4,4	15,63±0,7	13,03±0,7	3,17±0,07
	Aller aqua	2 отбор	36,6±1,7	28,9±2,6	12,28±1,1	10,04±0,9	0,76±0,09

Сухое вещество определяли гравиметрическим методом, для этого пробы высушивали в сушильном шкафу 2 часа при температуре 105°С до постоянной массы, взвешивали, после чего сжигали в муфельной печи при температуре 500°С в течение 1 часа и снова взвешивали с абсолютной погрешностью не более 0,001 г. По разнице масс определяли в процентах массу органического вещества [5].

Определение массовой доли белка проводили биуретовым методом без минерализации проб [10].Оптическую плотность растворов из-

меряли на спектрофотометре Jenway 6405 UV/Vis (Jenway, Великобритания) в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 546 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы (дистиллированная вода). Расчет вели по калибровочному графику, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (PAALaboratories, Австрия).

Содержания гликогена определяли с антроном и фотометрировали при 620 нм [6]. Расчет вели по калибровочному графику, в качестве стандарта использовали глюкозу. Найденное количество глюкозы умножали на коэффициент 0,9, т.к. молекулярный вес глюкозного остатка в гликогене равен 162, а молекулярный вес глюкозы 180.

Массовую долю жира определяли ускоренным экстракционно-весовым методом института питания АМН СССР. Метод основан на растворении липидов бинарной смесью органических растворителей (хлороформ-этанол, 2:1), отделении растворителей и весовом определении массы липидов [7].

Активности АсАТ и АлАТ в микросомальной фракции печени [8] проводили динитрофенилгидрозоновым методом Рейтмана-Френкеля [9], где оптическую плотность измеряли при 537 нм против холостой пробы, которую ставили, как опыт, но сыворотку добавляли после инкубации. Расчет активности ферментов в сыворотке крови проводили по калибровочному графику.

Содержание малонового диальдегида определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, где образовавшийся окрашенный триметиновый комплекс, имеет максимум поглощения при 532 нм. При расчете использовал и коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса – $1,56 \cdot 10^5$ [9].

Результаты и их обсуждение

Биохимический анализ печени молоди тилапии при различных условиях выращивания

Для оценки биохимического состояния печени была получена микросомальная фракция, в которой определено содержание общего белка, активность таких ферментов как аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза, а также количество общих липидов, гликогена, уровень перекисного окисления липидов в печеночной ткани.

Таблица 2 – Содержание гликогена, общих липидов ималонового диальдегида в печени молоди тилапии при различных условиях выращивания

Тип аквакультуры	Вид корма	Отбор	Содержание гликогена, мг/г сырой массы	Содержание общих липидов, мг/ г сырой массы	Содержание МДА, мкМоль/ г сырой массы
бассейновая технология, прямоток	контроль	1	5,54±0,6	75,6±0,8	9,5±0,5
	КазНИИ ППП	2	8,19±0,02	217,5±2,1	2,5±0,7
		3	25,05±2,1	195,2±1,1	10,7±1,3
	Карагандинский	2	3,17±1,1	219,4±3,8	6,2±0,1
		3	24,65±1,5	267,8±1,2	11,4±1,7
	Aller aqua	2	2,94±0,06	126,7±1,9	2,3±0,5
		3	27,52±1,4	138,9±1,3	3,8±0,3
бассейновая технология, УЗВ	КазНИИ ППП	2	3,07±0,1	169,7±1,8	4,9±0,3
		3	19,70±1,21	167,5±1,9	5,9±0,2
	Карагандинский	2	3,91±0,04	212,2±2,8	9,4±0,6
		3	22,02±1,6	225,1±2,2	7,7±0,2
	Aller aqua	2	29,27±1,2	235,6±2,3	2,4±0,1

Из данных таблицы 2 видно, что с увеличением срока культивирования содержание гликогена в печени молоди тилапии при бассейновой технологии повышается, к примеру,

при использовании корма, разработанного сотрудниками КазНИИ ППП, с 5,54±0,6 до 25,05±2,1мг/г сырой массы, а в установках замкнутого водоснабжения до 19,70±1,21мг/г сырой массы.Использование в рационе импортных кормов фирмы «Aller aqua» приводило к повышению концентрации гликогена до 29,27±1,2мг/г сырой массы при замкнутом водоснабжении уже к 15 суткам выращивания. На содержание гликогена в печени молоди телапии вид применяемого корма не оказал достоверного влияния.

Липиды в организме рыб являются важнейшим источником энергии, обеспечивающим различные ответственные моменты их жизнедеятельности [10]. Содержание и состав липидов в органах и тканях рыб зависят как от физиологического состояния их организма [11], так и от различных факторов водной среды [12].

Из трех использованных кормов накоплению липидов в печени способствовало применение карагандинского корма, к примеру, при прямоточной технологии масса липидов составила 267,8±1,2мг/ г сырой массы к 30 суткам эксперимента, что в 1,4 раза больше, чем при кормлении кормом, разработанного КазНИИ ППП и в 1,9 раза больше значения при корме фирмы «Aller aqua».

Среди многочисленных показателей липидного обмена процессы перекисного окисления липидов играют важную роль не только в физиолого-биохимическом гомеостазе нормальной клетки, но и выступают как универсальное неспецифическое звено механизма развития различных патологических состояний организма [11].

Наибольшее количество МДА обнаружено в печени тилапии при прямоточной бассейновой технологии выращивания с применением карагандинского корма – 11,4±1,7мкМоль/ г сырой массы, наименьшее на УЗВ с кормом «Aller aqua» – 2,3±0,5мкМоль/ г сырой массы.

Повышение концентрации малонового диальдегида свидетельствует об активации процессов перекисного окисления липидов или о снижении антиоксидантной защиты организма [10].

Аминотрансферазы играют ключевую роль в обмене веществ, объединяя в единое целое белковый, углеводный, жировой обмен и цикл трикарбоновых кислот. Учитывая исключительную роль аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) в обмене основных метаболитов клетки, активность этих ферментов используют в качестве биохимического индикатора физиологического статуса и клинического индикатора стрессового состояния, вызванного заболеванием или интоксикацией у ряда организмов, в том числе и у рыб [13].

В таблице 4 представлены результаты анализа содержания общего белка и аминотрансферазной активности в микросомальной фракции молоди рыб, выращенных при различных условиях.

Таблица 3 – Содержание общего белка и аминотрансферазная активностьв микросомальной фракции печени молоди рыб при различных условиях выращивания

Тип аквакультуры	Вид корма	Отбор	Содержание белка, мг/ г сырой массы	Активность АлАТ, мкмоль/ с×мг белка	Активность АсАТ, мкмоль/ с×мг белка
бассейновая технология, прямоток	контроль	1	4,87±1,8	1,95±0,06	0,64±0,06
	КазНИИ ППП	2	1,84±0,15	1,58±0,03	0,44±0,01
		3	2,85±0,11	0,33±0,06	0,26±0,02
	Карагандинский	2	2,64±0,09	0,68±0,03	0,42±0,04
		3	4,17±0,21	0,56±0,03	0,26±0,01
	Aller aqua	2	1,68±0,16	0,54±0,01	0,54±0,05
		3	2,54±0,02	1,03±0,05	0,43±0,03
бассейновая технология, УЗВ	КазНИИ ППП	2	3,24±0,27	0,29±0,01	0,68±0,03
		3	2,37±0,18	0,33±0,01	0,48±0,02
	Карагандинский	2	1,74±0,11	1,55±0,02	0,6±0,07
		3	2,93±0,25	0,58±0,01	0,45±0,03
	Aller aqua	2	2,85±0,01	1,42±0,03	0,49±0,02

Содержание белка в микросомальной фракции печени молоди телапии снижалось на первых этапах эксперимента независимо от вида применяемого корма, при прямоточной бассейновой технологии с кормом, разработанном в КазНИИ ППП, количество общих белков снизилось с 4,87±1,8 до 1,84±0,15мг/ г сырой массы.

Установлено, чтонаактивность АлАТв микросомальной фракции печени тилапииоказал влияние тип культивирования, так, при использовании в рационе корма, разработанного в КазНИИ ППП, к 15 суткам выращивания активность фермента составила 1,58±0,03при прямоточной выращивании, а в условиях УЗВ 0,29±0,01мкмоль/с×мг белка, что 5,4 раза меньше. Аналогичная картина характерна и для АсА, где активность фермента оказалась выше в пробах из молоди, выращенной при замкнутом водоснабжении. К примеру, при кормлении карагандинскими кормами в прямоточных бассейнах к 30 суткам аквакультуры активность равнялась 0,26±0,01, а в установках с замкнутым водоснабжении – 0,45±0,03мкмоль/с×мг белка.

Аминотрансферазы не обладают органной специфичностью, однако определение их активности в крови используется для диагностики болезней печени и сердца при которых происходит распад клеток. К примеру, при цитолизе гепатоцитов в несколько раз повышается активность не только аланинаминотрансферазы, но и аспартатаминотрансферазы [13].

Влияние состава различных продукционных кормов и условий выращивания на химический состав мышечной ткани молоди тилапии

Был проведен анализ химического состава спинных мышц: содержание сухого вещества и золы (таблица 5), содержание общего белка (без минерализации), общих липидов и гликогена (таблица 6).

Определение массовой доли влаги и содержание органического вещества являются важными сравнительными биохимическими показателями.

Таблица 4 – Содержание сухих, зольных и органических веществ в спинных мышцах молоди тилапии при различных условиях выращивания

Тип аквакультуры	Вид корма	Отбор	Массовая доля сухих веществ, %	Массовая доля зольных веществ, %	Массовая доля органических веществ, %
бассейновая технология, прямоток	контроль	1	20,3	1,22	19,1
	КазНИИ ППП	2	22,4	0,9	21,5
		3	21,3	1,12	20,2
	Карагандинский	2	22,7	0,90	21,8
		3	22,8	1,39	21,4
	Aller aqua	2	22,7	1,32	21,4
		3	22,6	1,26	21,3
бассейновая технология, УЗВ (КНВХ)	КазНИИ ППП	2	22,9	1,12	21,8
		3	22,8	1,40	21,4
	Карагандинский	2	22,4	1,19	21,2
		3	19,1	1,37	17,7
	Aller aqua	2	21,8	1,33	20,5

Сравнительно высокое содержание органических веществ в мышцах тилапии отмечено при прямоточном выращивании, среднее значение равнялось 21,3 %, на УЗВ – 20,5 %. Содержание общих белков в мышечных тканях молоди тилапии зависело от типа культивирования, так, при прямоточном выращивании с экспериментальными кормами КазНИИ ППП конечные значения составили 24,2±0,01, а в установках с замкнутым водоснабжением 22,7±0,04 г/ 100 г сырой массы.

Таблица 5 – Содержание общего белка, липидов, гликогенав спинных мышцах рыбпри различных условиях выращивания

Тип аквакультуры	Вид корма	Отбор	Содержание белка, г/ 100 г сырой массы	Содержание липидов, г/ 100 г сырой массы	Содержание гликогена, г/ 100 г сырой массы
бассейновая технология, прямоток	контроль	1	12,4±0,01	1,8±0,04	1,54±0,06
	КазНИИ ППП	2	14,9±0,02	2,6±0,02	1,13±0,1
		3	24,2±0,01	1,7±0,03	1,95±4,19
	Карагандинский	2	15,4±0,04	3,1±0,09	0,97±0,02
		3	24,6±0,01	2,6±0,01	0,96±0,05
	Aller aqua	2	10,6±0,02	2,9±0,02	0,76±0,07
		3	24,3±0,02	2,9±0,04	0,49±0,01
бассейновая технология, УЗВ	КазНИИ ППП	2	14,1±0,04	2,4±0,04	1,49±0,02
		3	22,7±0,04	2,4±0,07	1,19±0,09
	Карагандинский	2	10,1±0,03	1,8±0,03	1,75±0,07
		3	21,4±0,01	1,5±0,06	1,58±0,05
	Aller aqua	2	21,0±0,01	2,2±0,04	0,80±0,07

Влияние технологии выращивания заметно при использовании карагандинского корма для молоди телапии, при прямоточной технологии содержание гликогена равнялось 0,97±0,02 г/ 100 г сырой массы, а на установках замкнутого водоснабжения – 1,75±0,07 г/ 100 г сырой массы, т.е. почти в 2 раз больше. Можно отметить влияние способа выращивания молоди тилапии на содержание общих липидов в спинных мышцах при применении карагандинского корма, при прямотоке количество жиров равнялось 0,97±0,02 г/ 100 г сырой массы, а на УЗВ 1,75±0,07 г/ 100 г сырой массы.

Таким образом, на биохимический состав

В последние годы во всем мире товарное рыбоводство вызывает повышенный интерес. Сегодня наиболее перспективными считаются интенсивные технологии выращивания рыб, которые позволяют значительно повысить выход готовой продукции с единицы площади и дают возможность контроля и управления качеством среды и кормов, режимом кормления. Однако высокие плотности посадки, искусственное кормление нередко оказывают негативное влияние на организм рыб, и, вследствие этого, ухудшается их физиологическое состояние. В связи с этим проведение регулярного контроля за физиологическим состоянием рыб должно быть необходимым элементом технологии их выращивания в индустриальных хозяйствах. В качестве информативных показателей, характеризующих физиологическое состояние рыбы, сможет выступить состав ее биологических жидкостей: крови и слизи. Известно, что гематологические параметры и биохимический состав крови отражают высокоспециализированные механизмы адаптации организма к условиям выращивания.

Литература

1 Привезенцев Ю.А. Тиляпии (систематика, биология, хозяйственное использование). – М.: МСХ РФ, 2008. – 355 с.

2 Жигин А.В. Пути и методы интенсификации выращивания объектов аквакультуры в установках с замкнутым водоиспользованием. Автореф. дис. д. с-х наук. МСХА., 2002. – 32 с.

3 Лаврентьева Н.М. Биологические особенности и хозяйственно-полезные качества голубой тиляпии (Oreochromis aureus) при выращивании в системе с замкнутым циклом водоснабжения: Автореф. дис. канд. биол. наук.-М.: РГАЗУ, 2002.

4 Adams S. M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine system./ S. M. Adams // Marine Pollution Bulletin. – 2005. – Vol. 51 (8–12). – P. 649–657.

5 Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – Москва: Колос, 2001. – 376 с.

6 Практикум по биохимии /Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – 2 изд. – М.: Изд.МГУ, 1989. – 509 с.

7 ГОСТ 7686-35 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – Москва, 1985

8 Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. – Издательство: МИА, 2012. – 384 с.

9 Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / под ред. проф. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.

10 Шатуновский М. И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. – М.: Наука, 1980. – 283 с.

11 Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. – Л.: Наука, 1983. – 240 с.

12 Лукьяненко В. И. Общая ихтиотоксикология. – М.: Легкая и пищ. промышленность, 1983. – 320 с.

13 Самсонова М.В. Аланин- и аспартатаминотрансферазы как индикаторы физиологического состояния рыб // Автореф. дис. … канд. биол. наук. – Москва, 2002. – 26 с.

References

1 Privezentsev YA (2008) Tilapia (systematics, biology, management) [Tilyapii (sistematika, biologiya, khozyaystvennoye ispol'zovaniye)]. MA RF, Moscow, Russia, pp. 355. (In Russian)

2 Zhigin AV (2002) Ways and means of intensifying the cultivation of aquaculture facilities in installations with closed water supply[Puti i metody intensifikatsii vyrashchivaniya ob"yektov akvakul'tury v ustanovkakh s zamknutym vodoispol'zovaniyem]. Abstract of DSc thesis of agricultural sciences, Moscow, Russia, pp. 32. (InRussian)

3 Lavrenteva NM (2002) Biological characteristics and economically useful quality Blue tilapia (Oreochromis aureus) when grown in a closed loop water system [Biologicheskiye osobennosti i khozyaystvenno-poleznyye kachestva goluboy tilyapii (Oreochromis aureus) pri vyrashchivanii v sisteme s zamknutym tsiklom vodosnabzheniya]. Abstract of PhD Tesis of biol. Sciences, Moscow, Russia, pp. 118. (In Russian)

4 Adams SM (2005) Assessing cause and effect of multiple stressors on marine system,Marine Pollution Bulletin, 51(8-12):649-657.

5 Antipova LV, Glotovo IA, Rogov IA (2001) Research methods of meat and meat products [Metody issledovaniya myasa i myasnykh produktov]. Kolos, Moscow, Russia, pp. 376. (InRussian)

6 SeverinSE, SolovievaGA (1989) Practicum in biochemistry [Praktikum po biokhimii]. MSU, Moscow, USSR, pp. 509. (In Russian)

7 SS 61-2003. Fish, marine mammals, marine invertebrates and their by-products. Methods of analysis [Ryba, morskiye mlekopitayushchiye, morskiye bespozvonochnyye i produkty ikh pererabotki. Metodyanaliza]. Moscow, USSR, 1989. (In Russian).

8 Stroyev EA, Makarov VG (2012) Practicum in biological chemistry [Praktikum po biologicheskoy khimii]. MIA, Moscow, Russia, pp. 384. (InRussian)

9 KondrahinIP (2004) Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics:Laboratory manual [Metody veterinarnoy klinicheskoy laboratornoy diagnoctiki]. KolosS,Moscow, Russia, pp. 520. (InRussian)

10 Shatunovskii MI (1980) Ecological regularities of the metabolism of marine fish [Ekologicheskiye zakonomernosti obmena veshchestv morskikh ryb]. Nauka, Moscow, USSR, pp. 283. (In Russian)

11 Sidorov VS (1983) Environmental biochemistry of fishes. Lipids [Ekologicheskaya biokhimiya ryb. Lipidy]. Nauka, Leningrad, USSR, pp. 240. (In Russian)

12 Lukyanenko VI (1983) General ichthyotoxycology [Obshchaya ikhtiotoksikologiya]. Light and food industry, Moscow, USSR, pp. 320. (In Russian)

13 Samsonova MV (2002) Alanine and aspartate aminotransferase as indicators of physiological status of fish [Alanin- i aspartataminotransferazy kak indikatory fiziologicheskogo sostoyaniya ryb]. Abstract of PhD Tesis of biol. Sciences, Moscow, Russia, pp. 26. (In Russian)

4-бөлім

МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА

Раздел 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

Section 4

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Атамбаева Ш.А.,
Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е.

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Гены, связанные с развитием сердечно-сосудистых заболеваний

Проведен поиск генов-кандидатов, связанных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, артериальная гипертензия, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, метаболический синдром. Созданные базы данных по генам, связанных с развитием данных заболеваний, проанализированы в сравнительном аспекте. Показано, что некоторые из генов участвуют в развитии всех указанных выше заболеваний (AGTR1, ALDH2, APOE, ICAM1, IGF1, LPL, MTHFR, PON1, SERPINE1, TGFB1, VEGFA). Некоторые гены участвуют в развитии только одной формы сердечно-сосудистых заболеваний (ACSL1, ADTRP, AKT1, ALMS1, ANXA5, AQP2, AR, ATP2B1, CASZ1, CDH13, CELSR2, CFTR, CTSL, CUL7, DAP, DYRK1B, FIGN, FN1, FOS, FTO, GSN, HDAC9, ICOS, INPPL1, JAK2, LPIN1, MKKS, EDD4L, NFE2L2, PRL, SMTN, SOCS1, SOCS3, UMOD, WNT5A). Полученные результаты служат основой для выявления генов, экспрессия которых зависит от действия microRNA. Исследования по выявлению ассоциаций генов-кандидатов как мишеней microRNA имеют большое значение, поскольку низкомолекулярные RNA селективно регулируют экспрессию практически всех генов человека и могут как вызвать заболевание, так и использоваться в терапии и диагностике этих заболеваний.

Ключевые слова: атеросклероз, артериальная гипертензия, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, метаболический синдром, ген, диагностика.

Atambayeva S.A.,
Ivashchenko A.T., Niyazova R.Y.

Biology and biotechnology problems scientific-research institute of the al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

The genes associated with the development of cardiovascular diseases

Candidate genes associated with the development of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, myocardial infarction, coronary heart disease, metabolic syndrome are searched. A created database of the genes, associated with the development of these diseases have been analyzed in a comparative aspect. It has been shown that some of the genes involved in the development of all the forms of cardiovascular disease (AGTR1, ALDH2, APOE, ICAM1, IGF1, LPL, MTHFR, PON1, SERPINE1, TGFB1, VEGFA). It was also shown that there are genes are involved in the development of only some one form of cardiovascular disease (ACSL1, ADTRP, AKT1, ALMS1, ANXA5, AQP2, AR, ATP2B1, CASZ1, CDH13, CELSR2, CFTR, CTSL, CUL7, DAP, DYRK1B, FIGN, FN1, FOS, FTO, GSN, HDAC9, ICOS, INPPL1, JAK2, LPIN1, MKKS, EDD4L, NFE2L2, PRL, SMTN, SOCS1, SOCS3, UMOD, WNT5A). These results provide the basis for identifying genes, whose expression is dependent on the action of microRNA, since research on the identification of associations of these candidate genes like miRNA targets are of great importance because the low molecular weight RNA selectively regulate the expression of all human genes and may cause the disease, and used in the treatment, diagnostics of these diseases.

Key words: atherosclerosis, hypertension, myocardial infarction, coronary heart disease, metabolic syndrome, gene, diagnosis.

Атамбаева Ш.А.,
Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология және биотехнология проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

Жүрек-қан тамырлары ауруларының дамуымен байланысты гендер

Атеросклероз, гипертония, миокард инфарктісі, жүректің ишемиялық ауруы, метаболикалық синдром сияқты жүрек-қан тамырлары ауруларының дамуымен байланысты гендер-кандидаттардың іздеу және салыстырмалы талдау жасалынды. Осы жүрек-қан тамырлары ауруларының дамуымен байланысты гендердің деректер қоры құрылды және салыстырмалы түрінде талданды. Кейбір гендер аталған барлық аурулардың дамуына жауапты екені көрсетілді (AGTR1, ALDH2, APOE, ICAM1, IGF1, LPL, MTHFR, PON1, SERPINE1, TGFB1, VEGFA). Сондай-ақ, кейбір гендер жүрек-қан тамырлары ауруларының бір түріне ғана жауапты екені көрсетілді (ACSL1, ADTRP, AKT1, ALMS1, ANXA5, AQP2, AR, ATP2B1, CASZ1, CDH13, CELSR2, CFTR, CTSL, CUL7, DAP, DYRK1B, FIGN, FN1, FOS, FTO, GSN, HDAC9, ICOS, INPPL1, JAK2, LPIN1, MKKS, EDD4L, NFE2L2, PRL, SMTN, SOCS1, SOCS3, UMOD, WNT5A). Бұл нәтижелер, экспрессиясы микроРНҚ-ларға тәуелді гендерді анықтау үшін негіз болып табылады. Осы гендер-кандидаттардың, микроРНҚ-лардың нысана ретінде және олардың ассоциациялардың анықтауы өте маңызды, себебі молекулалық салмағы төмен РНҚ-лар адам гендерінің экспрессиясын селективті жүзінде реттейді, сондықтан аурудың тууына және олардың терапиясы мен диагностикасында пайдалануға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: атеросклероз, гипертония, миокард инфарктісі, жүректің ишемиялық ауруы, метаболикалық синдром, ген, диагностика.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 577.21

Атамбаева Ш.А., *Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е.

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии
Казахского национального университета им. аль-Фараби,
Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: a_ivashchenko@mail.ru

ГЕНЫ, СВЯЗАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности не только в Казахстане, но и во всем мире. Среди них наиболее распространены такие заболевания как: артериальная гипертензия, метаболический синдром, атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца. Заболевание, повышающее вероятность развития сердечно-сосудистых заболеваний этометаболический синдром (МС) (синдром резистентности к инсулину) – нарушение обмена веществ, имеющее гормональные и клинические отклонения. При данном заболевании происходят нарушение механизма усвоения глюкозы клетками, что влечет патологии во всех системах и тканях организма. Метаболический синдром приводит к таким заболеваниям как: ожирение, диабет, тахикардия, гипертония. Одно из самых распространённых заболеваний сердечно-сосудистой системы, возникающее, в том числе и в результате метаболического синдрома это артериальная гипертензия. Установлено, что бóльшая часть населения страдают именно артериальной гипертензия. С возрастом распространённость болезни увеличивается и достигает 50 – 65% у лиц старше 65 лет [1-20].

При дефиците кислорода в сердечной мышце возникает ишемическая болезнь сердца (ИБС). Самая распространённая причина этого – атеросклероз коронарных артерий и метаболический синдром. Одно из проявлений ИБС может быть инфаркт миокарда (ИМ). ИМ вызывает некроз участка сердечной мышцы вследствие острой ишемии. Иногда ИМ развивается по причине спазма коронарной артерии, атеросклеротической бляшкой. ИМ является мультифакториальным заболеванием и может рассматриваться как осложнение различных заболеваний, сопровождающихся острой коронарной недостаточностью. В основном ИМ развивается у больных атеросклерозом. **Атеросклероз** может возникать в результате метаболического синдрома – в результате накопления холестерина в крупных и средних артериях, происходит их поражение и как следствие нарушение кровообращения[1-20].

Проблема сердечно-сосудистых заболеваний занимает одно из ведущих мест среди важнейших медицинских проблем XXI века, так как это одна из основных причин смертности, а также временной и стойкой утраты трудоспособности

населения в развитых странах мира. Причины (этиология) возникновения выше описанных сердечно-сосудистых заболеваний взаимосвязаны между собой. Сердечно-сосудистые заболевания мультифакториальны и возникают под влиянием как внешних факторов, так и генетических. В настоящее время проведено огромное количество экспериментальных работ посвящённых поиску генетических факторов, приводящих к развитию ССЗ, так называемых генов-кандидатов [8-20]. При этом для каждого конкретного заболевания необходимо выделить группу генов-кандидатов, продукты которых могут прямо или косвенно участвовать в развитии патологии. А также необходимо выделить группу общих генов-кандидатов, участвующие в развитии всех описанных выше форм ССЗ. Не смотря на множество исследований в области генетики ССЗ [8-20] до сих пор нет единой базы установленных генов, участвующих в развитии ССЗ. Ранее нами была сформирована база генов-кандидатов ИБС и ИМ [21, 22]. В данной работе был проведен сравнительный анализ генов, участвующих в развитии таких ССЗ как: артериальная гипертензия, атеросклероз, метаболический синдром, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда. Установление общих генов-кандидатов ССЗ имеет большое значение для диагностики и лечения данных заболеваний.

Материалы и методы

В базе данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) был произведен поиск генов, при этом было использовано название заболевания как ключевое слово (подбор ключевых слов был в различных вариациях). Так, на каждый запрос по ССЗ, поиск выдавал несколько сот генов-кандидатов, все из которых проверялись отдельно. Проверка проводилась путем поиска связи этого гена с соответствующим заболеванием в публикациях за последние двадцать лет (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Таким образом, выяснялась связь гена с соответствующими заболеваниями, и создавались базы генов, участвующих в развитии ССЗ. Далее проводился сравнительный анализ полученных баз данных генов-кандидатов.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было установлено, что 174 гена связаны с развитием ишемического заболевания сердца и 185 генов связаны с развитием инфаркта миокарда [21, 22]. Были установлены гены, связанные с развитием атеросклероза (213 генов), артериальной гипертензией (128 генов) и метаболическим синдромом (182 гена). В ходе сравнительного анализа, выявлены 10 общих генов, участвующих в развитии всех пяти изучаемых форм сердечно-сосудистых заболеваний (ИБС, ИМ, артериальная гипертензия, атеросклероз и МС (табл. 1).

Например, ген *AGTR1*(Ангиотензин II), участвует в развитии всех ССЗ, является потенциальным вазопрессором и первичным регулятором секреции альдостерона. Это важный гормон, регулирующий артериальное давление в сердечно-сосудистой системе. Он действует, по крайней мере, через два рецептора. Этот ген кодирует рецептор первого типа, который, как полагают, опосредует основные сердечно-сосудистые эффекты ангиотензина II. В настоящее время считают, что существует только один ген рецептора первого типа в организме человека, также было зарегистрировано несколько вариантов альтернативного сплайсингатранскрипта этого гена. Анализ генов показал, что в развитии всех видов ССЗ может играть большую роль белок альдегиддегидрогеназа (ген*ALDH2*). Альдегиддегидрогеназа является вторым ферментом основного окислительного пути метаболизма алкоголя. В печени имеются две основные изоформы. Этот ген кодирует митохондриальнуюизоформу. Результаты альтернативного сплайсинга показывают много различных изоформ. Ген *APOE*, также участвует в развитии всех видов ССЗ. Белок, кодируемый этим геном, является важным апопротеином из хиломикронов. Он связывается со специфическим рецептором печени и периферической клетки, и имеет важное значение для нормального катаболизма богатых триглицеридами липопротеинов. Мутации в этом гене приводят к повышению уровня холестерина и триглицеридов в плазме вследствие нарушенного клиренса хиломикронов и остаточных ЛПОНП. Ген *ICAM1* кодирует клеточный поверхностный гликопротеин, который, как правило, экспрессируется на эндотелиальных клетках и в клетках иммунной системы. А ген *LPL* кодирует липопротеинлипазу, которая экспрессируется в сердце, мышцах и жировой ткани. *LPL* функционирует как гомодимер, и имеет двойную функцию гидролазы триглицеридов и участвует в проведении сигналов внеклеточных факторов. Тяжелые мутации гена *LPL* вызывают дефицит ЛПЛ, либо сопровождаются нарушениями метаболизма липопротеинов. Генетическая изменчивость гена *MTHFR* вли-

яет на предрасположенность к окклюзионным сосудистым заболеваниям, дефектам нервной трубки, раку толстой кишки и острому лейкозу, мутации в этом гене связаны с дефицитом метилентетрагидрофолатредуктазы. Фермент, кодируемый геном *PON1*, является арилэстеразой. Полиморфизм в этом гене являются фактором риска возникновения ишемической болезни сердца. Ген *SERPINE1* кодирует белок, который является членом суперсемейства ингибиторов серинпротеиназы. Этот белок является ингибитором процесса фибринолиза. Дефекты в этом гене связаны с тромбофилией и с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. В развитии ССЗ также участвует белок, трансформирующий ростовой фактор бета (TGFb), который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток, кодирует данный белок ген *TGFB1*. Этот представитель цитокинов участвует в иммунном ответе, раке, сердечно-сосудистых заболеваниях, сахарном диабете, синдроме Марфана, синдроме Лойеса-Дитса, болезни Паркинсона и синдроме приобретённого иммунодефицита. Ген *VEGFA*является членом семейства факторов роста *PDGF/VEGF*. Он кодирует гепарин-связывающий белок. Этот фактор роста стимулирует пролиферацию и миграцию сосудистых эндотелиальных клеток, и имеет важное значение как для физиологического и патологического ангиогенеза. Мутации этого гена у мышей приводят к образованию ненормального эмбрионального развития кровеносных сосудов. Экспрессия этого гена коррелирует со стадией опухоли и ее прогрессии.

Таблица 1 – Общие гены, участвующие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний

Ген	Характеристика гена	Ссылка по PUBMed
AGTR1 (*AT1; AG2S; AT1B; AT1R; AT1AR; AT1BR; AT2R1; HAT1R; AGTR1B*)	angiotensin II receptor, type 1	15454732, 22782431, 25603901, 24652215, 20606419, 16519598, 15454732, 19023273
ALDH2 (*ALDM; ALDHI; ALDH-E2*)	aldehydedehydrogenase 2 family (mitochondrial)	24606814, 24333098, 24606813, 25249183, 14597338, 25392542 14506613
APOE(*AD2, APO-E, LDLCQ5, LPG*),	apolipoprotein E	25332476, 25319703, 25319693, 25282659, 25150286, 23934537, 23223950, 24634178, 23466070, 24401234, 22371488, 25413697, 19243844
ICAM1 (*BB2; CD54; P3.58*)	intercellular adhesion molecule 1	23493781, 25503951, 24993975, 24378000, 24470464, 21392767, 22179741, 20494378
IGF1*(IGFI; IGF-I; IGF1A*)	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	18703768, 21039458, 23160066, 21915365 18603571, 11855685, 23233113, 19917654
LPL (*LIPD; HDLCQ11*)	lipoproteinlipase	24407533, 21499891, 21252145 24648989, 23089926, 25445417, 24308220
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	24418373, 24242286, 22885090 24310797, 24218123, 25458833, 25279160, 23247802, 23270270, 23391848, 25429430, 24624915, 21473680, 20547447, 20163778
PON1(*ESA, MVCD5, PON*)	paraoxonase 1	24918121, 23608957, 25155309, 24426219, 24833785, 24700021 25037113, 24211756, 23837895, 24028901, 26193203
SERPINE1 (*PAI; PAI1; PAI-1; PLANH1*)	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	24566095, 23976861, 23866515, 23283030, 25419432, 25501306, 17786291, 23719522, 21719525 25042166, 24249967, 21800006, 21414238, 22573918
TGFB1 (*CED; LAP; DPD1; TGFB; TGFbeta*)	transforminggrowthfactor, beta 1	22872813, 22513132, 22136666 25592103, 25155040, 23337395 24339930, 16646981, 21234356
VEGFA (*VPF; VEGF; MVCD1*)	vascular endothelial growth factor A	21362767, 24439853, 24321896, 16999951, 25423914, 19017672

Также было показано, что есть гены, которые участвуют в развитии только какой-то одной формы ССЗ, некоторые из которых показаны на таблице 2. Так, было выявлено, что более 10 генов участвуют в развитии только метаболического синдрома. Например, белок, кодируемый геном *ACSL1* является изоферментом семейства длинноцепочечных жирных кислот-КоА-лигазы. Он играет ключевую роль в биосинтезе липидов и деградации жирных кислот, несколько вариантов транскриптов, кодирующих различные изоформы, были найдены для этого гена. Ген *AKT1* кодирует серин-треонинпротеинкиназу, мутации в этом гене были связаны с синдромом Протея,также несколько вариантов альтернативного сплайсингатранскрипта были найдены для этого гена. Ген *CFTR* кодирует белок, который относится к семейству АТФ-связывающих кассетных («ABC») транспортеров, ABC белки транспортируют различные молекулы через вне- и внутриклеточные мембраны. Мутации в этом гене связаны с аутосомно-рецессивными расстройствами муковисцидоза. Ген *DYRK1B* кодирует белок семейства протеинкиназ ядерной локализации, кодируемый белок участвует в регуляции клеточного цикла.

Таблица 2 –Гены, участвующие в развитии только одного из пяти типов сердечно-сосудистых заболеваний

Ген	Характеристика гена	Ссылка по PUBMed
ACSL1 (*ACS1; LACS; FACL1; FACL2; LACS1; LACS2*)	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	20176858 (МС)
ADTRP (*AIG1L; C6orf105; dJ413H6.1*)	androgen-dependent TFPI-regulating protein	24573017 (А)
AKT1 (*AKT; PKB; RAC; CWS6; PRKBA; PKB-ALPHA; RAC-ALPHA*)	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	21061022, 20872231 (МС)
ALMS1(*ALSS*)	alstromsyndrome 1	24122612 (ИМ)
ANXA5 (*PP4; ANX5; ENX2; RPRGL3; HEL-S-7*)	annexin A5	23724626, 22341596 (А)
AQP2 (*AQP-CD; WCH-CD*)	aquaporin 2 (collectingduct)	22452789 (АГ)
AR (*KD; AIS; AR8; TFM; DHTR; SBMA; HYSP1; NR3C4; SMAX1; HUMARA*)	androgenreceptor	24653668 (МС)
ATP2B1 (*PMCA1; PMCA1kb*)	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	25059375, 24652215 (АГ)
BCHE (*E1; CHE1; CHE2*)	butyrylcholinesterase	16574762, 15907830 (МС)
CASZ1 (*CST; SRG; CAS11; ZNF693; dJ734G22.1*)	castorzincfinger 1	25249183 (АГ)
CDH13 (*CDHH; P105*)	cadherin 13	25875811, 21872196 (МС)
CELSR2 (*EGFL2; MEGF3; CDHF10; Flamingo1*)	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	18649068, 21087763, 10907856, 18262040, 22003152 (ИБС)
CFTR (*CF; MRP7; ABC35; ABCC7; CFTR/MRP; TNR-CFTR; dJ760C5.1*)	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	21538969, 24535988 (МС)
CTSL (*MEP; CATL; CTSL1*)	cathepsin L	15982660 (А)
CUL7 (*3M1; KIAA0076; dJ20C7.5*)	cullin 7	22942238 (МС)
DAP	death-associatedprotein	12482829 (А)
DYRK1B (*MIRK; AOMS3*)	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B	26346493, 24827035, 25092113, 25140975, 25140974, 25140972 (МС)
FIGN	fidgetin	25249183 (АГ)
FN1(*FN; CIG; FNZ; MSF; ED-B; FINC; GFND; LETS; GFND2*)	fibronectin 1	23337395 (АГ)

Продолжение таблицы 2

FOS (*p55; AP-1; C-FOS*)	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	25785607 (АГ)
FTO (*fat mass and obesity associated*)	ALKBH9	24675148, 25144618, 23490278, 22189543, 22311015 (МС)
GSN (*ADF; AGEL*)	gelsolin	19246681 (ИМ)
HDAC9(*HD7; HD9; HD7b; HDAC; HDRP; MITR; HDAC7; HDAC7B; HDAC9B; HDAC9FL*)	histonedeacetylase 9	25388417, 23449258, 25142878 (А)
ICOS (*AILIM; CD278; CVID1*)	inducible T-cell co-stimulator	15941568 (А)
INPPL1 (*OPSMD; SHIP2*)	inositolpolyphosphatephosphatase-like 1	22486725, 15220217 (МС)
JAK2 (*JTK10; THCYT3*)	Januskinase 2	22185674 (МС)
LPIN1 (*PAP1*)	lipin 1	26276647, 21263402, 17940119 (МС)
MKKS (*KMS; MKS; BBS6; HMCS*)	McKusick-Kaufmansyndrome	18813213 (МС)
NEDD4L (RSP5; NEDD4-2; NEDD4.2; hNEDD4-2)	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase	24430119, 24047422, 20090362 (АГ)
NFE2L2 (*NRF2*)	nuclearfactor, erythroid 2-like 2	24583459, 20947826, 23475581 (А)
PRL	prolactin	23517652, 19430852 (МС)
SMTN	smoothelin	22963604 (ИМ)
SOCS1 (*JAB; CIS1; SSI1; TIP3; CISH1; SSI-1; SOCS-1*)	suppressorofcytokinesignaling 1	23545584, 23300554, 19164812 (А)
SOCS3 (*CIS3; SSI3; ATOD4; Cish3; SSI-3; SOCS-3*)	suppressorofcytokinesignaling 3	23545584, 19737863, 19083014 (А)
UMOD (*THP; FJHN; HNFJ; THGP; HNFJ1; MCKD2; ADMCKD2*)	uromodulin	16982955 (АГ)
WNT5A (*hWNT5A*)	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	25240110, 25050997, 24346141 (А)
Примечание: МС-метаболический синдром, А-атеросклероз, АГ-артериальная гипертензия, ИМ-инфаркт миокарда, ИБС-ишемическая болезнь сердца.		

Только в развитии атеросклероза участвует ген *SOCS1*, который кодирует специфический ингибитор STAT-белков, он является негативным регулятором сигнализации цитокина. Ген NEDD4L, кодирующий белок, относящийся к семейству убиквитинлигаз, содержащие HECT-домен, может быть связан с развитием артериальной гипертензией, а именно одиночный нуклеотидный полиморфизм в этом гене, приводит к данному заболеванию. Кодируемый белок опосредует убиквитинирование нескольких целевых субстратов и играет критическую роль в эпителиальном транспорте натрия путем регуляции экспрессии на поверхности клеток эпителиальной натриевого канала. В развитии ИБС большую роль играет ген *CELSR2*. Белок, кодируемый этим геном, относится к кадгеринам – основному классу молекул клеточной адгезии, конкретная функция данного белка не определена.

Таким образом, показано, что некоторые из генов, участвуют в развитии всех указанных выше заболеваний, а также выявлены гены, участвующие в развитии только одной формы ССЗ. Полученные результаты служат основой для выявления генов, экспрессия которых зависит от действия microRNA. Исследования по выявлению ассоциаций этих генов-кандидатов как мишеней microRNA имеют большое значение, поскольку низкомолекулярные RNA селективно регулируют экспрессию практически всех генов человека и могут вызвать как заболевание, так и использоваться в терапии и диагностике этих заболеваний.

Литература

1 Grundy S.M.Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease //Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.– 2004. – 89(6). – P.2595-600.

2 Erickson S.R., Spoutz P., Dorsch M., Bleske B.Cardiovascular risk and treatment for adults with intellectual or developmental disabilities // The International Journal of Cardiology. – 2016. – 5.221. – P.371-375.

3 Tong D.C., Wilson A.M., Layland J.Novel risk factors for acute coronary syndromes and emerging therapies //The International Journal of Cardiology. – 2016. – 25;220. – P.815-824.

4 Ahmadi A., Stone G.W., Leipsic J., Shaw L.J., Villines T.C., Kern M.J., Hecht H., Erlinge D., Ben-Yehuda O., Maehara A., Arbustini E., Serruys P., Garcia-Garcia H.M., Narula J.Prognostic Determinants of Coronary Atherosclerosis in Stable Ischemic Heart Disease: Anatomy, Physiology, or Morphology?// Circulation Research,2016. – 8. – 119(2). – P.317-29.

5 Guha A., Amione-Guerra J., Park M.H.Epidemiology of Pulmonary Hypertension in Left Heart Disease //Progress in Cardiovascular Diseases. – 2016. – 8. – P.30053-6.

6 Grinnan D., Farr G., Fox A., Sweeney L.The Role of Hyperglycemia and Insulin Resistance in the Development and Progression of Pulmonary Arterial, Hypertension //Journal of Diabetes Research. – 2016. – P.2481659.

7 Villa A.D., Sammut E., Nair A., Rajani R., Bonamini R., Chiribiri A.Coronary artery anomalies overview: The normal and the abnormal //World Journal of Radiology. 2016. -28;8(6). – P.537-55.

8 Trenkwalder T., Kessler T., Schunkert H., Erdmann J.Genetics of coronary artery disease: Short people at risk?// Expert Review of Cardiovascular Therapy. – 2015. – 13(11). -P.1169-72.

9 Arbour L., Asuri S., Whittome B., Polanco F., Hegele R.The Genetics of Cardiovascular Disease in Canadian and International Aboriginal Populations //Canadian Journal Of Cardiology. – 2015. – 31(9). – P.1094-115.

10 Brænne I., Civelek M., Vilne B., Di.Narzo A, Johnson A.D., Zhao Y., Reiz B., Codoni V., Webb T.R., ForoughiAsl. H, Hamby S.E., Zeng L., Trégouët D.A., Hao K., Topol E.J., Schadt E.E., Yang X., Samani N.J., Björkegren J.L., Erdmann J., Schunkert H., Lusis A.J.; Leducq Consortium CAD GenomicsPrediction of Causal Candidate Genes in Coronary Artery Disease Loci // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2015. – 35(10). – P.2207-17.

11 Hamrefors V.Common genetic risk factors for coronary artery disease: new opportunities for prevention?// Clinical Physiology And Functional Imaging. – 2015. – P.17.

12 Cole C.B., Nikpay M., Stewart A.F., Mc.Pherson R.Increased genetic risk for obesity in premature coronary artery disease //European Journal of Human Genetics. – 2016. – 24(4). – P.587-91.

13 Yamada Y., Matsui K., Takeuchi I., Fujimaki T. Association of genetic variants with coronary artery disease and ischemic stroke in a longitudinal population-based genetic epidemiological study study // Biomedical reports. – 2015. – 3(3). – P.413-419.

14 Ozaki K., Tanaka T. Molecular genetics of coronary artery disease //Journal of Human Genetics. – 2016. – 61(1). – p.71-7.

15 Neelankavil J., Rau C.D., Wang Y. The Genetic Basis of Coronary Artery Disease and Atrial Fibrillation: A Search for Disease Mechanisms and Therapeutic Targets //Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. – 2015. – 29(5). – P.1328-32.

16 Hernesniemi J.A., Lyytikäinen L.P., Oksala N., Seppälä I., Kleber M.E., Mononen N., März W., Mikkelsson J., Pessi T., Louhelainen A.M., Martiskainen M., Nikus K., Klopp N., Waldenberger M., Illig T., Kähönen M., Laaksonen R., Karhunen P.J., Lehtimäki T.Predicting sudden cardiac death using common genetic risk variants for coronary artery disease //The European Heart Journal. – 2015. – 7;36(26). – P.1669-75.

17 Cheng Y., An B., Jiang M., Xin Y., Xuan S. Association of Tumor Necrosis Factor-alpha Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease // Hepatitis Monthly.- 2015.- 31.- 15(3).-P.26818.

18 Liao B., Cheng K., Dong S., Liu H., Xu Z.Effect of apolipoprotein A1 genetic polymorphisms on lipid profiles and the risk of coronary artery disease //Diagnostic Pathology. -2015. – 16;10. – P.102.

19 Arslan S., Korkmaz Ö., Özbilüm N., Berkan Ö.Association between NF-κBI and NF-κBIA polymorphisms and coronary artery disease //Biomedical reports. – 2015. – 3(5). – P.736-740.

20 Ahmadi Z., Senemar S., Toosi S., Radmanesh S.The Association of Lipoprotein Lipase Genes, HindIII and S447X Polymorphisms With Coronary Artery Disease in Shiraz City //Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2015. – 7(2).- P.63-7.

21 Иващенко А.Т., Атамбаева Ш.А., ниязова Р.Е., Пинский И.В. Гены, связанные с развитием ишемической болезни сердца // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2015. – №3 (65). – С. 100-108.

22 Иващенко А.Т., Атамбаева Ш.А., ниязова Р.Е., Пинский И.В. Гены, связанные с развитием инфаркта миокарда // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2015. – №3 (65). - P.124-132.

References

1 Grundy SM (2004) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89(6):2595-600.

2 Erickson SR, Spoutz P, Dorsch M, Bleske B (2016) Cardiovascular risk and treatment for adults with intellectual or developmental disabilities, The International Journal of Cardiology, 5;221:371-375. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.07.044.

3 Tong DC, Wilson AM, Layland J (2016) Novel risk factors for acute coronary syndromes and emerging therapies,The International Journal of Cardiology, 25;220:815-824. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.148.

4 Ahmadi A, Stone GW, Leipsic J, Shaw LJ, Villines TC, Kern MJ, Hecht H, Erlinge D, Ben-Yehuda O, Maehara A, Arbustini E, Serruys P, Garcia-Garcia HM, Narula J (2016) Prognostic Determinants of Coronary Atherosclerosis in Stable Ischemic Heart Disease: Anatomy, Physiology, or Morphology?CirculationResearch, 8;119(2):317-29. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308952.

5 Guha A, Amione-Guerra J, Park MH (2016) Epidemiology of Pulmonary Hypertension in Left Heart Disease,Progress in Cardiovascular Diseases, 8. pii: S0033-0620(16)30053-6. DOI: 10.1016/j.pcad.2016.07.001.

6 Grinnan D, Farr G, Fox A, Sweeney L (2016) The Role of Hyperglycemia and Insulin Resistance in the Development and Progression of Pulmonary Arterial, Hypertension,Journal of Diabetes Research, 2016:2481659. DOI: 10.1155/2016/2481659.

7 Villa AD, Sammut E, Nair A, Rajani R, Bonamini R, Chiribiri A (2016) Coronary artery anomalies overview: The normal and the abnormal,World Journal of Radiology, 28;8(6):537-55. DOI: 10.4329/wjr.v8.i6.537.

8 Trenkwalder T, Kessler T, Schunkert H, Erdmann J (2015) Genetics of coronary artery disease: Short people at risk?Expert ReviewofCardiovascularTherapy, 13(11):1169-72. DOI: 10.1586/14779072.2015.1094377.

9 Arbour L, Asuri S, Whittome B, Polanco F, Hegele R (2015) The Genetics of Cardiovascular Disease in Canadian and International Aboriginal Populations,Canadian Journal Of Cardiology, 31(9):1094-115. DOI: 10.1016/j.cjca.2015.07.005.

10 Brænne I, Civelek M, Vilne B, Di Narzo A, Johnson AD, Zhao Y, Reiz B, Codoni V, Webb TR, ForoughiAsl H, Hamby SE, Zeng L, Trégouët DA, Hao K, Topol EJ, Schadt EE, Yang X, Samani NJ, Björkegren JL, Erdmann J, Schunkert H, Lusis AJ; Leducq Consortium CAD Genomics (2015) Prediction of Causal Candidate Genes in Coronary Artery Disease Loci, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 35(10):2207-17. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306108.

11 Hamrefors V (2015) Common genetic risk factors for coronary artery disease: new opportunities for prevention?Clinical PhysiologyAnd Functional Imaging, 17. DOI: 10.1111/cpf.12289.

12 Cole CB, Nikpay M, Stewart AF, McPherson R (2016) Increased genetic risk for obesity in premature coronary artery disease,European Journal of Human Genetics, 24(4):587-91. DOI: 10.1038/ejhg.2015.162.

13 Yamada Y, Matsui K, Takeuchi I, Fujimaki T (2015) Association of genetic variants with coronary artery disease and ischemic stroke in a longitudinal population-based genetic epidemiological study study, Biomedical reports, 3(3), p.413-419.

14 Ozaki K, Tanaka T (2016) Molecular genetics of coronary artery disease,Journal of Human Genetics, 61(1):71-7. DOI: 10.1038/jhg.2015.70.

15 Neelankavil J, Rau CD, Wang Y (2015) The Genetic Basis of Coronary Artery Disease and Atrial Fibrillation: A Search for Disease Mechanisms and Therapeutic Targets,Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 29(5):1328-32. DOI: 10.1053/j.jvca.2015.01.031. Epub 2015 Jan 23.

16 Hernesniemi JA, Lyytikäinen LP, Oksala N, Seppälä I, Kleber ME, Mononen N, März W, Mikkelsson J, Pessi T, Louhelainen AM, Martiskainen M, Nikus K, Klopp N, Waldenberger M, Illig T, Kähönen M, Laaksonen R, Karhunen PJ, Lehtimäki T (2015) Predicting sudden cardiac death using common genetic risk variants for coronary artery disease, The European Heart Journal, 7;36(26):1669-75. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv106.

17 Cheng Y, An B, Jiang M, Xin Y, Xuan S (2015) Association of Tumor Necrosis Factor-alpha Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatitis Monthly, 31.15(3), p.26818.

18 Liao B, Cheng K, Dong S, Liu H, Xu Z (2015) Effect of apolipoprotein A1 genetic polymorphisms on lipid profiles and the risk of coronary artery disease,Diagnostic Pathology, 16;10:102. DOI: 10.1186/s13000-015-0328-7.

19 Arslan S, Korkmaz Ö, Özbilüm N, Berkan Ö (2015) Association between NF-κBI and NF-κBIA polymorphisms and coronary artery disease, Biomedical reports, 3(5):736-740.

20 Ahmadi Z, Senemar S, Toosi S, Radmanesh S (2015) The Association of Lipoprotein Lipase Genes, HindIII and S447X Polymorphisms With Coronary Artery Disease in Shiraz City, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 7(2):63-7. DOI: 10.15171/jcvtr.2015.14.

21 Ivashchenko A, Atambayeva S, Niyazova R, Pinsky I (2015) Genes associated with the development of coronary heart disease. VestnikKazNU, biological series [Genysvyazannye s razvitiemishemicheskoibolezniserdtca. VestnikKazNU, biologicheskayaseriya] 3(65):100-108. (In Russian).

22 Ivashchenko A, Atambayeva S,Niyazova R, Pinsky I (2015)Genes associated with the development of myocardial infarction. VestnikKazNU, biological series [Genysvyazannye s razvitieminfarctamiocarda. VestnikKazNU, biologicheskayaseriya] 3(65):124-132. (In Russian).

[1]Иващенко А.Т., [1]Ниязова Р.Е., [1]Атамбаева Ш.А., [1]Пинский И.В., [1]Пыркова А.Ю., [1]Алыбаева А.Ж., [1]Акимниязова А.Н., [1]Мамирова А.А., [2]Макашев Е.К.

[1]Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Институт физиологии человека и животных, Казахстан, г. Алматы

МикроРНК и гены, связанные с инфарктом миокарда

При анализе взаимодействия 2564 miRNA с mRNA 185 генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда человека, найдены 304 сайта связывания miRNA в 5′-UTR, CDS и 3′-UTR mRNA этих генов. Для 54 miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда человека, из mRNA 17510 генов выявлено 17 генов-мишеней. Выявлены ассоциации miRNA и генов мишеней, характеристики которых позволяют использовать их в качестве диагностических маркеров при инфаркте миокарда. Для диагностики предпочтительно использовать ассоциации одной miRNA с mRNA нескольких генов, либо нескольких miRNA с mRNA одного гена. Рекомендованы ассоциации miRNA и mRNA генов мишеней с высокой свободной энергией взаимодействия miRNA с mRNA: miR-3960, miR-466, miR-574-5p вместе с парами их генов-мишеней - PDE4D и SCAP, GSN и TNFSF4, CD40LG и OLR1, соответственно. Для диагностики предложены miRNA и mRNA генов-мишеней с высокой величиной свободной энергии взаимодействия в сайтах связывания: miR-1273d, miR-4758-5p и miR-4763-5p связывающиеся с mRNA генов PPIA, NFKB1 и SH2B1, соответственно. miR-1226-5p с mRNA гена ALDH2, miR-1183 с mRNA гена THBS1, и miR-6089-5p с mRNA генов ADAM8, IL6R и TFAM.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, сайты связывания, гены-мишени, инфаркт миокарда.

---

[1]Ivashchenko A.T., [1]Niyazova R.Y., [1]Atambayeva S.A., [1]Pyrkova A.Y., [1]Pinsky I.V., [1]Alybayeva A.Z., [1]Akimniyazova A.N., [1]Mamirova A.A., [2]Makashev E.K.

[1]Biology and biotechnology problems scientific-research institute of the al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[2]Institute of human and animal physiology, Kazakhstan, Almaty

microRNAs and mRNAs genes associated with the development of myocardial infarction

In the analysis of interaction between 2564 miRNAs with mRNAs of 185 genes, participating in the development of human myocardial infarction, there was identified 304 miRNAs binding sites with their mRNAs in 5′-UTR, CDS and 3′-UTR. For 54 miRNA involved in the development of human myocardial infarction, there was identified 17 target genes from 17510 genes. The revealed associations' characteristics of miRNAs with their target genes allow using their as diagnostic markers in myocardial infarction. There was recommended associations of miRNA with mRNA of target genes with a high free energy of interaction between miRNA with mRNA: miR-3960, miR-466, miR-574-5p with pairs of target genes - PDE4D and SCAP, GSN and TNFSF4, CD40LG and OLR1. For diagnosis it is offered miRNAs and mRNAs of target genes with a high value of free energy of interaction at the binding sites: miR-1273d, miR-4758-5p и miR-4763-5p binding with mRNA of PPIA, NFKB1 и SH2B1 genes, respectively. miR-1226-5p with mRNA of ALDH2 gene, miR-1183 with mRNA of THBS1 gene, and miR-6089-5p with mRNA of ADAM8, IL6R и TFAM.genes.

Key words: miRNA, mRNA, binding sites, target genes, myocardial infarction.

---

[1]Иващенко А.Т., [1]Ниязова Р.Е., [1]Атамбаева Ш.А., [1]Пинский И.В., [1]Пыркова А.Ю., [1]Алыбаева А.Ж., [1]Акимниязова А.Н., [1]Мамирова А.А., [2]Мақашев Е.Қ.

[1]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология және биотехнология проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.
[2] Адам және жануарлар физиологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

Миокард инфаркті дамуымен байланысты микроРНК-лар мен гендер

2564 miRNA-дың адамның миокард инфарктісінің дамуына қатысатын 185 гендердің mRNA-сымен байланысуын қарастырған кезде, гендер mRNA-ның 5′-UTR, CDS және 3′-UTR де 304 miRNA байланысатын сайттар табылды. Адамның миокард инфарктісінің дамуына қатысатын 54 miRNA үшін, 17510 гендердің mRNAнан 17 нысана гендер анықталды. Инфаркт миокардісі болғанда диагностикалық маркерлар ретінде қолдануға болатын miRNA мен олардың нысана гендер арасындағы ассоциациялар анықталды. Диагностиканы өткізу үшін ассоциациялар ретінде бір miRNA және бірнеше гендердің mRNA-сымен немесе бірнеше miRNA-лар мен бір геннің ассоциацияларын қолдануға болады. Байланысудың бос энергиясы жоғары miRNA-лар мен олардың нысана гендерінің келесі ассоциациялары алынған: miR-3960, miR-466, miR-574-5p және олардың нысана гендері - PDE4D және SCAP, GSN және TNFSF4, CD40LG және OLR1. Диагностика үшін келесі miRNA-лар мен олардың нысана гендерінің mRNA-мен байланысу сайттарын қолдануға болады: miR-1273d, miR-4758-5p және miR-4763-5p PPIA, NFKB1 және SH2B1 гендер mRNA-лары, сонымен бірге miR-1226-5p ALDH2 геннің mRNA, miR-1183 THBS1 геннің mRNA гена және miR-6089-5p ADAM8, IL6R және TFAM гендер mRNA.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, байланысу сайттары, нысана гендер, миокард инфаркті.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 577.21

[1*]Иващенко А.Т., [1]Ниязова Р.Е., [1]Атамбаева Ш.А., [1]Пинский И.В., [1]Пыркова А.Ю., [1]Алыбаева А.Ж., [1]Акимниязова А.Н., [1]Мамирова А.А., [2]Макашев Е.К.

[1]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Институт физиологии человека и животных, Республика Казахстан, г. Алматы
[*]E-mail: a_ivashchenko@mail.ru

микроРНК И ГЕНЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Инфаркт миокарда (ИМ) является сегодня одной из самых главных причин смертности и инвалидности людей в мире. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), занимают первое место среди причин смерти во всем мире, в том числе и в Казахстане [1]. Инфаркт миокарда – заболевание, вызванное некрозом участка сердечной мышцы вследствие острой ишемии. Иногда ИМ развивается по причине спазма коронарной артерии, атеросклеротической бляшки. Инфаркт миокарда является мультифакториальным заболеванием и может рассматриваться как осложнение различных заболеваний, сопровождающихся острой коронарной недостаточностью. В основном ИМ развивается у больных атеросклерозом. Но развитие ИМ происходит под влиянием многих факторов – воздействие внешней среды и наследственная предрасположенность. В последнее время все больше работ посвящено изучению роли генов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [2-8]. Однако поиск генов и их анализ в целом не проводился и количество установленных генов-кандидатов, участвующих в развитии ИМ, трудно оценить. Много исследований посвящено отдельным генетическим маркерам – белкам. Составлены генные сети биомаркеров, связанные с развитием ИМ. Проводились исследования по идентификации связанных с апоптозом microRNA и их генов-мишеней при инфаркте миокарда [9-13].

Недавно было установлено, что экспрессия генов-кандидатов может находится под контролем, так называемых microRNA, которые играют большую роль во всех ключевых биологических процессах, в том числе и при различных патологиях. Доказана роль microRNA в развитии многих заболеваний, в том числе и ССЗ [10-13]. В связи с этим установление белок-кодирующих генов, участвующих в развитии ИМ, является весьма актуальным, так как они могут быть потенциальными мишенями microRNA. Это, безусловно, имеет большое значение для диагностики и лечения данного заболевания.

В последнее время множество microRNA появляется в качестве потенциальных биомаркеров ИМ. miRNA-499 является одной из недавно открытых microRNA и в основном экспрессируется в миокарде. Уровень циркуляции miRNA-499 повышен у пациентов с острым инфарктом миокарда [14].

Уровни экспрессии microRNA отличаются в разных тканях. miRNA-1, miRNA-133a и miRNA-133b сильно экспрессируются в сердечной и скелетных мышцах. Однако после острого ИМ нет значительных различий в экспрессии miRNA-1, miRNA-133a и miRNA-133b, которые в норме представлены в сердце на высоком уровне. Установлено, что после возникновения условий для ишемии в сердце miRNA-1, miRNA-21 и miRNA-24 были значительно повышены. Повышенный уровень этих microRNA далее запускал защиту сердца с помощью eNOS, белка теплового шока 70 (HSP70) и фактора теплового шока 1 (HSF1) [15].

miRNA-320 вовлечена в регуляцию ишемического/реперфузионного повреждения сердца. Её мишенью является ген белка HSP20, который принимает участие в расслаблении гладких мышц, играет важную роль в их развитии и предотвращает агрегацию тромбоцитов, предотвращает апоптоз после ишемического инсульта, а также имеет значение в функционировании скелетных мышц и ответе мышц на инсулин. Таким образом, miRNA-320 может быть новой терапевтической мишенью для ишемических заболеваний сердца.

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR - внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы AKT и mTOR. Это один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток человека. Он отвечает за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток, метаболизм. Также у этого сигнального пути есть несколько тканеспецифичных функций, например, в работе сердца [16].

Показано, что miRNA-133a прогениторных клеток взрослого сердца (CPCs) усиливает сердечную функцию после инфаркта миокарда редукцией фиброза, гипертрофии вкупе с усилением роста кровеносных сосудов и пролиферации кардиомиоцитов. Исследование показало, что miRNA-24 играет критическую роль в функции сердечных фибробластов и фиброзе сердца после инфаркта миокарда через сигнальный путь фурин-TGFβ [17].

Трансформирующий ростовой фактор β (TGFβ) - белок, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. Этот представитель цитокинов участвует в иммунном ответе, раке, сердечно-сосудистых заболеваниях, сахарном диабете, синдроме Марфана, синдроме Лойеса-Дитса, болезни Паркинсона и синдроме приобретённого иммунодефицита (СПИД) [18]. TGFβ - это белок, выделяемый клеткой во внеклеточную среду. Существует, по крайней мере, в трёх изоформах: TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. Исследования на животных показывают, что холестерин подавляет реакцию сердечно-сосудистых клеток на TGFβ и их защитные свойства, позволяя развиваться атеросклерозу, в то время как статины (препараты, снижающие уровень холестерина), могут усиливать восприимчивость сердечно-сосудистых клеток к защитному действию TGFβ [18].

Роль семейства miRNA-26 и его причастность к условиям возникновения сердечно-сосудистого заболевания выявлена в разных типах клеток. Семейство miRNA-29 это важные miRNA, которые действуют как негативные регуляторы экспрессии генов, которые кодируют белки, вовлеченные в фиброз, включая многочисленные коллагены, фибриллины и эластин. Взаимодействие miRNA-29 с анти-miRNA в пробирке и in vivo индуцирует экспрессию коллагенов, в то время как избыточная экспрессия miRNA-29 в фибробластах уменьшает экспрессию коллагена и тем самым защищает сердце от инфаркта миокарда. В то же время, другое исследование показало, что семейство miRNA-29 индуцирует апоптоз активацией p53, p85α и Cdc42 [19].

miRNA-28 способствует ишемии миокарда через ингибирование экспрессии альдегиддегидрогеназы 2 (ALDH2) в кардиомиоцитах *Mus muculus* и, таким образом, может быть использована в качестве потенциальной мишени для терапии [20]. Показано, что пациенты с ишемической болезнью сердца имели значительно повышенную регуляцию miRNA-377 в образцах биопсии тканей миокарда [21]. Было установлено, что STK35-киназа является прямой мишенью miRNA-377 во время инфаркта миокарда. Эти исследования экспериментально подтвердили, что микроРНК играют важную роль в регулировании патологических состояний инфаркта миокарда [21].

Скелетные миобласты (SkMs) использованы в лечении инфаркта миокарда [22]. Функционируя как пост-транскрипционные регуляторы, microRNA, играют важную роль в восстановлении функций сердца и регуляции роста стволовых клеток. Однако, корреляция между microRNA и их генами-мишенями в клеточной терапии скелетных миобластов для лечения инфаркта миокарда была не совсем понятна. Использовалась кардиопротекция скелетными миобластами у крыс с инфарктом и определялась функция сердца в течение

четырех недель. В дополнение сравнивались профили экспрессии miRNA и mRNA у постинфарктных крыс с клеточной терапией скелетными миобластами или без неё, используя ДНК-микрочипы. Зависимость между экспрессией miRNA и уровнем mRNA определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Количественная электрокардиография и гистология показали усиленную функцию сердца, уменьшенную область сердца, пораженную инфарктом, и ингибированный апоптоз кардиомиоцитов в группе со скелетными миобластами, которую сравнивали с инфарктной группой. Обнаружено, что 160 miRNA дифференциально экспрессировались в инфарктной группе, по сравнению с контрольной группой, и 78 miRNA экспрессировались в группе, которую лечили скелетными миобластами, в сравнении с нелеченными постинфарктными клетками. Выявлен новый набор miRNA, ассоциированных с апоптозом, и их генов-мишеней, среди которых четыре miRNA (miR-30a-5p, miR-30c-5p, miR-145-5p, miR-140-3p), за исключением одной (miR-143-3p), ингибировались в группе, леченной скелетными миобластами, по сравнению с нелеченной группой. Более того, были обнаружены семь генов (*Angptl4, Dpep1, Egr1, Eif5a, Tsc22d3, Irs2* и *Cebpb*), которые показали линейную корреляцию с этими miRNA [22].

Единой базы данных по генам, связанных с развитием ИМ, до последнего времени не существовало, поэтому был произведен поиск и анализ генов-кандидатов. В результате была создана единая база генов, отвечающих за развитие инфаркта миокарда [23].

Так как продукты генов, проявляющихся при инфаркте миокарда, зачастую участвуют в двух и более процессах, существуют сложности в интерпретации роли генов в развитии разных заболеваний. Очевидно, что для точной диагностики заболеваний необходимо использование наборов (ассоциаций) нескольких генов [24].

Особенностью базы данных по генам, участвующим в развитии инфаркта миокарда, является малое число в ней генов транскрипционных факторов семейства ZNF. В геноме человека число этих генов составляет несколько сотен. В развитии некоторых онкологических заболеваний участвуют десятки этих генов. Следовательно, эту особенность можно использовать при молекулярной диагностике инфаркта миокарда [24].

Анализ информации по изучению участия генов в развитии инфаркта миокарда показывает, что число публикаций по этой проблеме в последние годы быстро увеличивается. В этих публикациях подтверждено участие многих ранее установленных генов в развитии различных типов сердечно-сосудистых заболеваний и выявлены новые гены. Это свидетельствует о перспективности выбранного нами направления и возможности на большой фактической базе получить более достоверные результаты об участии генов в развитии различных типов сердечно-сосудистых заболеваний [24].

Ранее нами была создана база данных о генах, экспрессия которых изменялась при инфаркте миокарда [24]. Наряду с этим были собраны сведения о miRNA, концентрация которых изменялась при этом заболевании. Публикации, в которых описаны одновременно изменения концентрации miRNA и экспрессии генов при инфаркте миокарда, к сожалению, нам неизвестны. Поскольку miRNA в значительной степени могут влиять на экспрессию генов, то представляется важным выяснить в какой степени изменения экспрессии генов могут зависеть от выявленных и других miRNA, кодирующихся в геноме человека. С другой стороны, необходимо установить, на экспрессию каких генов могут влиять выявленные miRNA.

Материалы и методы

Все нуклеотидные последовательности mRNA генов заимствовали из GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Нуклеотидные последовательности miRNA получены из базы miRBase (http://www.mirbase.org). Программа RNAHybrid использовалась для поиска сайтов связывания, свободной энергии связывания (ΔG) и схемы их взаимодействия. Величину $\Delta G/\Delta G_m$ использовали в качестве сравнительного количественного критерия силы взаимодействия miRNA с mRNA, где ΔG_m равна энергии связи miRNA с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Программа E-RNAhybrid рассчитывает отношение $\Delta G/\Delta G_m$, значение достоверности, определяет область расположения сайта microRNA в 5’-нетранслируемом участке (5’UTR), белок-кодирующей части (CDS) или 3’-нетранслируемом участке (3’UTR). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили по программе MirTarget [25].

Результаты и их обсуждение

Поиск сайтов связывания в mRNA 185 генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда,

показал, что из приведенных в базе miRBase 2564 miRNA, только в mRNA 97 генов найдены сайты связывания miRNA (таблица 1 и 2). Из них 95 сайтов связывания расположены в CDS, 40 сайтов находятся в 5´UTR и 169 сайтов имеются в 3´UTR. Из имеющейся базы данных по 54 miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда, ни одна miRNA не имели сайтов связывания в mRNA 97 генов. Число сайтов связывания miRNA в mRNA 97 генов изменялось от одного до семи. Характеристики сайтов mRNA, связывающих только по одной miRNA, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда и связывающих по одной miRNA.

Ген	Характеристика связывания miRNA	Ген	Характеристика связывания miRNA
ABCA1	miR-4435, 332-5, 92	*HNRNPUL1*	miR-6165, 868-C, 96
ABCC6	miR-6851-3p, 706-C, 93	*IGFBP1*	miR-6869-5p, 162-5, 92
AGT	miR-3126 -5p, 327-5, 91;	*IL23R*	miR-619-5p, 2542-3, 96
ALOX5	miR-8074, 2123-C, 89	*ILF3*	miR-4695-5p, 58-5. 90
ARG1	miR-6878-3p, 761-C, 92	*LAMA3*	miR-4300, 6804-C, 96
C4B	miR-4257, 4632-C, 96	*LIPG*	miR-8089, 127-5, 88
CD163	miR-4742-3p, 2549-C, 89	*LTA*	miR-6831-5p, 582-C, 90
CD40LG	miR-574-5p, 1549 - 1579 -3, 93	*NFKBIL1*	miR-326, 980-C, 96
CETP	miR-671-5p, 1311-C, 89	*NOS3*	miR-6501-3p, 983-C, 90
CHGA	miR-6886-3p, 1338-C, 93	*OLR1*	miR-574-5p, 1504-1508-3, 89-93
CYP2C8	miR-4709-5p, 50-5, 91	*PCSK2*	miR-3907, 3745-3, 90
CYP4F2	miR-378i, 176-C, 92	*PDE4D*	miR-3960, 337-416-C, 92-93
DDAH2	miR-6812-3p, 343-C, 91	*PON1*	miR-5003-3p, 331-C, 92
DOT1L	miR-6872-3p, 4186-C, 91	*PRF1*	miR-6812-5p, 203-C, 88
DRD1	miR-6783-3p, 596-5, 91	*PTX3*	miR-6866-5p, 37-5, 91
EDN1	miR-548az-5p, 1223-3, 90	*SCAP*	miR-3960, 105-107-5, 93
ESR1	miR-6879-5p, 3593-3, 90	*SERPINE1*	miR-4758-3p, 277-C, 90
FAIM2	miR-3162-5p, 2692-3, 92	*SF3A2*	miR-1225-5p, 915-C, 90
FGF2	miR-1285-5p, 3098-3, 91	*SHBG*	miR-6746-5p, 822-C, 90
FTO	miR-1273g-3p, 3672-3, 91	*SIRT1*	miR-4767, 236-C, 94
GCLC	miR-545-5p, 1130-C, 90	*SOD1*	miR-634, 48-5, 91
GNB3	miR-6736-3p, 1168-C, 91	*SOD3*	miR-3127-5p, 1235-3, 90
GSN	miR-466, 2621-3, 89	*TGFBI*	miR-6787-3p, 1164-C, 90
GSTCD	miR-619-5p, 2547-3, 96	*TNFSF4*	miR-466, 2492-2500-3, 91
HFE	miR-5095, 2196-3, 95	*UCP2*	miR-6878-3p, 510-C, 90
HMOX1	miR-3155a, 1228-3, 91	*VEGFA*	miR-1277-5p, 2085-3275-3, 88
Примечание: Во втором столбце последовательно указаны: miRNA, начало позиции сайта связывания miRNA в mRNA (нт), величина ΔG/ΔGm (%); -5, -C и -3 - сайты локализованы в 5’UTR, CDS и 3’UTR, соответственно.			

По одной miRNA связывали mRNA 52 генов. Половина этих mRNA имели сайты связывания в кодирующей области, что может свидетельствовать об устойчивой зависимости экспрессии соответствующих генов от miRNA, поскольку кодирующая область mRNA является эволюционно более консервативной. Степень комплементарности взаимодействия miRNA с mRNA наиболее высокая для следующих ассоциаций miRNA и mRNA: *C4B* и miR-4257, *GSTCD* и miR-619-5p, *HNRNPUL1* и miR-6165, *IL23R* и miR-619-5p, *LAMA3* и miR-4300, *NFKBIL1* и miR-326. Следует учитывать, что эффективность взаимодействия miRNA с mRNA определяется не только степенью комплементарности нуклеотидов в сайте связывания, но и энергией взаимодействия нуклеотидов. Следовательно, чем больше будет G-C-пар образовано, тем сильнее будет связь miRNA с mRNA. Эффективность взаимодействия miRNA с mRNA зависит и от стэкинг взаимодействий между нуклеотидами, но существующие методы предсказания сайтов связывания не учитывают эту составляющую энергии взаимодействия miRNA с mRNA.

mRNA десяти генов взаимодействуют с уникальными miRNA (семейство miR-1273, miR-619-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-574-5p, miR-3960, miR-466) [26-32]. miR-619-5p связывается с mRNA генов *GSTCD* и *IL23R,* miR-574-5p с mRNA генов *CD40LG* и *OLR1,* miR-3960 с mRNA *PDE4D* и *SCAP,* miR-466 с mRNA *GSN* и *TNFSF4.* miR-1273g-3p и miR-5095 связывались с mRNA *FTO* и *HFE,* соответственно. Факт связывания одной miRNA с mRNA двух генов может свидетельствовать о более сложном их участии в развитии заболеваний. Одновременно это затрудняет диагностику заболевания.

mRNA 45 генов связывали две и более miRNA (таблица 2). По пять miRNA связываются с mRNA генов *LRP1*, *LRP8*. По семь miRNA связываются с mRNA генов *CYP1A2* и *DNASE1*. Девять miRNA связывается с mRNA генов *CCL5* и *SP1*. Эти данные свидетельствуют о сильной зависимости экспрессии этих генов от соответствующих miRNA. mRNA генов *TFAM* и *SP1* имеют множественные сайты связывания miR-466, которая относится к классу уникальных miRNA [32]. mRNA гена *ADRB1* имеет множественные сайты связывания miR-3960, которая тоже относится к классу уникальных miRNA [28]. mRNA генов *CD40LG, CDKN2B* и *IGF* имеют множественные сайты связывания miR-574-5p, относящейся к классу уникальных miRNA [30]. Выявлена новая miRNA (miR-762), которая имеет множественные сайты связывания с mRNA гена *CDKN1C*. Ранее нами было показано, что в геноме человека кодируются уникальные miRNA, которые имеют более 300 сайтов связывания. К числу таких miRNA относятся miR-619, miR-5095, miR-5096, miR-3960, miR-1322 и некоторые miRNA из семейства miR-1273 [26-32]. Экспрессия значительной части генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, может зависеть от этих уникальных miRNA. Например, miR-619-5p имеет 14 генов-мишеней, miR-5585-3p имеет 12 генов-мишеней, miR-5095 и miR-5096 имеют восемь и шесть генов мишеней соответственно. Семейство miR-1273a,c,d,e,f,g,h имеет 34 сайтов связывания включая 19 сайтов связывания miR-1273g-3p в mRNA 14 генов.

Некоторые miRNA имеют большую свободную энергию связывания с mRNA нескольких генов. miR-1273d, miR-4758-5p и miR-4763-5p связываются с mRNA генов *PPIA*, *NFKB1* и *SH2B1* с свободной энергией связывания равной -125 kJ/mole, что составляет 88% - 94% от максимальной свободной энергии связывания этих miRNA. miR-1226-5p, состоящая из 26 н. связывается с mRNA гена *ALDH2* с свободной энергией связывания равной -127 kJ/mole, что составляет 86% от максимальной свободной энергии связывания. miR-1183 состоящая из 27 н. связывается с mRNA гена *THBS1*с свободной энергией связывания равной -132 kJ/mole, что составляет 90% от максимальной свободной энергии связывания.miR-6089-5p состоящая из 24 н. связывается с mRNA генов *ADAM8* и *TFAM* с свободной энергией связывания равной -132kJ/mole, что составляет 89% от максимальной свободной энергии связывания. Эта же miRNA связывается с mRNA гена *IL6R* с свободной энергией связывания равной -138 kJ/mole, что составляет 93% от максимальной свободной энергии связывания. (привести схемы на таблице 1).

Как правило, miRNA с высоким GC-содержанием связываются в 5’-UTR и CDS области mRNA, которые имеют более высокое GC-содержание по сравнению с 3’-UTR. Связывание miRNA в 5’-UTR и CDS препятствует синтезу белка на начальных этапах увеличения аминокислотной последовательности и тем самым предотвращает затраты энергии на ненужный синтез белка если бы miRNA связывалась в 3’-UTR.

Таблица 2 – Характеристики связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда и имеющих два и более сайтов связывания с разными miRNA

Ген	Характеристика связывания miRNA
ADAM8	miR-6089, 2285-C, 88,5; miR-671-5p, 2233-C, 90; miR-6742-5p, 1982-C, 90; miR-1207-5p, 2891-3, 93; miR-7162-3p, 2679-3, 94
ADAMTS7	miR-103a-3p, 1460 -C, 91; miR-3188, 3538-C, 90; miR-4489, 3274-C, 91
ADIPOQ	miR-5585 -5p, 1741-3, 91; miR-1273f, 1694-3, 94;
ADRB1	miR-3960, 951-960-C, 92-98; miR-6799-5p, 44-5,93; miR-1587, 32-5, 93; miR-3665, 1402-C, 98
ALDH2	miR-1226-5p, 156-C, 86; miR-4687-3p, 171-C, 91;
ANGPT2	miR-4452, 3124-3, 89; miR-5585-3p, 3221-3, 93; miR-7110-3p, 4997-3, 91; miR-5096, 3152-3, 92
AP3D1	miR-6893-3p, 3096-C, 90; miR-1228-5p, 2857-C, 91; miR-1910-5p, 144-5, 91; miR-3960, 2868-C, 93
CCL5	miR-1285-5p, 754-934-3, 94; miR-1303, 764-3, 91; miR-4452, 558-3, 89; miR-4728-3p, 1080-3, 87; miR-5095, 506-822-3, 93-95; miR-5096, 586-3, 94; miR-5585-3p, 655-835-3, 91-95; miR-619-5p, 512-858-3, 96-98; miR-7158-5p, 897-3, 89
CDKN1C	miR-3714, 561-C, 90; miR-762, 739-901-C, 91-97; miR-8089, 1875-3, 89
CDKN2B	miR-574-5p, 1744-1752-3, 90-93; miR-1229-3p, 387-C, 89
CLEC16A	miR-6743-3p, 87-5, 92; miR-3960, 120-5, 92
CYP1A2	miR-1273d, 2049-3, 87; miR-1273g-3p, 2015-2384-3, 91-93; miR-1303, 1860-3, 93; miR-5096, 1797-3, 91; miR-6894-5p, 515-C, 92; miR-7851-3p, 2753-3, 93
DNASE1	miR-1303, 987-5, 93; miR-5095, 596-5, 91; miR-5096, 674-5, 91; miR-5585-3p, 742-5, 91; miR-619-5p, 501-735-5, 91-98
ENPP1	miR-1273a, 6591-3, 87; miR-1273d, 6647-3, 87; miR-1273e, 6656-3, 91; miR-1273f, 6646-3, 98; miR-1273g-3p, 6280-6281-3, 91-96
F2R	miR-619-5p, 3245-3, 98; miR-5585-3p, 3387-3, 96; miR-5095, 3239-3, 98; miR-1285-5p, 3486-3, 92
FGB	miR-5096, 2171-3, 96; miR-1285-5p, 2306-3, 94
GHRL	miR-1254, 113-C, 89; miR-4686, 141-C, 91
GJA4	miR-642a-3p, 1280-3, 91; miR-6894-3p, 799-C, 93
GP6	miR-6798-5p, 117-C, 89; miR-630, 676-C, 94; miR-1285-5p, 2206-3, 94; miR-5096, 1647-3, 91
HSPA12B	miR-4701-5p, 2710-3, 91; miR-662, 1403-C, 93
ICAM1	miR-466, 2989-3, 91; miR-1273g-3p, 3031-3032-3, 93-98; miR-3621, 326-C, 93
IGF1	miR-1273d, 6043-3, 87; miR-1273e, 6052-3, 93; miR-1273g-3p, 6008-6009-3, 96; miR-1273f, 6042-3, 98; miR-574-5p, 4042-4062-3, 89-93
IL12B	miR-619-5p,1786-3, 93; miR-1303,1735-3, 91; miR-5585-3p,1793-3, 91; miR-6893-3p, 789-C,90
IL6R	miR-6089, 346-5, 93; miR-3921, 4984-3, 91; miR-619-5p, 4096-3, 95; miR-1273h-3p, 3233-3, 93; miR-5095, 4090-3, 98; miR-6809-3p, 2604-4, 90
ITGB3	miR-3126-5p, 3351-3, 95; miR-7107-5p, 2925-3, 92
KCNJ11	miR-1273a, 81-5, 90; miR-1273d, 137-5, 87; miR-1972, 342-5, 95; miR-1273c, 83-5, 91; miR-3664-3p, 3053-3, 90; miR-4769-3p, 2916-3, 90; miR-1273g-3p, 102-103-5, 91-96
KCNMA1	miR-4800-5p, 343-C, 91; miR-3176, 3560-C, 94
LDLR	miR-6751-5p, 1438-C, 90; miR-619-5p, 3903-4517-3,93- 98; miR-5585-3p, 4043-3, 96; miR-1303, 4159-3, 91; miR-5095, 3897-3, 95; miR-1285-5p, 4149-4451-3, 91-94
LRP1	miR-301a-3p, 13437-C, 89; miR-301b, 13437-C, 89; miR-6879-5p, 8791-C, 90; miR-3926, 14289-3, 90; miR-1911-3p, 4325-C, 92

Продолжение таблицы 2

LRP8	miR-1277-5p, 7289-3, 88; miR-6813-5p, 2970-C, 90; miR-3661, 972-C, 90; miR-6838-3p, 1188-C, 94; miR-3960, 1003-C, 92
MEF2A	miR-1277-5p, 2197-3, 90; miR-1273g-3p, 272-273-5, 95; miR-1273f, 306-5, 96
MTAP	miR-5585-3p, 2431-3, 98; miR-1285-5p, 2546-3, 94; miR-5708, 2277-3, 92
MTHFR	miR-8089, 3460-3, 88; miR-619-5p, 6861-3, 95; miR-5585-3p, 6300-7003-3, 93-94; miR-5095, 6855-3, 94; miR-1285-5p, 6399-3, 92
NAMPT	miR-466, 1798-3, 89; miR-6781-5p, 285-5, 93
NFKB1	miR-4758-5p, 306-5, 94; miR-4685-3p, 43-5, 93
PCSK9	miR-139-3p, 2017-C, 88; miR-6877-3p, 2469-3, 91
PPIA	miR-1273d, 1382-3, 92; miR-1273e, 1391-3, 91; miR-1285-5p, 1037-3, 92; miR-1273f, 1381-3, 94
PROCR	miR-4783-5p, 408-C, 92; miR-6779-5p(ig), 71-5, 91
SH2B1	miR-4763-3p, 3238-C, 88; miR-6848-5p, 4111-4112-C, 89
SMTN	miR-4687-3p, 1837-C, 91; miR-3940-5p, 946-C, 93
SP1	miR-466, 4145-4161-3, 89-91; miR-6891-5p, 7439-3, 94
STAT3	miR-619-5p, 3131-3, 98; miR-5585-3p, 3268-3, 95; miR-5095, 3125-3, 91
TFAM	miR-1273d, 3910-3, 91; miR-6089, 220-5, 89; miR-466, 3821-3835-3, 89; miR-1273h-5p, 3910-4207-3, 94
TGFBR1	miR-938, 1901-3, 91; miR-6887-3p, 733-C, 91
THBS1	miR-1183, 4361-3, 90; miR-328-5p, 84-5, 89; miR-3121-5p, 4306-3, 90; miR-6786-5p, 88-5, 93
Примечание: Во втором столбце последовательно указаны: miRNA, начало позиции сайта связывания miRNA в mRNA (н.), величина ΔG/ΔGm (%); -5, -C и -3 - сайты локализованы в 5'UTR, CDS и 3'UTR, соответственно.	

В связи с тем, что miRNA из нашей базы данных не имели сайтов связывания в mRNA 97 генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, то мы проанализировали mRNA 17510 генов, в которых могут находиться сайты связывания этих miRNA. Результаты проведенного поиска сайтов связывания приведены в таблице 3. Двенадцать miRNA имели сайты связывания в mRNA 17 генов. miR-1915-3p имела сайты связывания в mRNA трех генов, а miR-149-3p в mRNA четырех генов. Следовательно, эти miRNA могут с большей вероятностью, чем другие miRNA, стать причиной инфаркта миокарда.

Таблица 3 – Характеристики связывания miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда с mRNA генов-мишеней

miRNA	Ген-мишень	Позиция	Участок	ΔG, kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, н.
miR-101-3p	*CNOT7*	2525	3'UTR	-93	90	21
miR-149-3p	*SHISA3*	37	5'UTR	-110	90	21
miR-149-3p	*KCNJ6*	196	5'UTR	-110	90	21
miR-149-3p	*HNRNPA0*	86	5'UTR	-110	90	21
miR-149-3p	*MAP3K10*	265	5'UTR	-110	90	21
miR-1915-3p	*SLC27A2*	115	5'UTR	-115	93	20
miR-1915-3p	*SOCS3*	259	5'UTR	-113	91	20
miR-1915-3p	*SOCS3*	260	5'UTR	-113	91	20

Продолжение таблицы 3

miR-1915-3p	*TANC2*	36	5'UTR	-110	90	20
miR-1915-3p	*TANC2*	37	5'UTR	-110	90	20
miR-195-5p	*UNC5A*	3124	3'UTR	-98	90	21
miR-196a-5p	*HOXB8*	1377	3'UTR	-110	98	22
miR-24-3p	*SCN4B*	2037	3'UTR	-108	91	22
miR-26a-5p	*CNBP*	1013	3'UTR	-102	91	22
miR-29a-5p	*UGT3A1*	2942	3'UTR	-102	92	22
miR-320a	*ZFYVE1*	4274	3'UTR	-108	91	22
miR-328-3p	*RHBDL1*	19	5'UTR	-113	90	22
miR-423-5p	*SLFNL1*	49	5'UTR	-115	92	23
miR-499a-5p	*TXLNB*	4474	3'UTR	-93	90	21

Полученные данные показывают, что взаимодействия рассмотренных miRNA и mRNA может служить основой для выбора ассоциаций miRNA и mRNA для диагностики инфаркта миокарда. Под ассоциацией понимается связь одной miRNA с mRNA одного или нескольких генов, либо одной или нескольких miRNA с mRNA одного гена.

Так ассоциации miR-149-3p и с каждым из ее генов мишеней *HNRNPA0, KCNJ6, MAP3K10, SHISA3* можно использовать для диагностики развития инфаркта миокарда. Из данных приведенных в таблицах 1 в качестве кандидатов на диагностики рекомендуются следующие ассоциации: miR-619-5p и гены мишени *GSTCD* и *IL23R,* как имеющие высокую величину ΔG/ΔGm равную 96%, а также ассоциации miR-4257 и *C4B,* miR-326 и *NFKBIL1,* miR-4300 и *LAMA3* тоже имеющие величину ΔG/ΔGm, равную 96%. Безусловно в качестве диагностических ассоциаций могут использоваться уникальные miRNA: miR-3960, miR-466, miR-574-5p вместе с парами их генов мишеней - *PDE4D* и *SCAP, GSN* и *TNFSF4, CD40LG* и *OLR1,* соответственно. Эти miRNA имеют множественные сайты связывания в mRNA их генов мишеней, что в несколько раз увеличивает их способность регулировать экспрессию этих генов.

Из данных таблицы 2 в дополнение к ассоциациям с участием miR-3960 нужно добавить гены мишени *ADRB1, AP3D1, CLEC16A* и *LRP8*. К ассоциациям с участием miR-466 можно добавить гены *ICAM1, NAMPT, SP1* и *TFAM*. К ассоциациям с участием miR-574-5p добавляется ген *IGF1*.

В ассоциации с участием miR-619-5p добавляются гены *CCL5, DNASE1, F2R, IL12B, IL6R, LDLR, MTHFR* и *STAT3*. Как правило в mRNA многих генов имеются сайты связывания miR-619-5p и miR-5095 [26]. Таких генов, представленных в таблице несколько: *CCL5, DNASE1, F2R, IL6R, LDLR, MTHFR, STAT3*.

С участием семейства miR-1273 необходимо контролировать экспрессию генов: *ADIPOQ, CYP1A2, ENPP1, IGF1, KCNJ11, MEF2A, PPIA, TFAM*. Отметим, что гены мишени семейства miR-1273 и гены мишени miR-619-5p и miR-5095 не совпадают, что может служить дополнительным доказательством селективности действия этих miRNA.

В качестве диагностических ассоциаций miRNA и генов мишеней безусловно необходимо использовать отмеченные выше пары miRNA и генов мишеней с высокой величиной свободной энергии взаимодействия в сайтах связывания. Это пары miR-1273d, miR-4758-5p и miR-4763-5p связывающиеся с mRNA генов *PPIA*, *NFKB1* и *SH2B1,* соответственно. miR-1226-5p с mRNA гена *ALDH2,* miR-1183 с mRNA гена *THBS1* и miR-6089-5p с mRNA генов *ADAM8, IL6R* и *TFAM.*

Литература

1 American Heart Association. Heart and Stroke Statistical Update. - National Center. - 2012. - 43 p.

2 Abd El-Aziz T.A., Rezk N.A. Relation of PAI-1 and TPA genes polymorphisms to acute myocardial infarction and its outcomes in Egyptian patients // Cell Biochemistry & Biophysics. - 2015. - V.71(1). - P.227-234.

3 Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Покушалов Е.А. Анализ комбинаций генотипов по полиморфным точкам промоторных участков трех матричных металлопротеиназ и гена эндотелия сосудов у больного с историей острого инфаркта миокарда // Терапевтический архив.- 2014.- №.86(4).- С.19-24.

4 Xu X., Wang L.H., Liu H.B. Association of chemokines and their receptors genes polymorphisms with risk of myocardial infarction // Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.- 2013.- V.30(5).- P.601-607.

5 Helseth R., Seljeflot I., Opstad T. Genes expressed in coronary thrombi are associated with ischemic time in patients with acute myocardial infarction // Thromb Research.- 2015.- №135(2).- P.329-333.

6 Kovacs V., Gasz B., Balatonyi B. Polymorphisms in glutathione S-transferase are risk factors for perioperative acute myocardial infarction after cardiac surgery: a preliminary study // Molecular & Cell Biochemistry.- 2014.- V.389(1-2).- P.79-84.

7 Sakowicz A., Fendler W., Lelonek M., Sakowicz B., Pietrucha T. Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age // Biochemical Genetics.- 2013.- V.51(3-4).- P.230-242.

8 Wang Y., Wang L., Liu X., Zhang Y. Genetic variants associated with myocardial infarction and the risk factors in Chinese population // Public Library of Science One.- 2014.- V.9(1).- P.863.

9 Zhang T., Zhao L.L., Zhang Z.R., Fu P.D., Su Z.D., Qi L.C., Li X.Q., Dong Y.M. Interaction network analysis revealed biomarkers in myocardial infarction // Molecular Biology Report.- 2014.- V.41(8).- P.4997-5003.

10 Liu Q., Du G.Q., Zhu Z.T. Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts // Journal of Translational Medicine.- 2015.- V.19.- P.13-27.

11 Wang N., Zhou Z., Liao X., Zhang T. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure // International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Life.- 2009.- V.61(6).- P.566-571.

12 Ye Y., Perez-Polo J.R., Qian J., Birnbaum Y. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury // Physiological Genomics.- 2011.- V.43(10).- P.534-542.

13 Ono K., Kuwabara Y., Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases // Federation of European Biochemical Societies Journal.- 2011.- V.278(10).- P.1619-1633.

14 Xiao H., Lis J.T. Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements // Science.- 1988.- V.239.- P.1139–1142.

15 Benjamin I.J., McMillan D.R. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease // Circulation research.- 1988.- V.83(2).- P.117–132.

16 Li S.P., Liu B., Song B., Wang C.X., Zhou Y.C. MiR-28 promotes cardiac ischemia by targeting mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in *Mus musculus* cardiac myocytes // European Review for Medical and Pharmacological Sciences.- 2015.- V.19.- P.752–758.

17 Rouzier C., Vanatka R., Bannwarth S. A novel homozygous MMP2 mutation in a family with Winchester syndrome // Clinical Genetics.- 2016.- V.69(3).- P.271–276.

18 Joladarashi D., Srikanth G.V., Thandavarayan R.A., Verma S.K., Mackie A.R., Khan M. Enhanced cardiac regenerative ability of stem cells after ischemia-reperfusion injury: role of human CD34(þ) cells deficient in MicroRNA-377 // Journal of the American College of Cardiology.- 2015.- V.66.- P.2214–2226.

19 Аулик И.В. Определение физической работоспособности в клинике и спорте // Медицина.- 1979.- С.192.

20 Read A.P., Strachan T. Human molecular genetics 2. - New York: Wiley.- 1999.- 576 p.

21 Sinnaeve P.R., Donahue M.P., Grass P., Seo D., Vonderscher J., Chibout S.D., Kraus W.E., Sketch M.J., Nelson C., Ginsburg G.S. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease // Public Library of Science One.- 2009.- V.4.- P.70-73.

22 Sondermeijer B.M., Bakker A., Halliani A., de Ronde M.W., Marquart A.A., Tijsen A.J., Mulders T.A., Kok M.G., Battjes S., Maiwald S. Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340-3p and miRNA624-5p // Public Library of Science One.- 2011.- V.6.- P.46-59.

23 Patterson T.A., Lobenhofer E.K., Fulmer-Smentek S.B., Collins P.J., Chu T.M., Bao W., Fang H., Kawasaki E.S., Hager J., Tikhonova I.R. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project // Natural Biotechnology.- 2016.- V.24.- P.1140–1150.

24 Иващенко А.Т., Атамбаева С., ниязова Р.Е., Пинский И. Гены связанные с развитием инфаркта миокарда // Вестник КазНУ, биологическая серия.- 2015.- №3(65).- С.124-132.

25 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes // Biomed Research International.- 2014.- V.2014.- P.1-11.

26 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes // Biomed Research International. - 2014. - V.2014.- P.1-8.

27 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. - 2014. - V.10(7). - P.423-427.

28 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. The binding sites of unique miRNAs in the human mRNAs // Journal of Biotechnology. - 2014. - V.185S. - P.S37–S125.

29 Атамбаева С., ниязова Р.Е., Берилло О., Иващенко А.Т. Особенности сайтов связывания mir-574-5p и mir-574-3p с mrna генов-мишеней // Вестник КазНУ, биологическая серия. - 2015. - №1(63). - С.349-354.

30 Niyazova R., Berillo O., Atambayeva S., Pyrkova A., Alybaeva A., Ivashchenko A. miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes // Biomed Research International. - 2015. - V.2015. - p.1-7.

31 Niyazova R., Atambayeva S., Akimniyazova A., Pinsky I., Alybaeva A., Faye B., Ivashchenko A.T. Features of mir-466-3p binding sites in mRNA genes with different functions // International Journal of Biology and Chemistry. - 2015. - V.8(2). - P.44- 51

References

1 American Heart Association (2012) Heart and Stroke Statistical Update, National Center, 43 P. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046

2 Abd El-Aziz TA, Rezk NA (2015) Relation of PAI-1 and TPA genes polymorphisms to acute myocardial infarction and its outcomes in Egyptian patients, Cell Biochemistry & Biophysics, 71(1):227-234. DOI: 10.1007/s12013-014-0188-x

3 Shevchenko AV, Konenkov VI, Prokof'ev VF, Pokushalov EA (2014) Analysis of genotype combinations at the polymorphic points of the promoter regions of the genes of three matrix metalloproteinases and the gene of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with history of acute myocardial infarction. Therapeutic archives [Analiz kombinacii genotipov po polimorfnym tochkam promotornyh uchastkov treh matrichnyh metalloproteinaz i gena faktora endoteliya sosudov u bolnogo s istoriei ostrogo infarkta miokarda, Terapevticheskii Arkhiv] 86(4):19-24. (In Russian)

4 Xu X, Wang LH, Liu HB (2013) Association of chemokines and their receptors genes polymorphisms with risk of myocardial infarction, Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 30(5):601-607. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2013.05.021

5 Helseth R, Seljeflot I, Opstad T (2015) Genes expressed in coronary thrombi are associated with ischemic time in patients with acute myocardial infarction, Thromb Research, 135(2):329-333. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.11.028

6 Kovacs V, Gasz B, Balatonyi B (2014) Polymorphisms in glutathione S-transferase are risk factors for perioperative acute myocardial infarction after cardiac surgery: a preliminary study, Molecular & Cell Biochemistry, 389(1-2):79-84. DOI: 10.1007/s11010-013-1929-7

7 Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Sakowicz B, Pietrucha T (2013) Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age, Biochemical Genetics, 51(3-4):230-242. DOI: 10.1007/s10528-012-9558-5

8 Wang Y, Wang L, Liu X, Zhang Y (2014) Genetic variants associated with myocardial infarction and the risk factors in Chinese population, Public Library of Science One, 9(1):863. DOI: 10.1371/journal.pone.0086332

9 Zhang T, Zhao LL, Zhang ZR, Fu PD, Su ZD, Qi LC, Li XQ, Dong YM (2014) Interaction network analysis revealed biomarkers in myocardial infarction, Molecular Biology Report, 41(8):4997-5003. DOI: 10.1007/s11033-014-3366-4

10 Liu Q., Du G. Q., Zhu Z. T. Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts // Journal of Translational Medicine. – 2015. – V. 19. – P. 13-27.

11 Wang N, Zhou Z, Liao X, Zhang T (2009) Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure, International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Life, 61(6):566-571. DOI: 10.1002/iub.204

12 Ye Y, Perez-Polo JR, Qian J, Birnbaum Y (2011) The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury, Physiological Genomics, 43(10):534-542. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00130.2010

13 Ono K, Kuwabara Y, Han J (2011) MicroRNAs and cardiovascular diseases, Federation of European Biochemical Societies Journal, 278(10):1619-1633. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08090.x

14 Xiao H, Lis JT (1988) Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements, Science, 239:1139–1142. DOI: 10.1126/science.3125608

15 Benjamin IJ, McMillan DR (1988) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease, Circulation research, 83(2):117–132. DOI: 10.1161/01.RES.83.2.117

16 Li SP, Liu B, Song B, Wang CX, Zhou YC (2015) miR-28 promotes cardiac ischemia by targeting mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in *Mus musculus* cardiac myocytes, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 19:752–758.

17 Rouzier C, Vanatka R, Bannwarth S (2016) A novel homozygous MMP2 mutation in a family with Winchester syndrome, Clinical Genetics, 69(3):271–276. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2006.00584.x

18 Joladarashi D, Srikanth GVN, Thandavarayan RA, Verma SK, Mackie AR, Khan M (2015) Enhanced cardiac regenerative ability of stem cells after ischemia-reperfusion injury: role of human CD34(þ) cells deficient in MicroRNA-377, Journal of the American College of Cardiology, 66:2214–2226. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.09.009

19 Aulik IV (1979) The determination of physical working capacity in clinic and sport. Medicine [Opredelenie fizicheskoi rabotosposobnosti v klinike I sporte. Medicina] 192. (In Russian)

20 Read AP, Strachan T (1999) Human molecular genetics 2, New York:Wiley, 576 P.

21 Sinnaeve PR, Donahue MP, Grass P, Seo D, Vonderscher J, Chibout SD, Kraus WE, Sketch MJ, Nelson C, Ginsburg GS (2009) Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease, Public Library of Science One, 4:70-73. DOI: $\Delta G/\Delta G_m$ 10.1371/journal.pone.0007037

22 Sondermeijer BM, Bakker A, Halliani A, de Ronde MW, Marquart AA, Tijsen AJ, Mulders TA, Kok MG, Battjes S, Maiwald S (2011) Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340-3p and miRNA624-5p, Public Library of Science One. 6:46-59. DOI: 10.1371/journal.pone.0025946

23 Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, Collins PJ, Chu TM, Bao W, Fang H, Kawasaki ES, Hager J, Tikhonova IR (2016) Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project, Natural Biotechnology, 24:1140–1150. DOI:10.1038/nbt1242

24 Ivashchenko A, Atambayeva S, Niyazova R, Pinsky I (2015) Genes associated with development of myocardial infarction. Vestnik KazNU, biological series [Geny svyazannye s razvitiem infarcta miocarda. Vestnik KazNU, biologicheskaya seriya] 3 (65):124-132. (In Russian)

25 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R (2014) Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes, Biomed Research International, 2014: 1-11. DOI:10.1155/2014/620530

26 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva S (2014) The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes, Biomed Research International, 2014:1-8. DOI:10.1155/2014/720715

27 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva S (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes, Bioinformation, 10(7):423-427. DOI:10.6026/97320630010423

28 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva S (2014) The binding sites of unique miRNAs in the human mRNAs, Journal of Biotechnology, 185S:S37–S125.

29 Atambayeva S, Niyazova R, Berillo O, Ivashchenko A (2015) Futures of miR-574-5p and miR-574-3p binding sites with mRNA of target genes. Vestnik KazNU, biological series [Osobennosti saitov svyazyvaniya miR-574-5p i miR-574-3p s mRNA genov-misheney. Vestnik KazNU, biologicheskaya seriya] 1 (63):349-354. (In Russian)

30 Niyazova R, Berillo O, Atambayeva S, Pyrkova A, Alybaeva A, Ivashchenko A (2015) miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes, Biomed Research International, 2015:1-7. DOI:10.1155/2015/962637

31 Niyazova R, Atambayeva S, Akimniyazova A, Pinsky I, Alybaeva A, Faye B, Ivashchenko AT (2015) Features of mir-466-3p binding sites in mRNA genes with different functions, International Journal of Biology and Chemistry, 8 (2):44- 51.

Кожамкулов У.А., Каиров У.Е., Рахимова С.Е., Ережепов Д.А., Ахметова А.Ж., Молкенов А.Б., Утюбаев А., Акильжанова А.Р.

Назарбаев Университет, Частное учреждение «National Laboratory Astana», Казахстан, г. Астана

Идентификация генетических маркеров лекарственной устойчивости на основе полных геномов клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*

Проведено полногеномное секвенирование 20 клинических изолятов M. tuberculosis с использованием современных методов и инструментов секвенирования нового поколения. Большинство изученных изолятов M. tuberculosis (18) относятся к семейству Beijing (происхождение восточно-азиатское East Asian), только два изолята показали принадлежность к семействам T (происхождение евро-американское Euro-American) и MANU-1 (индо-океанское Indo-Oceanic). Изучены генетические маркеры для диагностики лекарственно-устойчивых форм туберкулеза (MDR и XDR штаммы M.tuberculosis). Проведен анализ генетических локусов клинических изолятов M. tuberculosis, определяющих устойчивость к противотуберкулезным лекарственным препаратам из числа найденных геномных вариантов, а также соответствующие гены. Обнаружено от 13 до 30 генетических локусов с геномными вариантами среди полногеномных данных 20 изолятов M. tuberculosis. Найдены геномные варианты в четырех генах PE_PGRS24, PPE24, PPE5, PE_PGRS56, кодирующие белки семейства PE/PPE и являющиеся уникальными и представленными только для вида Mycobacterium, которые характерны только для MDR и XDR клинических изолятов. Белки данного семейства могут играть роль факторов вирулентности и способствовать успешному инфицированию.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии туберкулеза, ДНК, полногеномное секвенирование, лекарственная устойчивость, мутации.

Kozhamkulov U.A., Kairov U.E., Rakhimova S.E., Yerezhepov D.A., Akhmetova A.Zh., Molkenov A.B., Utyubayev A., Akilzhanova A.R.

Nazarbayev University, Private institution «National Laboratory Astana», Kazakhstan, Astana

Identification of genetic markers of drug resistance based on whole genomes of clinical isolates of *M.tuberculosis*

Whole genome sequencing of 20 clinical isolated ofM. tuberculosis using modern methods and instruments of next-generation sequencing. Most of the studied isolates (18) belong to Beijing family (Southern East Asian), with only two isolates were belong to T (Euro-American) and MANU-1 (Indo-Oceanic).

The genetic markers for diagnostics of drug resistant forms of tuberculosis (MDRиXDRштаммыM.tuberculosis) were studied.The analysis of genetic loci of clinical isolates of M.tuberculosisthat determine the resistance to TB drugs among found genomic variants, and corresponding genes. We found from 13 to 30 genetic loci with genomic variants among whole genome data of these 20 isolates of M.tuberculosis. We found that genomic variants infour genes coding proteins of PE/PPE family and which are unique and represented only by Mycobacterium species are very specific and found only in MDR and XDR strains of mycobacteria. Proteins of this family can play a significant role as virulence factors and may contribute to the successful infection.

Key words: tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, DNA, whole genome sequencing, drug resistance, mutations.

Қожамқұлов Ұ.Ә., Қаиров Ұ.Е., Рахимова С.Е., Ережепов Д.Ә., Ахметова А.Ж., Молкенов А.Б., Өтібаев Ә., Акылжанова А.Р.

Назарбаев Университеті, «National Laboratory Astana» жеке мекемесі, Қазақстан, Астана қ.

M.tuberculosis клиникалық изоляттарының толық геномдарының секвенирленуі негізіндегі дәрмекке төзімділіктің генетикалық маркерлерін анықтау

Жаңа буынды секвенирлеудің заманауи әдістері мен құралдары көмегімен M. tuberculosis бактериясының 20 клиникалық изоляттарының толықгеномды секвенирленуі іске асырылды. Зерттелген үлгілердің көбісі (18) Beijing туыстастығына (шығу тегі шығыс азиялық), ал тек екі үлгі сәйкесінше T (шығу тегі евро американдық) мен MANU-1 (шығу тегі үнді-мұхиттық) туыстастықтарына жатады. Дәрмектерге төзімді туберкулез формаларын (M. Tuberculosis-тің MDR мен XDR штамдары) диагностикалаудың генетикалық маркерлері зерттелді. Анықталған геномдық варианттар негізінде M. tuberculosis-тің клиникалық изоляттарының туберкулезге қарсы қолданылатын дәрілік препараттарға төзімділікті анықтайтын генетикалық локустары талданды және жауапты гендері анықталды. M. tuberculosis-тің 20 изоляттарының толықгеномдық мәліметтерінің негізінде геномдық варианттары бар 13-тен 30-ға дейін генетикалық локустар анықталды. PE/PPE туыстастығының белоктарын кодтайтын және бактериялардың Mycobacterium түріне ғана тән болатын PE_PGRS24, PPE24, PPE5, PE_PGRS56 гендерінің геномдық варианттары біз секвенирленген үлгілердің MDR және XDR клиникалық изоляттарына тән екені табылды. Осы туыстастықтың белоктары вирулентті факторлары ретінде қарастырыла алады және сәтті инфекциялаудың себепкері бола алады.

Түйін сөздер: туберкулез, туберкулез микобактериялары, ДНҚ, толықгеномдық секвенирлеу, дәрілік төзімділік, мутациялар.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 577.21:579.25

*Кожамкулов У.А., Каиров У.Е., Рахимова С.Е., Ережепов Д.А., Ахметова А.Ж., Молкенов А.Б., Утюбаев А., Акильжанова А.Р.

Назарбаев Университет, Частное учреждение «National Laboratory Astana», Республика Казахстан, г.Астана
*E-mail: ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ НА ОСНОВЕ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Введение

Несмотря на прогресс, достигнутый в сокращении глобальной заболеваемости лекарственно-чувствительного туберкулеза, появление туберкулеза с множественной (мультирезистентной) лекарственной устойчивостью (МЛУ или MDR-multidrug-resistant) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ или XDRextensively-drug resistant) в течение последнего десятилетия ставит под угрозу эти достижения и является препятствием для эффективного контроля туберкулеза [1]. С каждым годом увеличивается число лекарственно-устойчивых штаммов, как мультирезистентных штаммов, обуславливающих устойчивость к основным двум противотуберкулезным препаратам первого ряда – изониазиду и рифампицину, так и XDR штаммов, устойчивых к обоим наиболее действенным противотуберкулезным препаратам, изониазиду и рифампицину, в сочетании с устойчивостью к любому из фторхинолонов (таких как левофлоксацин или моксифлоксацин) и по меньшей мере к одному из трех инъекционных препаратов второй линии (амикацин, капреомицин или канамицин) [1].

Лечение пациентов, инфицированных мультирезистентными штаммами, требует применения более токсичных и дорогостоящих химиопрепаратов, длительной госпитализации и, тем не менее, часто остается неэффективным, обуславливая высокий удельный вес инвалидизации и смертности. Таким образом, высокий уровень заболеваемости и смертности и постоянно растущая заболеваемость мультирезистентным туберкулезом затрудняет усилия, направленные на борьбу с этой эпидемией.

В лабораторной диагностике и эпидемиологическихисследованияхинфекционных заболеванийвсе больше стали применятьметоды полногеномного секвенирования, помогающие изучить генетическую структуру бактерий и вирусов, выявить особенности геномапатогенов,проводить мониторинг генетической вариабельности, распространенности и происхождения инфекционных агентов [2,3].

Микобактерия туберкулеза достаточно изучена, но некоторые результаты показывают удивительную неоднородность бактериальных популяций, даже между штаммами с одинаковы-

ми MIRU/VNTR, RFLP профилями, или сполиготипами [4,5]. Многие вопросы остаются, тем не менее, открытыми. Научные работы многих ученыхс использованием полногеномных методов исследований штаммов M. tuberculosisнаправлены на изучение динамики развития заболевания, передачи инфекции и лечения, изучение небольших очагов ТБ инфекции, изучение уникальных процессов эволюционной динамики, присущих распространению туберкулеза [6-8].

Сравнение полной последоват

ельности генома H37Rv вирулентного чувствительного штамма (размер 4.41 Mbp) и клинического штамма CDC1551 (размер 4.40 Mbp), выявил примерно 1100 SNP[9]. Примерно 65% SNPявляются несинонимичными заменами, что является необычным, в сравнении с другими бактериями, таких как кишечная палочка и сальмонелла. Анализ полиморфизма больших последовательностей (LSP) показывает, что микобактерии туберкулеза характеризуются меньшим генетическим разнообразием, чем другие бактерии. В крупном исследовании 100 клинических изолятов, в общей сложности были выявлены 68 различных делеций, в размере от 105 bp до примерно 12 Kbp [10]. Вместе эти LSP, представляют около 186 Kbp (~ 4,2%) генома H37Rv и влияют на 224 (~ 5,5%) гена, включая гены во всех основных функциональных категориях. Эти исследования показывают, что степень полиморфизма существует между различными штаммами микобактерий туберкулеза, который в соответствии с фенотипическим разнообразием наблюдается среди клинических изолятов [11]. Эти различия геномов микобактерийобеспечивают понимание эпидемиологии вспышек инфекции, факторов вирулентности отдельных штаммов. Примечательно, что половина полиморфизмов больших последовательностей (LSP) штаммов H37Rv и CDC1551 включают гены, полиморфные GC-богатые повторяющиеся последовательности (PGRS), кодирующие семейства белков Pro-Pro-Glu (PPE) и Pro-Glu (PE), обладающие иммуногенными свойствамии и играющие определенную роль в патогенезе. Белки семейства PE/PPE M. tuberculosis кодируются приблизительно 168 генами (примерно 5% от общейкодирующей емкости генома) [9]. Функциональная активность данных белковPE/PPE не совсем изучена и белки являются уникальными и важными для микобактерий туберкулеза.

Генетические исследования M. tuberculosisв Казахстане больше касались вопросов определения мутаций в генах M. tuberculosis, обуславливающих устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам и генотипированию штаммов, циркулирующих в Казахстане [12-15], лишь одна публикация касается предварительных данных полногеномного секвенирования двух клинических изолятов M. tuberculosis[16].

Проведение дальнейших исследований генома микобактерий необходимо, чтобы выявить особенности генома казахстанских штаммов M.tuberculosis с различной лекарственной устойчивостью, проследить эволюцию патогенных факторов, выявить факторы вирулентности штаммов с множественной и широкой устойчивостью.

Целью исследования является определение полной последовательности генома клинических изолятов M.tuberculosisс различной лекарственной чувствительностью и изучение генетических маркеров лекарственноой устойчивости туберкулеза, проведение сравнительного биоинформатического анализа между основными группами штаммов M.tuberculosis.

Материалы и методы

Клинические изоляты микобактерии туберкулеза получены в референс-лаборатории от пациентов, проходивших лечение вНациональном центре проблем туберкулеза Республики Казахстан, г.Алматы. Выборка состояла из 20 клинических изолятов с различной лекарственной чувствительностью: 1) M.tuberculosis с множественной лекарственной устойчивостью (MDRTB); 2) M.tuberculosis с широкой лекарственной устойчивостью (XDRTB); 3) M.tuberculosis полирезистентные – различные сочетания лекарственной устойчивости, кроме сочетания H(изониазид)+R(рифампицин); 4) M.tuberculosismонорезистентный, устойчивые к одному из противотуберкулезных препаратов (например, устойчивость только к рифампицину, или только к изониазиду, этамбутолу, стрептомицину); 5) лекарственно-чувствительные M.tuberculosis ко всем противотуберкулезным препаратам.Лекарственная чувствительностьM.tuberculosis к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 рядаопределялась методом абсолютных концентраций на твердой среде Левенштейна-Йенсена и с использованием системы BACTEC-MGIT 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube (BD Diagnostic Systems, США).

Выделение тотальной геномной ДНК образцов коллекции было проведено с использованием метода, описанного Van Soolingen D. [17].

Генотипирование штаммов M.tuberculosis.

Подготовка образцов, регенерация мембран, подготовка буферов, расходного материала, проведение сполиготипирования микобактерий туберкулеза осуществлялось по разработанному протоколу в микобактериологической лаборатории Wadsworthcenter (г. Олбани, штат Нью-Йорк, США). В ПЦР-амплификации используются праймеры соответствующие спейсерным последовательностям. Присутствие или отсутствие спейсерных последовательностей определяется Саузерн-блот-гибридизацией, то есть проводится гибридизация олигонуклеотидов соответствующего состава, нанесенных на мембрану с уникальными спейсерными последовательностями Ампликоны, включающие спейсерные промежутки DR-региона, полученные с использованием биотинилированных праймеров, гибридизовались со специфическими зондами, закрепленными на нейлоновой мембране. Био-тинилированые праймеры и мембрана входили в состав набора для сполиготипирования «SpoligotypingKit» (IsogenLifescience, США). Сполиготип для каждого штамма записывался в двоичном формате, где для каждого из 43 спейсерных промежутков DR-региона единицей (1) обозначалось наличие гибридизационного сигнала, а нулем (0) – его отсутствие. Обработку мембраны после гибридизации и визуализацию продуктов реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Подготовка библиотек для полногеномного секвенирования проводилась по протоколам производителя RapidLibraryPreparationMethodManualGSFLX+ SeriesXL+ (Roche diagnostics, Германия). Для осуществления эмульсионной ПЦР и обогащения магнитных бусинок с фрагментами ДНК использовали руководство завода-изготовителя Roche emPCR Method Manual– Lib-L SV(LV), где использовался набор emPCRKitLib-LSV(LV) (Roche diagnostics, Германия).

Полногеномное «shotgun» секвенирование было выполнено с использованием платформы Roche 454 GS FLX+ Titanium (Roche diagnostics) по стандартному протоколу GS-FLXPlus_Sequencing_Method-Manual_XLPlusKit_May2011 (Roche diagnostics, Германия).

Сборка полных геномов проводилась с использованием *NEWBLERde novo* assembler (454 Life Sciences, Branford, CT)(Roche diagnostics, Германия).Параметры сборки: ожидаемая глубина – 0; минимальная длина рида – 20; минимальная длина перекрывания – 40; минимальная идентичность перекрывания – 90%; параметр идентичности выравнивания – 2; параметр различности выравнивания – «-3»; пограничное значение для всех контигов – 100; пограничное значение для больших контигов – 500; пограничное значение для скафолдов – 2000.

Выравнивание и картирование сиквенсовых ридов проводилось на референсный штамм *M.tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3, GCF_000195955.2) с использованием GS Refe-rence Mapping (454 Life Sciences, Branford, CT). Полный референсный геном был загружен из международной базы GenBank (National Center for Biotechnology Information). Сравнительный анализ обнаруженных геномных вариантов среди 20 изолятов проводили с применением диаграмм Венна. Поиск генетических локусов и генов, соответствующих определенной позиции в геноме, среди обнаруженных геномных вариантов проводился с применением разработанного биоинформатического скрипта.

Результаты и их обсуждение

Генотипирование M.tuberculosis

Проведен анализ на присутствие или отсутствие уникальных спейсерных нуклеотидных последовательностей DR-регионов генома микобактерий для определения генотипов изучаемых 20 клинических изолятов (таблица 1).

Сравнительный анализ полученных данных проводили с данными интернациональной базы SpolDB3, SpolDB4, SITVITweb(http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html**),** а также с базой данных микобактериологической лаборатории Wadsworthcenter (штат Нью-Йорк, США).

Большинство изученных изолятов *M. tuberculosis* (18) относятся к семейству Beijing (происхождение восточно-азиатское East Asian), только два изолятапоказали принадлежность к семействам T (происхождение евро-американское Euro-American) и MANU-1 (индо-океанское Indo-Oceanic). Анализ данных лекарственной чувствительности показал, что генотипы отличные от Beijing – T и MANU-1 являются лекарственно-чувствительными изолятами, тогда как, представители семейства Beijing имеют различный профиль лекарственной чувствительности (множественная лекарственная устойчивость или мультирезистентные MDR -8, широкая лекарственная устойчивость или XDR -3, полирезистентный – 1, монорезистентный – 1, чувствительные – 5).

Таким образом, 13 из 18 изолятов *M. tuberculosis* семейства Beijing относятся к лекарственно-устойчивым штаммам, что подтверждает данные о том, что большинство представителей семейства Beijing имеют ассоциацию с лекарственной устойчивостью.

Таблица 1 – Генетические семейства и тип лекарственной чувствительности 20 исследуемых клинических изолятов M.tuberculosis

№ ID	Лекарственная чувствительность	Октал код	Семейство (генотип)	Линия происхождения
N1	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N2	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N3	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N4	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N5	XDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N6	чувствительный	777737663760771	T (T1)	Euro-American
N7	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N8	чувствительный	774777777427771	Manu1	Indo-Oceanic
N9	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N10	XDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N11	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N12	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N13	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N14	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N15	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N16	XDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N17	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N18	монорезистентный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N19	полирезистентный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N20	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)

Анализ геномных вариантов различных изолятов M.tuberculosis

Основные статистические показатели проведенного биоинформатического анализа геномных вариантов для каждого из 20 изолятов представлены в таблице 2, где указаны показатели общего количества обнаруженных геномных вариантов для каждого исследованного изолята, отличающихся от референсного штамма *M.tuberculosis*H37Rv.

Для изучения геномных локусов, участвующих в возникновении устойчивости к основным лекарственным препаратам была проанализирована международная база данных «Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database». В результате анализа были отобраны наиболее часто встречающиеся мутации в генетических локусах к основным лекарственным препаратам (таблица 3).

Для каждого полногеномного изолята были проанализированы генетические локусы, определяющие устойчивость к лекарственным препаратам из числа найденных геномных вариантов и соответствующие гены (таблица 2). Было обнаружено от 13 до 30 генетических локусов с геномными вариантами среди полногеномных данных 20 изолятов. В разработанной базе данных подробно приведены все обнаруженные геномные варианты (однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции, делеции) для каждого изученного изолята с указанием общей глубины покрытия на данный вариант, описанием продукта гена, позиции в референсном геноме.

Таблица 2 – Основные статистические показатели анализа геномных вариантов

Идентификатор	Лек. устойчивость	Общее кол-во геномных вариантов	Кол-во обнаруженных вариантов из международной базы «TBDrugResistance Mutation Database»	Кол-во генов
MTB-06-001	MDR	1768	26	14
MTB-06-002	MDR	1831	30	16
MTB-06-003	MDR	1721	26	15
MTB-06-009	MDR	1820	25	16
MTB-07-004	MDR	1799	27	17
MTB-07-005	MDR	854	18	15
MTB-07-007	MDR	1565	25	13
MTB-07-010	MDR	1685	26	16
MTB-06-005	XDR	1754	27	17
MTB-06-010	XDR	1780	26	16
MTB-07-006	XDR	1666	20	11
MTB-07-008	монорезистентный	1475	19	12
MTB-07-009	полирезистентный	1770	24	15
MTB-06-004	чувствительный	1741	23	12
MTB-06-006	чувствительный	1025	13	10
MTB-06-007	чувствительный	1651	16	12
MTB-06-008	чувствительный	1780	23	14
MTB-07-001	чувствительный	1737	22	14
MTB-07-002	чувствительный	1810	20	13
MTB-07-003	чувствительный	1641	19	12

Таблица 3 – Основные локусы лекарственной устойчивости M.tuberculosis, согласно базы данных«Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database»

Противотуберкулезный препарат	Локус	Ген
AMINOGLYCOSIDES (KANAMYCIN / CAPREOMYCIN / AMIKACIN / VIOMYCIN)	MTB000019, Rv1694	rrs, tlyA
ETHAMBUTOL	Rv0340, Rv0341, Rv0342, Rv0343, Rv1267c, Rv3124, Rv3125c, Rv3126, Rv3264c, Rv3266c, Rv3793, Rv3794, Rv3795	iniB, iniA, iniC, embR
ETHIONAMIDE	Rv1483, Rv1484, Rv3854c	mabA, inhA, ethA
FLUOROQUINOLONES	Rv0005, Rv0006	gyrB, gyrA
ISONIAZID	Rv0129c, Rv0340, Rv0341, Rv0342, Rv0343, Rv1483, Rv1484, Rv1592c, Rv1772, Rv1854c, Rv1908c, Rv1909c, Rv2242, Rv2243, Rv2245, Rv2247, Rv2427a, Rv2428, Rv2846c, Rv3139, Rv3566c, Rv3795	fbpC, iniB, iniA, iniC, mabA, inhA, ndh, katG, furA, srmR, fabD, kasA, accD6, oxyR, aphC, efpA, fadE24, nhoA, embB
PARA-AMINOSALISYLIC ACID	Rv2764c	thyA
PYRAZINAMIDE	Rv2043c	pncA
RIFAMPICIN	Rv0667, Rv3795	rpoB, embB
STREPTOMYCIN	MTB000019, Rv0682, Rv3919c	rrs, rpsL, gidB

На рисунке 1 представлено распределение всех обнаруженных геномных вариантов среди 20 изолятов. Для изолятов MTB-07-005 и MTB-06-006 было обнаружено аномально низкое количество генетических изменений в сравнении с референсным штаммом *M.tuberculosis* H37Rv и с общей группой по типу MDR и чувствительный. Практически все изоляты относятся к семейству Beijing, за исключением изолята MTB-06-006, относящегося к семейству T – евро-американская линия происхождения, что может служить подтверждением существенного отличия MTB-06-006 на уровне генетических изменений. Наиболее отличным и интересным остается изолят MTB-07-005, что требует его дальнейшего детального изучения.

Нами были выбраны три основные клинические группы для проведения сравнительного биоинформатического анализа между изолятами– чувствительная (SUSC), MDR и XDR. В качестве отдельных представителей каждой группы были выбраны изоляты – MTB-06-003, MTB-07-006 и MTB-07-002. Результат детекции и поиска общих и отличающихся генетических локусов, характерных для трех основных клинических групп представлен графически на рисунке 2.

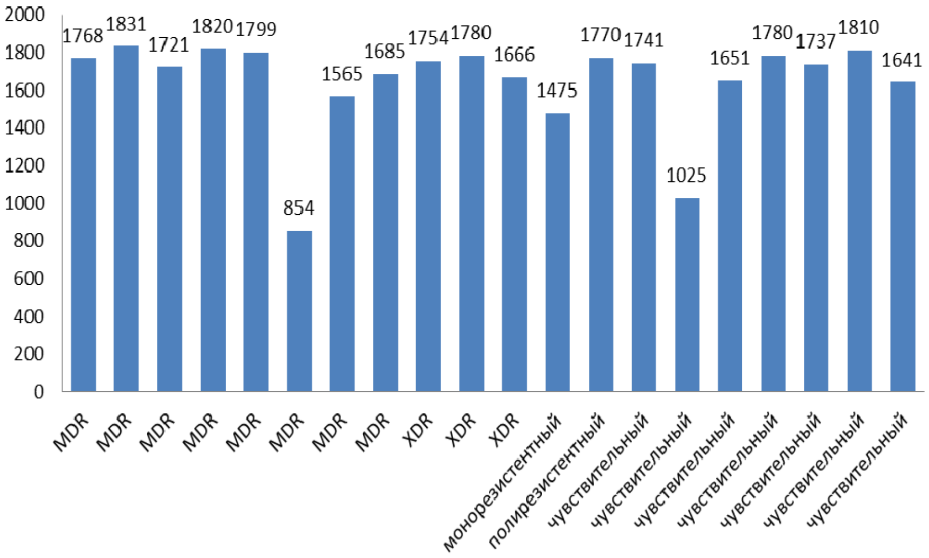


Рисунок 1 – Распределение обнаруженных геномных вариантов (полиморфизмы, делеции и инсерции) среди 20 изолятов согласно клинической характеристике

Из диаграммы легко проследить большее сходство MDR и XDR изолятов с чувствительным (SUSC) нежели между собой, на основании выбранных изолятов, так, например, между изолятами MTB-06-003 и MTB-07-006 обнаружено 4 общих генетических локуса (гены PE_PGRS24, PPE24, PPE5, PE_PGRS56), не найденных в MTB-07-002. Между MTB-07-002 и MTB-06-003, а также между MTB-07-002 и MTB-07-006 обнаружено 45 и 33 общих уникальных генетических локуса, соответственно.

Обнаружено 1018 общих генетических локуса между тремя изолятами разных групп лекарственной чувствительности, основную часть из которых составляют, так называемые «ядерные (core)» генетические локусы – необходимые для обеспечения жизнедеятельности микобактерии.

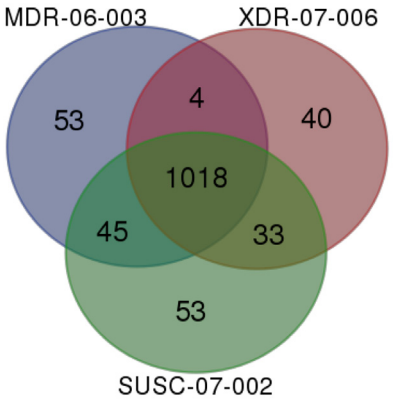


Рисунок 2 – Визуализация количества совпадений по геномным локусам, обнаруженных в трех типах изолятов в виде диаграммы Венна (чувствительный – SUSC, MDR и XDR) на примере MTB-06-003, MTB-07-006 и MTB-07-002

Необходимо отметить, что обнаруженные геномные варианты в четырех гена PE_PGRS24, PPE24, PPE5, PE_PGRS56, характерные для MDR и XDR изолятов, относятся к семейству генов PE/PPE, являющихся уникальными и представленными только для вида микобактерий. Белки данного семейства генов могут играть роль факторов вирулентности и способствовать успешному инфицированию [18, 19, 20]. Т.е. мутации характерные для двух данных изолятов могут быть одним из дополнительных факторов вирулентности, дающих преимущество данным изолятам при взаимодействии с организмом хозяина и требуют дальнейшего изучения.Кроме того, в нашей базе данных имеются данные по обнаруженным геномным вариантам в конкретных генетических локусах, как уникальные и не повторяющиеся, так и те, которые являются смежными в сравнительном аспекте для разных изолятов, относящихся к разным группам по лекарственной чувствительности, а также сравнительная характеристика совпадений по геномным локусам, обнаруженных в трех типах изолятов.

В последнее время все большее внимание уделяется изучению и внедрению новых технологий полногеномного секвенирования, а также внедрению современных молекулярно-генетических методов для диагностики *M.tuberculosis*. В данной работе определены полные последовательности геномов *20 клинических изолятов M. tuberculosis*с различной лекарственной чувствительностью, из базы данных«TuberculosisDrugResistanceMutationDatabase» отобраны основные 37 генов, ассоциированные с лекарственной устойчивостью*M.tuberculosis*к9 базовым противотуберкулезным препаратам1 и 2 ряда, были проанализированы соответствующику участки данных генов для каждого изолята, а также проведен сравнительный биоинформатический анализ между изолятами с различной лекарственной чувствительностью (чувствительные, MDR и XDR), где определены геномные варианты в четырех генах PE_PGRS24, PPE24, PPE5, PE_PGRS56, относящиеся к семейству протеинов PE/PPE, играющие ключевую роль в патогенезе и характерные для MDR и XDR изолятов.

Работа выполнена в рамках проекта «Создание предпосылок персонализированного подхода в диагностике и лечении туберкулеза на основе полногеномного секвенирования M.tuberculosis» по бюджетной программе МОН РК «Грантовое финансирование научных исследований» на 2013-2015 гг.

Литература

1 World Health Organisation. Global tuberculosis report.20th edition.-World Health Organisation, Geneva, Switzerland. – 2015.ISBN 978-92-4-156505-9.

2 Barzon L., Lavezzo E., Militello V., Toppo S., Palu G.Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology // Int. J. Mol. Sci.- 2011.- Vol. 12.- P. 7861-7884.DOI: 10.3390/ijms12117861

3 Koser C.U., Ellington M.J., Cartwright E.J.P.,Gillespie S.H., Brown N.M., Farrington M., Holden M.T.G., Dougan G., Bentley S.D., Parkhill. J., Peacock S.J. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology // PLoS Pathogen.- 2012.- Vol. 8. № 8.- P.1–9. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002824

4 Hershberg R., Lipatov M., Small P.M., Sheffer H., Niemann S., Homolka S., Roach J.C., Kremer K., Petrov D.A., Feldman M.W., Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography // Plos Biol. – 2008. – V.6(12). e311- P.2658-2671.DOI: 10.1371/journal.pbio.0060311

5 Niemann S., Köser C.U., Gagneux S., Plinke C., Homolka S., Bignell H., Carter R.J., Cheetham R.K., Cox A., Gormley N.A., Kokko-Gonzales P., Murray L.J., Rigatti R., Smith V.P.,Arends F.P.M., Cox H.S., Smith G.,Archer J.A.C. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints // PLoS ONE. – 2009. – V.4(10).e7407– P1-7.DOI: 10.1371/journal.pone.0007407

6 Ioerger T.R., Koo S., No E-G., Chen X.H., Larsen M.H., Michelle H., Jacobs W.R., Pillay M., Sturm A.W., Sacchettini J.C. Genome analysis of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa // PLoS ONE. – 2009. – V.4(11).e7778. – P1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0007778

7 Gardy J.L., Johnston J.C., Sui S.J.H, Sui S.J.H., Cook V.J., Shah L.N., Brodkin E., Rempel S., Moore R., Zhao Y.J., Holt R., Varhol R.,Birol I., Lem M., Sharma M.K.,Elwood K., Jones S.J.M., Brinkman F.S.L., Brunham R.C., Tang P.Whole-genome sequencing and social network analysis of a tuberculosis outbreak // N Engl J Med/ – 2011. – V.364(8). – P.730e9.DOI: 10.1056/NEJMoa1003176

8 Ford C.B., Lin P.L., Chase M.R., Shah R.R., Iartchouk O., Galagan J., Mohaideen N., Ioerger T.R., Sacchettini J.C., Lipsitch M., Flynn J.L., Fortune S.M. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection // Nat Genet. – 2011. – V.43(5), – P.482e6.DOI: 10.1038/ng.811

9 Fleischmann R. D., Alland D., Eisen J. A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri

H., Gill J., Mikula A.,Bishai W., Jacobs W.R., Venter J.C., Fraser C.M.Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains // J. Bacteriol. – 2002. – V.184. – P.5479–5490.DOI: 10.1128/JB.184.19.5479-5490.2002

10 Tsolaki A.G., Hirsh A.E., DeRiemer K., Enciso J.A., Wong M.Z., Hannan M., de la Salmoniere Y.O.L., Aman K., Kato-Maeda M., Small P.M. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains //Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004. – V.101. – P.4865–4870.DOI: 10.1073/pnas.0305634101

11 Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K. E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S. and Musser J.M. Restricted structural gene polymorphism in the *M. tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1997. –V. 94.– P.9869–9874.

12 Kozhamkulov U., Akhmetova A., Rakhimova S., Belova E., Alenova A., Bismilda V.,

Chingissova L., Ismailov Sh., Ramanculov E,, Momynaliev K. Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan // Japanese Journal of Infectious Disease.-2011.- V.64.- P.253-255.

13 Akhmetova A, Kozhamkulov U, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Dymova M, Filipenko M, Ramanculov E Mutations in the pncA and rpsA genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan. International Journal Tuberculosis and Lung Diseases 2015 Feb;19(2):179-84. DOI: 10.5588/ijtld.14.0305.

14 Ibrayeva, U. Kozhamkulov, D. Raiymbek, A. Alenova, S. Igilikova, E. Zholdybayeva, T. Abildaev, K. Momynaliev. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the penitentiary system of Kazakhstan // International Journal Tuberculosis and Lung Diseases. 2014 Mar; 18(3):298-301.DOI: 10.5588/ijtld.13.0558.

15 Skiba Y, Mokrousov I, Ismagulova G, Maltseva E, Yurkevich N, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Aitkhozhina N. Molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population in Kazakhstan: A country-wide study Tuberculosis (Edinb). 2015 Sep;95(5):538-46. DOI 10.1016/j.tube.2015.04.012.

16 Ulykbek Kairov, Ulan Kozhamkulov, Askhat Molkenov, Saule Rakhimova et al. Draft Genome Sequences of Two Clinical Isolates *of Mycobacterium tuberculosis* from Sputum of Kazakh Patients // May/June 2015.- Volume 3 Issue 3 e00466-15. DOI:10.1128/genomeA.00466-15

17 Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of*Mycobacteriumtuberculosis* // Methods Enzymol. 1994; 235.P.196–205.

18 Banu S., Honore N., Saint-Joanis B., Philpott D., Prevost M.C., Cole S.T. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? // Molecular microbiology. -2002. -Vol. 44, № 1. – P. 9-19.DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02813.x

19 Mukhopadhyay S., Balaji K.N. The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis* // Tuberculosis.-2011. -Vol. 91, № 5. – P. 441-447.DOI: 10.1016/j.tube.2011.04.004

20 Adindla S., Guruprasad L. Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in *Mycobacterium tuberculosis* and other genomes // Journal of biosciences. -2003. -Vol. 28, № 2. – P. 169-179.DOI: 10.1007/BF02706216

References

1 World Health Organisation. Global tuberculosis report (2015) 20th edition, World Health Organisation, Geneva, SwitzerlandISBN 978-92-4-156505-9

2 Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palu G(2011) Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology, Int J Mol Sci, 12:7861-7884.DOI: 10.3390/ijms12117861

3 Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, Holden MTG, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ (2012) Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology, PLoS Pathogen, 8 (8):1–9. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002824

4 Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S (2008) High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography, Plos Biol, 6(12): e311, 2658-2671.DOI: 10.1371/journal.pbio.0060311

5 Niemann S, Köser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, Carter RJ, Cheetham RK, Cox A, Gormley NA, Kokko-Gonzales P, Murray LJ, Rigatti R, Smith VP, Arends FPM, Cox HS, Smith G, Archer JAC (2009) Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints, PLoS ONE, 4(10): e7407, 1-7.DOI: 10.1371/journal.pone.0007407

6 Ioerger TR, Koo S, No E-G, Chen XH, Larsen MH, Michelle H, Jacobs WR, Pillay M, Sturm AW, Sacchettini JC (2009) Genome analysis of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa, PLoS ONE, 4(11): e7778, 1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0007778

7 Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Sui SJH, Cook VJ, Shah LN, Brodkin E, Rempel S, Moore R, Zhao YJ, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK,Elwood K, Jones SJM, Brinkman FSL, Brunham RC, Tang P (2011) Whole-genome sequencing and social network analysis of a tuberculosis outbreak, N Engl J Med, 364(8):730e9.DOI: 10.1056/NEJMoa1003176

8 Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, Mohaideen N, Ioerger TR, Sacchettini JC, Lipsitch M, Flynn JL, Fortune SM (2011) Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection, Nat Genet, 43(5): 482e6.DOI: 10.1038/ng.811

9 Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs WR, Venter JC, Fraser CM(2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains, J Bacteriol, 184:5479–5490. DOI: 10.1128/JB.184.19.5479-5490.2002

10 Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, de la Salmoniere YOL, Aman K, Kato-Maeda M, Small PM (2004) Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains, Proc Natl Acad Sci USA, 101:4865–4870. DOI: 10.1073/pnas.0305634101

11 Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS and Musser JM(1997) Restricted structural gene polymorphism in the *M. tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination, Proc Natl Acad Sci USA,94:9869–9874.

12 Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, Belova E, Alenova A, Bismilda V, Chingissova L, Ismailov Sh, Ramanculov E, Momynaliev K (2011) Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan, Japanese Journal of Infectious Disease, 64:253-255.

13 Akhmetova A, Kozhamkulov U, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Dymova M, Filipenko M, Ramanculov E (2015) Mutations in the pncA and rpsA genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan. International Journal Tuberculosis and Lung Diseases, 19(2):179-84. DOI: 10.5588/ijtld.14.0305

14 Ibrayeva A, KozhamkulovU, RaiymbekD, AlenovaA, IgilikovaS, ZholdybayevaE, AbildaevT, MomynalievK (2014) Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the penitentiary system of Kazakhstan, International Journal Tuberculosis and Lung Diseases, 18(3):298-301.DOI: 10.5588/ijtld.13.0558

15 Skiba Y, Mokrousov I, Ismagulova G, Maltseva E, Yurkevich N, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Aitkhozhina N (2015) Molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population in Kazakhstan: A country-wide study Tuberculosis, 95(5):538-46. DOI 10.1016/j.tube.2015.04.012

16 KairovU, KozhamkulovU, MolkenovA, Rakhimova S, et al. (2015) Draft Genome Sequences of Two Clinical Isolates *of Mycobacterium tuberculosis* from Sputum of Kazakh Patients, 3 (3): e00466-15.DOI:10.1128/genomeA.00466-15

17 Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD (1994) DNA fingerprinting of *Mycobacteriumtuberculosis*, Methods Enzymol, 235:196–205

18 Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST (2002) Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? // Molecular microbiology, 44(1):9-19.DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02813.x

19 Mukhopadhyay S, Balaji KN (2011) The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, 91(5):441-447. DOI: 10.1016/j.tube.2011.04.004

20 Adindla S, Guruprasad L (2003) Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in *Mycobacterium tuberculosis* and other genomes, Journal of biosciences, 28(2):169-179. DOI: 10.1007/BF02706216

[1,2]Сагындыкова М.С.,
[1]Иманбаева А.А.,
[2]Сарсенбаев К.Н.,
[3]Ахметоллаев И.А.

[1]РГП «Мангышлакский экспериментальный ботанический сад», Казахстан, г. Актау
[2]Евразийский Национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана
[3]РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана

Популяционная изменчивость геномной ДНК *Ferula foetida* (Bunge) Regel. в условиях пустыни Мангистау

В сравнительном плане изучена межвидовая близкородственная популяционная изменчивость геномной ДНК Ferula foetida (Bunge) Regel., произрастающей в пустыне Мангистау с различным уровнем эдафических факторов условия произрастания.

Для изучения геномной ДНК использовали свежие листья растений. Выделение ДНК проводили по модифицированному методу Holmes – Bonner. Для проведения ПЦР с геномной ДНК растений были отобраны 5 из 30 RAPD-праймеров. Получено 76 RAPD-маркерных бэндов, из которых 72 бэнда оказались полиморфными, а 4 бэнда – конститутивными для всех образцов. С помощью кластерных методов анализа и программы Popgen 32 построена дендрограмма, отражающая степень различий или сходства между RAPD-спектрами исследуемых объектов.

В результате проведённых исследований была обнаружена высокая межвидовая и популяционная изменчивость ферулы, обусловленная генетическими особенностями и условиями произрастания вида. Полученные результаты могут внести вклад в решение вопросов систематики внутри рода ферула. Данные о составе ДНК у популяций Ferula foetida, произрастающих в различных регионах, позволят генотипировать лекарственное сырьё и специи, получаемые из Ferula foetida в различных регионах для последующего его применения.

Ключевые слова: Ferula foetida, ДНК, RAPD, популяционная изменчивость, пустыня, Мангистау.

[1,2]Sagyndykova M.S.,
[1]Imanbaeva A.A.,
[2]Sarsenbaev K.N.,
[3]Ahmetollaev I.A.

[1]Mangyshlak Experimental Botanical Garden, Kazakhstan, Aktau
[2]G.N.Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana
[3]National Center of Biotechnology, Kazakhstan, Astana

Population variability of *Ferula foetida* genomic DNA, growing in arid Mangistau environment

Interspecific closely-related and population variability of genomic DNA of Ferula foetida (Bunge) Regel has been studied in the comparative plan. The plants grow in Mangistau desert with various levels of edaphic environmental factors.

Fresh plants leaves are used for genomic DNA research. DNA was extracted using modified Holmes – Bonner method. 5 out of 30 RAPD primers were selected for PCR with plants genomic DNA. 72 polymorphic and 4 constitutive RAPD-marker bands were obtained for all samples. The phylogenic dendrogram was plotted based on cluster analysis and Popgen 32 software. Dendrogram indicated distinctions or similarity degree between RAPD ranges of the researched objects.

As a result of conducted researches the high interspecific and population variability of Ferula was found. It was based on genetic features and growing conditions of species. The results received could make a contribution to the solution of controversial issues in terms of intrageneric systematization. DNA composition data of Ferula foetida which are growing in various regions could make possible the genetic typing medicinal raw products and spices came out from Ferula foetida in various regions for further practice.

Key words: Ferula foetida, DNA, RAPD, population variability, arid, Mangistau.

[1;2]Сағындықова М.С.,
[1]Иманбаева А.А.,
[2]Сарсенбаев К.Н.,
[3]Ахметоллаев И.А.

[1]РМК «Маңғышлақ тәжірибелік ботаникалық бағы» Қазақстан, Ақтау қ.
[2]Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.
[3] РМК «Ұлттық биотехнология центрі», Қазақстан, Астана қ.

Маңғыстаудың шөлді аймақтарында өсетін *Ferula foetida*-ның гендік ДНҚ-ның популяциондық өзгергіштігі

Өсу жағдайларының эдафикалық факторларының деңгейі әртүрлі. Маңғыстаудың шөлді аймақтарында өсетін Ferula foetida (Bunge) Regel. өсімдігінің гендік ДНҚ-ның тұраралық жақын туыстық және популяциондық өзгергіштігі салыстырмалы түрде зерттелген.

Гендік ДНҚ-ны зерттеу үшін өсімдіктің жасыл жапырақтарын пайдаландық. ДНҚ-ны бөлу Holmes-Bonner түрлендірілген әдістемесі бойынша жүргіздік. Өсімдіктің гендік ДНҚ-мен полимеразалық тізбек реакциясын іске асыру үшін 30 RAPD-праймер ішінен бесеуі таңдап алынды. Олардан 76 RAPD-маркерлі бэндтер бөлінді. Оның 72 бэнді – полиморфты, ал 4 бэнді барлық нұсқаларға тұрақты болып анықталды. Зерттелген нысандардың RAPD-спектрлерінің арасындағы айырмашылық пен ұқсастық деңгейін дендрограмма көрсетеді.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде феруланың үлкен тұраралық және популяциондық өзгергіштілігі табылған. Ол түрдің генетикалық ерекшеліктері мен өсіп-өну жағдайларымен шартталған. Зерттеулер нәтижесінде алынған мәліметтер ферула тұқымдасының ішкі систематикасының даулы мәселелерін шешуіне үлесін қосуы мүмкін. Әртүрлі аймақтарда өсетін Ferula foetida популяциясының ДНҚ құрамы туралы ақпарат болашақта пайдалану үшін әртүрлі аймақтарда өсетін Ferula foetida-дан алынатын дәрілік шикізат пен дәмдеуіштерді генотиптілеуіне мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: Ferula foetida, ДНҚ, RAPD, популяциондық өзгергіштік, шөл, Маңғыстау.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 58.009:574.3(577.21)

[1,2*]Сагындыкова М.С., [1]Иманбаева А.А.,
[2]Сарсенбаев К.Н., [3]Ахметоллаев И.А.

[1]РГП «Мангышлакский экспериментальный ботанический сад»,
Республика Казахстан, г. Актау
[2]Евразийский Национальный университет им.Л.Н.Гумилева,
Республика Казахстан, г. Астана
[3]РГП «Национальный центр биотехнологии», Республика Казахстан, г. Астана
*E-mail: m.sagyndykova@mail.ru

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМНОЙ ДНК *FERULA FOETIDA* (BUNGE) REGEL. В УСЛОВИЯХ ПУСТЫНИ МАНГИСТАУ

Введение

Флора Казахстана богата различными полезными лекарственными растениями. Представители рода *Ferula* L. насчитывают около 170 видов и многие виды с древнейших времен применялись в народной медицине различных государств (Средней Азии, Иране, Китае, Индии и др.) для лечения многих заболеваний [1, 2, 3]. В Казахстане, в том числе в пустыни Мангышлака одним из перспективных видов для введения в практическое использование в качестве лекарственного и пищевого растения является ферула вонючая – *Ferula foetida* (Bunge) Regel. [4, 5]. В пустыни Мангышлака популяции *Ferula foetida* охватывают большие площади и ежегодно хорошо возобновляются в природных условиях, которые позволяют заготавливать значительные объёмы растительного сырья. В различных популяциях морфологический и фитохимический состав растительного сырья его не одинаков, что связано с условиями произрастания и генетическими особенностями популяций. Введение данного вида предполагает изучение общей и сравнительной характеристики вида (биология, экология, распространение, сырьевые запасы) и химического состава отдельных органов.

Ферула вонючая – это многолетнее монокарпические травянистые растения, которые относятся к эфемероидам, т.е. цветут один раз в жизни по достижению определённого возраста соответственно [6]. Кроме того, этот вид рода *Ferula* L. разнообразен в морфологическом отношении, особенно по характеру рассечения листовой пластинки и плоду [7].

Самая всесторонняя классификация рода *Ferula* L., которая была предложена Коровиным Е.П. [8, 9, 10, 11], позже была модифицирована во Флоре СССР. В 80-е годы XX века Сафина Л.К. и Пименов М.Г., Чамберлин Д. и Речингер К. предложили свою классификацию рода, отличающуюся от классификации Коровина Е.П. [12, 13]. Коровин Е.П. утверждал, что *Ferula assa-foetida* является синонимом *Ferula foetida* [10], а Чемберлин Д. и Речингер К. [13], позже и Черепанов С.К. [14], оспаривали это утверждение, считая их разными видами. В 2008 году Курзина-Млыник Р. и др. на основе вариации ядерной

рибосомой ДНК описали филогенетическую позицию рода *Ferula* L., в которой придерживались систематики, предложенной Сафиной Л.К. и Пименовым М.Г. для видов рода ферула, произрастающих на территории современного Казахстана [15].

Таким образом, ферула вонючая, имеет ряд наименований в различных источниках литературы и странах, и однозначного мнения ученых об их видовой схожести или различия на сегодняшний день нет.

В настоящее время в систематике для определения видов наряду с морфологическими и анатомическими признаками используются данные биохимических и генетических исследований [16]. Имеются единичные филогенетические исследования некоторых видов рода *Ferula* L., в том числе место вида в иерархии рода [15, 17], однако изучение геномной ДНК *Ferula foetida* (Bunge) Regal. и его популяционная внутривидовая изменчивость в условиях пустыни Мангистау изучаются впервые.

Генетическое разнообразие популяции определяет её способность адаптироваться к непосредственному окружению в процессе естественного отбора. При низких показателях внутрипопуляционного полиморфизма снижается количество возможных комбинаций генов, способствующих адаптации к окружающей среде, что уменьшает вероятность того, что в этой популяции возникнут новые приспособленные генотипы. Таким образом, популяция в естественных условиях нуждается в соответствующем уровне генетического разнообразия для выживания под давлением постоянно меняющихся биотических и абиотических компонентов экосистемы [18].

Полиморфизм растений можно изучать, опираясь на информацию о нуклеотидной последовательности геномной ДНК. В большинстве случаев молекулярные маркеры, используемые для анализа внутривидового и межвидового разнообразия у растений, представляют собой анонимные ДНК-фрагменты, отражающие полиморфизм участков генома, выбранных случайным образом. RAPD-анализ при одновременном анализе образцов может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп [19].

Целью исследования являлось сравнительное изучение межвидовой и популяционной изменчивости геномной ДНК *Ferula foetida* (Bunge) Regel. в природных сообществах пустынной зоны Мангистау.

Материалы и методы исследования

Для изучения геномной ДНК растений нами были собраны образцы двух видов рода *Ferula* L., произрастающих в условиях пустыни Мангистау – *Ferula foetida* (Bunge) Regal. и *Ferula nuda* Spreng. Образцы растений были собраны в природных популяциях, расположенных в южной части полуострова Мангышлак, который на западе представлен песками Туйесу, на востоке впадиной и песками Карынжарык, на севере граничит с урочищем Караадыр, на юге примыкает к уступу Куланды (в районе возвышенности Тынымбай Шокы). Образцы замораживали и хранили в жидком азоте. Анализ всех образцов производили одновременно, одними и теми же реактивами. Какими методами Карта местности и ареала сбора образцов растений приведены в рисунке 1.

Пески Туйесу расположены неподалеку от посёлка Сенек, где ферула участвует в формировании саксаулово-ферулово-полынно-псаммофитно-кустарниковых ассоциаций. Рельеф с понижениями, бугристо-грядовый, волнистый с закрепленным песчаным массивом. Почвы – песчаные и супесчаные в основном незасоленные или слабозасоленные. Пески Туйесу обеспечены неглубокими пресными водами, имеются пригодные для питья верховодки. Глубина залегания подземных вод от 3,0 – 5,0 до 41 м. Мощность обводненной части эоловых песчаных массивов колеблется от 5,0 до 33,3 м.

Пески Карынжарык находятся в юго-западной части огромной впадины Карынжарык, южно-карынжарыкского района Мангистауской области. Дно впадины покрывает самый протяженный в пустыни Мангистау сор Кендерли. Часть территории Южно-Карынжаркского района расположена на территории Устюртского заповедника. При обследовании массивов с участием ферулы отмечено, что ее заросли широко распространены во впадине и песках Карынжарык в составе кемрудополынно-ферулово-разнотравно-саксаулловой, осоково-кемрудоно-полынно-боялычево-саксауловой ассоциациях. Почва на данной территории преимущественно песчаная и супесчаная незасоленная по всему генетическому профилю. Пески Карынжарык обводнены слабо либо безводные. Отдельные небольшие локальные участки обводнены водами различной степени засоленности.

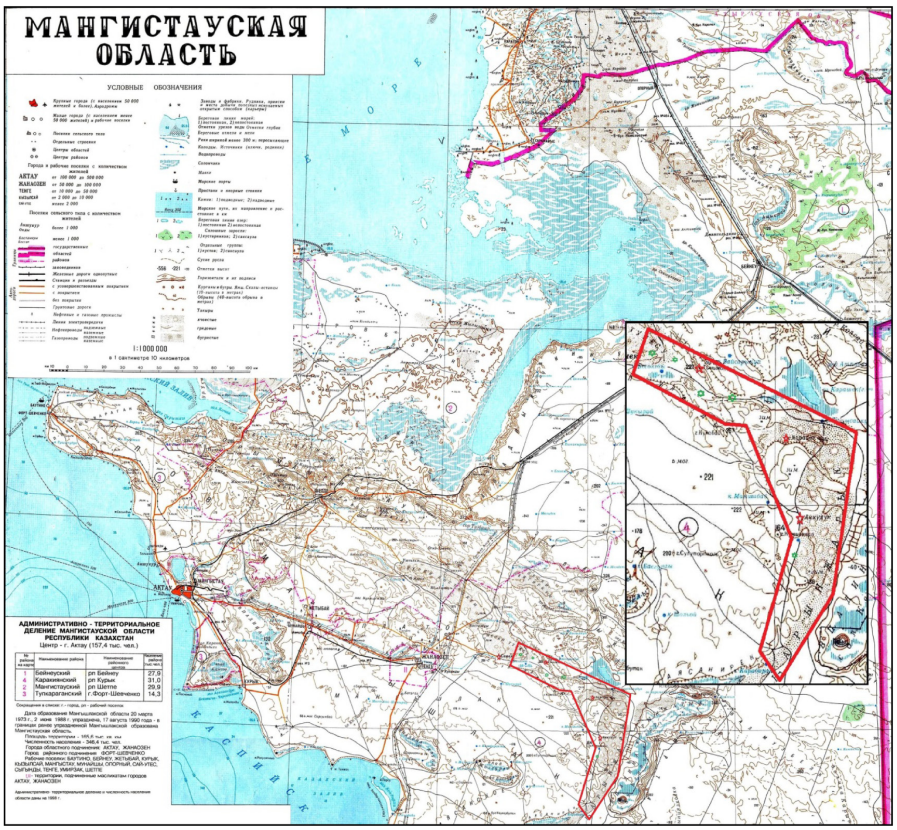


Рисунок 1 – Карта местности и ареала сбора образцов растений

Возвышенность Тынымбай шокы находится неподалёку от горы Кунабай. *Ferula foetida* встречается в составе саксаульно-феруловосантолинополынной, осоково-белоземельнополынно-феруловой ассоциаций. Местность значительно отличается от остальных как по механическому составу, так и по засоленности почвы. До глубины 30 см она супесчаная, от 30 до 50 см – легкосуглинистая, в интервале от 50 и до 100 см среднесуглинистая. Степень засоленности почвы с поверхности и до 50 см слабая, в горизонтах 50-80 см – средняя и 80-100 см – сильная. Оводненность территории крайне низкая, растения получают влагу в виде атмосферных осадков и неглубоко залегающих грунтовых вод различной степени засоленности.

Ферула вонючая встречается в супесчаных массивах в 8-10 км восточнее урочища Караадыр. В супесчаных массивах представлена в жузгуно-кустарниковых сообществах. Оводненность территории крайне низкая, растения получают влагу в виде атмосферных осадков.

В качестве объектов исследований использовали свежие листья растений, собранные во время полевых экспедиций по Мангистауской области в мае 2015 г. Образцы растений *Ferula nuda* использовались для сравнения с геномной ДНК *Ferula foetida*. Выделение ДНК проводили по модифицированному методу Holmes – Bonner [16]. Качество выделенной ДНК анализировали в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Полимеразную цепную реакцию проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей 2 единицы Taq-полимеразы («ACTG LAB», Казахстан), 10 мМ Трис-HCl pH 8.3, 50 мМ KCl, 0,01% детергента Tween-20 («PanReac AppliChem», Германия), по 25 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 2,5 мМ $MgCl_2$ («Qiagen», США), 200 нг ДНК и 1 мкМ праймера (таблица 1). Амплификацию проводили в программируемом термостате Tetrad 2 («Bio-Rad», США) в следующих условиях: 1 цикл – стадия денатурации при 94˚С 5 минут, затем 30 циклов: 94˚С – 30 с, 45˚С – 30 с, 72˚С- 30 с. Продукты реакции разделяли в 2% агарозном геле с дальнейшим окрашиванием бромистым этидием («Fermentas»,США). Генетические дистанции между исследованными геномами

было определено посредством невзвешанного парногруппового метода с арифметическим усреднением по алгоритму Неи [17]. С помощью кластерных методов анализа построили дендрограмму, отражающую степень различий или сходства между RAPD-спектрами исследуемых объектов, что важно для изучения меж- или внутривидовых взаимоотношений. Генеалогическую дендрограмму строили по данным RAPD-анализа с применением программы Popgen 32.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении ПЦР с геномной ДНК растений рода *Ferula* L. нами были испытаны 30 произвольных десятичленных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и GC-составу. Из них как наиболее информативных были отобраны 5 праймеров, фланкирующих обращенные повторы в геноме растений рода Ferula L. На рисунках 2-6 представлены спектры продуктов амплификации ДНК разных популяций растений рода *Ferula* L.

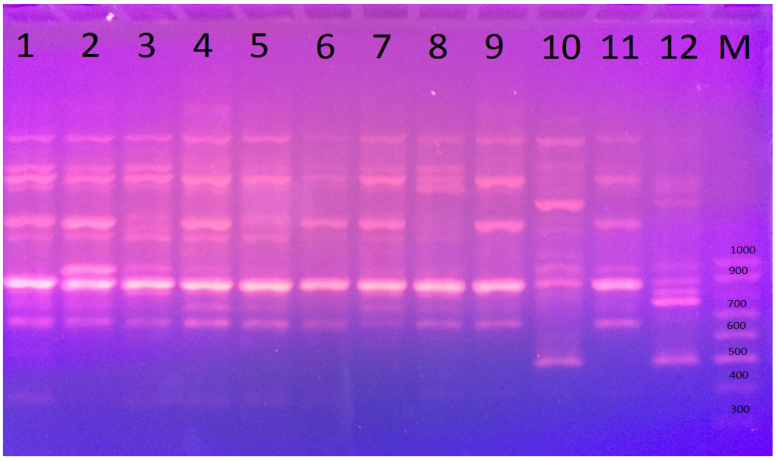


Рисунок 2 – RAPD-спектр полученный с помощью праймера RAPD07.
Популяции Ferula foetida: 1, 6, 9 – в районе песков Карынжарык; 2, 3 – в районе песков Туйесу;
11 – в районе ущелья Камысты; 4, 5 – в районе урочища Караадыр, 7 – местность Южнее возвышенности Тынымбай Шокы,
8 – местность Западнее возвышенности Тынымбай Шокы. Популяции Ferula Nuda: 10 – в районе ущелья Камысты,
12 – в районе урочища Караадыр.

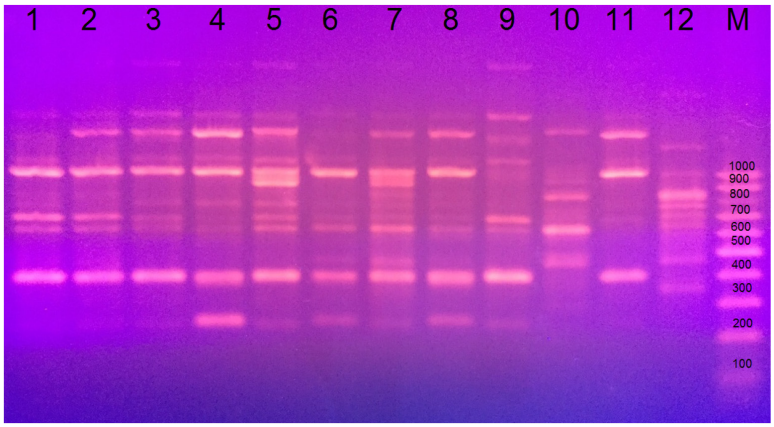


Рисунок 3 – RAPD-спектр полученный с помощью праймера RAPD13.
Популяции Ferula foetida: 1, 6, 9 – в районе песков Карынжарык; 2, 3 – в районе песков Туйесу;
11 – в районе ущелья Камысты; 4, 5 – в районе урочища Караадыр, 7 – местность Южнее возвышенности Тынымбай Шокы,
8 – местность Западнее возвышенности Тынымбай Шокы. Популяции Ferula Nuda: 10 – в районе ущелья Камысты,
12 – в районе урочища Караадыр.

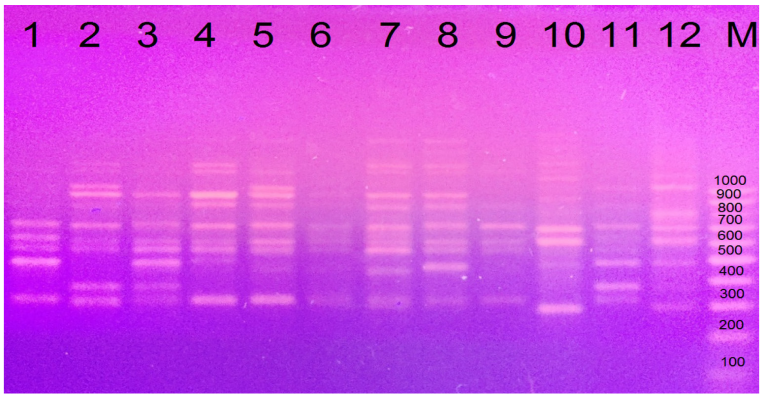


Рисунок 4 – RAPD-спектр полученный с помощью праймера RAPD14.
Популяции Ferula foetida: 1, 6, 9 – в районе песков Карынжарык; 2, 3 – в районе песков Туйесу; 11 – в районе ущелья Камысты; 4, 5 – в районе урочища Караадыр, 7 – местность Южнее возвышенности Тынымбай Шокы, 8 – местность Западнее возвышенности Тынымбай Шокы. Популяции Ferula Nuda: 10 – в районе ущелья Камысты, 12 – в районе урочища Караадыр.

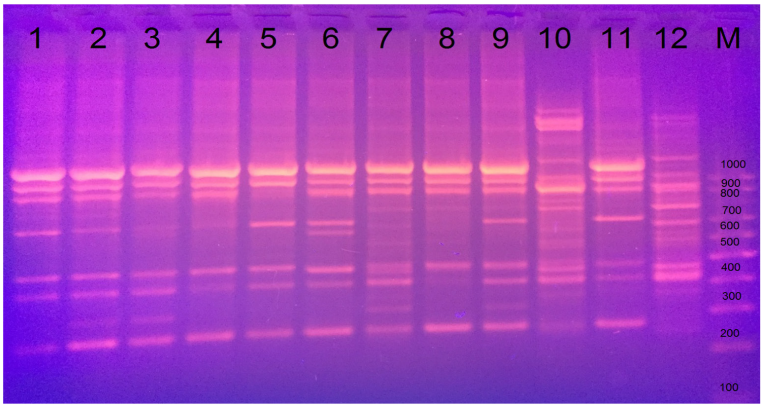


Рисунок 5 – RAPD-спектр полученный с помощью праймера RAPD24.
Популяции Ferula foetida: 1, 6, 9 – в районе песков Карынжарык; 2, 3 – в районе песков Туйесу; 11 – в районе ущелья Камысты; 4, 5 – в районе урочища Караадыр, 7 – местность Южнее возвышенности Тынымбай Шокы, 8 – местность Западнее возвышенности Тынымбай Шокы. Популяции Ferula Nuda: 10 – в районе ущелья Камысты, 12 – в районе урочища Караадыр.

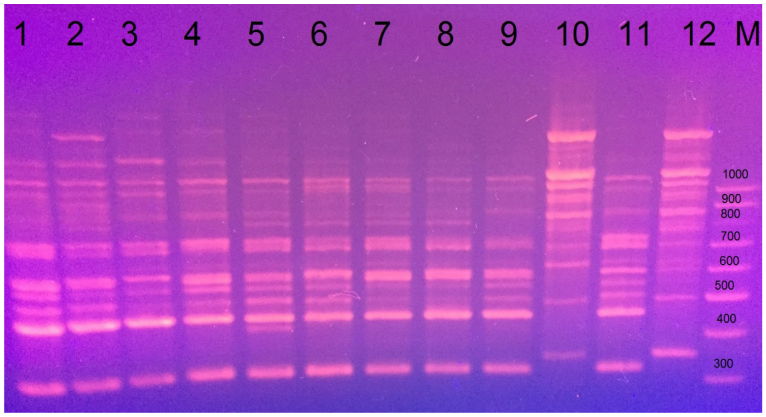


Рисунок 6 – RAPD-спектр полученный с помощью праймера RAPD30.
Популяции Ferula foetida: 1, 6, 9 – в районе песков Карынжарык; 2, 3 – в районе песков Туйесу; 11 – в районе ущелья Камысты; 4, 5 – в районе урочища Караадыр, 7 – местность Южнее возвышенности Тынымбай Шокы, 8 – местность Западнее возвышенности Тынымбай Шокы. Популяции Ferula Nuda: 10 – в районе ущелья Камысты, 12 – в районе урочища Караадыр.

По каждому из пяти выбранных RAPD праймеров была выявлена высокая изменчивость как между исследуемыми образцами ДНК одного вида, так и внутри рода. Вариабельность ампликонов, выявленная праймерами RAPD07, RAPD13, RAPD14, RAPD24 и RAPD30 достаточна для исследования внутрипопуляционной изменчивости растений рода *Ferula* L. Каждый из представителей 12 популяций растений рода *Ferula* L. имеет специфический спектр RAPD–продуктов характеризующихся количеством фрагментов, их размерами и степенью выраженности. Минорные фрагменты воспроизводятся при повторных амплификациях, а отдельные случаи отсутствия или недопроявления бэндов можно объяснить неполной амплификацией. Число фрагментов, полученных при амплификации ДНК 12 изученных популяций с используемыми праймерами, колеблется от 14 до 17. Некоторые фрагменты являются общими для всех или большинства исследуемых популяций. Вероятно, что эти ампликоны связаны с консервативными участками генома, и определяют принадлежность к одному роду или виду. В таблице 1 представлена информация об использованных праймерах и их RAPD спектрах.

Таблица 1 – Полиморфные и мономорфные последовательности с RAPD праймерами

Праймер	Последовательность праймера от 5’ к 3’	Общее количество RAPD – полос	Полиморфные последовательности	Мономорфные последовательности
RAPD07	CTGCGGGTCA	14	13	1
RAPD13	TGCCGAGCTG	17	16	1
RAPD14	AGTCAGCGAC	15	13	2
RAPD24	TGATCCCTGG	15	15	-
RAPD30	GTCCCGACGA	15	15	-
Всего		76	72	4

Таблица 2 – Суммарная матрица генетических дистанций

pop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	0,8421	0,8289	0,8289	0,8026	0,8289	0,7368	0,7763	0,8816	0,3947	0,8421	0,3684
2	0,1719	****	0,8289	0,8289	0,8289	0,7763	0,8158	0,8026	0,8026	0,3684	0,8158	0,3158
3	0,1876	0,1876	****	0,8158	0,7632	0,7105	0,7237	0,7105	0,7895	0,3816	0,8026	0,4079
4	0,1876	0,1876	0,2036	****	0,8684	0,7632	0,8289	0,8421	0,8158	0,3816	0,7763	0,3026
5	0,2199	0,1876	0,2703	0,1411	****	0,7632	0,8026	0,7632	0,8158	0,3026	0,7500	0,2763
6	0,1876	0,2532	0,3417	0,2703	0,2703	****	0,7500	0,7632	0,8421	0,4605	0,7763	0,4079
7	0,3054	0,2036	0,3234	0,1876	0,2199	0,2877	****	0,8553	0,7237	0,3947	0,6579	0,2895
8	0,2532	0,2199	0,3417	0,1719	0,2703	0,2703	0,1563	****	0,7368	0,4079	0,6974	0,2763
9	0,1260	0,2199	0,2364	0,2036	0,2036	0,1719	0,3234	0,3054	****	0,4079	0,8026	0,3553
10	0,9295	0,9985	0,9634	0,9634	1,1952	0,7754	0,9295	0,8967	0,8967	****	0,4211	0,8158
11	0,1719	0,2036	0,2199	0,2532	0,2877	0,2532	0,4187	0,3604	0,2199	0,8650	****	0,4211
12	0,9985	1,1527	0,8967	1,1952	1,2862	0,8967	1,2397	1,2862	1,0349	0,2036	0,8650	****

Как видно из представленных данных получено 76 RAPD – маркерных бэндов, из которых 74 бэнда проявляют себя как полиморфные маркеры, а 4 бэнда оказались конститутивными RAPD маркерами для всех образцов. Основываясь на этих данных, была составлена матрица состояния RAPD ампликонов и проведен математический анализ генетических дистанций между исследованными образцами. На основании полученных спектров ампликонов были составлены таблицы, отражающие наличие или отсутствие соответствующего ампликона, характерного для каждого из праймеров (наличие ампликона обозначалось цифрой – 1, отсутствие цифрой – 0). В таблице 2 представлены данные распределения генетических дистанций между исследованными популяциями.

Данные представленные в таблице 2 показывают генетическое расстояние, рассчитанное посредством анализа частоты распределения вариабельных и конститутивных ампликонов между исследованными геномами.

По данным генетических дистанций между исследованными популяциями были рассчитаны параметры сходства и различия RAPD профилей и построена дендрограмма характеризующая генетическое различие и сходство исследованных популяций. На рисунке 6 представлена дендрограмма, а в таблице 3 представлены показатели генетических дистанций между популяциями.

Все используемые праймеры эффективно обеспечивали синтез специфических и воспроизводимых наборов фрагментов (ампликонов). Число ампликонов в зависимости от использованного праймера составляло от 5 до 20, их размеры варьировали в пределах 200-2000 пн. Наряду с наличием общих ампликонов, большую часть спектров составляют фрагменты, которые присутствуют в одних и отсутствуют в других геномах. Эти фрагменты являются полиморфными маркерами исследуемых ДНК.

Генетическая дистанция, полученная при анализе RAPD-профилей одного и того же индивида, стремится к нулю, таким образом, чем меньше генетическое расстояние между популяциями, тем генетически ближе они друг к другу.

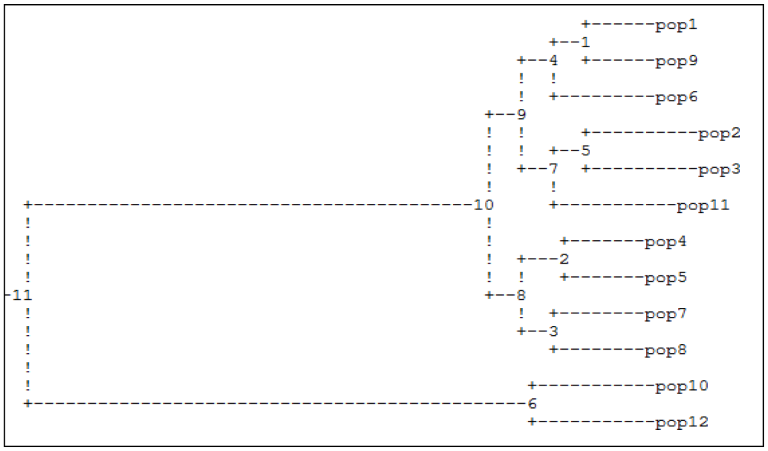


Рисунок 7 – Дендрограмма распределения RAPD-профилей у 12 образцов растений рода Ferula L.
11 – род Ferula L.: 10 –популяции Ferula foetida: 1, 6, 9 – в районе песков Карынжарык; 2, 3 – в районе песков Туйесу; 11 – в районе ущелья Камысты; 4, 5 – в районе урочища Караадыр, 7 – местность Южнее возвышенности Тынымбай Шокы, 8 – местность Западнее возвышенности Тынымбай Шокы. 6 – популяции Ferula Nuda: 10 – в районе ущелья Камысты, 12 – в районе урочища Караадыр.

Во время исследований была изучена геномная ДНК растений видов *Ferula foetida* (Bunge) Regel. и *Ferula nuda* Spreng., которые принадлежат к одному роду *Ferula* L. Результаты кластеризации RAPD-спектров показали, что исследуемые популяции образуют два основных кластера 6 и 10. Расстояние между корнем кластера 11 и кластера 10 равно 37,.42 единицам. Высокие показатели генетических дистанций между кластерами 6 и 10 указывает на то, что популяции, образующие эти кластеры генетически значительно отдалены друг от друга, что указывает на то, что растения относятся к одному роду, но разным видам, т.е. кластер 10 объединил один вид *Ferula foetida*, а кластер 6 – *Ferula nuda*. Кластер11 объединил оба вида в один кластер, так как оба вида принадлежат к одному роду *Ferula* L.

Таблица 3 – Показатели генетических дистанций

Кластер	Кластер и популяция	Дистанция
11	10	37,41740
10	9	1,82673
9	4	2,43349
4	1	2,68419
1	pop1	6,30204
1	pop9	6,30204
4	pop6	8,98622
9	7	0,83325
7	5	1,20653
5	pop2	9,37993
5	pop3	9,37993
7	pop11	10,58646
10	8	2,62646
8	2	3,56605
2	pop4	7,05393
2	pop5	7,05393
8	3	2,80268
3	pop7	7,81730
3	pop8	7,81730
11	6	40,48389
6	pop10	10,17995
6	pop12	10,17995

Кластер 6 (*Ferula nuda)* образован популяциями pop10 и pop12. Генетическое расстояние между этими популяциями составляет 10,18 единиц. Это расстояние свидетельствует о том, что этот вид имеет сходные геномы, так как относится к одному виду *Ferula nuda,* но произрастает в различных популяциях.

Кластер 10 (*Ferula foetida)* образован двумя кластерами 8 и 9, что указывает на различные условия произрастания вида, физико-химические свойства почвы, условия водного режима. Так, образцы, относящиеся к кластеру 8 произрастают насупесчанно-суглинистых почвах с высоко засоленными грунтовыми водами или низким содержанием влаги. Образцы, собранные в кластер 9 произрастают в песчаной местности с наличием как пресных, так и низкозасолённых грунтовых вод.

Кластер 8 образован двумя подкластерами 2 и 3, а подкластер 2 сформирован двумя популяциями pop4 и pop5, подкластер 3 образуют популяции pop7 и pop8. Эти данные показывают, что образцы ферулы вонючей, собранные всупесчаных-суглинистых массивах (pop4, pop5, pop7 и pop8) имеют сходные геномные профили и являются родственными. Это указывает на то, что растения могут быть однотипными по местам произрастания, но в то же время имеют высокую изменчивость внутри вида.

Кластер 9 образован двумя кластерами 4 и 7. Кластер 4, так же как и кластер 7 образован тремя популяциями, что указывает на схожие условия произрастания, так как образцы объединённые в кластер 4 были собраны с песков Карынжарык, а кластер 7 с песков Туйесу, но

при этом внутривидовая изменчивость высокая.

Таким образом, результаты исследований свидетельствует о высокой межвидовой изменчивости вида *Ferula foetida,* а также вида *Ferula nuda,* исследованного для сравнения, и популяционной изменчивости растений рода ферула, произрастающих в пустыни Мангистау, что обусловлено генетическими особенностями и условиями произрастания, такими как состав почвы, засоление, оводненность региона. Результаты наших предыдущих исследований по анатомии и морфологии подтверждают факт значительной изменчивости популяций *Ferula foetida* в пустыни Мангистау [20, 7].

Виды рода *Ferula*, произрастающих в Иране, тоже высокополиморфны. Это подтверждается результатом кластерного анализа вида *Ferula gumossa Boiss*. 94% амплифицированных RAPD бэндов оказались полиморфны. Они были собраны с 13 различных мест Ирана и были объединены в 3 главные группы [21].

Генетическое разнообразие зародышевых плазм вида *Ferula assa-foetida*, произрастающего на юго-востоке Ирана, с использованием метода RAPD, также установил высокий полиморфизм видов, собранных с 30 различных мест произрастания. Из 10 праймеров было получено 127 полиморфных бэндов, которык согласно кластерному анализу объединились в 5 групп [22].

Заключение

На фактическом материале были выявлены схожие маркеры для видов рода *Ferula* L., которые были объединены в различные кластеры – *Ferula foetida* и *Ferula nuda*. В результате проведённых исследований была обнаружена межвидовая и популяционная изменчивость ферулы, обусловленная условиями произрастания вида, таких как почва и оводненность региона. Результаты по морфологии подтверждают факт значительного полиморфизма популяций *Ferula foetida* в условиях пустыни Мангистау. Полученные результаты могут внести вклад в решении спорных вопросов систематики внутри вида *Ferula foetida*.

Литература

1 Kareparamban J.A., Nikam P.H., Jadhav A.P., Kadam V.J. Ferula foetida “Hing”: A review // Researchh Journal Pharmacy and Biol.Chem.Sci. – 2012.- No.3, Vol.2. – C.775-786. DOI: 10.1016/S2222-1808(13)60038-9.

2 Зубайдова Т.М., Джамшедов Дж.Н., Ходжиматов М., Назаров М.Н., Исупов С.Д., Загребельный И.А., Самандаров Н.Ю., Сухробов П.Ш. Применение ферулы вонючей в древне-традиционной и народной медицине // Вест.Таджик.нац.ун-та. Сер. Естеств.наук. – 2013. – №1/2(106). – С.201-212.

3 Sahebkar A., Iranshahi M. Biological activities of essential oils from the genus Ferula (Apiacea) // Asian Biomedicine. – 2010. – Vol.4. – No.6. – C.835-847

4 Байтулин И.О., Нурушева А.М. О некоторых хозяйственно-ценных видах рода Ferula Казахстана // Известия НАН РК. Сер.Биол. – 2008.- №6.- С.3-6.

5 Garbovskaya V., Imanbayeva A., Sarsenbayev K., Sagyndykova M., Turpanova R., Zhamangara A. Perspective for commercialization medicinal plant from Mangyshlak – Ferula foetida.// Journal of biotech. – 2015. – Vol.208. – C.25. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2015.06.066.

6 Сафина Л.К. Ферулы Средней Азии и Казахстана (карпоанатомический обзор). – Т.18 (3). – Алматы: LEM. – 2012. – 244 с.

7 Иманбаева А.А., Белозеров И.Ф., Сагындыкова М.С. Морфология Ferula foetida (Bunge) Regel. в природных популяциях пустыни Мангистау // Материалы респ.науч.конф. «Биологические и структурно-функциональные основы изучения и сохранения биоразнообразия Узбекистана». Ташкент. – 2015. – Вып.1. – С.145-150.

8 Коровин Е.П. Главнейшие линии в систематике рода Ferula (Tourn) L. // Бюл. МОИП., отд. биол. – 1939. – Т.48. – Вып.5-6. – С.5-15.

9 Коровин Е.П. Дифференцирующая роль условий существования в эволюции растений. Род Ferula L. // Растение и среда. – 1940. – Т.1. – С.237-274.

10 Коровин Е.П. Иллюстрированная монография рода Ferula (Tourn.) L. – Ташкент: Изд-во АН УзССР. – 1947. – 91 с.

11 Коровин Е.П., Королева К. М., Криштофович А. Н., Манденова И. П., Пояркова А. И., Шишкин Б. К. Флора СССР. – М. – Л.: Изд.АН СССР. – 1951. – Т.17. – 390 с.

12 Сафина Л.К., Пименов М.Г. Ферулы Казахстана. – Алма-Ата: Наука. – 1984. – 200 с.

13 Rechinger K.H. Flora Iranica. – Austria: Academische Druck und Verlagsanstalt. – 1987. – Т.162. – 426 с.

14 Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Спб.: Мир и семья. – 1995. – 992 с.

15 Kurzyna-Mlynik R., Oskolski A.A., Downie S.R., Kopacz R., Wojewozdka A., Spalik K. Phylogenetic position of the genus Ferula (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation // Plant SystEvol. – 2008. – №274. – C.74-66. DOI:10.1007/s00606-008-022-2.

16 Калаев В.Н., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Карпеченко К.А., Кондратьева А.М., Вепринцев В.Н., Карпеченко Н.А., Карпова С.С., Моисеева Е.В., Баранова Т.В. Использование методов молекулярно-генетического анализа для изучения полиморфизма ДНК растений рода Rhododendron с целью их паспортизации // Фундаментальные исследования. – 2012. – №6. – С.323-328.

17 Пименов М.Г., Терехин А.Т., Девяткова Г.Н., Баранова Ю.В. Классификация видов рода Ferula L. (Umbelliferae) с помощью иерархического кластер-анализа // Вопросы кибернетики. – 1978. – Вып.47. – С.98-113.

18 Грушецкая З.Е., Никитинская Т.В., Кубрак С.В., Дзюбан О.В., Кухарева Л.В., Поликсенова В.Д., Титок В.В., Лемеш В.А., Парфенов В.И., Хотылева Л.В. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений // Вест. БГУ. – 2013. – Сер.2. – №3. – С.50-56.

19 Кондратенко Е.И., Нетипанова Н.В., Скворцова И.А., Ломтева Н.А., Кузина Т.В., Касимова С.К. Цитогенетические и молекулярно-биологические методы анализа растений. Астрахань: Астраханский университет. – 2015. – 68 с.

20 Imanbayeva A.A., Sarsenbayev K.N., Sagyndykova M.S. Anatomical Organization of Above and Underground Organs of Ferula foetida (Bunge) Regel in Mangistau Natural Populations.// Contemporary Problems of Ecology. – 2015. – Vol.8. – No.6. – С.743–753. DOI: 10.1134/S1995425515060086.

21 Talebi K.E., Mohammad A., Naghavi M.R. Genetic diversity in Ferula gummosa Boiss. populations of Iran using RAPD molecular markers // Iranian journal of medicinal and aromatic plants. – 2008. – Vol.23. – No.4 (38). – С.514-522.

22 Sarhadipour S., Naghavi M.R., Baghizadeh A., Hasani D. Genetic diversity of Ferula assafoetida L. germplasms using RAPD analysis in Southeast of Iran // Ecophytochemical journal of medical plants. – 2015. – Vol.2. – No.4(8). – С.72-82.

References

1 Kareparamban J.A., Nikam P.H., Jadhav A.P., Kadam V.J. Ferula foetida “Hing”: A review // Researchh Journal Pharmacy and Biol.Chem.Sci. – 2012.- No.3, Vol.2. – S.775-786. DOI: 10.1016/S2222-1808(13)60038-9.

2 Zubajdova T.M., Dzhamshedov Dzh.N., Hodzhimatov M., Nazarov M.N., Isupov S.D., Zagrebel’nyj I.A., Samandarov N.Ju., Suhrobov P.Sh. Primenenie feruly vonjuchej v drevne-tradicionnoj i narodnoj medicine // Vest.Tadzhik.nac.un-ta. Ser. Estestv. nauk. – 2013. – №1/2(106). – С.201-212.

3 Sahebkar A., Iranshahi M. Biological activities of essential oils from the genus Ferula (Apiacea) // Asian Biomedicine. – 2010. – Vol.4. – No.6. – С.835-847

4 Bajtulin I.O., Nurusheva A.M. O nekotoryh hozjajstvenno-cennyh vidah roda Ferula Kazahstana // Izvestija NAN RK. Ser. Biol. – 2008.- №6.- С.3-6.

5 Garbovskaya V., Imanbayeva A., Sarsenbayev K., Sagyndykova M., Turpanova R., Zhamangara A. Perspective for commercialization medicinal plant from Mangyshlak – Ferula foetida.// Journal of biotech. – 2015. – Vol.208. – С.25. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2015.06.066.

6 Safina L.K. Feruly Srednej Azii i Kazahstana (karpoanatomicheskij obzor). – T.18 (3). – Almaty: LEM. – 2012. – 244 s.

7 Imanbaeva A.A., Belozerov I.F., Sagyndykova M.S. Morfologija Ferula foetida (Bunge) Regel. v prirodnyh populjacijah pustyni Mangistau // Materialy resp.nauch.konf. «Biologicheskie i strukturno-funkcional’nye osnovy izuchenija i sohranenija bioraznoobrazija Uzbekistana». Tashkent. – 2015. – Vyp.1. – S.145-150.

8 Korovin E.P. Glavnejshie linii v sistematike roda Ferula (Tourn) L. // Bjul. MOIP., otd. biol. – 1939. – T.48. – Vyp.5-6. – S.5-15.

9 Korovin E.P. Differencirujushhaja rol’ uslovij sushhestvovanija v jevoljucii rastenij. Rod Ferula L. // Rastenie i sreda. – 1940. – T.1. – S.237-274.

10 Korovin E.P. Illjustrirovannaja monografija roda Ferula (Tourn.) L. – Tashkent: Izd-vo AN UzSSR. – 1947. – 91 s.

11 Korovin E.P., Koroleva K. M., Krishtofovich A. N., Mandenova I. P., Pojarkova A. I., Shishkin B. K. Flora SSSR. – M. – L.: Izd.AN SSSR. – 1951. – T.17. – 390 s.

12 Safina L.K., Pimenov M.G. Feruly Kazahstana. – Alma-Ata: Nauka. – 1984. – 200 s.

13 Rechinger K.H. Flora Iranica. – Austria: Academische Druck und Verlagsanstalt. – 1987. – T.162. – 426 c.

14 Cherepanov S.K. Sosudistye rastenija Rossii i sopredel’nyh gosudarstv (v predelah byvshego SSSR). Spb.: Mir i sem’ja. – 1995. – 992 s.

15 Kurzyna-Mlynik R., Oskolski A.A., Downie S.R., Kopacz R., Wojewozdka A., Spalik K. Phylogenetic position of the genus Ferula (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation // Plant SystEvol. – 2008. – №274. – С.74-66. DOI:10.1007/s00606-008-022-2.

16 Kalaev V.N., Zemljanuhina O.A., Karpechenko I.Ju., Karpechenko K.A., Kondrat’eva A.M., Veprincev V.N., Karpechenko N.A., Karpova S.S., Moiseeva E.V., Baranova T.V. Ispol’zovanie metodov molekuljarno-geneticheskogo analiza dlja izuchenija polimorfizma DNK rastenij roda Rhododendron s cel’ju ih pasportizacii // Fundamental’nye issledovanija. – 2012. – №6. – С.323-328.

17 Pimenov M.G., Terehin A.T., Devjatkova G.N., Baranova Ju.V. Klassifikacija vidov roda Ferula L. (Umbelliferae) s pomoshh’ju ierarhicheskogo klaster-analiza // Voprosy kibernetiki. – 1978. – Vyp.47. – С.98-113.

18 Grusheckaja Z.E., Nikitinskaja T.V., Kubrak S.V., Dzjuban O.V., Kuhareva L.V., Poliksenova V.D., Titok V.V., Lemesh V.A., Parfenov V.I., Hotyleva L.V. Ispol’zovanie ISSR-analiza dlja izuchenija vnutri- i mezhvidovogo geneticheskogo polimorfizma razlichnyh taksonov vysshih rastenij // Vest. BGU. – 2013. – Ser.2. – №3. – С.50-56.

19 Kondratenko E.I., Netipanova N.V., Skvorcova I.A., Lomteva N.A., Kuzina T.V., Kasimova S.K. Citogeneticheskie i molekuljarno-biologicheskie metody analiza rastenij. Astrahan’: Astrahanskij universitet. – 2015. – 68 s.

20 Imanbayeva A.A., Sarsenbayev K.N., Sagyndykova M.S. Anatomical Organization of Above and Underground Organs of Ferula foetida (Bunge) Regel in Mangistau Natural Populations.// Contemporary Problems of Ecology. – 2015. – Vol.8. – No.6. – S.743–753. DOI: 10.1134/S1995425515060086.

21 Talebi K.E., Mohammad A., Naghavi M.R. Genetic diversity in Ferula gummosa Boiss. populations of Iran using RAPD molecular markers // Iranian journal of medicinal and aromatic plants. – 2008. – Vol.23. – No.4 (38). – C.514-522.

22 Sarhadipour S., Naghavi M.R., Baghizadeh A., Hasani D. Genetic diversity of Ferula assafoetida L. germplasms using RAPD analysis in Southeast of Iran // Ecophytochemical journal of medical plants. – 2015. – Vol.2. – No.4(8). – C.72-82.

Тайпакова С.М.,
Смекенов И.Т., Бисенбаев А.К.

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Создание рекомбинантных штаммов дрожжей для получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья

С помощью генно-инженерных методов сконструирован pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO, содержащий гены эндо-1,4-β-глюканазы, целлобиогидролазы и β-гликозидазы. Каждый ген в составе интегрального вектора содержал сигнальный пептид α-фактора дрожжей и экспрессировался под контролем промотора глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы.

Созданы новые стабильные штаммы дрожжей с генами целлюлитических ферментов в HO локусе хромосомы дрожжей. Хромосомная интеграция генов эндо-1,4-β-глюканазы, целлобиогидролазы и β-гликозидазы в HO локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР. Данный штамм обеспечивает непрерывную экспрессию генов целлюлитических ферментов и секрецию продуктов экспрессии в окружающую среду. Показано, что рекомбинантные штаммы S.cerevisiae, экспрессирующие гены целлюлаз, способны расти в синтетической среде, содержащей целлобиозу или карбоксиметилцеллюлозу (CMC) в качестве единственного источника углерода. Кроме того, рекомбинантный штамм производит 15,6 г/л этанола из 20% целлобиозы и 20% CMC. Эти результаты свидетельствуют о том, что рекомбинантные штаммы S.cerevisiae могут быть применимы к одновременному осахариванию и ферментации целлюлозосодержащей биомассы.

Ключевые слова: Saccharomyces cerevisiae, целлобиогидролаза, β-гликозидаза, эндо-1,4-β-глюканаза, сигнальный пептид α-фактора дрожжей, геномная интеграция.

Taipakova S.M.,
Smekenov I.T., Bissenbaev A.K.

Institute of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Development of recombinant yeast strains for production of bioethanol from cellulosic feedstock

By means of gene engineering approaches the pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO integral cassette, including endo-β-1, 4-glucanase, exo-1, 4-β-glucanase (cellobiohydrolase), exo-1, 4-β-glucosidase genes was constructed. Each gene included in integral vector are comprises the signal peptide of yeast α-factor and expressed under the control of a promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The constructed vector provides targeted integration of cellulose genes at S. cerevisiae HO locus. Integral vector contain KanMX selectable marker, and integrants can be selected by resistance to G418.

New stable yeast strains carrying cellulose genes in yeast genome were developed. Chromosomal integration of cellulase genes into HO locus of yeast genome was confirmed by PCR. The strain shows continuous expression of cellulase genes and secretion of the protein products into surrounding medium. It has been shown that recombinant S. cerevisiae expressing cellulase genes became able to grow in synthetic medium containing cellobiose or carboxymethyl-cellulose as the single carbon source. Moreover, the recombinant strain produced 15,6 g/L ethanol from 20% cellobiose and 20% CMC. These results suggest that recombinant S. cerevisiae strains may be applicable to the simultaneous saccharification and fermentation cellulose biomass.

Key words: Saccharomyces cerevisiae, cellobiohydrolase, β-glycosidase, endo-1,4-β-glucanase, signal peptide of yeast α-factor, genomic integration.

Тайпақова С.М.,
Смекенов И.Т., Бисенбаев А.Қ.

Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Целлюлозалы шикізаттан биоэтанол өндіру мақсатында ашытқылардың рекомбинантты штаммдарын алу

Гендік инженерия әдістерін қолдана отырып, құрамында эндо-1,4-β-глюканаза, целлобиогидролаза және β-гликозидаза гендері бар pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO құрастырылды. Интегральды вектордың құрамындағы әрбір генде ашытқы α-факторының сигнальды пептиді болады, әрі глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа промоторы бақылауында экспрессияланады.

Ашытқылар хромосомасының HO локусындағы целлюлитикалық ферменттердің гендері бар ашытқылардың жаңа тұрақты штаммдары жасалды. Эндо-1,4-β-глюканаза, целлобиогидролаза және β-гликозидаза гендерінің ашытқылар геномының HO локусына хромосомалық интеграциясы ПТР әдісі арқылы дәлелденген. Бұл штамм целлюлитикалық ферменттер гендерінің үздіксіз экспрессиясын және қоршаған ортаға экспрессия өнімдерінің секрециялануын қамтамасыз етеді. Целлюлоза гендерін экспрессиялай алатын S.cerevisiae рекомбинантты штаммдары құрамында көмірсудың жалғыз көзі ретінде целлобиоза немесе карбоксиметилцеллюлозасы (CMC) бар синтетикалық ортада өсуге қабілетті екендігі көрсетілген. Бұдан басқа, рекомбинантты штамм 20% целлобиозадан және 20% CMC-тан 15,6 г/л этанол өндіреді.

Түйін сөздер: Saccharomyces cerevisiae, целлобиогидролаза, β-гликозидаза, эндо-1,4-β-глюканаза, ашытқы α-факторының сигналды пептиді, геномдық интеграция.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК: 577.216.3, 577.218

Тайпакова С.М., Смекенов И.Т., *Бисенбаев А.К.

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии,
Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗО-СОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Введение

Целлюлоза является наиболее распространенным биологическим полимером. Она представляет собой линейный полимер, *D-гликопиранозные* остатки которого связаны β-1,4-глюкозидными связями. В зависимости от растительного источника степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять приблизительно от 10 тыс. (у древесины) до 15 тыс. (у хлопка) [1]. Эффективная деструкция целлюлозы до растворимых сахаров, обычно требует совместное действие трех типов ферментов: эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.91) и 1,4-β-гликозидазы (КФ 3.2.1.21) [2]. Эндо-1,4-β-глюканазы гидролизуют внутренние β-1,4-гли-козидные связи, экзо-1,4-β-гликозидазы (целлобиогидролазы) отщепляют целлобиозу с конца полимерных молекул нативной или частично гидролизованной целлюлозы и в свою очередь β-гликозидазы расщепляют целлобиозу до глюкозы [3-5]. Эти ферменты известны как целлюлазы, которые проявляют синергизм для полного гидролиза целлюлозы до растворимых олигомерных и мономерных сахаров.

В настоящее время целлюлитические ферменты используются в качестве добавок к детергентам и моющим средствам, целлюлозно-бумажной промышленности, в составе премиксов к кормам животных и птиц, и даже в пищевой промышленности [6]. В последнее время в связи с истощением запасов нефти и газа в энергетике широко обсуждаются проблемы применение технологии консолидированного биопроцесса гидролиза и сбраживания (СВР), т.е. прямой ферментации целлюлозосодержащего субстрата в этанол [7].

Из-за высокой способности сбраживать глюкозу до этанола и выдерживать высокое содержание этанола в среде, грибные целлюлазные гены были клонированы и экспрессированы в штаммах *S.cerevisiae* [8]. Кроме этого созданный рекомбинантный штамм *S.cerevisiae* коэкспрессирующий три целлюлитических фермента (экзо-1,4-β-глюканазы, эндо-1,4-β-глюканазы и 1,4-β-гликозидазы) способен конвертировать аморфную целлюлозу в этанол [9]. Однако во всех вышеперечисленных работах в качестве экспрессирующего вектора использовались эписомные, или плазмидные вектора.

С практической точки зрения для стабильности белка, а также для предотвращения потери рекомбинантного гена в отсутствие селективного фактора, более подходящим являются использование интегральных векторов - обеспечивающих внедрение генов в хромосому дрожжей [10]. В связи с этим *δ*-интеграционные векторы были использованы для стабильного повышения числа копий гена-мишени в *S.cerevisiae*. Длинные концевые повторы Ту-элемента, известные как *δ*-последовательность, являются хорошими мишенями для интеграции генов путем гомологичной рекомбинации, так как по всему геному дрожжей содержится приблизительно 425 копий данной последовательности [11]. Векторы для *δ*-интеграции были использованы для экспрессии человеческого фактора роста [12], антикоагулянта-гирудин [13], глюкоамилазы [14]. Относительно недавно были сконструированы рекомбинантные штаммы *S.cerevisiae,* содержащие множество копий генов эндоглюканазы,целлобиогидролазыи β-гликозидазы,интегрированные в хромосому посредством интегрального вектора на основе *δ*-последовательности [11,15]. Данный подход значительно увеличил целлюлолитическую активность рекомбинантного штамма. Однако все вышеперечисленные интеграционные векторы, содержат ауксотрофные маркерные гены, такие как *LEU2-D*, *HIS3*, *TRP1* и *URA3*. Описанные подходы вынуждают работать с узким кругом хорошо охарактеризованных мутантных штаммов дрожжей. Такие штаммы дрожжей не пригодны для промышленного использования, поскольку в случае промышленных дрожжей не существует внутренних генетических маркеров, таких как потребность в аминокислотах или нуклеиновых кислотах и т.д.

Ворт с соавторами [16] сообщили о создании нескольких интегральных дрожжевых векторов способных включаться в хромосому дрожжей путем генного замещения с использованием участка гомологичной последовательности *HO* гена. *HO* ген кодирует эндонуклеазу, ответственную за превращение дрожжевой клетки в клетку противоположного типа спаривания и инициирует диплоидизацию гаплоидных клеток [17]. Показано что, делеция, *HO* локуса не влияет на рост дрожжей и практически все лабораторные и промышленные штаммы *S. cerevisiae* имеют мутации в данном локусе.

В настоящей работе с использованием вектора для геномной интеграции получены новые штаммы дрожжей эффективно экспрессирующие эндо-1,4-β-глюканазу, β-гликозидазу гриба рода *Aspergillus* и целлобиогидролазу гриба *Lentinula edodes*. Хромосомная интеграция генов *eng1, cel7A* и *bglI* гриба *L.edodes* в *HO* локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР. Показана способность рекомбинантных штаммов расти в среде с целлобиозой и карбоксиметилцеллюлозой в качестве единственного источника углеводородов.

Материалы и методы

В ходе работы использовали клеточные линии: DH5α (F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ–) для наработки плазмидной ДНК и дрожжевой экспрессионный штамм FF18733 (MATa his7-2 leu2-3,112 lys1-1 trp1-289 ura3-52) фирмы «Stratagene» (США). Культивирование бактерий E.coli проводили при 37 °C в полноценной среде LB при необходимости дополненной ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл. Дрожжи вырашивали при 30 °C в среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза). Скрининг трансформированных дрожжевых клеток проводили в среде YPD с генетицином (G418) в конечной концентрации 100 мкг/мл.

В данной работе были использованы вектора и плазмиды представленные в таблице 1. Интегральный вектор pHO-poly-KanMX4-HO - любезно предоставлен профессором Дэвидом Стилманом (университет Юты, США), конститутивный вектор YEGAp - профессором Х. Кумагай (Киотский университет, Япония).

Таблица 1 – Плазмиды, использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
HO-poly-KanMX4-*HO*	Интегральный вектор, KanMX4	[16]
HO-GAPDH-*eng1*-KanMX4-*HO*	Экспрессионный вектор для нтеграции в *HO* локус генома дрожжей	[18]
YEGAp/α-*cel7A*-myc-*6xHis*	pGAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*•tag-tGAPDH	[19]
YEGAp/α-*bglI*-flag	pGAPDH-α-*bglI*-flag -tGAPDH	[20]

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma» (Германия)., «Amresco» (США)., «Applichem» (Германия). и «Реахим» (Удмуртия). А так же в ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (Германия), «New England Biolabs» (Франция), «Fermentas» (Польша), «Promega» (США), «Roche» (США).

Выделение геномной ДНК из дрожжей Saccharomyces cerevisiae

Инокулят дрожжевых клеток в 5 мл богатой среды YPD с антибиотиком G418 инкубировали в течение ночи при 30 ºС. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин и осадок клеток отмывали предворительно охлажденной стерильной dH_2O. Далее клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (2% Triton X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) добавили равный объем хлороформ- изоамилового спирта (24:1) и 300 мг стеклянных бусинок, промытых в кислоте и гомогенизировали вортексированием при максимальной скорости в течение 3-4 мин с перерывами каждые 1 мин. Далее к лизату добавляли 200 мкл 1xTE, перемешали и центрифугировали со скоростью 12000 об/мин при 4ºС, 10 минут. Отбирали водную фазу и проводили экстракцию 2,5 объемом охлажденного изопропанола (-20 ºС). Плавно перемешивали и инкубировали в морозильной камере в течение 30 минут. Препарат центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут. Затем супернатант сливали и осадок, содержащий нуклеиновые кислоты, подсушивали под вакуумом и растворяли в 400 мкл 1xTE с RNase для деградации РНК. Далее содержимое пробирки инкубировали 30 мин при 37 ºС. После завершения времени инкубации добавили 10 мкл 4 М ацетата аммония, 2,5 объема % этанола и помещали на 30 мин на -20 °С. Осадок собирали центифугированием и растворяли в 50 мкл dH_2O.

Полимеразная цепная реакция

Для аналитических и препаративных процедур использовали набор PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific #K0172, США). ПЦР-амплификацию проводили в следующем температурном режиме: денатурация – 94 °С – 1 мин, 30 циклов амплификации при 94 °С – 1 мин, 61°С – 30 сек, 72°С – 30 сек и заключительная элонгация при 72°С – 2 мин, 4°С 10 мин. Для определения эффективности интеграции методом ПЦР использовали специфические праймера (таблица 2).

Таблица 2 – Праймеры, использованные для анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции

Праймера	Последовательность
Pr-1	5’-GCGTTGTTACCACAACTCTTATGAG-3’
Pr-2	5’-TCTGAAAACACGACTATTCTGATGG-3’
Pr-4	5’-ATGAAGTTTCAGAGCACTCT -3’
Pr-5	5’-TCAAAGATATGCCTCCAGGA -3’
Pr-6	5’-GCGGCCGCCCCGGGATGAGATTTCCTTC-3’
Pr-7	5’-GCGGCCGCTTAATTAAGGATCCTCAATGATGATGATG-3’
Pr-11	5’-AAGGATCCACTAGTCCGTAAGGGGGAAGCGG-3’

Электрофоретическое разделение белков в ДСН-ПААГ и зимограмма

Разделение белков по молекулярной массе проводили электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли в денатурирующих условиях [21].

Белковые образцы готовили кипячением в 2x буфере для образцов (2x: 125 мМ Tris-HCl pH 6.8, 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.02% бромфенолового синего, 20% глицерина) в течение 5 мин при 100 °С. Далее 15 мкг образца белка нанесли на 5% концентрирующий гель и проводили концентрацию белков при 80 V. Разделение белков осуществляли в 10% геле при 180 V. В качестве электродного буфера использовали стандартный Трис-глицинный буфер pH 8.3 (25 мМ Tris pH 8.3, 192 мМ глицина, 0.1% SDS). После завершения электрофореза окрашивание

гели проводили при комнатной температуре в растворе кумасси (50% метанол, 10% уксусная кислота, 0.25% Coomassie Blue R-250) в течение 1ч. Далее декантировали раствор для окрашивания и добавляли отмывочный раствор (10% метанол, 5% уксусная кислота). Гель отмывали, легко взбалтывая и помешивая жидкость до тех пор, пока зоны, свободные от белков, не станут прозрачными.

Для определения целлюлазной активности ДСН-ПААГЭ зимограммой, белки были разделены в геле (12% акриламидом и 0.1% ДСН) содержащей 0.2% СМС. После электрофореза гель отмывали в 25% изопропаноле с постоянным перемешиванием в течение 30 мин при комнатной температуре для удаления следов ДСН и ренатурации белков. Далее гель отмывали буфером (50 мМ натрий ацтатный pH 6.0) в течение 30 мин и инкубировали 2 ч в этом же растворе при 60°С оптимальной температуре для активности фермента. После инкубации окрашивали 0,5%-ным водным раствором Конго красного в течение ночи при 37 °С и отмывали раствором 1 М NaCl три раза по 5 мин при комнатной температуре. Активность рекомбинантных белков проявлялась в виде просветления вокруг белковых полос.

Иммуноблотинг

Определение экспрессии рекомбинантной плазмиды проводили методом иммуноблотинга. Белки из ДСН-ПААГ (12% акриламидом и 0.1% ДСН) перенесли на PVDF мембрану. После завершения переноса на мембрану, блокируем блот в TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6) растворе с 5% нежирным, сухим молоком на 30 минут на шейкере при комнатной температуре. Далее добавляем соответствующие разведенные первичные антитела (рекомбинантный CEL7A *L. edodes* инкубировали с коммерческими с-*Myc*-антителами 1:1000 (ABR Affinity BioReagents, США), а для рекомбинантного BGLI использовали антитела с коммерческими *flag*-антителами 1:10000 (Thermo Scientific, Канада) и инкубируем в 4 °С ON. По истечению времени инкубации (16 часов), мембрану отмываем трижды в растворе TBST (5-10 минут на шейкере). Добавляем подходящие вторичные антитела разведенные в TBST и оставляем на шейкере на 60 минут (поликлональные anti-sheep для с-*Myc*-антител 1:5000, моноклональные anti-mouse для *flag*-антител 1:20000). Затем снова отмываем трижды в растворе TBST и проявляем на пленке.

Определение выхода этанола

Содержание этанола анализировали согласно протоколу набора «Ethanol Kit» («Megazyme», США). Для этого дрожжевые культуры были выращены в SD-Trp средах, содержащих 20 г/л глюкозы, 20 г/л целлобиозы или 20 г/л глюкозы + 20 г/л целлобиозы, в течение 5 дней в анаэробных условиях. Концентрацию этанола измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм каждые 12 часов с момента посева клеток. Изначально в кюветы залили 2 мл дистилированной воды, сверху добавили 100 мкл образца, при этом каждый раз прикрывая кюветы крышками во избежание испарения этанола. После последовательно в каждую кювету залили по 200 мкл «solution 1 (buffer)», 200 мкл «solution 2 (NAD+)», 50 мкл «solution 3 (Aldehyde dehydrogenase)» и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25ºС приблизительно 2 минуты, после чего измеряли абсорбцию (A1). Получив значения A1, к реакционной смеси добавили второй фермент «suspension 4 (Alcohol dehydrogenase)», и хорошо перемешав, инкубировали при 20-25 ºС приблизительно 5-10 минут, после чего измеряли абсорбцию (A2). Полученные данные обрабатывали с помощью онлайн калькулятора Mega-CALC™.

Результаты и их обсуждения

Для создания рекомбинантной ДНК-конструкции, содержащей гены целлобиогидролазы гриба *Lentinula edodes*, эндогюконазы и β-гликозидазы грибов рода *Aspergillus* использовали плазмиду *HO*-GAPDH-*eng1*-KanMX4-*HO*, созданную нами на основе *HO*-poly-KanMX4-*HO* плазмиды. В качестве источника кассеты, содержащей последовательность, кодирующую целлобиогидролазу *cel7A* гриба *L.edodes* под контролем промотора глицероальдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) и GAPDH терминатора использовали YEGAp/α-*cel7A*-myc-*6xHis* [19]. Для создание вектора p*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-KanMX4-*HO* экспрессирующего β-1,4-эндоглюканазу и целлобиогидролазу с фланкированными гомологичными последовательностями к локусу *HO* эндонуклеазы, *Pvu*II фрагмент плазмиды YEGAP/α-*cel7A*-myc-*6xHis*, содержащий *cel7A* ген *L.edodes* под контролем промотора GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDHt был клонирован в плазмиду *HO*-GAPDH-*eng1*-KanMX4-*HO* [18] по *Pac*I сайту предворительно обработанный

фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* для получения тупых концов и дефосфорилированному обработкой щелочной фосфотазой FastAP. В результате была создана рекомбинантная плазмида р*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-KanMX4-*HO*.

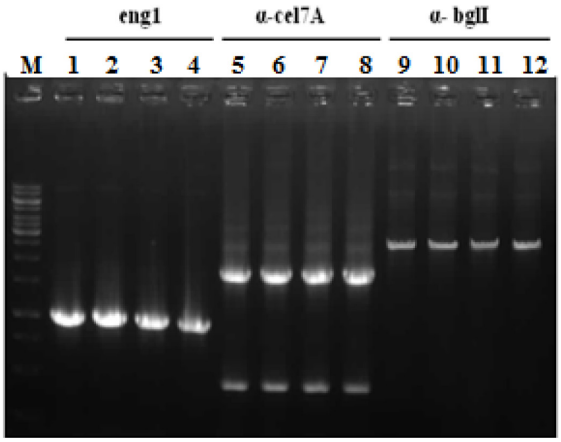


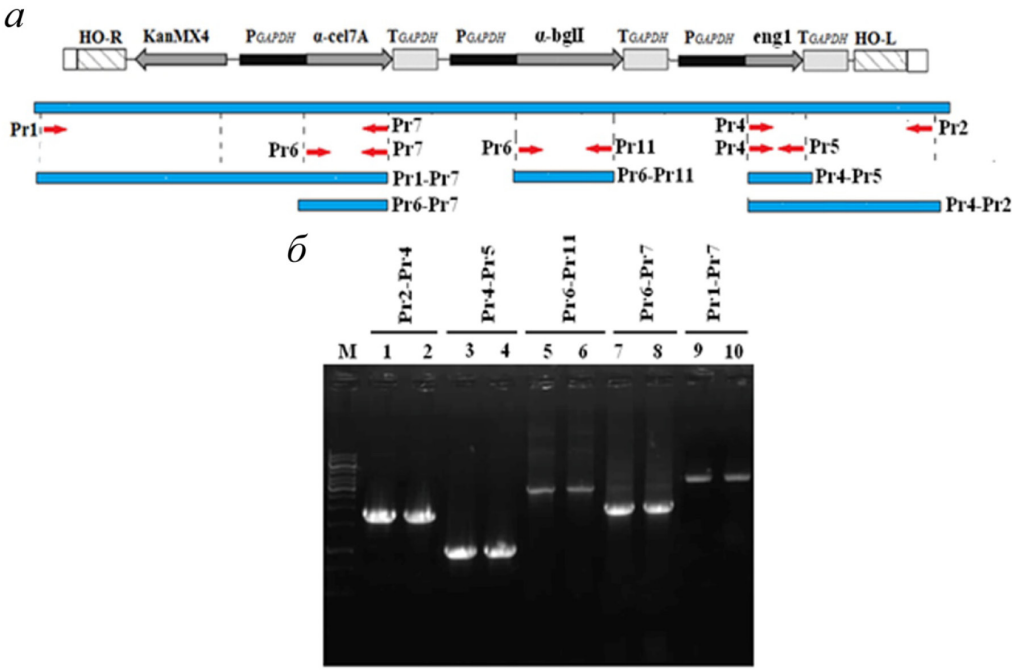
Рисунок 1 – Анализ рекомбинантной р*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-cel7A-myc-*6xHis*- GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO* на наличие вставки

Далее в корпус созданной нами рекомбинантной плазмиды р*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-KanMX4-*HO* клонировали кассету содержащию ген *bgl1* слитый с сигнальным пептидом α-фактора дрожжей и flag-эпитопом под контролем конститутивного промотора и терминатора GAPDH. Для этого *Hind*III фрагмент рекомбинантной плазмиды YEGAp/α-*bglI*-flag [20] обработали фрагментом Кленова для получения тупых концов и лигировали в корпус плазмиды pHO-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-KanMX4-*HO* предворительно порезанной по сайту рестрикции фермента *Sma*I, в результате которого была получена рекомбинантная плазмида р*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO*

Рекомбинантные плазмиды проверяли на наличие вставок методом ПЦР с использованием генспецифических праймеров. Фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель - электрофореза полностью соответствовали длине клонированных генов *eng1,* α-*cel7A* и α-*bgl*1 (рисунок 1). В последующих экспериментах полученную рекомбинантную интегральную плазмиду р*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO* линеаризировали рестрикцией ферментами *Sac*II и *Sfo*I и использовали для трансформации клеток *S.cerevisiae* штамма FF18733. Скрининг трансформантов проводили в агаризованной YPD в присутствии G418. Хромосомная интеграция кассеты с генами *eng1,* α-*cel7A* и α-*bglI* в *HO* локус генома дрожжей была подтверждена методом ПЦР с применением праймеров представленных в таблице 2 и с использованием геномной ДНК рекомбинантных штаммов в качестве матрицы (рисунок 2).

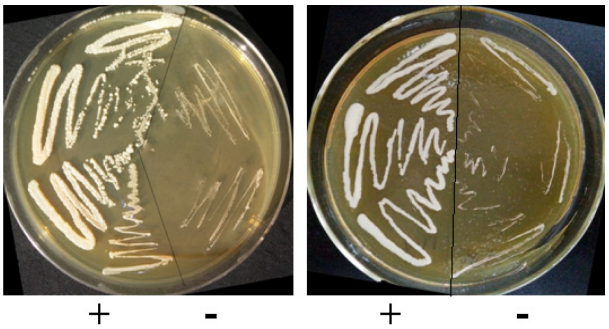
В результате ПЦР с праймерами Pr2 (гомологичного к участку хромосомы фланкирующий *HO*-L локус) и антисмыслового ген специфического праймера Pr4 (комплементарна к 3'-концу *eng1)*, как ожидалось, амплифицирован фрагмент ДНК размером около 2500 п.н (рисунок 2б, 1-2). Наличие гена 1,4-β-эндоглюканазы гриба *Aspergillus niger* в интегрированной кассете проверяли применением ген-специфических праймеров Pr4-Pr5 (рисунок 2б, 3-4). При использовании праймеров Pr6 (комплементарна к 3'-концу последовательности сигнального пептида) и Pr11 (комплементарна к 3'-концу кассеты с flag-эпитопом) обнаружился только один фрагмент длиной 2800 п.н (рисунок 2б, 5-6). В результате ПЦР с праймерами Pr6 и Pr7 (комплементарна к 3'-концу кассеты *с 6xHis* хвостом) как ожидалось амплифицирован фрагмент ДНК размером около 1900 п.н. (рисунок 2б, 7-8). При использовании праймеров Pr6 и Pr1 (гомологичного к участку хромосомы фланкирующий *HO*-R локус) был амплифицирован фрагмент длиной около 4000 п.н. Результаты этих экспериментов подтверждают эффективную интеграцию

кассеты p*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO* в *HO* локус генома *S. cerevisiae*. Таким образом, нами полученные данные подтверждают эффективную интеграцию конструированной нами экспрессионной рекомбинантной кассеты, содержащей гены трех разных целлюлитических ферментов, в геномную хромосому *S.cerevisiae.*



а – Интегральный вектор pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO, содержащий гены эндо-1,4-β-глюканазы, целлобиогидролазы и β-гликозидазы слитые с промотором глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Размеры продуктов ПЦР указаны в тексте статьи. б – Продукты ПЦР полученные на матрице геномной ДНК с применением Pr1-Pr11 праймеров. М- ДНК маркер; 1-2- ПЦР продукты полученные с применением Pr2 и Pr4; 3-4- ПЦР продукты полученные с применением Pr4и Pr5; 5-6- ПЦР продукты полученные с применением Pr6, Pr11; 7-8- ПЦР продукты полученные с применением Pr6 и Pr7; 9-10- ПЦР продукты полученные с применением Pr1 и Pr7

Рисунок 2 – Анализа эффективности интеграции рекомбинантной конструкции



а б

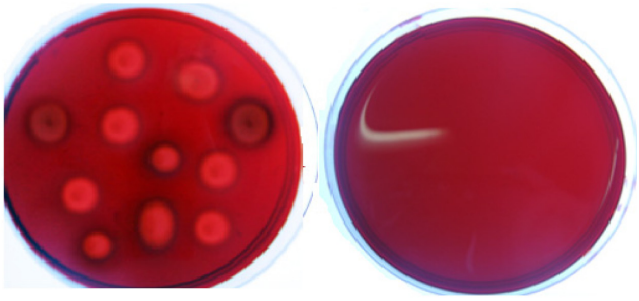
а – Скрининг рекомбинантных клеток S.cerevisiae FF 18733 - pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis- GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO в среде с целлобиозой. б – Скрининг рекомбинантных клеток S.cerevisiae FF 18733 - pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis- GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO в среде с КМЦ. «+» - клетки S.cerevisiae FF 18733 - pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis- GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO. «-» - не трансформированные клетки S.cerevisiae

Рисунок 3 – Скрининг рекомбинантных S.cerevisiae FF 18733-pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO на среде с целлобиозой или КМЦ

Способны ли нами конструированные реком-бинантные штаммы использовать целлюлозу в качестве источника энергии? Для выяснения этого вопроса конструированные штаммы дрожжей выращивали в среде содержащей целлобиозу или карбоксиметилцеллюлозу в качестве единственного источника углеводородов (рисунок 3).

Как видно из рисунка рост рекомбинантных штаммов *S.cerevisiae* был обильным в среде с целлобиозой, так и в среде с КМЦ в качестве единственного источника энергии, тогда как рост не трансформированных клеток в этих условиях не наблюдался.

Кроме этого синтез 1,4-β-эндоглюканазы в рекомбинантных штаммах *S.cerevisiae* проверяли с помощью окрашивания 0,5% раствором Конго красный на агаризованной среде с КМЦ (рисунок 4). Как видно из рисунка вокруг колонии *S.cerevisiae* FF18733 – p*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO* четко видны зоны просветления (рисунок 4*а*). Тогда как вокруг не трансформированных колоний *S. cerevisiae* зоны просветления не обнаруживалась (рисунок 4*б*). Эти данные указывают на то, что трансформированные клетки *S.cerevisiae* синтезируют и секретируют 1,4-β-эндоглюканазу гриба *Aspergillius niger*.



а б

а – Анализ секреции 1,4-β-эндоглюканазы трансформированными клетками.
б – Анализ секреции 1,4-β-эндоглюканазы не трансформированными клетками

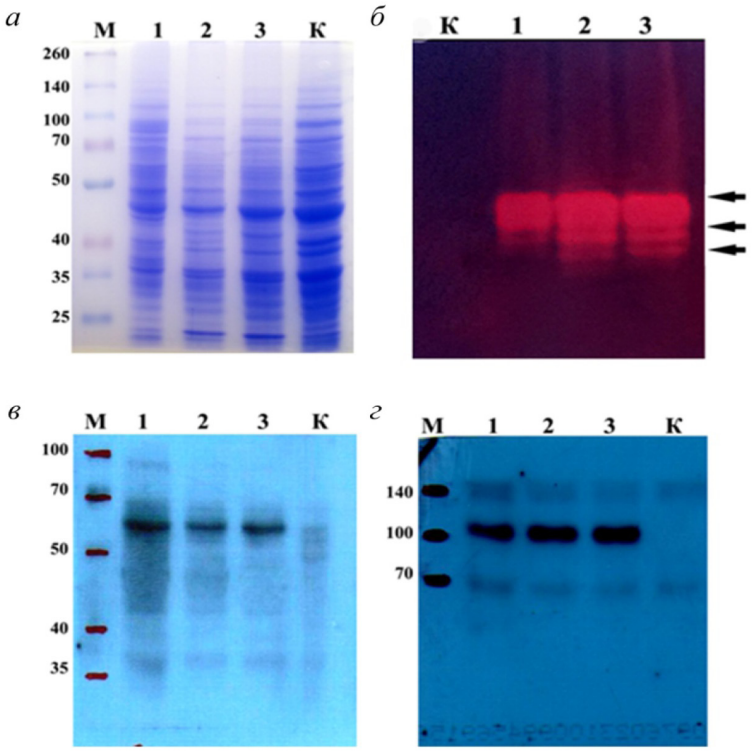
Рисунок 4 – Оценка эффективности секреции 1,4-β-эндоглюканазы рекомбинантными клетками, методом выявления эндоглюканазной активности

В последующих экспериментах мы решилить проверить экспрессию каждого гена в рекомбинантных штаммах дрожжей. Экспрессию гена *cel7A* с myc-эпитопом и гена *bglI* с flag-эпитопом проверяли с помощью иммуноблотинга со специфическими антителами к myc- и flag-эпитопу, соответственно. Тогда как экспрессию эндогюконазы *Aspergillus niger* решили проверить с помощью ДСН-ПААГ с последующим выявлением активности фермента на электрофореграмме. Как видно из данных представленных на рисунке 5*а* белковые фракции трансформированных и нетрансформированных клеток *S.cerevisae* имели вытянутые размытые очертания на ДСН-ПААГ. По представленным данным определить белковые полосы с молекулярной массой, характерной для эндо-1,4-β-глюканазы, целлобиогидролазы и β-гликозидазы не представляется возможным. Однако, определение активности 1,4-β-эндоглюканазы на ДСН-ПААГ выявила активные белковые зоны с молекулярной массой приблизительно 50 кДа и 70 кДа. Тогда как в не трансформированных клетках, похожие активные белковые зоны не обнаруживались (рисунок 5*б*). Молекулярная масса двух из трех обнаруженных белков в ДСН-ПААГ превышала расчетную молекулярную массу фермента, что указывает на то, что 1,4-β-эндоглюканаза в трансформированных дрожжевых клетках представлена разными гликоформами рекомбинантной 1,4-β-эндоглюканазы.

Для доказательства экспрессии рекомбинантного CEL7A *L. edodes* методом иммуноблоттинга белки из ДСН-ПААГ перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с коммерческими *c-Myc-антителами (ABR Affinity BioReagents, США)*. Иммуноблотинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной

массой незначительно большей, чем рассчитанная молекулярная масса CEL7A (рисунок 5*в*). Тогда как белки, полученные из не трансформированных клеток, не содержали белковой полосы с искомой массой.

Для доказательства экспрессии рекомбинантного BGLI использовали иммуноблоттинг с коммерческими *flag-антителами (Thermo Scientific, Канада)*. Как видно из результатов, приведенных на рисунке 5*г* белки, полученные из не тансформированных клеток *S.cerevisiae* не имеют белковой полосы с искомой молекулярной массой. Тогда как белки трансформированных рекомбинантной конструкцией FF18733-p*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO* дрожжей показывали при иммуноблотинге белок с молекулярной массой около 100 кДа, что соответствует массе BGLI (рисунок 5*г*), следовательно эти данные указывают на эффективную экспрессию рекомбинантных CEL7A и BGLI в *S. cereviciae*.

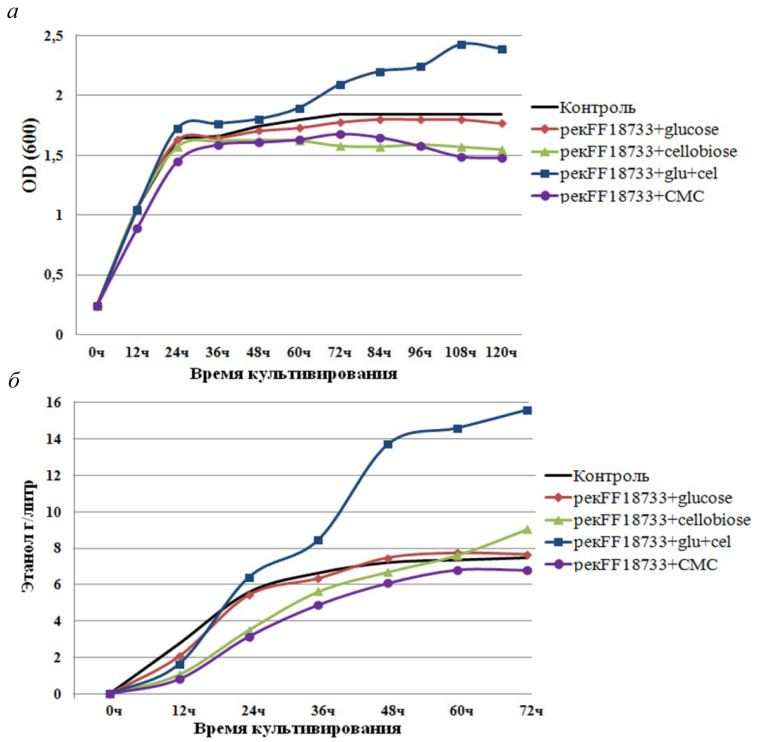


а – ДСН-ПААГЭ белков клеточного экстракта. б – Анализ экспрессии рекомбинантной эндоглюканазы. в – Анализ экспресии рекомбинантной целлобиогидролазы. г – Анализ экспресиии рекомбинантной β-гликозидазы.
М – маркер; 1-3 – клоны трансформированных клеток; К – не трансформирваная клетка

Рисунок 5 – Анализ экспрессии рекомбинантных белков клетками FF18733-pHO-GAPDH-eng1-GAPDH-α-cel7A-myc-6xHis-GAPDH-α-bglI-flag-KanMX4-HO

В последующих экспериментах мы исследовали скорость роста конструированных нами рекомбинантных дрожжей. Для этого дрожжи выращивали в YPD среде, содержащей карбоксиметилцеллюлозу или целлобиозу в качестве единственного источника углеводов. Кроме этого, рекомбианнтные дрожжи также выращивали в YPD среде содержащей целлобиозу и глюкозу. Для сравнения эффективности роста рекомбинантных штаммов дрожжей в среде с целлюлозой в качестве контроля использовали нетрансформированные клетки, выращенные в YPD среде с глюкозой (Контроль). Рекомбинантный штамм не демонстрировал существенных отличий от родительского нетрансформированного штамма (в среде с глюкозой) по скорости роста и выходу биомассы (рисунок 6*а*). Во-первых это указывает на отсутствие негативного влияния синтеза рекомбинантных белков в дрожжах F18733-

p*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-*cel7A*-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO*. Во-вторых, нами созданные рекомбинантные штаммы с высокой эффективностью могут использовать целлюлозу в качестве источника энергии, за счет эффективной работы, интегрированных в хромосому дрожжей, генов целлюлитических ферментов.



а – Определение скорости роста рекомбинантного штамма *S.cereviciae. б* – Определение выхода этанола во время ферментации субстрата рекомбинантным штаммом *S.cereviciae*

Рисунок 6 – Исследования физиологических характеристик рекомбинантного штамма FF18733-p*HO*-GAPDH-*eng1*-GAPDH-α-cel7A-myc-*6xHis*-GAPDH-α-*bglI*-flag-KanMX4-*HO*

В последующих экспериментах мы определяли выход этанола в среде содержащей 20% целлобиозу или 20% карбоксиметилцеллюлозу в качестве единственного источника углеводородов (Рис. 6б). Для сравнения эффективности выхода этанола в ходе ферментации целлюлозных субстратов (целлобиоза и карбоксиметилцеллюлоза), параллельно нетрансформированные клетки инкубировали в среде с 2% глюкозой (Контроль). Полученные данные указывают на то, что способность продуцировать этанол в обогащенной среде с целлобиозой или карбоксиметилцеллюлозой, повышается по мере увеличения времени инкубации.

Интересно отметить, выход этанола производимые рекомбинантными дрожжами в среде с целлобиозой или карбоксиметилцеллюлозой были сравнимы с количеством этанола производимыми нетрансформированными клетками дрожжей в среде с 2% глюкозой.

Рекомбинантные дрожжи, выращенные в среде с целлобиозой, через 24 ч продуцировали 4 г этанола на литр, после 72 часов - 9 г этанола на литр. Рекомбинантные дрожжи, выращенные в среде с карбоксиметилцеллюлозой, через 72 часа продуцировали 7 г этанола на 1 литр. Тогда как нетрансформированные родительские штаммы дрожжей, выращенные в среде с глюкозой, продуцировали этанол в количестве 8 г этанола на 1литр. Кроме того, рекомбинантные штаммы, выращенные в среде, содержащей целлобиозу и глюкозу, показали более высокий выход этанола (15,6 г/л).

Таким образом, в результате проведенных нами работ был получен рекомбинантный штамм *S. cerevisiae,* содержащий в геноме гены

целлобиогидролазы гриба *Lentinula edodes*, эндоглюканазы и β-гликозидазы грибов рода *Aspergillus*, а также эффективный для ферментации целлюлозы в этанол.

Литература

1 Блинов И.П. Химия микробных полисахаридов. – Москва: Высшая школа. – 1984. – 162 с.

2 Скомаровкий А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса Penicillium verruculosum. – дисс. ... канд. хим. наук. – Москва, 2006. - 176 с.

3 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // Appl Environ Microbiol.- 2004.-№70.- P.1207-1212.

4 Wen F., Sun J., Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol // Appl Environ Microbiol.- 2010.- №76.- P.1251-1260.

5 Yanase S., Yamada R., Kaneko S., Noda H., Hasunuma T., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast // Biotechnol J.- 2010.- №5.- P. 449-455.

6 Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology // Biotechnol Adv. - 2000. - №18. - P.355-383.

7 Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // Current Opinion in Biotechnology.- 2005.- №16.– P.577–583.

8 Van Rensburg R., Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation // Yeast. - 1998. - №14. - P. 67–76.

9 Fujita Y., Ito J., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // Appl Environ Microbiol.- 2004.- №70.- P.1207-1212.

10 Yamada R., Hasunuma T., Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing // Biotechnol Adv.- 2013.- №31.- P.754-763.

11 Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast // Appl Microbiol Biotechnol.- 2010.- №88.- P. 849-857.

12 Sakai A., Shimizu Y., Hishinuma F. Integration of heterologous genes into chromosome of Saccharomyces cerevisiae using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty // Appl Microbiol Biotechnol.- 1990.- №3.- P. 302-306.

13 Kim M.D., Rhee S.K., Seo J.H. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant Saccharomyces cerevisiae by chromosomal delta-integration // J Biotechnol. - 2001. - №85. - P. 41-48.

14 Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H., Ko H.M., Chin J.E., Lee H.B., Kim I.C., Bai S. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of Saccharomyces cerevisiae producing glucoamylase, α-amylase and debranching enzyme // Biotechnol Lett.- 2010.- №32.- P. 713-719.

15 Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H. Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains // Microb Cell Fact.- 2010.- №9.- P. 32.

16 Voth W.P., Richards J.D., Shaw J.M., Stillman D.J. Yeast vectors for integration at the HO locus // Nucleic Acids Res. - 2001.- №29.- P. 59.

17 Herskowitz I., Rine J., Strathern J. Mating type determination and mating-type interconversion in Saccharomyces cerevisiae / Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R. etc. // The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression – NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992. – P. 583-656.

18 Taipakova S.M., Smekenov I.T., Saparbaev M.K. and Bissenbaev A.K. Characterization of Aspergillus niger endo-1,4-β-glucanase ENG1 secreted from Saccharomyces cerevisiae using two different expression vectors // Genetics And Molecular Research.- 2015.- №2.- P. 6439-6452.

19 Тайпакова С.М., Смекенов И.Т., Бисенбаев А.К. Создание рекомбинантного штамма Saccharomyces cerevisiae с геном целлобиогидролазы гриба Lentinula edodes в НО локусе хромосомы // Вестник КазНУ. – 2014. - №2. – С. 352 – 355.

20 Смекенов И.Т., Куанбай А.К., Бурибаева А.С., Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К. Экспрессия кднк β-гликозидазы гриба Thermoascus aurantiacus в S. cerevisiae // Доклады НАН РК. – 2016. - №3. – С.11.

21 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. - 1970. - №227. P. 680-685.

References

1 Blinov IP (1984) Chemistry of microbial polysaccharides [Khimiya mikrobnikh polisakharidov]. Vischaya schkola, Moscow, Russia, pp. 162. (In Russian)

2 Skomarovskii AA (2006) Component composition and hydrolytic ability of Penicillium verruculosum's ferment complex [Komponentnii sostav I gidroliticheskaya sposobnost fermentnogo kompleksa Penicillium verruculosum] Diss. of the cand. of chem. sci., MSU, Moscow, Russia, pp. 176. (In Russian)

3 Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme, Appl Environ Microbiol, 70:1207-1212. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1207-1212.2004

4 Wen F, Sun J, Zhao H (2010) Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol, Appl Environ Microbiol, 76:1251-1260. DOI: 10.1128/AEM.01687-09

5 Yanase S, Yamada R, Kaneko S, Noda H, Hasunuma T, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2010) Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast, Biotechnol J, 5: 449-455. DOI: 10.1002/biot.200900291

6 Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology, Biotechnol Adv, 18:355-383. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0

7 Lynd LR, van Zyl WH, McBride J E, Laser M (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update, Current Opinion in Biotechnology, 16: 577–583. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.08.009

8 Van Rensburg R, Van Zyl WH, Pretorius IS (1998) Engineering yeast for efficient cellulose degradation. Yeast, 14: 67–76. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<67::AID-YEA200>3.0.CO;2-T

9 Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme, Appl Environ Microbiol, 70:1207-1212. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1207-1212.2004

10 Yamada R, Hasunuma T, Kondo A (2013) Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing, Biotechnol Adv, 31: 754-763. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.02.007

11 Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Kondo A (2010) Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast, Appl Microbiol Biotechnol, 88: 849-857. DOI: 10.1007/s00253-010-2850-6

12 Sakai A, Shimizu Y, Hishinuma F (1990) Integration of heterologous genes into chromosome of Saccharomyces cerevisiae using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty, Appl Microbiol Biotechnol, 3: 302-306. DOI: 10.1007/BF00164526

13 Kim MD, Rhee SK, Seo JH (2001) Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant Saccharomyces cerevisiae by chromosomal delta-integration, J Biotechnol, 85: 41-48. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00376-X

14 Kim JH, Kim HR, Lim MH, Ko HM, Chin JE, Lee HB, Kim IC, Bai S (2010) Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of Saccharomyces cerevisiae producing glucoamylase, α-amylase and debranching enzyme, Biotechnol Lett, 32: 713-719. DOI: 10.1007/s10529-010-0212-1

15 Yamada R, Taniguchi N, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H (2010) Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains, Microb Cell Fact, 9: 32. DOI: 10.1186/1475-2859-9-32

16 Voth WP, Richards JD, Shaw JM, Stillman DJ (2001) Yeast vectors for integration at the HO locus, Nucleic Acids Res, 29: 59. DOI: 10.1093/nar/29.12.e59

17 Herskowitz I, Rine J, Strathern J (1992) Mating type determination and mating-type interconversion in Saccharomyces cerevisiae. In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression (Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, and J.R. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 583-656.

18 Taipakova SM, Smekenov IT, Saparbaev MK and Bissenbaev AK (2015) Characterization of Aspergillus niger endo-1,4-β-glucanase ENG1 secreted from Saccharomyces cerevisiae using two different expression vectors, Genetics And Molecular Research, 2: 6439-6452. DOI: 10.4238/2015

19 Taipakova SM, Smekenov IT, Bisenbaev AK (2014) Construction a recombinant strain of Saccharomyces cerevisiae with cellobiohydrolase gene from fungus Lentinula edodes in HO locus of chromosome, Bulletin of KazNU, Biology series [Sozdanie rekombinantnogo shtamma Saccharomyces cerevisiae s genom tsellobiogidrolazyi griba Lentinula edodes v HO lokuse hromosomyi, Vestnik KazNU, Seriia Biologiia] 2: 352 – 355. (In Russian)

20 Smekenov IT, Kuanbai AK, Buribaeva AS, Taipakova SM, Bisenbaev AK (2016) Expression of β-glucosidase cDNA of fungus Thermoascus aurantiacus in S.cerevisiae, Reports of the NAS RK [Ekspressiya kdnk β-glucozidazi griba Thermoascus aurantiacus v S. cerevisiae. Doklady NAN RK] 3: 11. (In Russian)

21 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0

[1]Усенбеков Е.С.,
[2]Яковлев А.Ф.,
[1]Акимжан Н.А.

[1]Казахский национальный аграрный университет, Казахстан, г. Алматы
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Россия, г. Санкт-Петербург-Пушкин

Результаты мониторинга быков-производителей на носительство генетических дефектов

В статье приводятся сведения о частоте встречаемости аутосомальных рецессивных летальных мутаций – дефицита адгезии лейкоцитов (BLAD), комплексного уродства позвоночника (CVM), дефицита фермента уридин-моно-фосфат-синтетазы (DUMPS) и цитруленемии (BC) у племенных быков-производитедей АО «Асыл-Тулик» (N=67) и ТОО «Асыл» (N=43) отечественной и зарубежной селекции. Детекция летальной мутации генов CD 18, SLC35A3, UMP и ASS у быков-производителей (N=110) проводилась методом PCR-RFLP анализа и Real-Time PCR SNPs диагностики. Установлено, что племенные быки местных пород: Алатауской, Аулиекольской и Казахской белоголовой свободны от носительства вредных мутаций - BLAD, CVM, DUMPS и BC. Два факта гетерозиготного носительства CVM были выявлены у быков голштинской и герефордской пород и один случай гетерозиготного носительства BLAD у животного голштинской породы зарубежной селекции. Разработанный метод диагностики позволяет в течение двух часов точно определить здоровых гомозиготных животных и гетерозиготных носителей мутации. Авторами работы впервые использована методика Real-Time PCR SNPs диагностики для выявления генетического дефекта DUMPS.

Ключевые слова: PCR, RFLP, Real-Time PCR SNPs диагностика, аутосомальная рецессивная точечная мутация, BLAD, CVM, DUMPS, BC, быки-производители.

---

[1]Usenbekov Y.S.,
[2]Yakovlev A.F.,
[1]Akimzhan N.A.

[1]Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan,
[2]All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg-Pushkin, Russia

Results of monitoring bulls carrier genetic defects

The article provides information about the frequency of occurrence of autosomal recessive lethal mutation – Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD), Complex vertebral malformation (CVM), Uridine Monophosphate Synthase Deficiencies (DUMPS) and Bovine Citrullinaemia (BC) in breeding bulls JSC «Asyl-Tulik» (N = 67) and LLP «Asyl» (N = 43) of domestic and foreign selection. It is known that harmful allele mutation frequency is high in cattle Holstein, some local cattle breeds prevalence of these mutations is low or non-existent. Detection of lethal mutations of genes CD 18, SLC35A3, UMP and ASS in bulls (N = 110) was performed by PCR-RFLP analysis and Real-Time PCR SNPs diagnostics. It was found that breeding bulls of local breeds, Alatau, Auliekol and Kazakh white-free carriers of harmful mutations – BLAD, CVM, DUMPS and BC. Two facts are revealed heterozygous carriers of CVM bulls of Holstein and Hereford breeds and one case of heterozygous carriers of BLAD animal Holstein foreign selection. The developed diagnostic method allows for two hours to pinpoint healthy animals homozygous and heterozygous carriers of the mutation. The authors of the first technique used Real-Time PCR SNPs diagnostics to identify the genetic defect DUMPS.

Key words: PCR, RFLP, Real-Time PCR SNPs diagnostics, autosomal recessive point mutation, BLAD, CVM, DUMPS, BC, sires.

---

[1]Усенбеков Е.С.,
[2]Яковлев А.Ф.,
[1]Акимжан Н.А.

[1]Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Бүкілресейлік генетика және малды өсіру ҒЗИ, Ресей, Санкт-Петербург-Пушкин

Генетикалық кемтарлықтар тасымалдаушысына бұқаларды тексеру нәтижелері

Мақалада «Асыл-Түлік» АҚ және «Асыл» ЖШС қарасты отандық және шет ел сұрыптауына жататын асыл тұқымды бұқаларда аутосомальдық рецессивті мутациялардың – лейкоциттер адгезиясының жетіспеушілігі (BLAD), омыртқаның кешенді кемтарлығы (CVM), уридин-моно-фосфат-синтетаза ферментінің жетіспеушілігі (DUMPS) және ірі қара малының цитруленемиясы (BC) тұқым қуалаушы ауруларының таралуы туралы мәліметтер берілген. CD 18, SLC35A3, UMP және ASS гендерінің летальдық мутацияларына барлау жасау бұқаларда (N=110) ПТР мен РФҰП талдауларының және Real-Time PCR SNPs тәсілдерінің көмегімен жүзеге асырылды. Зерттеу нәтижелеріне сәйкес, жергілікті тұқымдас Алатау, Әулиекөл, Қазақтың ақ бас бұқаларында зиянды BLAD, CVM, DUMPS және BC тұқымқуалаушылық кемтарлықтары кездеспеді. Нәтижелерге сәйкес екі рет CVM кемтарлығының гетерозиготалы тасымалдаушысы голштеин және герефорд тұқымдас бұқаларда және бір голштеин тұқымдас бұқада BLAD гетерозиготалы тасымалдаушы ретінде шет сұрыптауынан анықталды. Ойлап табылған балау әдісі екі сағат ішінде дені сау гомозиготалы және тасымалдаушы гетерозиготалы жануарларды анықтауға мүмкіндік береді. Авторлар DUMPS генетикалық кемтарлығын балауға Real-Time PCR SNPs әдісін алғаш рет қолданған.

Түйін сөздер: ПТР, РФҰП, Real-Time PCR SNPs балау, аутосомальдық рецессивтік нүктелік мутация, BLAD, CVM, DUMPS, BC, бұқалар.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 575.224.22:636.2

[1*]Усенбеков Е.С., [2]Яковлев А.Ф., [1]Акимжан Н.А.

[1]Казахский национальный аграрный университет,
Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Россия, г. Санкт-Петербург-Пушкин
*E-mail:usen03@mail.ru

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ НА НОСИТЕЛЬСТВО ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ

Введение

Высокая скорость распространения летальных мутаций определяется рецессивным характером их наследования. Продукты таких генов, как правило, участвуют в регуляции тканеспецифичных функций и неблагоприятные эффекты мутантного аллельного варианта компенсируются в гетерозиготе нормальной функцией аллеля дикого типа. В настоящее время у крупного рогатого скота известны 46 наследственных заболеваний, при которых разработаны молекулярно-генетические методы диагностики. По информации ассоциации голштинской породы Канады стоимость PCR диагностики образцов ДНК на генетические дефекты составляет: BLAD 35 $, Brachyspina – 65 $, CVM – 40 $, PL – Polled – 80 $, DUMPS – 35 $, MF – Mulefoot – 160 $ США. Своевременная диагностика данных мутаций и выбраковка животных и племенного материала, а также требования генетического паспорта при закупке скота, эмбрионов, семени и т.п. позволяют элиминировать болезни и направленно сформировать группы для воспроизводства животных [1,2].

Хорошо изучена генетическая природа наследственных заболеваний BLAD, CVM, DUMPS, BC и для их детекции успешно применяется метод полимеразной цепной реакции и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов [3,4,5]. Своевременное выявление носителей генетических мутации позволяет выбраковать носителей вредных мутации. В Республике Казахстан разводятся в основном местные породы крупного рогатого скота, такие как Алатауская, Аулиеатинская молочно-мясного направления и Казахская белоголовая мясного направления. С 1995 года все племенные хозяйства используют для искусственного осеменения коров Алатауской породы сперму быков-производителей швицкой породы Американской компании «Taurus-Service». Поэтому, большое практическое значение имеет ДНК тестирование особей Алатауской породы на носительство генетических аномалии.

В литературе имеются противоречивые сведения о распространенности аутосомальных рецессивных летальных мутации у крупного рогатого скота. Генеалогический анализ

показывает, что носители аутосомальной рецессивной мутации гена CD 18 являются потомками выдающегося быка производителя голландского происхождения Osborndale Ivanhoe US 1189870, родившийся в 1952 году в Америке. Элитный бык-производитель голштинской породы Carlin-M Ivanhoe Bell (US 1667366) является носителем двух распространенных наследственных дефектов: BLAD и CVM, который унаследовал эти генетические аномалии от отца Penstate Ivanhoe Star US 1441440. Частота мутации BL у коров голштинской породы Аргентины составляет 3,5%, у голштино-фризского скота Дании 13,4%, у животных голштинской породы Японии 8,1% [6]. Аутосомальное наследственное заболевание Bovine Citrullinaemia (BC) была впервые описана в Австралии в 1986 году и распространенность данного дефектного гена была 8% среди быков центра искусственного осеменения [7]. Все гетерозиготные носители были потомками быка Linmack Kriss King (LMKK) [8]. Наследственная болезнь DUMPS сопровождается ранней эмбриональной смертностью и все носители летальной аутосомальной мутации являются потомками элитного быка Skokie Sensation Ned [9]. Мониторинг племенного поголовья Польши показывает, что носителей генетической аномалии DUMPS не выявлены [10].

Известно, что интенсивный обмен генетическими материалами между странами требует проведения систематического мониторинга качества биоматериалов, таких, как замороженная сперма, замороженный эмбрион и живой скот. Во всех странах с развитым животноводством большое внимание уделяется своевременной диагностике генетических дефектов у племенных животных с целью недопущения распространения гетерозиготных носителей.

Целью настоящей работы было проведение мониторинга племенных быков-производителей молочных и мясных пород на носительство генетических дефектов BLAD, CVM, DUMPS, BC методом PCR-RFLP анализа и разработка Real-Time PCR SNPs диагностики точечных мутации генов CD18, SLC35A3, UMP и ASS.

Материалы и методы

В настоящей работе протестировали быков-производителей АО «Асыл-Тулик» (N=67) и ТОО «Асыл» (N=43) отечественной и зарубежной селекции. Исследования проводились в 2012-2014 гг. в учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета. В качестве материала для иссле-дования использовали замороженную сперму быков, выделяли ДНК из спермы методами Bahnak и с помощью набора «ДНК сорб В» («ИнтерЛабСервис», Россия), с некоторой модификацией.

Выделение ДНК проводили из замороженной спермы быков-производителей по методу Bahnak. Центрифугировали 200 мкл спермы в течение 5 минут при 4000 g, осевшие клетки промывали 0,15 М раствором NaCl, 2 мМ ЭДТА («BioChemica AppliChem», Германия) и центрифугировали в течение 5 минут при 4000 g. Эту процедуру повторяли дважды. Затем, после последнего центрифугирования верхний слой отсасывали с помощью пипетки, а к осадку добавляли лизирующий буфер Bahnak в количестве 1000 мкл, имеющий следующий состав: 6М гуанидинтиоцианат («Amresco», Канада), 25 мМ цитрат натрия pH 7,0, 0,5% Sarcosyl, 0,1 М 2-меркаптоэтанол («Amresco», Канада) и инкубировали при 37 C^0 в течение 30 минут. Перед депротеинизацией лизированный раствор ДНК разбавляли 0,15 М раствором NaCl в соотношении 1:4. Депротеинизацию осуществляли по обычной методике, путем добавления равного объема смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1). После центрифугирования осторожно отсасывали верхний слой пипеткой и осаждали в двух объемах 96% этилового спирта. Высушивали ДНК в течение 2-5 минут под вытяжным шкафом и растворяли в буфере ТЕ [11].

При выделении ДНК из замороженной спермы быков-производителей с помощью набора «ДНК сорб В» («ИнтерЛабСервис», Россия), с целью оптимизации и выделения более качественной ДНК из спермы быков-производителей нами был использован способ предварительной обработки спермы следующим образом: вносили в пробирку 200 мкл спермы, затем добавляли 1000 мкл лизирующего буфера, имеющий состав 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и перемешивали в течение 30 секунд, далее центрифугировали g 10000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования, суспендировали осадок в 500 мкл буфера: 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и добавляли 8 мкл 2-меркаптоэтанола («Sigma-Aldrich», США). Затем перемешивали на вортексе в течение 1 минуты и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Подготовленную таким способом смесь в количестве 100 мкл использовали для выделения ДНК с помощью набора «ДНК сорб-В» согласно протокола.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для ПЦР диагностики генетических дефектов BLAD, CVM, DUMPS, BC у быков-производителей

Дефекты	Последовательности праймеров	ПЦР продукт	Рестрик-таза
BLAD	F- 5´- AGG CAG TTG CGT TCA ATG TGA -3´ R -5´- CCG ACT CGG TGA TGC CAT TGA -3´ [12]	159 п.н.	Tag I
CVM	F – 5´- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG -3´ F – 5´- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT-3´ R – 5´- CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG -3´ [13]	287 п.н.	
DUMPS	F – 5´- TGAGTTCAATGTGACATGAGAAAAT-3´ R – 5´- ATTACCAATCAATAGGCTTACCTCC -3´ [14]	241 п.н.	Ava I
BC	F -5´- GGCCAGGGACCGTGTTCATTGAGGACATC -3´ R – 5´- TTCCTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG -3´[15]	198 п.н.	Ava II

В первую очередь, перед выделением ДНК прогревали лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 из набора «ДНК-сорб-В» в течение 1 часа при температуре 65 °С. Затем, внесли в пробирку 100 мкл подготовленную с β-меркаптоэтанолом смесь и тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 минут при температуре 65 °С. Центрфугировали 5 секунд при g 5000 об/мин на микроцентрифуге. В каждую пробирку, затем вносили 25 мкл универсального ресуспендированного сорбента из набора. Перемешивали на вортексе, ставили на штатив на 2 минуты, затем повторяли эту процедуру еще раз и ставили на штатив на 5 минут. Осаждали сорбент центрифугированием при g 5000 об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость, затем вносили по 300 мкл раствора для отмывки №1. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК, которую в последующем использовали для полимеразной цепной реакции. Качество и количество выделенной таким способом ДНК проверяли на 0,8 % агарозном геле. ДНК тестирование племенных быков-производителей проводилось методом PCR-RFLP анализа с использованием соответствующих рестриктаз [12,13,14,15]. В случае успешной амплификации на электрофореграмме были выявлены бэнды размером 159 п.н. (BLAD), 198 п.н. (BC) и 241 п.н. (DUMPS) (Рисунок 1).

Визуализацию результатов амплификации и продукта рестрикции осуществляли с помощью гель-документирующей системы. У здоровых гомозиготных животных по локусу BLAD имеется сайт рестрикции для эндонуклеазы Taq I и продукт PCR после рестрикции режется на два фрагмента, длиной 49 п.н. и 110 п.н.

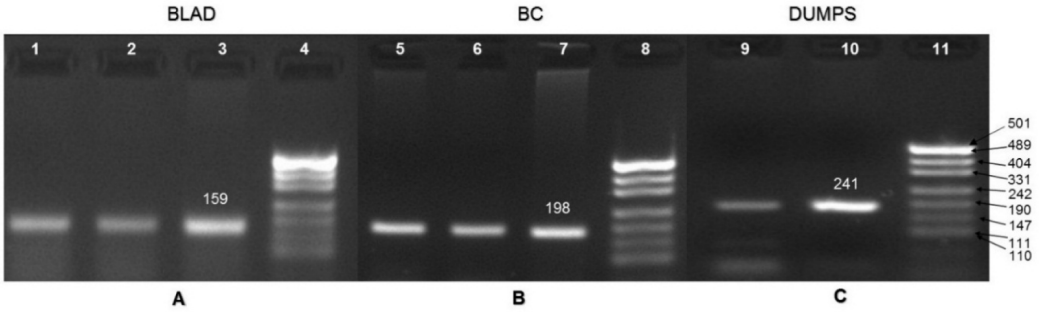


Рисунок 1 – Продукт полимеразной цепной реакции, А – лунки 1, 2, 3 BLAD – 159 п.н., 4,8,11 – ДНК маркер, pUC19 DNA/MspI, В – лунки 5, 6, 7 BC 198 п.н., С – лунки 9, 10 DUMPS 241 п.н.

Использование последовательностей праймеров (таблица 1) позволяет амплифицировать фрагмент гена UMP длиной 241 п.н., который после рестрикции эндонуклеазой Ava I дает фрагменты 158 п.н. и 83 п.н. у здоровых гомозиготных животных, 241 п.н., 158 п.н. и 83 п.н. у гетерозиготных носителей, у гомозиготных носителей мутации один фрагмент, размером 241 п.н (Рисунок 2).

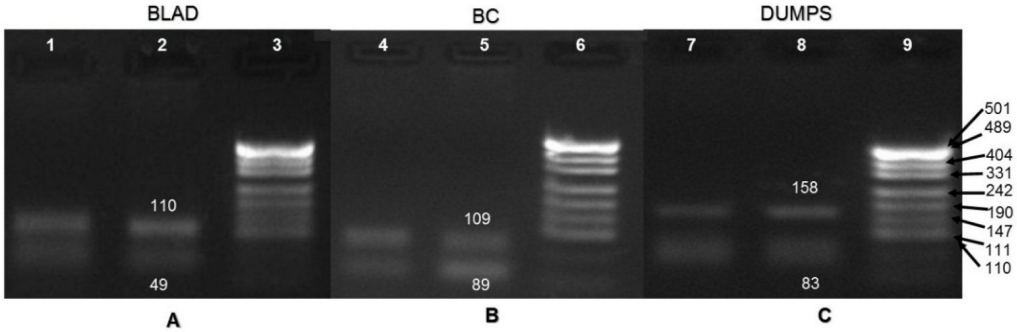


Рисунок 2 – Электрофореграмма амплификатов после рестрикции, А – лунки 1, 2 фрагменты 49 п.н., 110 п.н. (BLAD), 3,6,9 – ДНК маркер pUC19 DNA/MspI, В – лунки 4, 5 фрагменты 89 п.н., 109 п.н. (BC), С – лунки 7, 8 – фрагменты 83 п.н., 158 п.н. (DUMPS)

Следует отметить, что фрагменты 241 п.н., 158 п.н., 83 п.н. хорошо видны на электрофореграмме и способ позволяет определить генотип исследуемых животных с 100 % точностью. В ходе подбора последовательностей прямого и обратного праймеров, мы исключили замену одного нуклеотида, предложенного автором Schwenger B. в последовательности обратного праймера в позиции 19 по принципу комплементарности к последовательности гена UMP [5].

Для детекции точечной мутации CVM у быков-производителей использовали аллельспецифическую полимеразную цепную реакцию с праймерами G и T (Рисунок 3). Необходимо отметить, что использование метода PCR-RFLP анализа для детекции носителей генетического дефекта CVM является сложным и трудоемким способом, так как нет соответствующей рестриктазы для выявления точечной мутации. Обычно для детекции носителей CVM используются различные варианты метода полимеразной цепной реакции: амплификация участка гена с помощью аллельспецифических праймеров (AS-PCR), создание сайта рестрикции при амплификации для выявления точечной мутации (CRS-PCR -created restriction site) и введение в последовательности праймера замену одного нуклеотида с целью создания сайта рестрикции для эндонуклеазы (PCR-PIRA).

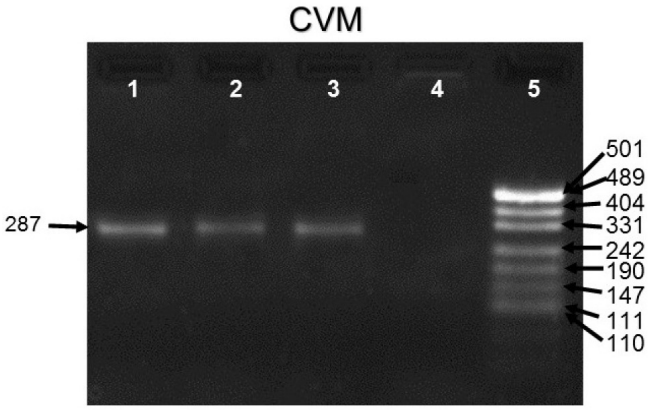


Рисунок 3 – Продукт амплификации участка гена SLC35A3 с аллельспецифическими праймерами, лунки 1, 2, 3 – 287 п.н. с аллельспецифическими праймерами G, 4 – с аллельспецифическими праймерами T, 5 ДНК маркер – pUC19 DNA/MspI

Регистрация флуоресцентного сигнала проводится в процессе амплификации на специальном приборе – амплификаторе для Real-Time Step One Plus. По нарастанию интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения, прилагаемого к амплификатору, вычисляется концентрация исходной матрицы ДНК. Real-Time PCR SNPs

диагностика скрытого генетического дефекта CVM проводилась на приборе Американского производства Real-Time Step One Plus Applied Biosystems марки 7500 («Thermo Fisher Scientific», США).

Данный эксперимент проводился в следующей последовательности: выбор типа эксперимента, выбор типа реагента и типа анализа. Наборы праймеров и зонды были разработаны на основании опубликованных результатов секвенирования, гена SLC35A3. В каждом наборе зондов, один зонд, который идеально совпадал с мутирующим геном, был обозначен как 5' при помощи 6-карбоксифлуоресцеина (FAM), (Рисунок 5); другой зонд, совпадающий с вариантом дикого типа, был обозначен (5'-VIC), (Рисунок 4) кроме того, оба зонда включали в себя нефлоуресцентные гасители и частицы белка.

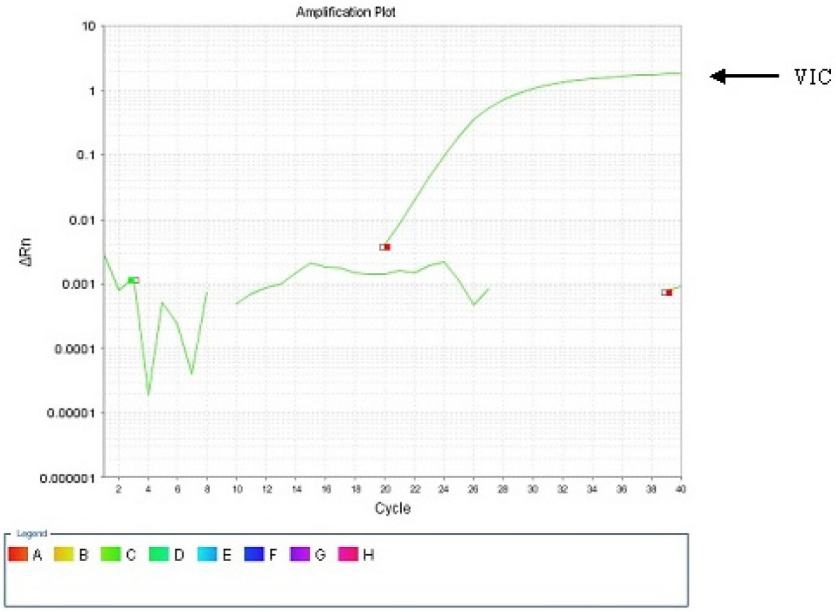


Рисунок 4 – Результаты Real-Time PCR SNPs диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу CVM (амплификация с VIC зондом, дикий тип)

В нашей работе для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации CVM были использованы праймеры: прямые F–5'–AGCTGGCACAATTTGTAGGT -3' и обратные R -5'-CTCAAAGTAAACCCCAGCAAAGC-3' и внутренние меченые прямые F – VIC – 5'-TCATGGCA**G**TTCTCA–3' и внутренние меченые обратные R – FAM – 5'-TCATGGCA**T**TTCTCA-3' [16].

Методика Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации CVM включает в первую очередь нормализацию концентрации ДНК в образцах путем разбавления TE буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл. Условия проведения PCR в режиме реального времени I шаг – 95°C – 10 минут, II шаг – 95°C – 15 сек и 60°C – 60 сек, количество циклов 40.

Аллельное распознавание может осуществляться путем анализа графиков амплификации в режиме реального времени. Теоретически, зонды VIC типа будут комплементарны только дикому типу и формируют стандартный график амплификации, в то время как FAM зонды комплементарны только мутантным аллелям и формируют собой график амплификации. Таким образом, генотип может быть точно определен посредством сравнения графиков усиления. На графическом изображений результатов амплификации с использованием меченых олигонуклеотидов с VIC типом (аллель G) на дисплее амлификатора Real-Time Step One Plus Applied Biosystems появляется одна кривая, визуально кривая появляется начиная с 22 цикла полимеразной цепной реакции и до конца амплификации идет усиление накопления амплифицируемого фрагмента исследуемого гена (Рисунок 4). Так, при Real-time PCR SNPs диагностике гетерозиготных носителей

мутации CVM в результате амплификации участка гена с мутантным аллелем (аллель T), олигонуклеотиды меченые с FAM зондом обеспечивает амплификацию мутантного аллеля и на дисплее ампликатора появляется вторая кривая с FAM зондом (Рисунок 5).

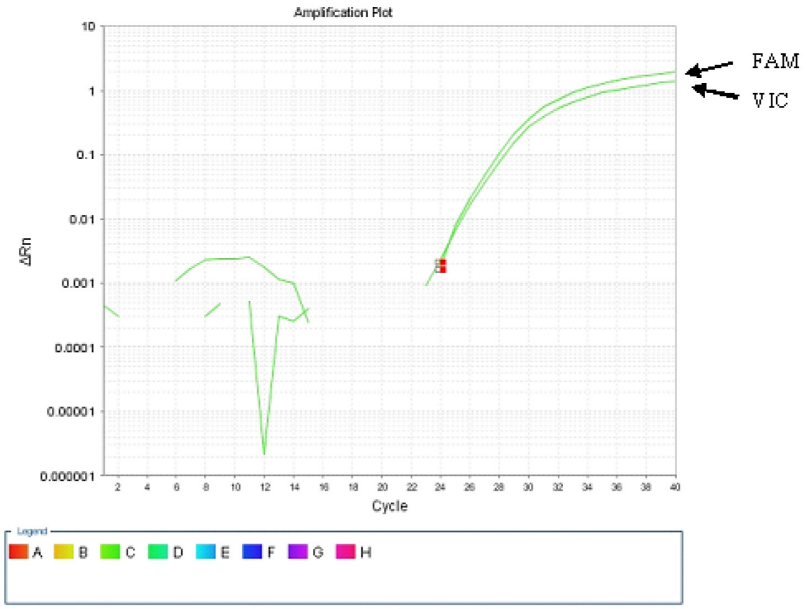


Рисунок 5 – Графическое изображение результатов Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации гена SLC35A3, гетерозиготный носитель CVM (амплификация с FAM зондом, мутантный тип и с VIC зондом, дикий тип)

В наших экспериментах по Real-Time PCR SNPs диагностике точечной мутации BLAD были использованы праймеры: прямые F – 5' – CAGTTGCGTTCAATGTGACCTT -3' и обратные R -5'- GAGTAGGAGAGGTCCAT-CAGGTA-3' и внутренние меченые прямые F – VIC – 5'- CCCCATCGACCTGTAC – 3' и внутренние меченые обратные R – FAM – 5'-CCCATCGGCCTGTAC-3'. Перед Real-Time PCR амплификацией ДНК, в первую очередь нормализовали концентрацию образцов ДНК путем разбавления TE буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл.

В то время, как графики амплификации в режиме реального времени исследовались на наличие BLAD, слабый неспецифический сигнал наблюдался в аллели дикого типа (дикий тип. Китайскими учеными в 2012 году в результате проведенных экспериментов также бы выявлен данный эффект, амплификация участка гена с зондом VIC типа. Вероятно, это происходит в связи с тем, что аллельспецифический зонд имеет одно ошибочное связывание пары оснований с другим аллелем; а также, если нуклеотидная последовательность рядом с участком SNP, сильно насыщенным AT/GC или содержащим определенные сочетания последовательности, а зонд, как правило, менее отличителен по сравнению с несоответствующей аллелей. Тем не менее, образец графиков амплификации в режиме реального времени можно легко разграничить на дикий и мутирующий тип, потому что интенсивность неспецифического сигнала намного ниже по сравнению с отметкой цели (Рисунок 6).

На графическом изображений (Рисунок 7) начиная с 20-22 цикла по 32 наблюдается тенденция увеличения сигнала в результате накопления продуктов амплификации, у гетеризиготных быков-производителей обе кривые почти паралелльные. У гомозиготных здоровых особей на дисплее появляются две кривые, но продукты амплификации с VIC и FAM накапливаются с разной интенсивностью. Так, более интенсивно накапливается продукт с VIC зондом (с диким типом аллели гена CD 18), если животное является гетерозиготным носителем получаем изображение с паралеллными кривыми.

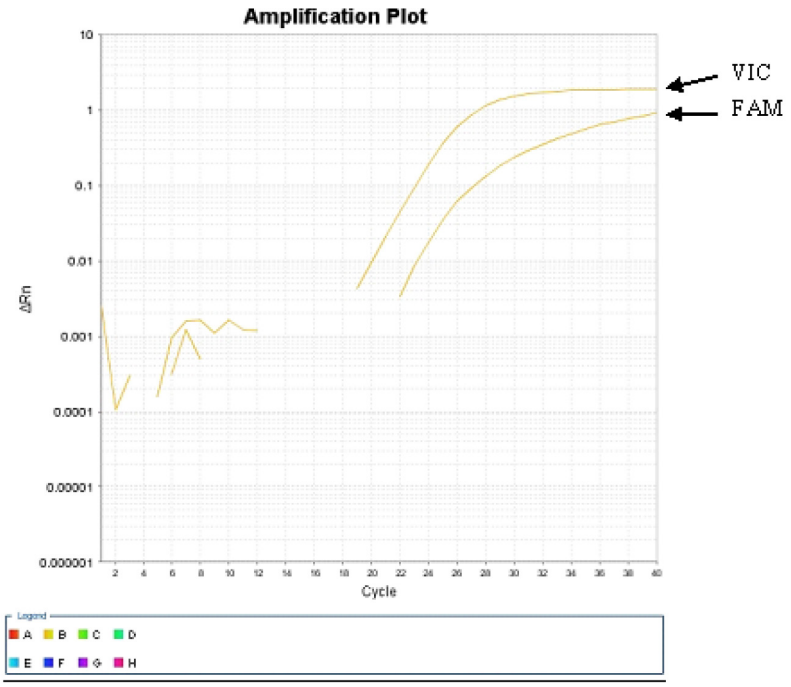


Рисунок 6 – Результаты Real-time PCR диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу BLAD

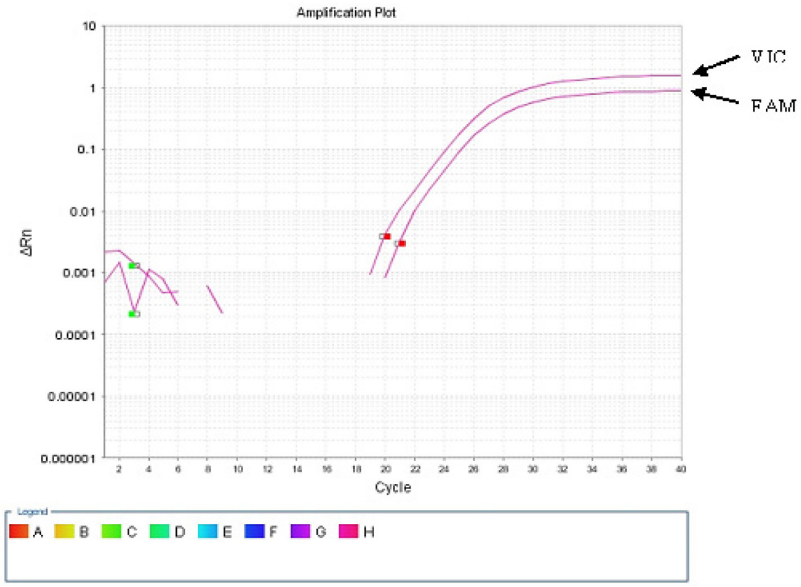


Рисунок 7 – Графическое изображение результатов Real-time PCR SNPs диагностики точечной мутации гена CD 18, гетерозиготный носитель BLAD, (амплификация с FAM зондом, мутантный тип, и с VIC зондом, дикий тип)

Real-Time PCR SNPs диагностику точечной мутации DUMPS мы проводили с использованием праймеров для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность:

F – 5 ' – G G C T G A A G A A C A T T C T - GAATTTGTGA-3' и R-5'-TGGAGTCAAGT-GAAGAAATTCTGGTT-3' и меченые F–VIC-5'-ATGCTTACTCGGGAGCCA-3' и R–FAM-5'-ATGCTTACTCAGGAGCCA-3'. Праймеры для генотипирования и меченые зонды VIC, FAM праймеры были синтезированы компанией Applied Biosystems, США.

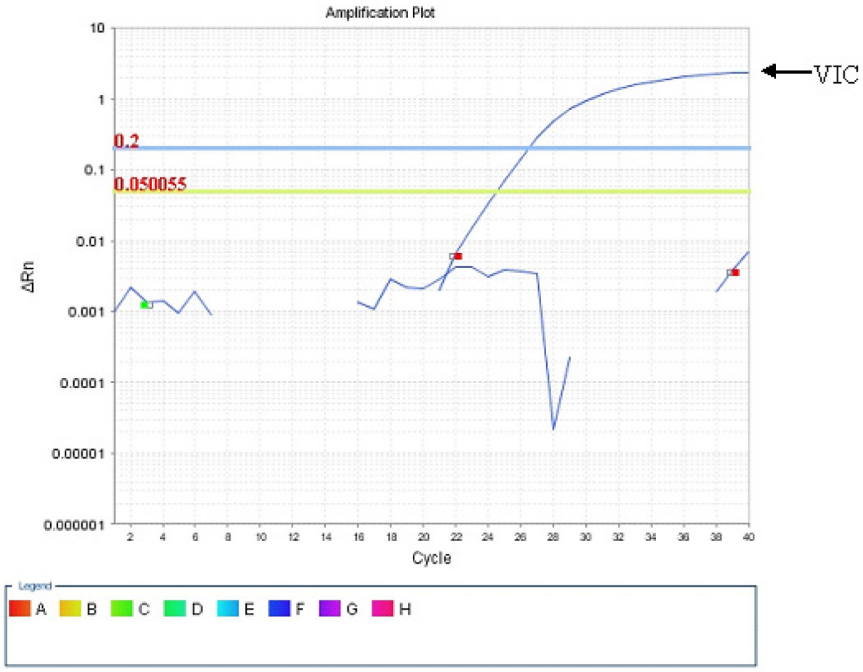


Рисунок 8 – Результаты Real-time PCR диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу DUMPS (амплификация с VIC зондом, дикий тип)

Real-Time PCR диагностику на носительство генетического дефекта DUMPS проводили с помощью амплификатора Real Time StepOnePlus, объемом реакционной смеси 25 мкл (Рисунок 8). Условия проведения ПЦР I шаг – 95°С – 10 минут, II шаг – 92°С – 15 сек и 60°С – 60 сек, количество циклов 40. В пробирку Эппендорфа набираем компонеты реакционной смеси (на 17 реакции), имеющий состав: TaqMan Genotyping Master Mix 220 мкл, праймеры 11 мкл и бидистиллированная вода 170 мкл. Затем смесь перемешиваем на вортексе и переносим реакционную смесь в количестве 23 мкл в стрипы и добавляем по 2 мкл ДНК с концентрацией 20-40 нг/мкл.

Результаты и их обсуждение

В Республике Казахстан ежегодно отмечается тенденция роста объема импорта замороженной спермы племенных быков-производителей молочных и мясных пород зарубежной селекции, в связи с этим увеличивается вероятность распространения аутосомальных летальных рецессивных мутации у животных. По сведениям зарубежных авторов, локальные местные породы крупного рогатого скота свободны от носительства вредных мутации BLAD, DUMPS, CVM, BC и FXID [17], BC и DUMPS [18], BLAD, DUMPS [19]. Известно, что в последнее время отмечается снижение распространенности летальной точечной мутации BLAD, CVM, DUMPS и BC у племенных животных в результате своевременной PCR диагностики животных на наличие генетических дефектов. Так, в США частота генетического дефекта BLAD в 1992 году среди быков-производителей составила 14,1% и среди коров 5,8% [1].

Для выявления точечной мутации CVM, при скринировании известных SNP, в каждом случае нужны только те олигонуклеотиды, которые соответствуют известным аллельным вариантам. Такие аллель-специфические наборы олигонуклеотидов были использованы для кодирующей части гена SLC35A3 у крупного рогатого скота в позиции 559 G/T. Использование программы Real Time PCR Primer and Probe Database позволяет нам определить последовательности ДНК указанного гена. Следующий этап – синтез праймеров с аллель-специфическим олигонуклеотидом G/T. Однако, применение аллельспецифической полимеразной цепной реакции является трудоемким и длительным процессом, необходимо ставить две реакции с каждым исследуемым образцом (Рисунок 3).

Таким образом, на заключительном этапе работы был разработан метод Real Time PCR SNPs диагностики для детекции носителей ге-

нетического дефекта CVM. Разработанный метод диагностики позволяет в течение двух часов точно определить здоровых гомозиготных животных (Рисунок 4) и гетерозиготных носителей мутации (Рисунок 5). У гетерозиготных носителей мутации идет амплификация с двумя зондами (VIC и FAM), соответственно образуются две кривые. Реал-Тайм ПЦР способ детекции точечной мутации является экспресс методом и сокращаются такие этапы анализа, как – проведение электрофореза, рестрикции продукта амплификации и повторного элек-трофореза.

Нами, экспериментальным путем установлено, что в случае Real Time PCR SNPs диагностики носителей мутации генетического дефекта BLAD по неизвестной причине идет амплификация фрагментов ДНК с двумя зондами (VIC и FAM, Рисунок 6). Однако, интенсивность накопления продуктов амплификации и графическое изображение кривой позволяет дифференцировать гомозиготных здоровых животных от гетерозиготных носителей мутации BLAD (Рисунок 7).

Результаты Real Time PCR SNPs диагностики генетического дефекта DUMPS оказались ожидаемыми, т.е. у гомозиготных здоровых животных прошла амплификация с меченым олигонуклеотидным VIC зондом (Рисунок 8), полимеразная цепная реакция с FAM зондом не прошла (мутантный аллель), что свиде-тельствует об специфичности данной реакции. Следует отметить, что разработанная нами методика постановки Real Time PCR SNPs диагностики при наследственных аномалиях CVM, BLAD, DUMPS позволяет в течение двух часов идентифицировать гетерозиготных носителей, значительно сокращается время для исследования образцов.

В заключений следует отметить, что быки производители локальных пород: Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой оказались свободными от носительства наследственных заболеваний (CVM, BLAD, DUMPS, BC). Отсутствие носителей генетических дефектов у племенных быков-производителей местных пород можно объяснить тем, что исследуемые животные были Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой, которые в своей родословной не имеют предков, носителей аутосомальных рецессивных мутации. Однако, с целью недопущения распространения вредных генетических дефектов рекомендуется проводить мониторинг племенного поголовья методом полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ анализом.

По результатам генетического мониторинга были выявлены гетерозиготные носители мутации гена SLC35A3 у животных зарубежной селекции (бык-производитель голштинской черно-пестрой породы, индивидуальный № 1HO08415 CM-R-Run-Morty-Jacson-Et и и бык-производитель породы герефорд, индивидуальный № 2791092 Schu-Lar-3T зарубежной селекции). Для проведения генетического мониторинга племенных животных, спермы, замороженных эмбрионов и других биологических материалов рекомендуется использовать метод Real Time PCR SNPs диагностики.

Работа была выполнена за счет грантового финансирования МОН РК «Мониторинг племенных животных Республики Казахстан на носительство генетических дефектов с помощью молекулярно-генетических методов», сроки реализации 2012-2014 гг, № государственной регистрации 0112РК02603.

Литература

1 Shuster D.E., Kehrli M.E., Ackerman M.R., Gilbert R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle //Proceeding of the National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89, No.19. – P. 9225-9229

2 Agerholm J.S., Bendixen C., Andersen O., Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves//J Vet Diagn Invest. -2001. – Vol. 13, No.4. – P. 283-289

3 Robinson J.L., Drabik M.R., Dombrowski D.B., Clark J.H. Consequences of UMP synthase deficiency in cattle // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. – 1986. Vol. 80, No.2. – P. 321-323

4 Harper P.A., Healy P.J., Dennis J.A., O'Brien J.J., Rayward D.H. Citrullinaemia as a cause of death in neonatal Friesian calves //Aust Vet J. – 1986. – Vol. 63, No.11.-P. 378-379

5 Schwenger B., Tammen I., Aurich C. Detection of homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro //J Reprod Fertil. – 1994. – Vol. 100. – P. 511-514

6 Poli M.A., Dewey R., Semorile L., Lozano M.E., Albariño C.G., Romanowski V., Grau O. PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle //Zentraibi Veterinaermed A.- 1996. – Vol. 43. No.3. – P. 163-168

7 Dennis J.A., Heally P.J., Beaduet A.L., Obrien W.F. Molecular definition of Bovine Argininosuccinate synthetase deficiency //Proceeding of Natl Acad Sci USA.- 1989.- Vol. 86, No.20. – P. 7947-7951

8 Healy P.J., Dennis J.A., Camilleri L.M., Robinson J.L., Stell A.L., Shanks R.D. Bovine citrullinaemia traced to the sire of Linmack Kriss King // Aus Vet J. – 1991. – Vol. 68, No.4. – P. 155

9 Robinson J.L., Popp R.G., Shanks R.D., Oosterhof A., Veerkamp J.H. Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein Friesian cattle of North America and Europe // Livest Prod Sci. – 1993. – Vol. 36. – P. 287-298

10 Kaminski S., Grzybowsk G., Prusak B., Rure A. No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle // J Appl Genet. – 2005. Vol. 46, No.4. – P. 395-397

1. Bahnak B.R., Wu Q.Y., Coulombel L., Drouet L., Kerbiriou-Nabias D., Meyer D. A single and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm // NAR.-1988. – Vol. 16, No. 3.- P. 1208.

2. Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction //Science.-1991. – Vol. 252. – P. 1643-1651

3. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F., Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR //NAR. – 1992. – Vol. 20, No.17. – P. 4567–4573

4. Усенбеков Е.С., Альпейсов Ш.А., Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н. Применение полимеразной цепной реакции для выявления точечной мутации у быков-производителей //Журнал «Ізденістер, Результаты». – 2013. № 3. – С. 79-86

5. Grupe S., Diet G., Schwerin M. Population survey of citrullinemia on German Holsteins //Livestock Prod Sci. – 1996. – Vol. 45, No. 1. – P. 35-38

6. Zhang Y., Xuehua F., Dongxiao S., Yachun W., Ying Y., Yan X., Shengli Z., Yuan Z.Z. A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle //J Anim Sci Biotechnol. – 2012. – Vol. 3, No.1. – P. 24-30

7. Meydan H., Uğurlu M., Yildiz M.A. Monitoring of BLAD, DUMPS, CVM, BC and FXID in Turkish Native Cattle Breeds // Journal of Agricultural Sciences. – 2012. – Vol. 18. – P. 239-245

8. Patel R.K., Singh K.M., Soni K.J., Chauhan J.B., Sambasiva Rao K.R.S. Lack of carriers of Citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle // J Appl Genet. – 2006. – Vol. 47, No.3. – P. 239-242

9. Rahimi G., Nejati-Javaremi A., Olek K. Genotyping BLAD, DUMPS and – CSN loci in Holstein young bulls of the National Animal Breeding Center of Iran //Pakistan J Biol Sci. -2006. – Vol. 9, No.7. – P. 1389-1392

References

1. Shuster DE, Kehrli ME, Ackerman MR, Gilbert RO (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. Proceeding of the National Academy of Sciences Vol. 89 (19): P. 9225-9229

2. Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J (2001) Complex vertebral malformation in Holstein calves. J Vet Diagn Invest Vol. 13 (4): P. 283-289

3. Robinson JL, Drabik MR, Dombrowski DB, Clark JH (1986) Consequences of UMP synthase deficiency in cattle. Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 80 (2), 321-323

4. Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, O'Brien JJ, Rayward DH (1986) Citrullinaemia as a cause of death in neonatal Friesian calves. Aust Vet J, Vol. 63 (11): P. 378-379

5. Schwenger B, Tammen I, Aurich C (1994) Detection of homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. J Reprod Fertil. Vol. 100: P. 511-514

6. Poli MA, Dewey R, Semorile L, Lozano ME, Albariño CG, Romanowski V, Grau O (1996) PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle. Zentraibi Veterinaermed A Vol. 43 (3): P. 163-168

7. Dennis JA, Heally PJ, Beaduet AL, O'brien WF (1989) Molecular definition of Bovine Argininosuccinate synthetase deficiency. Proceeding of Natl Acad Sci USA, Vol. 86 (20): P. 7947-7951

8. Healy PJ, Dennis JA, Camilleri LM, Robinson JL, Stell AL, Shanks RD (1991) Bovine citrullinaemia traced to the sire of Linmack Kriss King. Aus Vet J, Vol. 68 (4): P. 155

9. Robinson JL, Popp RG, Shanks RD, Oosterhof A, Veerkamp JH (1993) Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein Friesian cattle of North America and Europe. Livest Prod Sci Vol. 36: P. 287-298

10. Kaminski S, Grzybowsk G, Prusak B, Rure A (2005) No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. J Appl Genet Vol. 46 (4): P. 395-397

11. B.R.Bahnak, Q.Y.Wu, L.Coulombel, L.Drouet, D.Kerbiriou-Nabias and D.Meyer (1988) A single and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm.// NAR Vol. 16 (3): P. 1208.

12. Erlich, HA, Gelfand D, Sninsky JJ (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. Science, Vol. 252: P. 1643-1651

13. Huang MM, Arnheim N, Goodman MF (1992) Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. NAR Vol. 20 (17): P. 4567–4573

14. Usenbekov ES, Alpejsov ShA, Zhanserkenova OO, Kasymbekova ShN (2013) The use of polymerase chain reaction for the detection of point mutations in bulls. Journal Izdenister, results [Primenenie polimeraznoj cepnoj reakcii dlja vyjavlenija tochechnoj mutacii u bykov-proizvoditelej. Zhurnal Izdenister, Rezultaty] 3: 79-86. (In Russian)

15. Grupe S, Diet G, Schwerin M (1996) Population survey of citrullinemia on German Holsteins. Livestock Prod Sci, Vol. 45 (1): P. 35-38

16. Zhang Yi , Xuehua Fan, Dongxiao Sun, Yachun Wang, Ying Yu, Yan Xie, Shengli Zhang and Yuan Zhang Zhang (2012). A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. J Anim Sci Biotechnol Vol. 3 (1): P. 24-30

17. Meydan H, Uğurlu M, Yildiz MA (2012) Monitoring of BLAD, DUMPS, CVM, BC and FXID in Turkish Native Cattle Breeds. Journal of Agricultural Sciences. Vol. 18: P. 239-245

18. Patel RK, Singh KM, Soni KJ, Chauhan JB, Sambasiva Rao KRS (2006) Lack of carriers of Citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. J Appl Genet Vol. 47 (3): P. 239-242

19. Rahimi G, Nejati-Javaremi A, Olek K (2006) Genotyping BLAD, DUMPS and – CSN loci in Holstein young bulls of the National Animal Breeding Center of Iran. Pakistan J Biol Sci, Vol. 9 (7): P. 1389-1392

Хусаинова Э.М.,
Джантаева К.Б.,
Амиргалиева А.С.,
Муратова Ф.Т., Скворцова Л.А.,
Нуржибек, Утегенова К.С.,
Перфильева А.В.,
Бекманов Б.О.

Институт общей генетики
и цитологии,
Казахстан, г. Алматы

Изучение полиморфизмов генов, участвующих в антиоксидантных реакциях у людей, подвергшихся действию радиации

В реализации последствий действия радиации на организм важную роль играют механизмы репарации, детоксикации ксенобиотиков и оксидативной защиты. Одним из эффектов воздействия ионизирующего излучения является возникновение свободных радикалов, которые могут являться индукторами оксидативного стресса, приводить к одиночным и множественным оксидативным повреждениям ДНК, ингибировать ферменты, окислять липиды мембран, тем самым нарушая функциональную активность клеток. Однонуклеотидные полиморфизмы в генах, кодирующих факторы антиоксидантной защиты, могут влиять как на степень экспрессии генов, так и на функциональную способность соответствующих ферментов. В статье приводятся данные анализа полиморфизмов Ile105Val гена GSTP1 и 4a/b гена eNOS у казахстанцев, подвергавшихся действию радиации в течение длительного времени в результате проживания вблизи бывшего Семипалатинского ядерного полигона. В результате проведенного исследования нами были получены частотные распределения для генотипов и аллелей по полиморфным локусам GSTP1Ile105Val и eNOS4a/b в изучаемой популяции. Как показывают результаты статистического анализа, высокие показатели риска радиочувствительности определены для гомозигот мутантного типа a/a гена eNOS (OR = 6,15; p = 0,04).

Ключевые слова: радиация, генетический банк, генетический полиморфизм, окислительный стресс, ферменты детоксикации ксенобиотиков.

Khussainova E.M.,
Djantaeva K.B.,
Amirgalieva A.S., Muratova F.T.,
Skvortsova L.A., Nurzhibek,
Utegenova K.S.,
Perfilyeva A.V.,
Bekmanov B.O.

Institute of General Genetics and
Cytology, Kazakhstan, Almaty

The study of polymorphisms of genes involved in antioxidant reactions in people exposed to radiation

In the implementation of radiation consequences on the body an important role belongs to the mechanisms of repair, xenobiotics detoxification and oxidative protection. One of the effects of exposure to ionizing radiation is the formation of free radicals, which can induce oxidative stress, lead to single and multiple oxidative DNA damage, inhibit enzymes and oxidize membrane lipids, thereby supressing functional activity of cells. Maintaining a balance between the processes of formation and utilization of free radicals is an important aspect of cell life and organism as a whole. The article presents the data on analysis of polymorphisms of genes GSTP1 Ile105Val and eNOS 4a/b in Kazakhstan population, exposed to radiation for a long time as a result of living in areas surrounding former Semipalatinsk nuclear test site. During this study we obtained the frequency distribution for genotypes and alleles at polymorphic loci GSTP1 Ile105Val and eNOS 4a/b in the examined population. According to the results of statistical analysis, high level of radiation sensitivity risk revealed mutant homozygotes a/a of eNOS gene (OR = 6,15; p = 0,04).

Key words: radiation, gene bank, genetic polymorphism, oxidative stress, xenobiotic detoxification enzymes.

Хусаинова Э.М.,
Джантаева К.Б.,
Әмірғалиева А.С.,
Мұратова Ф.Т., Скворцова Л.А.,
Нұржібек, Утегенова Қ.С.,
Перфильева А.В.,
Бекманов Б.О.

Жалпы генетика
және цитология институты,
Қазақстан, Алматы қ.

Радиация әсеріне ұшыраған адам организмінде антиоксидантты реакцияға қатысатын гендер полиморфизмін зерттеу

Адам организміне радиация әсерін бағалауда маңызды рөлді сол организмдегі ДНҚ молекуласының репарациясы, ксенобиотиктердің детоксикациясы және организмнің оксидативті қорғанысы атқарады. Организмде иондаушы сәулелердің әсерін ондағы түзілетін бос радикалдардың мөлшерімен сипаттайды. Бос радикалдар ДНҚ молекуласының оксидативті бұзылысына, липидтер мембраналарының тотығуына, ферменттер жұмысының басылуына және клетка белсенділігінің төмендеуіне әкеліп соғады. Бүкіл организмдегі және клеткадағы бос радикалдардың түзілуі мен оның ыдырауы арасындағы тепе-теңдіктің сақталуы сол организм үшін өте маңызды. Бұл мақалада бұрынғы Семей ядролық полигоны аймағында тұратын және ұзақ уақыт бойы аз мөлшерде радиациялық сәулелену әсеріне ұшыраған адамдарда GSTP1 Ile105Val және eNOS4a/b гендерінің полиморфизмін талдау нәтижелері берілген. Жүргізілген зерттеулер негізінде популяциядағы GSTP1Ile105Val және eNOS4a/b полиморфты локустары генотиптерінің таралу жиілігі анықталды. Статистикалық талдау нәтижелерінен радиосезімталдылық қаупінің жоғары көрсеткіші eNOS генінің гомозиготалы a/a мутантты типінде (OR = 6,15; p = 0,04) байқалатынын көруге болады.

Түйін сөздер: радиация, генетикалық қор, генетикалық полиморфизм, тотығу стресі, ксенобиотиктер детоксикациясы ферменттері.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 575.113; 577.21; 539.1.04

*Хусаинова Э.М., Джантаева К.Б., Амиргалиева А.С., Муратова Ф.Т., Скворцова Л.А., Нуржибек, Утегенова К.С., Перфильева А.В., Бекманов Б.О.

Институт общей генетики и цитологии,
Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: khussainova@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В АНТИОКСИДАНТНЫХ РЕАКЦИЯХ У ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ ДЕЙСТВИЮ РАДИАЦИИ

В процессе радиационного поражения ведущая роль принадлежит оксидативному повреждению биологических мембран, которое осуществляется с помощью реактивных соединений кислорода, генерированных под воздействием ионизирующей радиации. Во многих исследованиях отмечено, что при облучении возрастает интенсивность пероксидации липидов и снижается активность антиоксидантных ферментов [1-4].

Ферменты биотрансформацииксенобиотиков участвуют в антиоксидантных реакциях и детоксикациивнешнесредовыхполютантов, стимулирующих развитие воспалительного процесса вследствие токсического и раздражающих эффектов. Большая роль среди них принадлежит ферментам глутатион-S-трансферазам (GST) [5]. Глутатион-опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, воздействию свободных радикалов и алкилированию белков [6].

Одним из генов супер семейства глутатион S-трансфераз является ген *GSTP*. Он кодирует фермент, участвующий во второй фазе детоксикации к сенобиотиков–глутатионS-трансферазу*P1* типа. Снижение его активности может способствовать нарушению детоксикации реактивных метаболитов к сенобиотиков и продуктово кислительного стресса. Для гена *GSTP1* описано два вида однонуклеотидных полиморфизмов. Один приводит к замене основания аденин на гуанин (*A/G*) в 313 положении в 5 экзоне. Следствием чего является замена аминокислоты изолейцина на валин (*Ile/Val*) в 105 положении пептида. Другой полиморфизм приводит к замене основания цитозин на тимин (*C/T*) в 341 положении в 6 экзоне гена *GSTP1*. В результате этого аминокислота аланин меняется на валин в 114 положении (*Ala/Val*). Врезультате указанных несинонимичныхаминокислотныхзаменвструктуре*GSTP1* происходит изменение его ферментативной активности, что способствуетповышениюуровнягидрофобныхпромежуточных-реактивныхметаболитовксенобиотиковвтканяхиорганах [7].

Ряд исследований свидетельствует о важной роли молекулы оксида азота (NO) в патогенезе радиационного повреждения [8,9]. Было показано, что во время радиационного воздействия NO может проявлять как радиозащитное, так и радиотоксичес-

кое действие, что обусловлено высокой реактивностью этой молекулы. Радиопротекторная роль оксида азота обусловлена антиоксидантными свойствами этой молекулы [10], а в основе радиотоксического действия лежит биологическая деградация NO в цитотоксический пероксинитрит в условиях радиация – индуцированного окислительного стресса [11]. Обнаружено, что ингибиторы NO препятствуют развитию радиация-индуцированного апоптоза путем уменьшения степени повреждения митохондрий и подавления активации нисходящих каспаз [12].

Ген *NOS3* кодирует эндотелиальную изоформусинтазы оксида азота (NOS), его конститутивная экспрессия обеспечивает постоянную продукцию важной сигнальной молекулы организма – оксида азота. Четко прослеживается связь между уровнем продукции NO в организме и выраженностью окислительного стресса при сосудистой патологии: ингибирование синтеза и резкое снижение содержания оксида азота в кровяном русле связано с накоплением свободно-радикальных молекул. На уровень экспрессии гена *NOS3* и уменьшение выработки NO оказывает влияние *4a/b* полиморфизм 4-го интрона. Нормальный вариант содержит 5 минисателлитных повторов (27 пар нуклеотидов (п.н.)) и обозначается как *4b*-аллель. Мутантный вариант содержит 4 таких повтора и обозначается как *4a*-аллель. Для данного варианта описаны ассоциации с атеросклерозом, ишемической болезнью сердца и инфарктом миокарда [13].

Гены, кодирующие ферменты детоксикацииксенобиотиков и окислительного стресса, часто рассматриваются в качестве кандидатных генов радиочувствительности и радиорезистентности и широко изучаются в связи с предрасположенностью носителей «ослабленных» генотипов к различным заболеваниям. В связи с этим целью нашей работы явилась оценка частоты распределения полиморфизмов*Ile105Val* гена*GSTP1* и *4a/b* гена *eNOS* у казахстанцев, подвергавшихся действию низких доз радиации в течение длительного времени в результате проживания вблизи бывшего Семипалатинского ядерного полигона.

Материалы и методы

Объектом исследования были образцы периферической крови людей, проживающих на территории бывшего Семипалатинского ядерного полигона и Алматинской области. ДНК выделяли из замороженных (-20°C) образцов периферической крови, содержащих в качестве антикоагуляционного агента ЭДТА. Для выделение геномной ДНК использовали набор реагентов *QIAampDNAMiniKit* (*Qiagen,* США) и (*ThermoFisherScientific*, США). Количественную и качественную оценку выделенных ДНК проводили с помощью ДНК-фотометра (*Biofotometer-Plus, Eppendorf*, Германия) и электрофоретического анализа.

Генотипирование полиморфизма гена GSTP1 Ile105Val. Генотипирование полиморфизма гена детоксикации ксенобиотиков GSTP1Ile105Val (A313G)осуществлялось методом поли-меразной цепной реакции и последующей рестрикцией амплификатов (ПЦР-ПДРФ). Смесь для амплификации объемом 20 мкл включала 50 нг изолированной ДНК образцов, 10 пмоль каждого праймера, GSTP1 5´-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3´ и 5´-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3´. Амплификация состояла из 30 циклов: 94оС – 30 секунд, 55оС – 30 се-кунд, 72оС – 30 секунд. Реакция заканчивалась с заключительным шагом 72оС – 5 минут.

На втором этапе по 5 мкл амплификата размером 176 п.н. подвергали рестрикции эндо-нуклеазойAlw26I(ThermoFisherScientific, США) в течение 4 часов при 37оС. О наличии поли-морфного сайта рестрикции в Val105Val (G313G) аллели свидетельствовало образование 2-х фрагментов длиной 91 п.н. и 85 п.н. ГенотипIle105Val – 176 п.н., 91 п.н. и 85 п.н. и генотип Ile105Ile – 176 п.н. [14].

Генотипирование полиморфизма 4a/b гена eNOS. Смесь для амплификации объемом 20 мкл включала 50 нг изолированной ДНК образцов, 10 пмоль каждого праймера, eNOS 5′-ACC TCA GCC CAG TAG TG-3′ и 5′-GCA AGT GTC AGA TAG GAT T-3′. Условия ПЦР состояли из: начальной денатурирующей температуры 94°C – 5 минут, затем проводили 35 циклов амплификации в режиме 94°C – 2 минуты, 54°C – 1 минута, 72°C – 1 минута. Реакция заканчивалась с заключительным шагом 72°C – 10 минут. ПЦР продукты состояли из фрагментов длиной 573 п.н. для гомозиготных «аа» аллелей, 604 п.н. для гомозиготных «bb» аллелей и 573/604 п.н. для гетерозиготных «ab» аллелей [15].

Продукты амплификации и рестрикционные фрагменты анализировали в 3% агарозном геле или 5% акриламидном геле в присутствии бромистого этидия и визуализацией фрагментов с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST5 (VilberLourmat, Франция).

Методы статистической обработки результатов. Показатель относительного риска (OR),

выявляющий подверженность генов GSTP1 ие NOSмутационным изменениям в результате действия радиации рассчитывали по стандартной формуле [15]. Достоверность разли-чий (P) между группами определяли с использованием Chi2 и t-критерия Стьюдента [16]. Уровень вероятностей 0,05 использовался как критерий значения.

Результаты и их обсуждение

Характеристики изученных популяций. Несмотря на обширные данные о влиянии иони-зирующего излучения и техногенных загрязнителей на геном человека, многое еще не ясно, поскольку генетический риск воздействия радиации на человека оценивается в основном по информации, полученной по результатам экспериментов на животных, и общих знаний радиобиологии. В большой степени это обусловлено ограниченным количеством биомате-риала для исследования, полученного от пострадавшего от действия техногенных факторов населения. Данное ограничение исходит из объективной невозможности проводить экспе-рименты на людях.

В Институте общей генетики и цитологии собрана уникальная коллекция биообразцов, представляющих облученные радиацией казахстанские популяции и популяции, не подвергавшиеся действию агрессивных мутагенов окружающей среды. В настоящее время общий объем коллекции составляет 1131 образец замороженой крови и ДНК людей, про-живающих на густонаселенной территории Семипалатинского ядерного полигона (с. До-лонь, с. Канонерка, с. Бодене, с. Черемушки, с. Мостик, с. Чаган), относящейся к зоне чрез-вычайного радиационного риска (730 образцов) и в экологически благоприятных районах Алматинской области (с. Дзержинск, с. Уш-Тобе, с. Жанаталап, пос. Таукаратурык, с. Кырбалтабай) (401 образец).

Для создания уникального генетического банка были выбраны семьи, проживающие в данных селах и имеющие 3 поколения, где в каждом поколении было более двух детей. Одним из наиболее значимых критериев действия радиации является статус здоровья, особенно в отношении репродуктивной функции и раковых заболеваний. При сборе материала ориентировались на семьи с хорошей репродуктивной способностью, где живы оба родителя P0. При формировании когорт для исследования основным условием было соответствие анкет-ных данных представителей облученной и контрольной групп. При этом учитывались: возраст, пол, национальность, профессиональный стаж, курение, употребление алкогольных напитков, медицинские данные, время и место рождения респондентов, область профес-сиональной деятельности, семейное положение, характер питания, тип домов и др. Кроме того, для женщин учитывали сведения о репродуктивной функции, случаях рождения детей с врожденными пороками развития, самопроизвольных абортах.

Таким образом, контрольная и облученная популяции имеют сходный климато-географический, социальный и этнический фон. Все объекты исследования имеют удовлет-ворительный статус здоровья и соответствуют по возрастному критерию и вредным при-вычкам.

Результаты генотипирования по полиморфизму GSTP1 Ile105Val. Для генотипирования полиморфных аллелей гена, кодирующего фермент детоксикацииксенобиотиковGSTP1, были использованы 519 образцов ДНК, представляющих облученную когорту и 284 образца из контрольной когорты здоровых людей соответствующего пола, возраста и национальности из Алматинской области.

Таблица 1 – Частоты аллелей гена GSTP1 в облученной и контрольной когортах

Аллели	Случаи	Контроль	χ^2	p	OR	95% CI
	n = 519	n = 284				
Аллель *Ile*	0.778	0.759	0.80	0.37	1.12	0.88 – 1.42
Аллель *Val*	0.222	0.241			0.90	0.70 – 1.14

Проведенный анализ распределения GSTP1 генотипов среди здоровых людей и людей, подвергшихся радиационному облучению, не выявил достоверной разницы в распределении аллелей

исследуемого гена в данных когортах. Частота аллеляIleв облученной когорте не намного превышает частоту данного аллеля в контроле (0,778 и 0,759 соответственно); также не выявлено достоверной разницы в распределении алеллеVal: 0,222 в облученной ко-горте и 0,241 в контрольной когорте (таблица 1). Распределение генотипов в исследуемых когортах соответствовало распределению Харди-Вайнберга.

Сравнивая полученные нами частоты полиморфных и нормальных аллелей *GSTP1* в исследованных популяциях с литературными данными, можно отметить, что частота распределения аллеля*105Val* в изученной нами казахстанской популяции близка к частоте распределения в азиатских популяциях. Эпидемиологические исследования распределения частот аллелей гена *GSTP1Ile105Val* в различных популяциях показали значительное различие в распространении аллелей в разных популяциях и этнических группах. Так, *GSTP1105Val* аллель наиболее широко представлен в популяции афро-американцев (0,42) и наименее распространен в популяции китайцев (0,23). Тогда как частота распределения *105Val* в популяции американцев европейского происхождения, британцев и других европеоидов находится в пределах от 0,33 до 0,36, а в популяции японцев – 0,26 [17]. Более того, изучение распределения аллелей гена *GSTP1* в этнических группах южных регионов Индии показало, что даже внутри одной страны существует значительные различия. Частота распределения аллеля*105Val* в некоторых этнических группах составила 0%, тогда как в других популяциях частота доходила до 11,8% [18].

В таблице 2 представлены результаты статистического анализа возможной ассоциации изученного полиморфизма *GSTP1Ile105Val* с фактором облучения в популяции жителей Семипалатинского региона и соответствующего контроля. Согласно полученным данным полиморфизм *Ile105Val*гена*GSTP1* не проявляет ассоциации с фактором облучения (P=0.33).

Таблица 2 – Ассоциация GSTP1-генотипов по полиморфизму Ile105Valс фактором облучения

Ген	Генотип	Контроль, чел. (%)	Облученные, чел. (%)	OR	CI (95%)	P
GSTP1 (Ile105Val)	*Ile / Ile*	153 (53,87)	303 (58,38)	1.20	0.90 – 1.61	0.33
	Ile / Val	125 (44,01)	202 (38,92)	0.81	0.60 – 1.09	
	Val / Val	6 (2,12)	14 (2,70)	1.28	0.49 – 3.38	

Согласно литературным данным генотипы *Ile/Ile*, *Ile/Val*, *Val/Val* гена *GSTP1* в китайской популяции распределены следующим образом: 56.6%, 40.8% и 2.6% соответственно, а в популяции афро-американцев – 35.0%, 46.0% и 19.0% соответственно [17]. В изученной нами популяции распределение генотипов гена *GSTP1* (табл. 2) соответствует распределению исследуемых генотипов в китайской популяции.

Можно сделать предположение, что различия в распределении генотипов могут быть связаны с наличием избирательного давления среды на популяции и этнические группы, проживающие в различных регионах. Вместе с тем, известно, что *Ile105Val* полиморфизм гена *GSTP1* значительно меняет каталитическую активность данного фермента II фазы детоксикации, что может влиять на индивидуальную чувствительность к канцерогенным метаболитам и развитию устойчивости к лекарственным средствам.

Результаты генотипирования по полиморфизму eNOS4a/b. Для того чтобы оценить значимость VNTR (*VariableNumberTandemRepeat*) полиморфизма в интроне 4 гена *eNOS*нами проводилось генотипирование полиморфизма *4a/b* гена эндотелиальной *NOS* методом ПЦР с использованием специфических праймеров к данному гену.

В таблице 3 приведены расчеты частот аллелей гена *eNOS* в контрольной и облученной популяциях. Частота аллеля*b* в облученной когорте равна 0,883; тогда как частота аллеля a, отвечающей за 4 копии 27 п.н. тандемного повтора, равна 0,117. В контрольной популяции частота аллеля*b* превышает частоту данного аллеля в облученной когорте – 0,918, в то время как частота аллеля*a* в контрольной когорте ниже, чем в облученной – 0,082.

Таблица 3 – Частоты аллелей гена eNOSв облученной и контрольной когортах

Аллели	Случаи	Контроли	χ^2	p	OR	95% CI
	n = 499	n = 274				
Аллель *b*	0.883	0.918	4.65	0.03	0.67	0.47 – 0.97
Аллель *a*	0.117	0.082			1.48	1.03 – 2.13

Согласно полученным результатам, аллель *4b* гена *eNOS* более распрастранен в исследуемой нами казахстанской популяции как в облученной, так и в контрольной когортах (0,883 и 0,918 соответственно), чем аллель *4a* (0,117 – облученная когорта и 0,082 – контрольная когорта). Анализируя частоты аллелей гена *eNOS* в других изученных популяциях, было отмечено, что в популяциях европеоидов и монголоидов выявляются аллели как с 4 (аллель *4a*), так и с 5 (аллель *4b*) повторами. В европейской белой популяции более распространен аллель 4b, в то время как, достоверно большая частота аллеля*4a* выявлена в японской и корейской популяциях [19-22].

Результаты распределения генотипов по полиморфизму *4a/b* гена *eNOS*в группе из 499 человек, представляющих облученную когорту и 274 человек, представляющих контрольную когорту, представлены в таблице 4. Для количественной оценки и выявления возможной ассоциации полиморфизма *4a/b* гена эндотелиальной NO-синтазы с фактором облучения был рассчитан показатель относительного риска методом соотношения шансов (таблица 4).

Таблица 4 – Ассоциация eNOS-генотипов по полиморфизму 4a/b с фактором облучения

Ген	Генотип	Контроль, чел. (%)	Облученные, чел. (%)	OR	CI (95%)	P
eNOS(4a/b)	b/b	230 (83,94)	393 (78,76)	0.71	0.48 – 1.04	0.04
	b/a	43 (15,69)	95 (19,04)	1.26	0.85 – 1.87	
	a/a	1 (0,37)	11 (2,20)	6.15	0.79 – 47.92	

Согласно результатам статистического анализа, высокие показатели относительного риска определены для гомозигот мутантного типа *a/a* гена *eNOS* (OR=6,15; p=0,04).

Как показывают многочисленные исследования, люди, пережившие радиационное облучение, наиболее чаще страдают онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Принимая во внимание тот факт, что биодоступность эндотелиального оксида азота влияет, в первую очередь, на поддержание тонуса сосудов, нейрональную передачу и реализацию иммунного ответа большое внимание уделяется роли NO в развитии сердечно-сосудистых патологий [23]. Многими исследователями была установлена ассоциированность полиморфизма *4a/b* гена *eNOS* с развитием инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, гипертонии, ишемического инсульта и др. Редко встречающееся гомозиготное носительство аллеля*4a* гена *eNOS* (генотип *4a/a*) ассоциировано с почти 2-кратным увеличением массы миокарда левого желудочка (ММЛЖ) у больных с эссенциальной гипертонией в сравнении с носителями генотипов *4a/b* и *4b/b* [24, 25].

Связь облучения с сосудистыми патологиями очень сложна и не всегда понятна. Внутренняя выстилка кровеносных сосудов (эндотелий) сильно страдает при облучении. Восстанавливаясь, эндотелий может избыточно разрастаться, что приводит к склеротизации сосудов. Так или иначе, отдаленные последствия лучевой болезни приводят к тому, что средняя продолжительность жизни перенесших ее людей оказывается примерно на 30% ниже средней для их поколения [26].

В то же время имеются убедительные данные о влиянии оксида азота на активность антиоксидантных систем. Известно, что эффект

радиации может иметь долговременное действие, обусловленное радиолизом воды, образованием химически активных соединений и свободных радикалов. Несмотря на многочисленный интерес к оксиду азота, прямых данных об участии полиморфизма *4a/b* гена *eNOS* в индивидуальной радиочувствительности и радиорезистентности в литературе не представлено.

Работа выполнена в рамках проекта «Поддержание, пополнение уникального генбанка, представляющего радиационно-облученные популяции Казахстана и оценка генетического риска для населения Семипалатинского региона» по бюджетной программе Комитета науки МОН РК «Грантовое финансирование научных исследований» на 2012-2014 гг.

Литература

1 Biaglow J.E., Ayene I.S., Koch C.J., Donahue J., Stamato T.D., Mieyal J.J., Tuttle S.W. Radiation response of cells during altered protein thiol redox // Radiat. Res. – 2003. – Vol.159(4). – P. 484-494.

2 Guo G., Yan-Sanders Y., Lyn-Cook B.D., Wang T., Tamae D., Ogi J., Khaletskiy A., Li Zh., Weydert Ch., Longmate J.A., Huang T., Spitz D.R., Oberley L.W., Li J.J. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses // Mol. Cell. Biol.,– 2003. – Vol.23(7). – P. 2362-2378.

3 Yu H. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage // Chin. J. Cancer Res. – 2012. – Vol.24(2). – P. 83-89.

4 Pathak R., Cheema A.K., Boca S.M., Krager K.J., Hauer-Jensen M., Aykin-Burns N. Modulation of Radiation Response by the Tetrahydrobiopterin Pathway // Antioxidants (Basel). – 2015. – Vol. 4(1). P. 68-81.

5 СуртаеваА.К. РольполиморфизмагенаферментабиотрансформацииксенобиотиковGSTP1 впредрасположенностикбронхиальнойастме// Сборник материалов Второго научного форума молодых ученых «Биотехнология XXI века».Астана, Евразийский национальный университет им.Л.Н.Гумилева.-2011.-С.129.

6 Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предикативной медицины / Под ред. В.С.Баранова. Спб.: Изд-во Н-Л.- 2009.- 528с.

7 Дедков А.А., Богомазов А.Д., Иванов В.П., Полоников А.В., Булгакова И.В., Куприянова Я.С. Исследование связи полиморфизма ile105val гена gstp1 с развитием атопической бронхиальной астмы у детей в курской области // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».-2011.- №1.-С.31-35.

8 Gisone P., Dubner D., Pérez M.D., Michelin S., Puntarulo S. The role of Nitric Oxide in the radiation-induced effects in the developing brain // In Vivo. – 2004. – Vol.18. – P. 281-292.

9 Rabender C.S., Alam A., Mikkelsen R.B. Ionizing radiation induced nitric oxide signaling // Austin J.Nucl. Med.Radiother. – 2014. – Vol.1(1). – P. 5.

10 Gisone P., Boveris A.D., Dubner D., Perez M.R., Robello E., Puntarulo S.Early neuroprotective effect of nitric oxide in developing rat brain irradiated in utero // Neurotoxicology. – 2003. – Vol.24(2). – P. 245-253.

11 Kizub I.V., Soloviov A.I., Moibenko O.O., Stefanov O.V. Effect of inhibition of glycolysis and myoendothelial electrical coupling on contractile responses of pulmonary artery and aorta during hypoxia in rats // Fiziol. Zh. – 2003. – Vol.49(4). – P. 42-47.

12 Chen Y., Stanford A., Simmons R.L., Ford H.R., Hoffman R.A.Nitric oxide protects thymocytes from gamma-irradiation-induced apoptosis in correlation with inhibition of p53 upregulation and mitochondrial damage // Cellular immunology. – 2001. – Vol.214(1). – P. 72-80.

13 Ekmekçi A., Ozcan K.S., Güngör B., Abaci N., Osmonov D., Zencirci A., Toprak E., Dönmez C., Ustek D., Güleç C., Eren M. The relationship between endothelial nitric oxide synthase 4a/4b gene polymorphism and premature coronary artery disease // Acta.Cardiol. – 2013. – Vol.68(5). – P. 464-468.

14 Zhao M., Lewis R., Gustafson D.R., Wen W.Q., Cerhan J.R., Zheng W.No apparent association of GSTP1 A(313)G polymorphism with breast cancer risk among postmenopausal Iowa women // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. – 2001. – Vol.10(12). – P. 1301-1302.

15 Kincl V., Vasku A., Meluzin J.,Panovsky R., Semenka J., Groch L. Association of the eNOS 4a/b and -786T/C polymormphisms with coronary artery disease, obesity and diabetes mellitus // Folia Biol.(Praha). – 2009. – Vol.55(5). – P. 187-191.

16 РокицкийП.Ф. Введениевстатистическуюгенетику: учебноепособиедлястудентовбиологическихспециальностей. Минск: Высшаяшкола.- 1978.- 448с.

17 WangY., Ren B., Zhang L., Guo Z. (2015) Correlation between metabolic enzyme GSTP1 polymorphisms and susceptibility to lung cancer // Exp.Ther. Med.– 2015. – Vol.10(4). – P. 1521-1527.

18 Lakkakula S., Maram R., Gurramkonda V.B., Pathapati R.M., Visweswara S.B., Lakkakula B. Gene Frequencies of the Human GSTT1 (Null Allele) and GSTP1 (Ile105Val) Polymorphisms among South Indian Populations // Advances in Cancer: Research & Treatment. – 2013. – Vol.201. – P. 4869-4878.

19 Jemaa R., Kallel A., Sediri Y., Abdessalem S., Mourali M.S., Feki M., Mechmeche R., Kaabachi N.Association between endothelial nitric oxide gene intron 4a4b VNTR polymorphism and plasma homocysteine concentrations in Tunisian male patients with myocardial infarction // Nutr. Res. – 2012. – Vol.32(5). – P. 342-346.

20 Salimi S., Firoozrai M., Nourmohammadi I., Shabani M., Mohebbi A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran // Indian J. Med. Res. – 2006. – Vol.124(6). – P. 683-688.

21 Uwabo J., Soma M., Nakayama T., Kanmatsuse K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese // Am. J.Hypertens. – 1998. – Vol.11(1Pt1). – P. 125-128.

22 Martinelli N.C., Santos K.G., Biolo A., La Porta V.L., Cohen C.R.,Silvello D., Andrades M.E., Clausell N., Rohde L.E. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis // Nitric Oxide. – 2012. – Vol.26(3). – P. 141-147.

23 Förstermann U., Sessa W.C.Nitric oxide synthases: regulation and function //Eur. Heart J. – 2012. – Vol.33(7). – P. 829-837.

24 Ayub H., Khan M.I., Micheal S., Akhtar F., Ajmal M., Shafique S., Ali S.H., den Hollander A.I., Ahmed A., Qamar R. Association of eNOS and HSP70 gene polymorphisms with glaucoma in Pakistani cohorts //Mol. Vis. – 2010. – Vol.16. – P. 18-25.

25 Yeh C.C., Santella R.M., Hsieh L.L., Sung F.C., Tang R. An intron 4 VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with early-onset colorectal cancer // Int. J. Cancer. – 2009.– Vol.124(7). – P.1565-1571.

26 Cole A.J., McGarry C.K., Butterworth K.T., McMahon S.J., Hounsell A.R., Prise K.M., O'Sullivan J.M. Investigating the influence of respiratory motion on the radiation induced bystander effect in modulated radiotherapy // Phys. Med. Biol. – 2013. – Vol.58(23). – P. 8311-8322.

References

1 Biaglow JE, Ayene IS, Koch CJ, Donahue J, Stamato TD, Mieyal JJ, Tuttle SW (2003) Radiation response of cells during altered protein thiol redox. RadiatRes. 159(4):484-94.

2 Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Zh, WeydertCh, Longmate JA, Huang T, Spitz DR, Oberley LW, Li JJ (2003) Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. Mol Cell Bio. 23(7):2362-78.

3 Yu H (2012) Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage.Chin J Cancer Res.24(2):83-89.

4 Pathak R,Cheema AK, Boca SM, Krager KJ, Hauer-Jensen M, Aykin-Burns N (2015) Modulation of Radiation Response by the Tetrahydrobiopterin Pathway.Antioxidants (Basel). 4(1):68-81.

5 Surtaeva AK (2011)The role of gene polymorphism of biotransformation of xenobiotics enzyme GSTP1 in susceptibility to asthma. The materials of the Second Scientific Forum of Young Scientists "Biotechnology XXI century". Astana, L.N.Gumilev Eurasian National University [Rol' polimorfizmagenafermentabiotransformaciiksenobiotikov GSTP1 v predraspolozhennosti k bronhial'nojastme. SbornikmaterialovVtorogonauchnogoforumamolodyhuchenyh «Biotehnologija XXI veka». Astana, Evrazijskijn acional'nyjuniversitetim.L.N.Gumileva] C.129. (In Russian).

6 Baranov VS (2009)The genetic passport – the basis of individual and predicative medicine. Ed. by Baranov VS[Geneticheskijpasport – osnovaindividual'nojipredikativnojmediciny / Pod red. V.S.Baranova. Spb.:Izd-vo N-L] 528 p.

7 Dedkov AA, Bogomazov AD, Ivanov VP, Polonikov AV, Bulgakova IV, KuprijanovaJaS (2011) Study links gene polymorphism ile105val gstp1 with the development of atopic asthma in children in the Kursk region. Kursk scientific-practical herald "Human and his Health" [Issledovaniesvjazipolimorfizma ile105val gena gstp1 s razvitiematopicheskojbronhial'nojastmy u detej v kurskojoblasti. Kurskijnauchno-prakticheskijvestnik «Cheloveki ego zdorov'e»] №1. P.31-35.

8 Gisone P, Dubner D, Pérez MD, Michelin S, Puntarulo S (2004) The role of Nitric Oxide in the radiation-induced effects in the developing brain. In Vivo. 18:281-92.

9 Rabender CS, Alam A, Mikkelsen RB (2014) Ionizing radiation induced nitric oxide signaling. Austin J Nucl Med Radiother. 1(1): 5.

10 Gisone P, Boveris AD, Dubner D, Perez MR, Robello E, Puntarulo S (2003)Earlyneuroprotective effect of nitric oxide in developing rat brain irradiated in utero.Neurotoxicology, 24(2):245-53.

11 Kizub IV, Soloviov AI, Moibenko OO, Stefanov OV (2003) Effect of inhibition of glycolysis and myoendothelial electrical coupling on contractile responses of pulmonary artery and aorta during hypoxia in rats.Fiziol. Zh. 49(4):42-7.

12 Chen Y, Stanford A, Simmons RL, Ford HR, Hoffman RA (2001) Nitric oxide protects thymocytes from gamma-irradiation-induced apoptosis in correlation with inhibition of p53 upregulation and mitochondrial damage. Cellular immunology, 214(1):72-80.

13 Ekmekçi A, Ozcan KS, Güngör B, Abaci N, Osmonov D, Zencirci A, Toprak E, Dönmez C, Ustek D, Güleç C, Eren M (2013) The relationship between endothelial nitric oxide synthase 4a/4b gene polymorphism and premature coronary artery disease. ActaCardiol. 68(5):464-8.

14 Zhao M, Lewis R, Gustafson DR, Wen WQ, Cerhan JR, Zheng W (2001) No apparent association of GSTP1 A(313)G polymorphism with breast cancer risk among postmenopausal Iowa women.Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.10(12):1301-2.

15 Kincl V, Vasku A, Meluzin J,Panovsky R, Semenka J, Groch L (2009) Association of the eNOS 4a/b and -786T/C polymormphisms with coronary artery disease, obesity and diabetes mellitus. Folia Biol (Praha). 55(5):187-91.

16 Rokickij PF(1978) Introduction to statistical genetics: a textbook for students of biological specialties. Minsk: High school [Vvedenie v statisticheskujugenetiku: uchebnoeposobiedljastudentovbiologicheskihspecial'nostej. Minsk: Vysshajashkola] 448 p.

17 WangY, Ren B, Zhang L, Guo Z (2015) Correlation between metabolic enzyme GSTP1 polymorphisms and susceptibility to lung cancer.ExpTher Med, 10(4):1521-1527.

18 Lakkakula S, Maram R, Gurramkonda VB, Pathapati RM, Visweswara SB, Lakkakula B (2013) Gene Frequencies of the Human GSTT1 (Null Allele) and GSTP1 (Ile105Val) Polymorphisms among South Indian Populations. Advances in Cancer: Research & Treatment, 201.:4869-4878.

19 Jemaa R, Kallel A, Sediri Y, Abdessalem S, Mourali MS, Feki M, Mechmeche R, Kaabachi N (2012) Association between endothelial nitric oxide gene intron 4a4b VNTR polymorphism and plasma homocysteine concentrations in Tunisian male patients with myocardial infarction.Nutr Res. 32(5):342-346.

20 Salimi S, Firoozrai M, Nourmohammadi I, Shabani M, Mohebbi A (2006) Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran.Indian J Med Res. 124(6):683-688.

21 Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K (1998) Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese.Am J Hypertens. 11(1 Pt 1):125-128.

22 Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, Cohen CR, Silvello D, Andrades ME, Clausell N, Rohde LE (2012) Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis.Nitric Oxide. 26(3):141-147.

23 Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function.Eur Heart J. 33(7):829-37, 837a-837d.

24 Ayub H, Khan MI, Micheal S, Akhtar F, Ajmal M, Shafique S, Ali SH, den Hollander AI, Ahmed A, Qamar R (2010) Association of eNOS and HSP70 gene polymorphisms with glaucoma in Pakistani cohorts.Mol Vis. 16:18-25.

25 Yeh CC, Santella RM, Hsieh LL, Sung FC, Tang R (2009) An intron 4 VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with early-onset colorectal cancer.Int J Cancer. 124(7):1565-1571.

26 Cole AJ, McGarry CK, Butterworth KT, McMahon SJ, Hounsell AR, Prise KM, O'Sullivan JM (2013) Investigating the influence of respiratory motion on the radiation induced bystander effect in modulated radiotherapy.Phys Med Biol. 58(23):8311-22.

5-бөлім

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Раздел 5

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 5

BIOTECHNOLOGY

[1]Мустафин К.Г.,
[2]Ахметсадыков Н.Н.,
[3]Бисько Н.А., [2]Сулейменова Ж.Б.,
[2]Нармуратова Ж.Б.,
[2]Садуева Ж.К.

[1]Алматинский университет энергетики и связи, Казахстан, г. Алматы
[2]Научно-производственное предприятие «Антиген», Казахстан, г. Алматы
[3]Институт Ботаники имени М.Г. Холодного, Украина, г. Киев

Подбор оптимальных условий культивирования для повышенного синтеза биомассы базидиального гриба *Trametes versicolor*

Настоящая статья посвящена изучению оптимальных условий культивирования (состав питательной среды, температура, pH, скорость растворения кислорода) для повышенного синтеза грибной биомассы в условиях глубинного культивирования. Объектами исследований служили штаммы гриба T. versicolor 353, 5095, 5131 из коллекции шляпочных грибов Института ботаники НАН Украины. Исследование роста исследуемых штаммов на питательных средах с разными источниками углерода и азота позволило установить, что наиболее подходящим источником азота для всех штаммов был пептон, а углерода - глюкоза. Установлено, что из всех исследуемых штаммов T. versicolor 353 является биотехнологически перспективным объектом для получения биомассы и экзополисахаридов при культивировании на глюкозо-пептон-дрожжевой среде. Оптимальное соотношение концентрации углерода к азоту в питательной среде составляет C/N = 26,6. В этих условиях штамм T. versicolor 353 способен синтезировать на глюкозо–пептон-дрожжевой среде до 11,6 г/л биомассы. Оптимальными параметрами глубинного культивирования штамма T. versicolor 353 для максимального накопления биомассы являются следующие: температура 30,0±1,0°C, pH 5,0±0,5, скорость растворения кислорода (гO2/л•ч) – 0,55.

Ключевые слова: *Trametes versicolor,* биологически активные соединения, биомасса, глубинное культивирование, гриб.

---

[1]Mustafin K.G.,
[2]Ahmetsadykov N.N., [3]Bisko N.A.,
[2]Suleimenova Zh.B.,
[2]Narmuratova Zh.B.,
[2]Saduyeva Zh.K.

[1]Almaty University of Power Engineering & Telecommunications, Kazakhstan, Almaty
[2]Research and production company «Antigen», Kazakhstan, Almaty
[3]M.G. Kholodny Institute of Botany, Ukraine, Kiev

Selection of the optimal culture conditions for high biomass synthesis by *Trametes versicolor*

For most substances, fungal biomass obtained by submerged cultivation has higher nutritional value. In present study optimal culture conditions (composition of culture medium, temperature, pH, oxygen dissolution rate) for increased biomass synthesis in submerged culture have been studied. The objects of research work were strains T. versicolor 353, 5095, 5131 from the collection of mushrooms of the Institute of Botany of Ukraine. Investigation of the tested strains growth on nutrient media with different carbon and nitrogen sources revealed that the most appropriate nitrogen source for all strains was peptone and the carbon-glucose. It was found that among all of strains tested the T. versicolor 353 is perspective strain for biomass and exopolysaccharides production when cultivated on glucose-peptone-yeast medium. The optimal C/N ratio was 26,6. T. versicolor 353 is able to synthesize in glucose-peptone-yeast medium up to 11.6g/l of biomass. The optimal parameters of submerged cultivation of T. versicolor 353 strain for maximal accumulation of fungal biomass are as follows: temperature 30,0±1,0°C, pH 5,0±0,5, the oxygen dissolution rate ($gO_2/l{\cdot}h$) – 0.55.

Key words: *Trametes versicolor*, biologically active compounds, biomass, submerged cultivation, fungi.

---

[1]Мустафин К.Г.,
[2]Ахметсадыков Н.Н.,
[3]Бисько Н.А., [2]Сулейменова Ж.Б.,
[2]Нармуратова Ж.Б.,
[2]Садуева Ж.К.

[1]Алматы энергетика және байланыс университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]ЖШС ҒӨК «Антиген», Қазақстан, Алматы қ.
[3]М.Г. Холодной атындағы Ботаника институты, Украина, Киев

Trametes versicolor базидиальді саңырауқұлағының биомасса синтезін жоғарылату үшін дақылдаудың тұрақты жағдайына іріктеме жасау

Мақала ерекшелігі дақылдандырудың терең жағдайында саңырауқұлақ биомассасының синтезін арттыру үшін дақылдандырудың тұрақты жағдайында зерттеу (қоректік ортаның құрамы, температура, pH, оттегі еруінің жылдамдығы). Украинадағы Н.Г. Холодной атындағы ботаника институтындағы қалпақты саңырауқұлақ жинағынан зерттеу объектісі ретінде T. Versicolor 353, 5095, 5131 саңырауқұлақтың штамдары қолданылды. Зерттеуге алынған штамның қоректік ортада әр түрлі көмірсу және азот көздерінде өсуді зерттеу, барлық штамм түрлеріне, көбінесе жақсы әсер еткен азот – пептон, ал көмірсудан – глюкоза болып табылатындығы анықталды. Глюкоза-пептон ашытқы ортасында дақылдау кезінде экзополисахаридтердің және биомассы алу үшін, барлық зерттеу штамдарының ішінде T. versicolor 353 штамы биотехнологиялық кең объект болатындығы дәлелденді. Қоректік ортада азоттың көмірсуға концентрациясының тұрақты қатынасы C/N = 26,6. Бұл жағдайда T. versicolor 353 штамы глюкоза-пептон ашықты ортасында 11,6 г/л-ге дейін биомасса синтездеуге қабілетті. T. versicolor 353 штамын тұрақты тәсілдермен тереңдік дақылдандыру кезінде биомассаның максимальды дәрежесіне жету үшін келесідей болу қажет: температура 30,0±1,0 °C, pH 5,0±0,5, оттегі еріту жылдамдығы (гO2/л*ч) – 0,55.

Түйін сөздер: *Trametes versicolor,* биологиялық белсенді қосылыстар, биомасса, тереңдік дақылдау, саңырауқұлақ.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 604.4:582.28

[1]Мустафин К.Г., [2]Ахметсадыков Н.Н., [3]Бисько Н.А., [2]Сулейменова Ж.Б., [2]Нармуратова Ж.Б., [2*]Садуева Ж.К.

[1]Алматинский университет энергетики и связи, Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Научно-производственное предприятие «Антиген», Республика Казахстан, г. Алматы
[3]Институт Ботаники имени М.Г. Холодного, Республика Украина, г. Киев
*E-mail: saduyeva@mail.ru

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕННОГО СИНТЕЗА БИОМАССЫ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *TRAMETES VERSICOLOR*

Одним из приоритетных направлений развития современной микологии является разработка технологии получения биологически активных соединений с использованием базидиальных грибов, которые являются продуцентами целого ряда биологически активных веществ – белков, липидов, полисахаридов, органических кислот, ферментов, витаминов и др. Многие из этих соединений являются фармакологически активными и, по сравнению с продуктами химического синтеза, менее токсичными и более эффективными. Большинство работ по поиску и выделению биологически активных веществ базидиомицетов проведены с использованием плодовых тел [1-9]. Известно, что биологически активные соединения, получаемые из высших грибов содержатся не только в базидиомах, но и в вегетативном мицелии гриба, получаемом путем жидкофазного и твердофазного культивирования [10-13]. Важным преимуществом получения биомассы мицелия с помощью биотехнологических методов являются экологическая чистота получаемых препаратов, возможность создания крупномасштабного производства и доступность сырьевых ресурсов.

Одним из наиболее перспективных видов ксилотрофных грибов является *T. versicolor* (трутовик разноцветный) – гриб, имеющий тысячелетнюю историю применения в качестве лекарства от многих болезней. Гриб содержит полноценный комплекс биологически активных веществ, из которых наиболее важными являются иммуномодулирующие и противоопухолевые полисахариды, регулирующие процессы метаболизма. К первым полисахаридным препаратам онкостатического действия, которые начали производить в Японии, относятся крестин (PSK) из мицелия *T. versicolor*, который представляет собой β-D-глюкан-протеиновый комплекс [14, 15]. Кроме того, гриб содержит в себе белки, ферменты, витамины и необходимые организму человека аминокислоты. Считается, что основными действующими компонентами белково-полисахаридных комплексов являются высокомолекулярные глюканы, гликаны и гетерополисахариды, обладающие способностью тормозить рост опухолей. Глюканы с высоким молекулярным весом оказались более эффективными, чем низкомолекулярные.

Грибные полисахариды способствуют предотвращению онкогенеза, обладают выраженной противоопухолевой активностью в отношении различных аллогенных и сингенных опухолей и предотвращают развитие метастаз. Полисахариды не воздействуют на раковые клетки непосредственно, а активизируют различные иммунные реакции в организме. Проявление полисахаридами разнообразного противоопухолевого воздействия является результатом усиления ответной реакции предшественников Т – клеток и макрофагов на цитокины, произведенные лимфоцитами после специфического распознавания опухолевых клеток. Вторичные же метаболиты с низкой молекулярной массой оказывают влияние на такие процессы, как апоптоз, ангиогенез, развитие метастазов, регуляция клеточного цикла и передача сигнальных каскадов в клетке [16].

В настоящее время 70% – 80% всех грибных препаратов получают из плодовых тел и 20% – 30% – из экстракта мицелия грибов и культуральной жидкости [17-19]. Получение препаратов из плодовых тел обычно занимает несколько месяцев и, более того, в таких условиях очень трудно контролировать качество производимого продукта. В этом отношении получение грибной биомассы в условиях глубинного культивирования при оптимальных условиях выращивания может стать экономически целесообразным и доступным способом получения высококачественной экологически чистой продукции. Существующие исследования по искусственному выращиванию высших грибов направлены на увеличение выхода целевых продуктов (биомассы, белка, аминокислот), создание грибного аромата, разработку новых относительно дешевых и простых питательных сред. Одним из вариантов этих направлений может быть также поиск или создание новых промышленных штаммов грибов, оптимизация качественного и количественного состава питательных сред для направленного биосинтеза биологически активных соединений. При этом следует отметить, что выращивание биомассы глубинным способом по скорости процесса более чем на порядок выше, чем традиционное получение плодовых тел, что позволяет значительно сократить время получения биомассы, увеличить ее количество, а за счет оптимизации состава питательной среды и условий культивирования проводить направленный синтез биологически активных соединений.

Данные о динамике накопления в биомассе лекарственных базидиомицетов отдельных биологически активных соединений, особенностях их структуры, биологической активности, методах управления процессами их биосинтеза являются неполными. В связи с этим актуальным является проведение исследований, направленных на получение биомассы гриба *T. versicolor* в условиях глубинного культивирования.

Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы гриба T. versicolor 353, 5095, 5131 из коллек-ции шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г.Холодного НАН Украины. Исход-ные культуры выращивали на сусло – агаре в течение 5-7 суток. Эксперименты ставили на лабораторных качалках (80 и 150 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл жидкой среды. Среды инокулировали гомогенизированной биомассой определенного штамма (10 % по объему) и инкубировали при температуре 28,0 ± 2,0°С [20].

Глубинное культивирование проводили на жидких средах следующего состава:

1) глюкозо – пептон – дрожжевая среда (ГПД), г/л: глюкоза − 25,0; пептон − 3,0; дрожжевой экстракт − 2,0; KH2PO4 − 1,0; K2HPO4 − 1,0; MgSO4 – 7 H2O – 0,25; вода – 1 л.

2) нативная молочная сыворотка производ-ства ОАО «Яготинского маслозавода», массовая часть (%): лактоза − 60; белок − 10; липиды − 2; молочная кислота − 7,85; витамины − 0,15; зола – 7.

3) нативная крахмальная крупка (отход производства ОАО «Кремнянского крахмального завода»). Состав, массовая часть (%): крахмал − 76,3; белок − 15,6; липиды − 1,3; эндополисахариды − 5,2; зола − 1,6.

4) глюкозо-аспарагиновая среда (ГА), (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 0,4; KH2PO4 – 1,0; MgSO4 • 7 H2O – 0,5; вода − 1л

Полученную биомассу отфильтровывали через капроновые фильтры и дважды про-мывали дистиллированной водой. Грибную биомассу рассчитывали весовым методом по абсолютно сухому веществу после высушивания при температуре 105,0 ± 1,0 ºС до постоян-ного веса. В конце культивирования в культуральной жидкости измеряли значения pH.

При исследовании влияния разных источников углерода и азота на синтез биомассы штаммы культивировали на стандартной среде (глюкоза+дрожжевой экстракт, ГДЭ) такого состава, г/л: глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 2,0; (NH4)2HPO4 – 4,0; K2HPO4 – 1,0; KH2PO4 – 1,0; MgSO4 × 7H2O – 0,25; вода дистиллированная – 1 л. Для изучения влияния

разных источников углерода на синтез биомассы в питательные среды вместо глюкозы в качестве источника углерода добавляли сахарозу, мальтозу или крахмал в количестве, эк-вивалентном 20 г глюкозы по углероду. В качестве источника азота вместо (NH4)2HPO4 ис-пользовали KNO3 и пептон, которые вносили в среду в количестве, эквивалентном 4 г (NH4)2HPO4 по азоту.

Для установления влияния соотношения источников углерода и азота в питательной среде на накопление биомассы использовали 2 варианта сред ГПД. В 1-й вариант среды входил оптимальный для вида источник углерода, эквивалентный 20, 25, 30 или 35 г глюкозы по углероду и оптимальный для этого вида источник азота, эквивалентный 4 г (NH4)2HPO4 по азоту. Во 2-й вариант среды входил оптимальный для вида по составу и концентрации источник углерода и оптимальный для вида источник азота в концентрациях эквивалентных 4, 5 или 6 г (NH4)2HPO4. Штаммы культивировали в стационарных условиях при 28 °С в те-чение 14 суток.

Питательную среду инокулировали 4 дисками (d = 0,7 мм) мицелия исследуемого штамма, который был выращен на ГПДА (среда ГПД агаризованная). Штаммы культиви-ровали поверхностным способом на протяжении 14 суток при 28 °С. Биомассу отфильтро-вывали и высушивали при 105 °С до постоянной массы.

Исследования роста культур при разных значениях концентрации ионов водорода (pH) проводили в 100 мл конических колбах с 50 мл синтетической среды. До стерилизации кислотность среды до разных значений pH доводили с помощью 1N HCl или 1N NaOH. После стерилизации pH среды составило 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 и 7,0. Инокулированные тремя дисками мицелия (диаметр дисков 7 мм) колбы со средой с выше упомянутыми pH инкубировали поверхностно при температуре 28,0 ± 2,0 °С в течение 29 суток.

Скорость растворения кислорода в среде определяли сульфитным методом, который яв-ляется наиболее удобным среди известных методов оценки степени аэрирования куль-туральной среды и который характеризует скорость рас-творения кислорода и одновременно с этим позволяет определить его количество, необходимое для достижения максимального экономического коэффициента образования того или иного продукта [21].

Повторность проведения опытов – трех – и пятикратная. Результаты, полученные при сравнительном изучении штаммов, обработаны статистическими методами анализа, вычис-лены значения средних квадратических отклонений, коэффициентов вариации, доверитель-ных интервалов с помощью компьютерных пакетов Microsoft Office Excell и StatSoft Statistika 6.0. В таблицах и рисунках представлены средние статистически достоверные данные.

Результаты и их обсуждение

Подбор состава питательной среды для повышенного синтеза грибной биомассы гриба Trametes versicolor

Большое влияние на накопление биомассы, физиологическую активность и синтез биологически активных соединений оказывают правильно подобранные источники угле-родного и азотного питания. В качестве источников углеродного питания исследовались мо-носахариды (глюкоза), дисахариды (мальтоза) и полисахариды (крахмал). В качестве источ-ников азота исследовались пептон, (NH4)2HPO4 и KNO3.

Полученные результаты свидетельствуют, что все исследованные штаммы T. versicolor растут на питательных средах с углеродными соединениями разной природы (таблица 1). Максимальное количество биомассы на всех средах отмечено у штамма T. versicolor 353. Максимальное количество биомассы наблюдалось на глюкозе, затем следовала сахароза, мальтоза и крахмал.

Таблица 1 – Количество биомассы штаммов T. versicolor (г/л) на ГДЭ (глюкоза+дрожжевой экстракт) среде с различными источниками углерода на 14 сутки культивирования

Штамм	Источники углерода			
	Глюкоза	Крахмал	Мальтоза	Сахароза
353	**4,25±**	**2,50±**	**2,83±**	**4,00±**
5095	2,66±	1,33±	2,25±	2,51±
5131	2,33±	2,33±	3,25±	1,25±

Исследование роста вышеперечисленных видов и штаммов на питательных средах с разными источниками углерода и азота позволило установить, что все культуры способны усваивать широкий спектр углеродных субстратов. Наиболее подходящим источником азота для всех штаммов был пептон.

Нами было установлено, что наилучшим источником азота для накопления биомассы всеми исследованными штаммами *T. versicolor* был пептон (таблица 2). Положительное влияние пептона на рост штаммов заключается в его комплексном составе, в который входят высоко- и низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты. Более того, в состав пептидов также входят ростовые вещества, что делает пептон отличным источником азотного питания для базидиальных грибов. Аммиачный и нитратный азот усваивался культурами в меньшей степени.

Таблица 2 – Количество биомассы штаммов T. versicolor (г/л) на ГДЭ (глюкоза + дрожжевой экстракт) среде с различными источниками азота на 14 сутки культивирования

Штамм	Источник азота		
	$(NH_4)_2HPO_4$	Пептон	KNO_3
353	**2,66±**	**8,50±**	**5,36±**
5095	2,50±	7,45±	5,62±
5131	2,330,17	6,70±	4,17±

Оптимизация среды для повышенного синтеза биомассы грибов *T. versicolor* включает в себя не только подбор оптимальных источников углерода и азота, но и поиск их оптимального соотношения (таблицы 3, 4). Необходимые для максимального синтеза биомассы значения количественного соотношения углерода и азота в среде можно получить двумя путями: в первом случае варьируя концентрацией источника углерода при постоянной концентрации азота, во втором – наоборот. В связи с этим, было исследовано влияние количественного соотношения углерода и азота в питательных средах на синтез биомассы *T.versicolor* в обоих случаях. Для *T. versicolor* 353 увеличение концентрации глюкозы в питательной среде до 25 или 30 г/л с повышением соотношения С к N до 22,2 или 26,6 стимулировало синтез биомассы, количество которой возрастало на 14,0 – 85,0 % (таблица 3).

Таблица 3 – Накопление биомассы культурой T. versicolor 353 на среде ГПД с разными концентрациями углерода

Штамм	Содержание глюкозы в среде, г/л			
	20	25	30	35
	C:N = 17,7	C:N = 22,2	C:N = 26,6	C:N = 31,1
T. versicolor 353	8,50 ± 0,27	9,01 ± 0,21	11,66 ± 0,46	6,61 ± 0,24

Дальнейшее повышение содержания глюкозы в среде до 35 г/л ингибировало синтез биомассы. При соотношении С к N = 31,1 процесс синтеза замедлялся, количество биомассы уменьшалось почти в 2 раза по сравнению с количеством биомассы при 30 г/л глюкозы в среде. Результаты экспериментов по изучению влияния концентрации пептона в питательной среде на накопление биомассы штаммом *T. versicolor* 353 показали, что увеличение его содержимого до 4 или 5 г/л (в исходной среде содержимое пептона составляло 3 г/л) с одновременным уменьшением соотношения С к N до 20 и 16 приводили к снижению количества биомассы (таблица 4).

Таблица 4 – Накопление биомассы культурой T. versicolor 353 на среде ГПД с разными концентрациями азота

Штамм	Содержание пептона в среде, г/л		
	3,0	4,0	5,0
	C:N = 26,6	C:N = 20	C:N = 16
T. versicolor 353	11,60 ± 0,44	8,88 ± 0,25	5,88 ± 0,09

Таким образом было установлено, что для культуры *T. versicolor* 353 оптимальное соотношение концентрации углерода к азоту в питательной среде составляет C/N = 26,6. В этих условиях штамм *T. versicolor* 353 способен синтезировать на среде ГПД до 11,6 г/л биомассы.

Подбор оптимальных условий культивирования (температура, pH, аэрация) для повышенного синтеза биомассы гриба T. versicolor

Температура, концентрация ионов водорода (pH) и аэрация являются важнейшими факторами, регулирующими накопление биомассы базидиомицетов, в частности, грибов *T. versicolor*. Для определения степени влияния этих факторов на уровень накопления биомассы было проведено глубинное культивирование на оптимизированной глюкозо-пептон-дрожжевой среде (ГПД).

Температура. В качестве критерия для определения оптимальной температуры использовали радиальную скорость роста на твердой оптимизированной питательной среде (ГПДА). Кроме подбора оптимальных температурных условий чрезвычайно важно установ-ление граничных температур инкубации. Верхняя и нижняя граничные (критичные) тем-пературы инкубации – это температуры, при которых рост мицелия не наблюдается, но сохраняется его жизнеспособность и при перенесении в более подходящие условия рост культуры возобновляется. Изучение динамики роста мицелия и жизнеспособности штаммов проводили при 4, 8, 24, 28, 30, 32, 34, 37, 42 и 44°C. Штаммы выращивали на оптимизи-рованной среде ГПДА. При изучении влияния высоких температур мицелий инкубировали в течение 3-х суток. Жизнеспособность грибных культур определяли при температуре 28 °C. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Скорость радиального роста мицелия разных штаммов T. versicolor на бреде ГПДА при разных значениях температур, мм/сут

Штамм	Температура инкубации, ±1 °					
	8	24	28	30	32	34
353	**1,9±0,08**	**5,6±0,1**	**11,5±0,2**	**12,7±0,2**	**10,3±0,35**	**7,5±0,35**
5095	2,3±0,10	6,3±0,1	10,5±0,2	11,5±0,2	6,4±0,41	6,4±0,41
5131	1,5±0,02	5,7±0,2	9,7±0,2	10,6±0,2	8,5±0,35	7,1±0,35

В результате исследования влияния низких и высоких температур на рост и жизне-деятельность мицелия исследованных штаммов T. versicolor было установлено, что при тем-пературе 4 °C все штаммы не проявляли признаков роста, однако сохраняли жизнеспособ-ность, о чем свидетельствует возобновление роста при изменении температуры инкубации на 28°C.

При температуре 37 °C рост мицелия отсутствовал у всех исследованных штаммов T. versicolor, однако мицелий этих штаммов не терял жизнеспособность и возобновлял рост при 28°C на протяжении семи дней. При нахождении при температуре 42 – 44 °C в течение 3-х суток мицелий погибал и не возобновлял рост при переносе в термостат при 28 °C.

pH среды. Ранее нами было установлено, что кардинальные (минимальные, максимальные) значения и оптимум кислотности для роста и спороношения грибов зависят от условий культивирования, в частности, от состава питательной среды, температуры, аэрации.

Боль-шинство видов грибов растут при разных значениях кислотности, однако, оптимальными для роста мицелия высших базидиомицетов считается диапазон pH 5,0–6,0. Базидиомицеты рода Trametes способны расти в широком диапазоне pH (от 3,5 до 7,5), но оптимальные значения pH имеют видовые и штаммовые различия. Исследования роста культур при разных значениях концентрации ионов водорода (pH) показали, что для штамма T. versicolor 353 активный рост мицелия наблюдается в диапазоне начальных значений pH среды от 4,5 до 6,5 (рисунок 1).

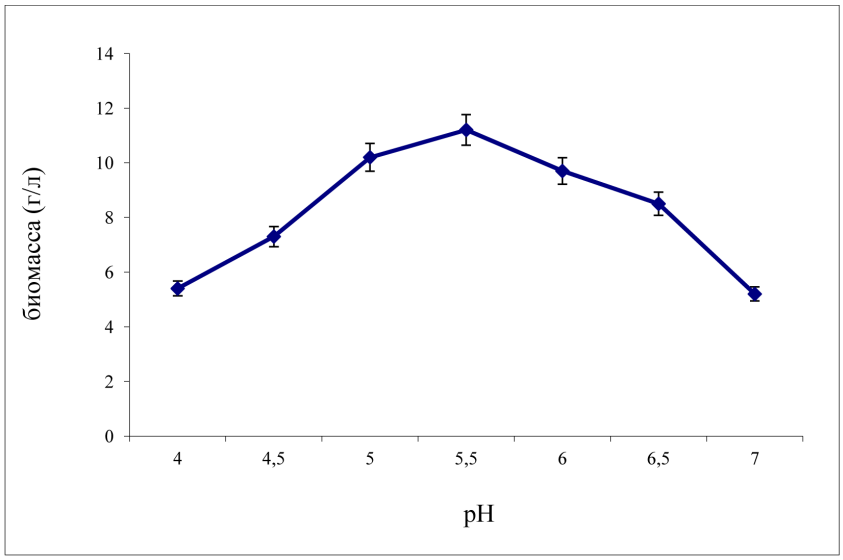


Рисунок 1 – Накопление биомассы штамма T. versicolor 353 при разных значениях pH среды

Как видно из рисунка 1 диапазон pH от 3,5 до 4,0 был не благоприятен для роста глу-бинной культуры T. versicolor 353 на исследуемой среде. Наибольший выход биомассы наблюдался при исходном значении pH = 5,5.

Аэрация. Насыщение среды кислородом влияет на синтез биомассы, морфологию кле-ток, биосинтез метаболитов. Аэрация в зависимости от биологических особенностей вида может уменьшать, увеличивать или не оказывать влияние на синтез биомассы и на продук-цию полисахаридов. У некоторых видов грибов повышение аэрации приводит к увеличе-нию скорости роста и уменьшению продукции экзополисахаридов.

Влияние аэрации на рост штамма T. versicolor 353 изучали, варьируя уровень массооб-мена за счет изменения объема питательной среды в колбах объемом 500 мл.

Установлено, что увеличение аэрации способствовало увеличению грибной биомассы (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние интенсивности аэрации на синтез биомассы штамма T. versicolor 353

Объем среды в колбе, мл	Скорость растворения кислорода, г O_2/л·ч	Биомасса, г/л
50	0,55	13,4
100	0,325	13,0
150	0,21	12,5
200	0,155	12,0
250	0,13	9,5
300	0,115	8,5

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что

-– гически перспективным объектом для получения биомассы и экзополисахаридов при культивировании на глюкозо – пептон – дрожжевой среде;

– оптимальные параметры глубинного культивирования штамма *T. versicolor* 353 для мак-симального накопления биомассы следующие: температура 30,0±1,0°С, pH 5,0±0,5, скорость растворения кислорода, (гO_2/л·ч) – 0,55.

Литература

1 Беккер З.И. Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во МГУ. – 1988. – С. 277.

2 Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38. – № 2. – С. 1 – 4.

3 Гарибова Л.В, Сидорова И.И. Грибы // Энциклопедия природы России. – М.: Изд-во «ABF», – 1999. – С.352.

4 Гарибова Л.В. Обзор и анализ современных систем грибов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. -1999. – С.28.

5 Гарибова Л.В. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2005. – С. 207.

6 Феофилова Е.П. Биотехнология мицелиальных грибов: достижения и перспективы развития // Современная микология России. -Тез. докл. I конгр. микологов России. М.: Национальная академия микологии. – 2002. – С. 294-295.

7 Шиврина А.Н., низовская О.П. Биосинтетическая деятельность высших грибов. М.-Л.: Наука. – 1969. – С. 241.

8 Reshetnicov S.V., Wasser S.P., Tan K.K. International Journal of – Medicinal Mushrooms. – 2001. V. 3. – № 2 – 3. – P. 86.

9 Sliva D. *Ganoderma lucidum* in cancer research. Leukemia Research. – 2006. – V. 30. – P. 767-768.

10 Автономова А.В., Краснопольская Л.М., Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №2. – С. 186 – 192.

11 Автономова А.В., Белицкий И.В., Исакова Е.Б. и др. Водорастворимые полисахариды мицелия *Gano-derma lucidum*: биотехнологии получения и противоопухолевые свойства // Успехи медицинской микологии. 2006. – Т. VII. – С. 217 – 219.

12 Краснопольская Л.М. Грибы класса Basidiomycetes — источники лекарственных веществ // Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии: сборник статей. М.: МГУ ИД «Муравей». – 1998. – С. 230-232.

13 Сидоренко М.Л. Биотехнология трутовика лекарственного // Мат. II Междунар. научно-технич. конф. молод, уч. «Актуальные проблемы технологии живых систем». Владивосток. – 2007. – С. 73-76.

14 Fisher M., Yang LX. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. Anticancer Res. – 2002. -Vol. 22. – P. 1737–1754.

15 Yang QY. Yun Zhi polysaccharopeptide (PSP) and the general aspects of its research // Fung Sci. -1997. – Vol. 12. – P. 1 – 8.

16 Zaidman BZ, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. № 67(4). -P. 453 – 68.

17 Chang S.T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – № 1. – P. 1-7.

18 Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus Ganoderma lucidum: occurrence, biological activities and pharmacological functions // Chem. Rec. – 2003. № 3(3). – P. 172-80.

19 Deng Pan et al. Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from G. lucidum fruiting bodies // Food Chemistry. – 2012. – Vol. 135. – № 3. – P. 1097–1103.

20 Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Пархоменко Л.П., и др. Опыт глубинного выращивания Pleurotus ostrestus (Fr.) Kumm. на комплексных средах // Производство высших съедобных грибов СССР. Киев: Наук. Думка. – 1978. – С. 29-32.

21 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Из-во МГУ. – 1976. – С.276.

References

1 Bekker ZI (1988) Physiology and biochemistry of fungi [Fiziologija i biohimija gribov] MSU, Moscow, Russia. 277. (In Russian)

2 Belova NV (2004) Prospects for the use of biologically active compounds of higher basidiomycetes in Russia. Mycology and Phytopathology [Perspektivy ispol'zovanija biologicheski aktivnyh soedinenij vysshih bazidiomicetov v Rossii. Mikologija i fitopatologija] 38:2:1-4. (In Russian)

3 Garibova LV, Sidirova II (1988) Mushrooms. Encyclopedia of Russian nature [Griby. Enciklopedija prirody Rossii] ABF, Moscow, Russia. (In Russian)

4 Garibova LV (1999) Review and analysis of modern systems of mushrooms [Obzor i analiz sovremennyh sistem gribov]. Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk. 28. (In Russian)

5 Garibova LV (2005) Fundamentals of mycology. Morphology and taxonomy of fungi and organisms mushroom of similar [Osnovy mikologii. Morfologija i sistematika gribov i gribopodobnyh organizmov]. Association of scientific editions KMK, Moscow, Russia. 207. (In Russian)

6 Feofilova EP (2002) Biotechnology of filamentous fungi : achievements and prospects. Modern Russian mycology. Proc. rep. I stamping. Russian [Biotehnologija micelial'nyh gribov: dostizhenija i perspektivy razvitija. Sovremennaja mikologija Rossii. Tez. dokl. I kongr. mikologov Rossii] The National Academy of Mycology, Moscow, Russia. 294-295. (In Russian)

7 Shivrina AN, Nyzovskaya OP (1969) Biosynthetic activity of higher fungi. [Biosinteticheskaja dejatel'nost' vysshih gribov] Nauka, Moscow-Leningrad. 241. (In Russian)

8 Reshetnicov SV, Wasser SP, Tan KK (2001) International Journal of-Medicinal Mushrooms. 3:86. (In English)

9 Sliva D (2006) Ganoderma lucidum in cancer research. Leukemia Research. 30:767-768. (In English)

10 Avtonomova AB, Krasnopol'skaja LM, Maksimov VN (2006) Optimization of the composition of the culture medium for the cultivation submerged Ganoderma lucidum (Curt .: Fr.) P. Karst. Microbiology [Optimizacija sostava pitatel'noj sredy dlja pogruzhennogo kul'tivirovanija Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst. Mikrobiologija] 75(2) 186-192. (In Russian)

11 Avtonomova AB, Belickij IV, Isakova EB et. al. (2006) Water-soluble polysaccharides of mycelium Gano-derma lucidum: Biotechnology preparation and anticancer properties. Advances Medical Mycology [Vodorastvorimye polisaharidy micelija Ganoderma lucidum: biotehnologii poluchenija i protivoopuholevye svojstva. Uspehi medicinskoj mikologii] VII:217-219. (In Russian)

12 Krasnopol'skaja LM (2008) Class Basidiomycetes Mushrooms – sources of drugs . Modern problems of mycology, plant pathology and algology: a collection of articles [Griby klassa Basidiomycetes — istochniki lekarstvennyh veshhestv. Sovremennye problemy mikologii, al'gologii i fitopatologii: sbornik statej] MSU ID «Muravei», Moscow, Russia. 230 – 232. (In Russian)

13 Sidorenko ML (2007) Biotechnology Polypore drug. Mat. II International. scientific and tech. Conf. young, uch. "Actual problems of the technology of living systems" [Biotehnologija trutovika lekarstvennogo. Mat. II Mezhdunar. nauchno-tehnich. konf. molod, uch. «Aktual'nye problemy tehnologii zhivyh sistem»] Vladivostok, Russia. 73-76. (In Russian)

14 Fisher M, Yang LX (2002) Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. Anticancer Res. 22:1737–1754. (In English)

15 Yang QY (1997) Yun Zhi polysaccharopeptide (PSP) and the general aspects of its research. Fung Science. 12:1–8. (In English)

16 Zaidman BZ, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP (2005) Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. Appl Microbiol Biotechnol. 67(4):453-468. (In English)

17 Chang ST (1999) Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. Int. J. Med. Mushr. 1:1-7. (In English)

18 Shiao MS (2012) Natural products of the medicinal fungus Ganoderma lucidum: occurrence, biological activities, and pharmacological functions.Chem. Rec. 3(3):172-180. (In English)

19 Deng Pan et al. (2012) Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from G. lucidum fruiting bodies. Food Chemistry, 135(3):1097–1103. (In English)

20 Buhalo AS, Solomko JEF, Parhomenko LP et. al. (1978) Experience deep cultivation Pleurotus ostrestus (Fr.) Kumm. on complex media. Production of higher edible mushrooms of the USSR. [Opyt glubinnogo vyrashhivanija Pleurotus ostrestus (Fr.) Kumm. na kompleksnyh sredah. Proizvodstvo vysshih sedobnyh gribov SSSR] Nauk. Dumka, Kiev. 29-32. (In Russian)

21 Egorov NS (1976) Workshop on microbiology [Praktikum po microbiology] MSU, Moscow, Russia. 276. (In Russian)

Смирнова И.Э., Саданов А.К, Сабденова А.А.,Султанова А.Ж., Нурмуханбетова А.М.

Институт микробиологии и вирусологии, Казахстан, г. Алматы

Создание ЭМ-ассоциаций, изучение их влияния на пастбищные культуры и биологическую активность деградированных почв

Одним из наиболее перспективных решений проблемы деградации пастбищных земель является использование технологии эффективных микроорганизмов (ЭМ-технологии), основанной на внесении в почву ассоциации эффективных микроорганизмов (ЭМ). Цель исследования – подбор штаммов, создание ЭМ-ассоциаций и изучение их влияния на пастбищные травы и биологическую активность деградированных почв. Из почв высокопродуктивных пастбищ Алматинской области были выделены азотфиксирующие, целлюлолитические и фосфатмобилизирующие бактерии, изучена их биосовместимость и отобрано девять штаммов бактерий, на их основе создано 84 варианта ассоциаций. Для отбора наиболее эффективных ЭМ-ассоциаций изучили их влияние на развитие луговых трав и биологическую активность деградированных почв, в результате отобрано четыре ЭМ-ассоциации. Установлено, что обработка семян этими ассоциациями повышает урожайность зеленой массы трав на 25-30% и положительно влияет на биологическую активность почвы - значительно возрастала активность почвенных ферментов (дегидрогеназа в 6,2-7,0 раз, каталаза и уреаза в 4,5-5 раз), а интенсивность почвенного дыхания увеличилась в 6-7 раз по сравнению контролем. Применение этих ЭМ-ассоциаций позволит восстановить деградированные почвы пастбищ и повысить их продуктивность.

Ключевые слова: деградированные почвы, пастбища, эффективные микроорганизмы (ЭМ), ЭМ-ассоциации, плодородие почв.

Smirnova I.E., Sadanov A.K., Sabdenova A.A, Sultanov A.Z., Nurmuhanbetova A.M.

Institute of Microbiology and Virology, Kazakhstan, Almaty

Creating EM-associations, study their effects on the pasture grasses and biological activity of degraded soils

At the present time, in Kazakhstanthere are trend towards to degradation of pastures. This poses the problem of their restoration. The most promising solutions – using EM technology, based on the introduction in soil of EM-association. The aim this study was selection of strains, creation of EM-associations,study of their effect on meadow grass and biological activity of the soils. From the ecologically pasture's soil of Almaty region the nitrogen-fixing, cellulolytic and phosphatemobilizing bacteria were isolated. Their biocompatibility was studied, nine strains of were selected.From them 84 variants were created. For the selection perspective EM-associations, their effect on meadow grass and soil biological activity was studied. The inoculation of seed with EM-associations increased green biomass of meadow grasses on the 25-30%. The introduction EM-associations in the soil increased activity of thesoil's enzymes(dehydrogenase increased in 6.2-7.0, catalase and urease in 4.5-5.0 times), and soil respiration in 6-7 times as compared with control. On the basis of these EM-associations will be possible to restoration of the degraded pasture soils.

Key words: degraded soils, pastures, effective microorganisms (EM), EM-association, fertilitysoils.

Смирнова И.Э., Саданов А.К., Сабденова А.А., Султанова А.Ж., Нурмуханбетова А.М.

Микробиология және вирусология институты, Қазақстан, Алматы қ.

ТМ-қауымдастығын құру және олардың жайылымдық дақылдарға әсері мен деградацияға ұшыраған топырақтардың биологиялық белсенділігін зерттеу

Деградацияланған жайылым жерлерді қалпына келтіру шешімдердің бірі ТМ-технологиясын (тиімді микроорганизмдер технологиясы) пайдалану болып табылады, бұл топыраққа тиімді микроорганизмдер қауымдастығын (ТМ-қауымдастығы) енгізуге негізделген. Зерттеудің мақсаты – штамдарды таңдау, ТМ-қауымдастығын құру және олардың шалғын шөптерге әсері мен деградацияланған топырақтың биологиялық белсенділігі болып табылады. Алматы облысының экологиялық бұзылмаған жайылымдық топырақтарынан азотфиксациялаушы, целлюлотикалық және фосфатмобилиздеуші бактериялар іріктеліп алынды, биологиялық сәйкестілігі зерттелді және тоғыз штамм бөлініп алынды. Олардың негізінде қауымдастықтың 84 нұсқасы құрылды. Анағұрлым перспективалы ТМ-қауымдастығын іріктеп алу үшін деградацияланған топырақтың биологиялық белсенділігі мен олардың жайылымдық шабынды шөптердің даму әсеріне зерттеу жүргізілді. Зерттеу нәтижелері бойынша ең тиімді 4 ТМ-қауымдастығы іріктеп алынды. ТМ-қауымдастығымен өңделген дәндердің өнімділігі шабындық шөптердің көгін 25-30% арттыратындығы және топырақтың биологиялық белсенділігіне жағымды әсер ететіндігі анықталды. Деградацияланған жайылымдық топырақтар осы ТМ-қауымдастықтардың негізінде қалпына келуі мүмкін.

Түйін сөздер: деградацияланған топырақ, жайылым жер, тиімді микроорганизмдер (ТМ),ТМ-қауымдастығы, топырақ құнарлылығы.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 631.4

*Смирнова И.Э., Саданов А.К, Сабденова А.А., Султанова А.Ж., Нурмуханбетова А.М.

Институт микробиологии и вирусологии,
Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: iesmirnova@mail.ru

СОЗДАНИЕ ЭМ-АССОЦИАЦИЙ, ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ПАСТБИЩНЫЕ КУЛЬТУРЫ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕГРАДИРОВАННЫХ ПОЧВ

Введение

Исторически и традиционно пастбища Казахстана были территорией развития скотоводства. В настоящее время, в Республике наблюдается устойчивая тенденция к деградации пастбищных земель, что связано с нерегулируемым выпасом скота и отсутствием контроля над состоянием пастбищ. Большая часть пастбищ серьезно нарушена, исчезли ценные кормовые травы, почвы сильно истощены, потери гумуса в них составляют 25-30% [1]. Ветровой эрозии подвержены 60% пастбищных земель, более 50% почв в той или иной степени засолены, 26% составляют пастбища, где изменения приобрели необратимый характер, то есть их самовосстановление невозможно или требует крупные вложения и длительный заповедный режим [2,3]. Все эти негативные процессы вызывают обеднение биоразнообразия, снижение продуктивности природных пастбищных экосистем и, как следствие, ухудшение кормовой базы пастбищного животноводства [4-5].

Такое неудовлетворительное состояние пастбищ выдвигает насущную проблему – восстановление и повышение их продуктивности.

Одним из наиболее перспективных решений является использование ЭМ-технологии(технология эффективных микроорганизмов). Одним из направлений ЭМ-технологииявляЕтся биологизация почвенного земледелия [6-8]. Это направление основывается на использовании восстановительного потенциала микроорганизмов, являющихся главным экологическим фактором почвообразования. При биологическом земледелии решающим становится поддержание почвы в биологически активном состоянии, обеспечивающем ее плодородие[9-10].

Биологизация почвенного земледелия состоит во внесении в почву ассоциации эффективных микроорганизмов (ЭМ-микроорганизмы).В состав ЭМ-ассоциаций входят разные группы микроорганизмов, такие как азотфиксирующие, фосфатмобилизующие, целлюлолитические, силикатные и другие. Состав ассоциаций долженсоответствовать нормальному микробиоценозу здоровой плодородной почвы.При внесении ЭМ-ассоциаций в истощенную почву происходит ее обогащение

легкодоступными элементами питания за счет повышения активности почвенных процессов, почва становится более плодородной, а сами микроорганизмы поставляют растениям необходимые продукты своей жизнедеятельности (ферменты, витамины, аминокислоты и пр.) [11-12]. Кроме того, ЭМ-ассоциации обладают защитно-стимулирующим действием на растения, повышают их урожайность и улучшают качество конечной продукции [13].При этом не применяются минеральные удобрения, пестициды и другие химические средства защиты растений и продукция становится экологически чистой, полностью безопасной для человека и сельскохозяйственных животных[14].

В настоящее время, создание и применение ЭМ-ассоциаций имеет большое практическое значения для восстановления почвенного плодородия деградированных и истощенных земель, а исследования в этом направлении весьма актуальны.

Целью исследования явилось проведение подбора штаммов агрономически ценных микроорганизмов,исследование их биологической совместимости, создание ЭМ-ассоциаций и изучение их влияния на растения, присутствующие впастбищном травостое, и биологическую активность деградированных почв.

Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы свободноживущих азотфиксирующих, целлюлолитических и фосфатмобилизирующих бактерий, выделенные из естественных, антропогенно ненарушенных почв пастбищАлматинской областиКазахстана.

Культивирование микроорганизмов проводили на жидких средах (среда Эшби, №79, Гетчинсона, Муромцева, NBRIP и МПБ) на качалке при скорости 180 об/мин и на твердых питательных средах Эшби, №79, Гетчинсона и МПА. Температура культивирования микроорганизмов варьировала в пределах от 25^0 до 30^0С в зависимости от физиологической группы бактерий.

Для изучения характера взаимоотношений между штаммами применяли метод перпендикулярных штрихов [15]. Для этого исследуемую культуру бактерий выращивали на агаризованной среде и затем наносили штрихом по центру новой чашки со средой, тест-культуры высевали перпендикулярно к штриху исследуемой культуры. Через 3-5 дней проводили изучение антагонистических взаимоотношений между исследуемыми штаммами бактерий.

Модельные лабораторные опыты по влиянию созданных ЭМ-ассоциаций на развитие луговых трав проводили в климатической камере (ConstantClimateChamber HPP-750, «Memmert», Germany). Параметры влажности, освещенности и температуры соответствовали усредненным показателям весеннегопериодагода Алматинской области Казахстана. В качестве посевного материала использовали семена основных луговых трав, присутствующих в естественных травостоях высокопродуктивных пастбищКазахстана.В состав травосмеси входили злаковые травы:тимофеевка луговая (Phleumpratense L.), овсяница луговая (Festucapratensis L.), райграс многолетний (Loliumperenne L.) и бобовые: донник желтый (MelilotusofficinalisL.) и люцерна синяя (Medicagosativa L.).

Для инокуляции семян использовали бактериальные суспензии ассоциаций с титром 10^6-10^7 кл/мл.Обработку семян проводили из расчета 15-20 мл на 100 г семян. Время экспозиции составляло 1 час. Обработанные семена высевали в вегетационные сосуды с объемом 250 мл. Количество семян составляло 10 г на сосуд. В опытах использовали почву, собранную на деградированных пастбищах в Илийском районе Алматинской области. Длительность опытов составляла 15 суток. Контролем служили не обработанные семена.

Для изучения влияния ЭМ-ассоциаций на биологическую активность почв использовали почву деградированных пастбищ, собранную в Илийском районе, в к/х «Бабаева Аккумис». Для постановки опытов в вегетационные сосуды (250 мл) с почвой вносили определенное количество клеточной суспензии с титром клеток не менее 10^8-10^9кл/мл. В качестве контроля использовали исходную почву без внесения ассоциаций.

Активность микробных ферментов почвы (каталазы, дегидрогеназы, уреазы), а также дыхательную активность почв, определяли через 7, 14 и 28 суток после внесения ЭМ-ассоциаций.

Для определения дегидрогеназной активности 1 г почвы помещали в пробирку, добавляли 0,1 г$CaCO_3$, 1 мл 0,1 М раствора глюкозы и 1 мл 1% раствора трифенилтетразолия хлористого (ТТХ). Образовавшийся формазан экстрагировали 50 мл этанола и фильтровали. Дегидрогеназную активность выражали в единицах оптической плотности. Оптическую плотность определяли на цифровом фотоэлектроколориметреАР-101 («Apel»,Япония) при длине волны 460 нм [16].

Активность уреазы определяли методом определения аммиака, образуемого при распаде мочевины,и выражали мг NH_2в грамме почвы за сутки [16].

Для определения каталазной активности измельченную почву (1г) вносили в сосуд емкостью 100 мл, добавляли 0,5 г $CaCO_3$. Осторожно помещали на дно маленький стаканчик с 5 мл 3% раствора перекиси водорода. Склянку плотно закрывали пробкой с трубкой, соединенной с бюреткой и сообщающейся с грушей. Бюретку и грушу заполняли водой. Сосуд с перекисью опрокидывали и взбалтывали в течение 1 минуты. Каталазную активность выражали в мл O_2, выделившегося за одну минуту на грамм почвы [16].

Дыхательную активность почвы определяли весовым методом Изермейера и выражали в гпоглощенного CO_2 [17].

Повторность опытов была 5-ти кратная. Статистическую достоверность полученных результатов определяли по коэффициенту Стьюдента для доверительной вероятности p<0,01.

Результаты и их обсуждение

С целью восстановления нормальной микрофлоры деградированных пастбищ необходимо создание эффективных ЭМ-ассоциаций агрономически ценныхмикроорганизмов, в состав которых должны входить представители разных таксономических групп микроорганизмов. Из высокопродуктивных почв пастбищ Алматинской области Казахстана были выделены азотфиксирующие, целлюлолитические и фосфатмобилизующие бактерии. На их основе создана коллекция агрономически ценныхмикроорганизмов.

Из коллекции агрономически ценных микроорганизмовбыли отобраны штаммы для создания ЭМ-ассоциаций. Критерием отбора штаммов служила высокая биологическая активность и наличие производственно-ценных показателей, таких как высокая скорость роста, повышенное накопление биомассы и популяционная устойчивость.

В результате проведенной работы было отобрано 23 штамма – восемь штаммов азотфиксирующих, девять штаммов фосфатмобилизующих и шесть штаммов целлюлолитических бактерий.

Поскольку отобранные штаммы относятся к разным физиологическим группам среди них возможно наличие антагонистических взаимоотношений, поэтому была изучена их биосовместимость. Для определения характера взаимоотношений между штаммами применяли метод перпендикулярных штрихов.

В результате проведенной работы отобрали-девять культур, характеризующихся отсутствием антагонизма по отношению друг к другу. Кроме того, при отборе штаммов особое внимание уделялось их биологической активности. Поэтому эти штаммы, кроме отсутствия антагонизма, характеризовались высокой азотфиксирующей, целлюлазной,фосфатмобилизующей активностью и высокими производственно-ценными показателями.

Из отобранных штаммов бактерий были созданы различные сочетания, в общей сложности 84 варианта ассоциаций.В состав ЭМ-ассоциаций были включены азотфиксаторы, фосфатмобилизаторы и целлюлолитические бактерий. Следует отметить, что при подборе штаммов-партнеров силикатные бактерии не были введены в состав ассоциаций. Это объясняется тем, что при исследовании микробного состава почв деградированных пастбищ установлена высокая численность силикатных бактерий, которая составляла 10^7-10^8КОЕ/г почвы. Поэтому дополнительное внесение этой группы микроорганизмов не представлялось целесообразным.

С целью создания продуктивных ЭМ-ассоциаций в лабораторных условиях были проведены опыты по изучению их влияния на развитие луговых трав,присутствующих в естественных травостоях продуктивных пастбищ Казахстана. Для постановки опытов в вегетационные сосуды вносили определенное количество почвы. В опытах использовали почву деградированных пастбищИлийского района Алматинской области.

В результате проведенной работы из 84 различных композиций были отобраны четыре ассоциации бактерий: ассоциация №1 (21(8)+Ф7А+Azp24); ассоциация №2 (82+Ф12+Azp22);ассоциация№3(21(8)+Ф12+Azp22); ассоциация №4 (82+Ф7А+Azp24).Штаммы 21(8) и 82 являются целлюлолитическим бактериями и относятся к роду *Bacillus*, штаммы Ф12 и Ф7А – фосфатмобилизующие бактерии вида *Bacillus-megatherium*, штаммыAzp22 и Azp24 являются свободноживущими азотфиксаторами рода *Azotobacter*.

Изучение влияния отобранных эМ-ассоциа-цийна рост и развитие растенийпоказалоих высокоеростостимулирующеедействие. В таблице 1 приведены данные по влиянию ЭМ-ассоциаций на биометрические показатели роста и урожайность зеленой массы луговых трав.

Таблица 1 – Влияние ЭМ-ассоциаций на рост, развитие и урожайность пастбищных культур

Варианты опыта	Средняя длина стебля, см	Средняя длина корня, см	Вес сухой массы всегорастения, г	Урожайность зеленой массы, г/сосуд
Контроль (без обработки)	5,6±0,08	2,2±0,1	0,2±0,01	8,1±0,1
Ассоциация №1	10,0±0,1	4,6±0,2	0,4±0,01	17,5±0,3
Ассоциация №2	11,1±0,2	5,4±0,1	0,5±0,02	16,8±0,2
Ассоциация №3	11,0±0,1	6,8±0,2	0,5±0,03	16,6±0,2
Ассоциация №4	11,4±0,2	4,3±0,1	0,5±0,01	15,4±0,1

Из данных таблицы 1 хорошо видно, что обработка семян ЭМ-ассоциациями положительно влияет на рост и развитие растений. При этом средняя длина стебля увеличилась в 1,8-2,0 раза, корня – в 1,9-3,1 раза, урожайность зеленой массы возросла в 2,0-2,2 раза, а сухая масса одного растений – в 2,0-2,5 раза по сравнению с контрольным вариантом без обработки семян.

Для изучения влияния ЭМ-ассоциаций на биологическую активность деградированных почв в лабораторных условиях были проведены модельные опыты. Активность микробных ферментов почвы (каталаза, дегидрогеназа, уреаза), а также интенсивность почвенного дыхания исследовали в динамике, через 7, 14 и 28 суток после внесения ассоциаций.Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Динамика изменения ферментативной активности и почвенного дыхания при внесении ЭМ-ассоциаций в почву

Варианты опыта	Активность почвенных ферментов			Активность дыхания, г $CO_2/м^2/ч$
	Дегидрогеназа, ед.ОП	Каталаза, млO_2/г/мин	Уреаза, мгNH_2/г/сут.	
7 суток				
Контроль (почва)	0,12±0,01	2,2±0,1	0,16±0,02	0,10±0,01
Ассоциация №1	0,38±0,1	2,6±0,1	0,31±0,1	0,19±0,02
Ассоциация №2	0,39±0,1	2,9±0,2	0,37±0,2	0,18±0,02
Ассоциация №3	0,41±0,1	2,8±0,2	0,31±0,2	0,20±0,01
Ассоциация №4	0,42±0,2	2,4±0,1	0,32±0,2	0,21±0,02
14 суток				
Контроль (почва)	0,15±0,01	2,1±0,1	0,15±0,01	0,11±0,01
Ассоциация №1	0,56±0,2	4,6±0,3	0,43±0,1	0,29±0,02
Ассоциация №2	0,59±0,2	3,8±0,2	0,41±0,2	0,28±0,02
Ассоциация №3	0,62±0,3	4,5±0,3	0,47±0,1	0,37±0,03
Ассоциация №4	0,64±0,4	4,8±0,2	0,46±0,2	0,32±0,03
28 суток				
Контроль (почва)	0,14±0,01	2,0±0,1	0,14±0,01	0,09±0,01
Ассоциация №1	0,94±0,3	8,7±0,3	0,63±0,2	0,59±0,02
Ассоциация №2	0,97±0,4	8,7±0,2	0,63±0,1	0,62±0,03
Ассоциация №3	0,87±0,2	9,1±0,2	0,71±0,2	0,63±0,02
Ассоциация №4	0,89±0,2	9,2±0,3	0,72±0,2	0,61±0,02

Из данных таблицы 2хорошо видно, что исходная почва характеризуется крайне низкой активностью почвенных ферментов.Внесение в почву ЭМ-ассоциаций значительно активизирует почвенные процессы. Так, через 7 суток после внесения ассоциаций в почву активность дегидрогеназы возросла в 3,2-3,5 раз, через 14 суток в 3,7-4,3 раза, а через 28 суток в 6,2-7,0 раз. Изучение динамики изменения таких почвенных ферментов как каталаза и уреаза показало, что активность каталазы значительно возросла и через 28 суток превышала таковую в контролев4-4,6 раз,аureазы в 4,5-5раз. Также, из данных таблицы 2 следует, что при внесении ассоциаций значительно активируется почвенное дыхание, которое через 28 суток возросло в 6-7 разпо сравнению с исходной почвой.

Выводы

Таким образом, из почв экологически ненарушенных естественных пастбищ Алматинской области Казахстана были выделены азотфиксирующие, целлюлолитические и фосфатмобилизирующие бактерии. На их основе создана коллекция ЭМ-микроорганизмов.

Для создания ЭМ-ассоциаций была изучена биологическая совместимость различных физиологических групп бактерий и отобрано девять штаммов с отсутствием антагонизма по отношению друг к другу.При подборе штаммов особое внимание уделялось их биологической активности,поэтому отобранные штаммы, характеризовались высокой азотфиксирующей, целлюлазной и фосфатмобилизирующейактивностью.На основе этих штаммов создано 84 варианта ассоциаций. По результатам исследований отобрано четыре наиболее эффективные ЭМ-ассоциации. В состав ассоциаций входили целлюлолитические бактериями рода *Bacillus*(штаммы 21(8) и 82), фосфатмобилизующие бактерии, относящиеся к виду*Bacillusmegatherium* и азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*(штаммы Azp22 и Azp24).

Для отбора наиболее перспективных ЭМ-ассоциаций было изучено их влияние на развитие луговых трав, составляющих основу травостоя пастбищ.Установлено, что обработка семян этими ЭМ-ассоциациями повышает урожайность зеленой массы луговых травна 25-30%.

При создании ЭМ-ассоциаций очень важно подобрать ассоциации, оказывающие положительное влияние не только на растения, но и характеризующиеся способностью активировать биологические процессы почвы и повышать ее плодородие. Показано, что внесение созданных ЭМ-ассоциаций в почву положительно влияет на ее биологическую активность и приводит к активизации микробных процессов. При этом активность дегидрогеназы возрастала в 6,2-7,0 раз, каталазы и уреаза в 4,5-5 раз, а почвенное дыханиевозросло в 6-7 разпо сравнению с контролем. Эти показатели свидетельствуют об активизации почвенных процессов иинтенсификации процессов разложения органических соединений в почве микроорганизмами.На основесозданных ЭМ-ассоциаций возможно восстановление плодородия почв деградированных пастбищ и повышение их продуктивности. В настоящее время, ЭМ-ассоциации проходят полевые испытания в к/х «Бабаева Аккумис» в Илийском районе Алматинской области.

Работа выполнена в рамках грантового проекта МОН РК «Разработка и внедрение комплексных агробиологических мероприятий по восстановлению и повышению продуктивности деградированных пастбищных земель Юго-востока Казахстана», ГР№0115РК01099, 2015-2017 гг.

Литература

1 Абсеитов А.К.Центральная Азия: концепции, методология и новые подходы // Матер. междунар. науч. конф. «Развитие сельскохозяйственных наук в Центральной Азии». – Алматы: Дайк-Пресс. – 2012. – С. 21-25.

2 Лебедь Л. В., Беленкова З.С. Методические указания по оценке и прогнозу урожайности природных кормовых угодий Казахстана. Алматы.: Бастау. – 2005. – 30 с.

3 Кузьмин Т.В., Трешкин С. Е., Мамутов Н.К. Результаты опытного формирования естественной растительности на засоленных землях обсыхающего дна Аральского моря // Аридные экосистемы. – 2006. Т. 12., № 29. – С 27-40.

4 Шамсутдинов З.Ш. Творческое наследие Н.Т. Нечаевой и разработка научных основ пастбищного хозяйства // Аридные экосистемы. – 2000. – Т.6.-№11-12. – С.10-25.

5 ЩетниковА.И., Зайченко О.А. Динамика и устойчивость степных геосистем // Аридные экосистемы. – 2000. – Т.6. – №3. – С. 65-74.

6 Condor A.F., Gonzalez P.P., Lokare C. Effective Microorganisms: Myth or reality? // Rev. Peru.Biol.-2007.-Vol.14. – № I2. P. 315-319.

7 Jamal T., Hasruman H., Anwer A. R., Saad M.S., Shariffuddin H.A. Effect of EM and fertilization on soil physical properties under sweet potato cultivation // Paper presented at the 14-th EM-Technology Conf. – Saraburi, Thailand, 2013. – P. 295-302.

8 Khan A.A, Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S., Rasheed M. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production // J. Agric. Biol. Sci. 2009. – Vol.1(1). P. 48-58.

9 Vahed H.S., Shahinrokhsar P., Heydarnezhad F. Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of rice (*Oryza Sativa L.*) in the presence of phosphorus fertilizer // Int. J. Agri. Crop Sci. – 2012. – Vol. 4(17). P. 1228-1232.

10 Щербаков А. В. Эндофитные сообщества сфагновых мхов как источник бактерий – эффективных ассоциантов сельскохозяйственных культур. -Дисс. … канд.биол. наук. – СПб., 2013. – 179 с.

11 Baset Mia M.A., Shamsuddin Z.H., Wahab Z., Marziah M. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured maize plantlets under nitrogen-free hydroponics condition // Aust. J. Crop. Sci. – 2010. – V.4. – No.2. – P.85-90.

12 Jusoh M.L.C., Manaf L.A., Latiff P.A. Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality // Iran. J. Env. Health.- 2013.- Vol. 10. – P.17-28. doi:10.1186/1735-2746-10-17

13 Mayer J., Scheid S., Widmer F., Fließbach A., Oberholzer H.R. How effective are "Effective microorganisms (EM)" Results from a field study in temperate climate // Appl. SoilEco. – 2010. -Vol. 46(2). – P. 230-239.

14 Gorski R, Kleiber T. Effect of effective microorganisms (EM) on nutrient content in substrate and development and yielding of roses (*Rosa×hybrida*) and gerbera (*Gerbera jamesonii*) // Ecol. Chem. Eng. – 2010. – Vol. 17. – P.506-512.

15 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: МГУ.- 1976. – 307 с.

16 Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ. – 1991. – 304 с.

17 ЕмцевВ.Т., МишустинЕ.Н. – М.: Дрофа. – 2005. – 445 с.

References

1 AbseitovAK(2012) Central Asia: the concept, methodology and new approaches. Proceedings Intern. scientific. Conf. of the development of agricultural sciences in Central Asia [Central'najaAzija: koncepcii, metodologijainovyepodhody.Mater. mezhdunar. nauch. konf. Gjrazvitiesel'skohozjajstvennyhnaukvCentral'nojAzii]. Dajk-Press,Almaty. P. 21-25.(In Russian)

2 Lebed LV, Belenkova ZS (2005) Methodical guidelines for assessment and forecast productivity of natural forage lands of Kazakhstan [MetodicheskieukazanijapoocenkeiprognozuurozhajnostiprirodnyhkormovyhugodijKazahstana]. Bastau, Almaty. 30 p.(In Russian)

3 Kuzmin TV, Treshkin SE, Mamutov NK (2006) The results of experimental formation of natural vegetation on saline lands of the Aral Sea dries.Arid Ecosystems [Rezul'tatyopytnogoformirovanijaestestvennojrastitel'nostinazasolennyhzemljahobsyhajushh egodnaAral'skogomorja.Aridnyejekosistemy] 12(29):27-40.(In Russian)

4 ShamsutdinovZSh(2010) The creative legacy of the Nechaeva NT and development of scientific bases pasture management. Arid Ecosystems. [Tvorcheskoenasledie N.T. Nechaevojirazrabotkanauchnyhosnovpastbishhnogohozjajstva.Aridnyejekosistemy] 6(11-12):10-25.

5 Shchetnikov AI,Zaichenko OA (2010) Dynamics and stability of the steppe geosystems. Arid Ecosystems. [Dinamikaiustojchivost' stepnyhgeosistem.Aridnyejekosistemy] 6(3):65-74.(In Russian)

6 Condor AF, Gonzalez PP, Lokare C(2007) Effective Microorganisms: Myth or reality? Rev Peru Biol 14(2):315-319.

7 Jamal T, Hasruman H, Anwer AR, Saad MS, Shariffuddin HA (2013) Effect of EM and fertilization on soil physical properties under sweet potato cultivation. Paper presented at the 14-th EM-Technology Conf. Saraburi, Thailand. – P. 295-302.

8 Khan AA Jilani G, Akhtar MS, Naqvi S Rasheed M (2009) Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. J AgricBiolSci, 1(1):48-58.

9 Vahed HS, Shahinrokhsar P, Heydarnezhad F (2012) Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of rice *(Oryza Sativa L.*) in the presence of phosphorus fertilizer.Int J Agri Crop Sci, 4(17):1228-1232.

10 Scherbakov AV (2013) Endophytic community sphagnum moss as a source of bacteria – effective Assiociants crops. PhD Thesis. [Jendofitnyesoobshhestvasfagnovyhmhovkakistochnikbakterij – jeffektivnyhassociantovsel'skohozjajstvennyhkul'tur.Diss. … kand. biol. nauk]. State University of Sankt-Peterburg,Russian Federation(In Russian)

11 Baset Mia MA, Shamsuddin ZH, Wahab Z, Marziah M (2010) Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured maize plantlets under nitrogen-free hydroponics condition.Aust J Crop Sci, 4(2):85-90.

12 Jusoh MLC, Manaf LA, Latiff PA (2013) Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality. Iran J Env Health, 10:17-28. doi:10.1186/1735-2746-10-17.

13 Mayer J, Scheid S, Widmer F, Fließbach A, Oberholzer HR (2010) How effective are "Effective microorganisms (EM)" Results from a field study in temperate climate.Appl Soil Eco,46(2):230-239.

14 Gorski R, Kleiber T (2010) Effect of effective microorganisms (EM) on nutrient content in substrate and development and yielding of roses (*Rosa×hybrida*) and gerbera (*Gerbera jamesonii*)./ EcolChemEng, 17:506-512.

15 Egorov NS (1976) Practical manual on microbiology.[Praktikumpomikrobiologii]MoscowStateUniversityPress, Moscow. (In Russian)

16 Zvyagintsev DG (1991) Methods of Soil Microbiology and Biochemistry. [Metodypochvennojmikrobiologiiibiohimii]MoscowStateUniversityPress, Moscow. (In Russian)

17 Emtsev VT, EN Mishustin (2005) Microbiology. [Mikrobiologija] Drofa, Moscow(In Russian)

Треножникова Л.П.,
Ултанбекова Г.Д.,
Балгимбаева А.С.,
Галимбаева Р.Ш.,
Масирбаева А.

Институт микробиологии
и вирусологии КН МОН РК,
Казахстан, г. Алматы

Оптимизация условий культивирования штаммов рода *Streptomyces*, составляющих биопрепарат для растениеводства

Изучен рост биомассы штаммов Streptomyces candidus ИМВ 37 и Streptomyces canofumeus ИМВ 541, составляющих препарат для растениеводства, и биосинтез ими биологически активных веществ на 10 органических и синтетических средах. Показано значительное влияние состава питательных сред на рост штаммов стрептомицетов и уровень образования биологически активных веществ. Оптимальный рост биомассы штаммов стрептомицетов обеспечивали органические среды с соевой мукой. Среда № 8 с овсяной мукой является наиболее оптимальной для синтеза как антифунгального антибиотика, так и веществ, стимулирующих рост растений. Среда № 8 обеспечивает высокий уровень накопления биомассы (45,8 г/л) штамма Streptomyces-canofumeus ИМВ 541, а также высокую антифунгальную активность культуральной жидкости (диаметр зоны подавления роста тест-организмов 31-32 мм) и экстрактов из биомассы (36 мм). Культуральная жидкость штамма Streptomycescandidus ИМВ 37, полученная на среде № 8, увеличивает энергию прорастания семян пшеницы на 26,6%, лабораторную всхожесть – на 20,0 %, длину проростков – в 2,2 раза, длину корня – в 2,0 раза, сырую массу растений – в 1,9 раза.

Ключевые слова: стрептомицет, антифунгальная активность, ростстимулирующее действие, зерновые культуры.

Trenozhnikova L.P.,
Ultanbekova G.D.,
Balgimbaeva A.S.,
Galimbaeva R.Sh.,
Masirbaeva A.

Institute of Microbiology and Virology
SC MES RK, Kazakhstan, Almaty

Optimization of culture conditions for strains of the genus *Streptomyces* formulatingbiopreparation for plant cultivation

Biomass growth and biosynthesis of biologically active substances in the strains Streptomyces candidus IMV 37 and Streptomyces canofumeus IMV 541 formulating a preparation for plant cultivation have been studied in 10 organic and synthetic culture media. Considerable effect of medium composition on the growth of Streptomyces strains and formation rate of biologically active substances was shown. The optimal biomass growth of studied Streptomyces strains provide organic medium with soy flour. Medium No. 8 with oat flour is the most optimal for the synthesis of both antifungal antibiotic, and plant growth-stimulating substances. Medium No. 8 supports high-level biomass accumulation (45.8 g/L) of the strain Streptomyces canofumeus IMV 541, and strong antifungal activity of the culture fluid (zone diameter of growth inhibition of the test organisms is within 31-32 mm) and biomass extracts (36 mm). Culture fluid of the strain Streptomyces candidus IMV 37 obtained in the medium No. 8 increases the germination energy of wheat seeds by 26.6%, laboratory germination capacity by 20.0%, length of sprouts 2.2 times, root length 2.0 times, and plant wet weight 1.9 times.

Key words: streptomycete, antifungal activity, growth-stimulating activity, cereal crops.

Треножникова Л.П.,
Ұлтанбекова Г.Д.,
Балғымбаева А.С.,
Галимбаева Р.Ш.,
Масирбаева А.

Микробиология және вирусология
институты ҚР БҒМ ҒК,
Қазақстан, Алматы қ.

Ауылшаруашылығы үшін биологиялық өнімді құрайтын, Streptomyces тектес штамдарын өсіру жағдайларын оңтайландыру

Өсімдік шаруашылығына арналған препараттың құрамына кіретін Streptomyces candidus ИМВ 37 және Streptomyces canofumeus ИМВ 541 штамдары 10 органикалық және синтетикалық қоректік орталарда биомассалары өсіріліп, биологиялық белсенді заттарының биосинтезі зерттелді. Стрептомицеттер штамдарының өсуіне қоректік орталардың құрамының айтарлықтай әсері бар екендігі және биологиялық белсенді заттардың құралу деңгейі анықталды. Зерттеліп отырған стрептомицет штамдарының биомассасы, соя ұны қосылған органикалық қоректік ортада жақсы өседі. Ең қолайлы орта сұлы ұны қосылған №8 қоректі орта екендігі анықталады. Streptomyces canofumeus ИМВ 541 штамының биомассасы №8 қоректі ортада жақсы өсетіндігі анықталып, 45,8 г/л деңгейді көрсетті, дақылдық сұйықтық жоғары антифунгалды белсенділікті көрсетті (тест-ағзалардың тежелу аймағы 31-32 мм), биомасса сығымының тежелдендіру аймағы (36 мм) құрды. Streptomyces candidus ИМВ 37 штамын №8 қоректі ортада өсіргендегі дақылдық сұйықтығы бидай тұқымының өсу қуатын 26,6%, зертханада зерттегендегі өнімін 20,0 %, көшеттің бойының ұзындығын 2,2 есеге, тамырының ұзындығын 2,0 есеге, өсімдіктің шикі салмағын 1,9 есеге артатындығы анықталды.

Түйін сөздер: стрептомицет, антифунгалды белсенділік, өсуді тездететін әсер, астық дақылдары.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 621.13.35

Треножникова Л.П., *Ултанбекова Г.Д., Балгимбаева А.С., Галимбаева Р.Ш., Масирбаева А.

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК,
Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: ultanbekova77@mail.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ РОДА *STREPTOMYCES*, СОСТАВЛЯЮЩИХ БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

Введение

Около 80% всех биологически активных микробных метаболитов были изолированы из актиномицетов, особенно из штаммов рода *Streptomyces*[1-3]. Виды *Streptomyces* имеют большой потенциал для биологической борьбы с грибковыми заболеваниями растений, вызванными разными фитопатогенными грибами: *Phytophthoracapasici*, *Phytophthoracinnamomi*, *Fusariumoxysporum, Botrytiscinerea, Sclerotiumrolfsii*, *Colletotrichumgloeosporioides* и др.

Дегтяревой Е.А.и др. [4] доказана принципиальная возможность биоконтроля фитопатогенных грибов в почве и ризосфере с помощью почвенных стрептомицетов. Из 279 выделенных из дерново-подзолистых почв популяций стрептомицетов были отобраны объекты с выраженной антигрибной активностью по отношению к различным фитопатогенным грибам.

ИзолятыIABT-A1, IABTA2, IABT-A3, IABT-A6, IABT-A7, IABT-A8 и IABT-A9, принадлежащие к *Streptomyces*spp. или *Actinopolymorpha*spp., показали 98-100% ингибирование *Rhizoctoniasolani*, возбудителя ризоктониоза риса [5]. ИзолятIABT-A7 (*Actinopoymorpha*spp.) наиболее эффективен при использовании для обработки семян, почвы и опрыскивания листьев риса, обеспечивает уменьшение заболеваемости и стимулирует рост растений, при этом увеличивается высота растений, длина корней и их биомасса.

Новый штамм актиномицета PP14 показал высокую противогрибковую активность против фитопатогенных грибов *Fusariumoxysporum, F. solani*и *F. culmorum,* включая микотоксигенные грибы *Aspergilluscarbonarius* и *Penicilliumexpansum* [6].

Штамм *Streptomyceshigroscopicus* A4, изолированный из ризосферы овса на кислой дерново-подзолистой почве, в лабораторных экспериментах снижал заболеваемость и гибель растений овса, озимой ржи, яровой пшеницы и клевера лугового от корневых гнилей до 60-70% к контролю (без бактеризации семян) [7].

Многими исследованиями установлено, что бактерии рода *Streptomyces* могут стимулировать рост растений, синтезируя промоторы, такие как, ауксины или гиббереллины [8,9]. Показано, что определенные виды *Streptomyces*, такие как *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. rochei* и *Streptomyces*spp., выделен-

ные из ризосферы растений, продуцируют индолил-3-уксусную кислоту и улучшают рост растений путем увеличения всхожести семян, массы растений и удлинения корня [10]. В настоящее время некоторые стрептомицеты, выделенные из ризосферы, изучаются и разрабатываются в качестве основных компонентов биопрепаратов, ускоряющих рост растений. Эти бактерии проявляют повышенную конкурентоспособность в присутствии аборигенной микрофлоры, что позволяет им сохранять свою жизнеспособность в новых условиях существования. Подобные свойства актиномицетов являются ценными при разработке биопрепаратов для растениеводства, особенно, для применения в неблагоприятных условиях для роста и развития растений.

В настоящее время исследуется достаточно большое количество штаммов стрептомицетов, защищенных патентами и предлагаемых для производства биопрепаратов с целью защиты растений, однако технология их массового производства отсутствует. До настоящего времени еще недостаточно изучены условия получения биомассы и метаболитов многих продуцентов. Не подобраны оптимальные питательные среды для культивирования многих штаммов с целью производства биопрепаратов. Кроме того, не проведена апробация отдельных биопрепаратов в полевых условиях. Все это сдерживает возможность внедрения препаратов на основе стрептомицетов в качестве инструмента биоконтроля.

Способность культур рода *Streptomyces* расти и формировать биоактивные продукты не является фиксированной, но может быть значительно увеличена или полностью потеряна при разных условиях питания и выращивания [11]. Улучшение роста стрептомицетови образования антибиотиков может осуществляться путем манипулирования процессами питания и физическими параметрами условий культивирования. Изменения в характере и типе источников углерода и азота, как сообщается, значительно влияет на биосинтез антибиотиков, так же, как pH, инкубационный период и температура культивирования играют важную роль в производстве биологически активных метаболитов [12,13]. Большое значение для максимально возможного роста стрептомицетов и биосинтеза антибиотиков имеет подбор рационального состава питательных сред, которые определяются в соответствии со штаммом продуцента. У каждого штамма потребность в источниках питания неодинакова, поэтому состав питательных сред не может быть постоянным для всех продуцентов. Ферментационные среды состоят из источников углерода и азота, неорганических солей и буферных агентов, таких как $CaCO_3$, и специальных факторов роста. Существует значительная избирательность в использовании этих веществ для разных видов актиномицетов.

Наиболее важными факторами в составе питательных сред являются источники углерода и азота, которые оказывают большое влияние на образование микроорганизмами антибиотических веществ [14]. Основными источниками углерода и азота в производстве антибиотиков являются соевая мука, меласса, кукурузный экстракт и мука, картофельный крахмал, сульфит отработанного щелока, хлопковый шрот, дрожжевой экстракт, пептон и другие; карбонат кальция, фосфат аммония, фосфат калия и другие соли могут быть включены для повышения производства антибиотиков.

Показано, что источники углерода и азота, такие как глицерин, крахмал, аргинин, аспарагин, казеин и нитраты являются оптимальными для роста штаммов *Streptomycesspp.* [15]. Установлено, что овсяная мука, крахмал и казеин увеличивают биосинтез антибиотика штаммом *Streptomyces*J12, по сравнению с дрожжевым и кукурузным экстрактом [16]. Изучено влияние состава среды на продукцию полиеновых антибиотиков штаммом *S. hygroscopicus*CH-7 с использованием различных источников углерода (глюкозы, лактозы, рибозы, фруктозы и трегалозы) и источников азота [12]. Максимальное образование антибиотиков наблюдалось на среде с лактозой (10 г/л) и соевой мукой (10 г/л), также как с глюкозой (10 г/л) и соевой мукой (5 г/л).

Установлено, что глюкоза, как источник углерода, и соевая мука, как источник азота, оптимальны для образования антибиотика штаммом *S. chattanoogensis*MTCC 3423 [17]. Большое значение компонентов ферментационной среды установлено для биосинтеза антибиотиков штаммом *S. parvulus* DAUFPE 3124. Оптимальными источниками углерода и азота были фруктоза и L(-) треонин, глюкоза и галактоза полностью ингибировали биосинтез антибиотиков [18].

Таким образом, для осуществления эффективного процесса роста стрептомицетов и биосинтеза биологически активных веществ, важным этапом является оптимизация его технологических параметров – состава ферментационных сред, на основе подбора оптимальных сред, а также источников углерода, азота, неоргани-

ческих солей и физико-химических факторов культивирования.

Целью данного исследования являлся подбор оптимальных сред для накопления биомассы и образования биологически активных веществ штаммами стрептомицетов, отобранных для формирования биопрепарата с антифунгальными и стимулирующими рост растений свойствами.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись штаммы *Streptomyces candidus* ИМВ 37 и *Streptomyces-canofumeus* ИМВ 541, отобранные для состава биопрепарата с антифунгальными и стимулирующими рост растений свойствами. Штаммы депонированы в коллекции микроорганизмов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК.

Штамм *Streptomyces candidus* ИМВ 37 обладает фитостимулирующим действием на зерновые культуры (пшеница, рис), обеспечивает стимулирование роста растений в разных экологических условиях. Штамм *Streptomyces-canofumeus* ИМВ 541 подавляет рост фитопатогенных грибов родов *Fusarium,Alternaria,Pyricularia, Bipolaris, Aspergillus* в нейтральных и альтернативных (соленых и щелочных) условиях роста, зоны подавления роста (20-50 мм).

Для получения спорового материала штаммы стрептомицетоввыращивали в течение 10 суток при температуре 28^0С на минеральном агаре1 Гаузе или сахарозо-дрожжевом агаре Чапека. Готовили инокулюм спор актиномицетов в концентрации 10^9КОЕ/мл и проводили засев жидких питательных сред (1 мл инокулюма на 100 мл питательной среды).

Штаммы *Streptomycescandidus* ИМВ 37 и *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541 выращивали на 10 питательных жидких средах следующего состава (%):

Среда № 1: глюкоза-5,0; крахмал нерастворимый-10,0; KNO_3-2,0; $MgSO_4x7H_2O$-0,25; K_2HPO_4-0,2; $(NH_4)_2SO_4$ -1,0; NaCl -5,0; $CaCO_3$ -1,0; pH 7,0.

Среда № 2: глюкоза-30,0; NaCl-3,0; NH_4Cl-0,8; K_2HPO_4-0,5; $CaCO_3$-5,0; pH 7,0.

Среда № 3: глюкоза-15,0; соевая мука-15,0; NaCl-5,0; $CaCO_3$-2,0; pH 7,2-7,4.

Среда № 4: гороховая мука-15,0; глюкоза-20,0; крахмал-5,0; $NaNO_3$-5,0; $CaCO_3$-5,0; NaCl-5,0; pH 7,0-7,3.

Среда № 5: дрожжевой экстракт-5,0; пептон-10,0; глюкоза-20,0; $CaCO_3$-3,0; pH 7,3.

Среда № 6: соевая мука-10,0; глюкоза-10,0; крахмал-10,0; NaCl-5,0; $CaCO_3$-3,0; $ZnSO_4x7H_2O$-0,003, $CuSO_4x5H_2O$-0,003; $MnC_{l2}x7H_2O$-0,003; pH 7,4.

Среда № 7: крахмал растворимый-15,0; глюкоза-10,0; соевая мука-20,0; дрожжевой экстракт-5,0; NaCl-3,0; CaCO3-3,0; pH 7,6.

Среда № 8: глюкоза-15,0; овсяная мука-15,0; $CaCO_3$-2,5; NaCl-5,0; pH 7,0-7,2.

Среда № 9: глюкоза-10,0; пептон-5,0; K_2HPO_4-1,0; $MgSO_4x7H_2O$-0,5; pH 7,2-7,4.

Среда № 10: глюкоза-10,0; кукурузный экстракт-10,0; KNO_3 -1,0; NaCl-5,0; $CaCO_3$ -5,0; pH 7,0 -7,2.

Биосинтез биологически активных веществ осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28° С в течение 120 часов.

Для оценки эффективности влияния состава питательных сред учитывали величину биомассы (г/л), антибиотическую активность культуральной жидкости и этанольных экстрактов из биомассы в отношении диких изолятовфитопатогенных грибов(*Fusariumoxysporum*, *Aspergillusniger*) и ростстимулирующее действие культуральной жидкости. Биомассу, отжатую до 70% влажности, взвешивали, экстрагировали этанолом в соотношении 1:3 и этанольные экстракты отделяли фильтрованием.

Антифунгальную активность определяли методом диффузии в агарна питательном агаре Чапека-Докса [14]. Для оценки антибиотической активности в агаре, засеянном тест-культурами глубинным ростом (КОЕ 10^6/мл), делали лунки с помощью стандартного бура (диаметром 7 мм), а затем в лунки вносили фильтрат нативного раствора или экстракт биомассы по 0,1 мл. В качестве контроля использовали стерильные чистые среды и этанол. Чашки помещали в термостат при 25°С.Диаметр зон подавления роста мицелиальных грибов измеряли после инкубирования при температуре 25^oС в течение 72 часов.

Фиторегуляторную активность определяли методом замочки семяняровой твердой пшеницы сорта Милана(селекция КИЗ, урожай 2014 года), без предварительной стерилизации. Отфильтрованную культуральную жидкость разливали в стаканчики на 100 мл, отбирали по 20семян растений, замачивали их в каждом сосуде, используя разведение исходного фильтрата 1:10. Сосуды закрывали крышками и ставили в термостат при температуре 25°С на 24 часа. Для контроля семена замачивали на тот же срок в

стерильной дистиллированной воде. Проращивание семян проводили в соответствии с ГОСТ 12038-84 [19]. Семена раскладывали на фильтровальной бумаге (2 слоя) в чашках Петри, сверху накрывая слоем фильтровальной бумаги. Учитывали энергию прорастания семян и ростовые эффекты: количество проросших семян, длину и массу проростков и корней. Энергию прорастания определяли на 3 сутки по числу проросших семян (выражали в процентах от общего числа обработанных семян), всхожесть – на 7 сутки, биометрические показатели и биомассу проростков – на 7 сутки.

Все исследования выполняли в трех повторностях.Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [20].

Результаты и их обсуждение

Важным этапом разработки биопрепаратов является подбор состава питательной среды для культивирования микроорганизмов, позволяющей получить максимальное количество биомассы и достичь высокого уровня биологической активности при оптимальных параметрах культивирования. В свою очередь процесс ферментации по биотехнологическим параметрам является основным фактором, оказывающим влияние на качество и эффективность биопрепарата. Стадия ферментации является основной стадией технологического процесса получения продуктов микробиологического синтеза.

Для подбора оптимальной среды проведено глубинное культивирование штаммов *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541 и *Streptomycescandidus* ИМВ 37с использованием 10 питательных сред. Данные по влиянию состава сред на накопление биомассы и антифунгальную активность культуральной жидкости и экстрактов из биомассы штамма *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541 приведены в таблице 1.

Показано, что уровень накопления биомассы штаммом *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541 значительно зависит от состава питательных сред;максимальное накопление биомассы наблюдалось на органических средах: с соевой мукой (среды №№ 3, 6, 7) и с овсяной мукой (среда № 8). Уровень накопления биомассы изменяется на средах с соевой мукой от 42,1 г/л до 49,5 г/л, на среде № 8 накопление биомассы составляет 45,8 г/л. Наиболее низкое накопление биомассы наблюдалось на синтетических средах №№ 1 и 2, а также на среде № 10 с кукурузным экстрактом. На среде № 9 с глюкозой и пептоном рост штамма *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541 отсутствует.

Таблица 1 – Влияние состава питательных сред на накопление биомассы и биосинтезантифунгального антибиотика штаммом Streptomycescanofumeus ИМВ 541

Номер среды	pH среды до стерилизации	pH среды после 120 часов культивирования	Вес биомассы, г/л	Диаметр зоны подавления ростафитопатогенных грибов, мм			
				Культуральная жидкость		Экстракт биомассы	
				1	2	1	2
№ 1	7,0±0,02	6,5±0,02	3,5±0,1	23±0,3	13± 0,2	25±0,4	25±0,1
№ 2	7,0±0,03	7,2±0,01	3,75±0,3	0	0	30±0,3	35±0,5
№ 3	7,2±0,01	7,4±0,02	42,1±0,7	21±0,1	21±0,4	34±0,1	35±0,3
№ 4	7,1±0,02	5,4±0,03	30,3±0,4	19±0,2	15±0,3	35±0,2	31±0,1
№ 5	7,3±0,03	8,0±0,02	21,0±0,4	32±0,3	35±0,5	33±0,2	36±0,1
№ 6	7,4±0,02	7,0±0,02	46,3±0,3	28±0,1	29±0,1	36±0,1	36±0,4
№ 7	7,6±0,03	7,3±0,01	49,5±0,2	27±0,1	30±0,2	33±0,5	31±0,4
№ 8	7,0±0,01	6,8±0,02	45,8±0,5	31±0,5	32±0,1	36±0,3	36±0,2
№ 9	7,2±0,02	6,0±0,03	Нет роста	-	-	-	-
№ 10	7,2±0,03	7,6±0,02	3,5±0,1	27	28	35±0,3	35±0,1
Примечание – 1-*Aspergillusniger*, 2-*Fusariumoxysporum*							

Уровень антифунгальной активности культуральной жидкости наиболее высокий на среде № 5 с дрожжевым экстрактом (диаметр зоны подавления роста*Aspergillusniger* и *Fusariumoxysporum* – 32 и 35 мм, соответственно) и на среде № 8 с овсяной мукой (диаметр зоны подавления роста*Aspergillusniger* и *Fusariumoxysporum* – 31 и 32 мм, соответственно). Диаметр зоны подавления роста тест-организмов экстрактами из биомассы изменялся от 25 до 36 мм, наиболее высокие результаты получены на средах с соевой и овсяной мукой.

Для создания биопрепарата важно сочетание максимального образования биомассы и высокого уровня биологической активности микроорганизмов, поэтому в качестве оптимальной производственной среды для культивирования штамма*Streptomycescanofumeus* ИМВ 541 выбрана среда № 8 с овсяной мукой, которая обеспечивает как высокий уровень накопления биомассы (45,8 г/л), так и высокую антифунгальную активность культуральной жидкости (диаметр зоны подавления тест-организмов 31-32 мм) и экстрактов из биомассы (36 мм).

Результаты по изучению влияния состава сред на накопление биомассы и ростстимулирующее действие культуральной жидкости штамма *Streptomycescandidus* ИМВ 37 приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние состава питательных сред на накопление биомассы и биосинтезростстимулирующих веществ штаммом Streptomyces candidus ИМВ 37

Номер среды	pH среды до стерилизации	pH среды после культивирования	Вес биомассы микроргаизма, г/л	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина стебля, см	Длина корня, см	Вес сырой массы растения, г
№ 1	7,0±0,02	6,9±0,03	6,4±0,3	73,3±0,4	86,7±0,2	13,4±0,1	12,8±0,5	0,208±0,03
№ 2	7,0±0,03	7,3±0,03	3,9±0,1	73,3±0,3	86,7±0,1	13,0±0,3	10,8±0,1	0,192±0,01
№ 3	7,2±0,01	7,4±0,04	30,0±0,2	73,3±0,1	86,7±0,2	12,4±0,3	12,3±0,2	0,217±0,01
№ 4	7,1±0,02	6,3±0,05	19,1±0,2	73,3±0,2	86,7±0,5	12,9±0,1	10,7±0,2	0,185±0,08
№ 5	7,3±0,03	7,9±0,05	11,3±0,4	73,3±0,2	86,7±0,3	12,1±0,2	13,5±0,3	0,228±0,03
№ 6	7,4±0,02	6,7±0,03	16,9±0,1	86,7±0,4	93,3±0,3	11,8±0,4	12,1±0,5	0,190±0,07
№ 7	7,6±0,03	7,4±0,02	39,9±0,5	66,7±0,1	73,3±0,1	13,3±0,4	10,5±0,3	0,180±0,05
№ 8	7,0±0,01	7,0±0,04	11,1±0,4	93,3±0,1	93,3±0,4	15,4±0,3	14,0±0,2	0,249±0,02
№ 9	7,2±0,02	5,7±0,05	10,3±0,3	86,6±0,3	86,7±0,2	12,8±0,1	11,0±0,2	0,182±0,02
№ 10	7,2±0,03	7,8±0,03	15,8±0,3	66,7±0,2	73,3±0,2	13,3±0,1	13,5±0,1	0,210±0,03
Контроль	Вода дистиллированная			66,7±0,1	73,3±0,3	7,1±0,1	7,0±0,3	0,130±0,05

Уровень накопления биомассы штаммом *Streptomycescandidus* ИМВ 37 также зависит от состава питательных сред, наиболее максимальное накопление биомассы наблюдалось на органических средах с соевой мукой (среды №№ 3 и 7). Уровень накопления биомассы изменяется на средах с соевой мукой от 16,9 г/л (среда № 6) до 39,9 г/л на среде № 7. Наиболее низкое накопление биомассы наблюдалось на синтетических средах №№ 1 и 2.

Уровень образования биологически активных веществ, стимулирующих рост и развитие растений, также изменяется в зависимости от состава сред. Оптимальные результаты по образованию ростстимулирующих веществ получены при использовании сред №№ 1,3,5,8,9. Среда № 8 обеспечивает наиболее высокий уровень биосинтеза биологически активных веществ. Культуральная жидкость штамма *Streptomycescandidus* ИМВ 37, полученная на этой среде, увеличивает энергию прорастания семян пшеницы на 26,6%, лабораторную всхожесть на 20,0 %, длину проростков в 2,2 раза, длину корня в 2,0 раза, сырую массу растений в 1,9 раза.

Таким образом, состав питательных сред значительно влияет на рост биомассы штаммов стрептомицетов и накопление ими биологически активных веществ. Органические среды с соевой мукой обеспечивают наиболее оптимальный рост биомассы. Среда № 8 с овсяной мукой является оптимальной для синтеза как антифунгального антибиотика, так и веществ, стимулирующих рост растений.

Выводы

1. Изучен рост биомассы штаммов *Streptomyces candidus* ИМВ 37 и *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541, составляющих препарат для растениеводства, и биосинтез ими биологически активных веществ на 10 органических и синтетических средах.

2. Показано значительное влияние состава питательных сред на рост биомассы штаммов стрептомицетов и накопление ими биологически активных веществ.

3. Среда № 8 с овсяной мукой является наиболее оптимальной для синтеза как антифунгального антибиотика, так и веществ, стимулирующих рост растений.

4. Среда № 8 обеспечивает высокий уровень накопления биомассы (45,8 г/л) штамма *Streptomycescanofumeus* ИМВ 541, а также высокую антифунгальную активность культуральной жидкости (диаметр зоны подавления тест-организмов 31-32 мм) и экстрактов из биомассы (36 мм).

6. Культуральная жидкость штамма *Streptomycescandidus* ИМВ 37, полученная на среде № 8, увеличивает энергию прорастания семян пшеницы на 26,6%, лабораторную всхожесть на 20,0 %, длину проростков в 2,2 раза, длину корня в 2,0 раза, сырую массу растений в 1,9 раза.

Литературы

1 Joo G.J. Production of an antifungal substance for biological control of Phytophthoracapsici causing phytophthora blight in red-peppers by Streptomyces halstedii // Biotechnol. Lett. – 2005. – Vol. 27. – P. 201–205.

2 Aryantha P.G., Guest I.D. Mycoparasitic and antagonistic inhibition on PhytophtoracinnamomiRands by microbial agents isolated from manure composts // Plant Pathology. – 2006. – Vol. 5. – P. 291-298.

3 Propagdee B., Kuekulvong C., Mongkolsuk S. Antifungal potential of extracellular metabolites producer by Streptomyces hygroscopicusagaintsphytopathogenic fungi // Int. J. Biol. Sci. – 2008. – Vol. 4. – P. 330-337.

4 Дегтярева Е.А., Виноградова К.А., Александрова А.В., Филоненко В.А., Кожевин П.А. Почвенные актиномицеты как потенциальные биофунгициды // Вестник Московского университета, сер. почвоведение. – 2009. – № 2. – С. 22-26.

5 Snehal J., Shinde S.K., Prashanthi P.U., Krishnaraj J. Identification and utilization of actinobacteria for biocontrol of rice sheath blight pathogen Rhizoctoniasolani // Asian Journal of Bio Science. – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. 227-233.

6 Bouras N., Meklat A., Toumatia O., Mokrane S., Holtz M.D., Strelkov S.E., Sabaou N. Bioactive potential of a new strain of Streptomyces sp. PP14 isolated from Canadian soil // Afr. J. Microbiol. Res. – 2013. – Vol. 7. – N 25. – P. 3199-3208.

7 ШирокихИ.Г. идр. ЭффектыинтродукцииStreptomiceshygroscopicusA4 вфитосферуголозерногоовса // ЗерновоехозяйствоРоссии. – 2013. -№ 3. – С. 52-56.

8 Brown M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere // Journal of Applied Bacteriology. – 1972. – Vol. 35. – P. 443-451.

9 Martens D.A., Frankenberger W.T. Assimilation of exogenous 2'-14C-indole acetic acid and 3'-14C-tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties // Plant and Soil. – 1994. – Vol. 166. – P. 281-290.

10 Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M., Crawford D.L., Salove M.H., Deobald L.A., Bailey J.F., Morra M.J. Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving Streptomyces lydicus WYEC108 nd the Pea Plant (Pisumsativum) // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68. – P. 2161-2171.

11 Waksman S.A. Classification, Identification and Description of Genera and Species. The Actinomycetes. – Baltimore: Waverly Press, 1961. – Vol. 2. – 962 p.

12 Ilić S., Konstantinović S., Veljković B., Savić S., Gojgić-Cvijović G. The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by Streptomyces hygroscopicus CH-7 // Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. – 2010. – Vol. 2. – P. 1337-1342.

13 Reddy N.G., Ramakrishna D., Rajagopal S. Optimization of culture conditions of Streptomyces rochei (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites // Egyptian Journal of Biology. – 2011. – Vol. 13. – P. 21-29.

14 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: МГУ, Наука, 2004. – 528 с.

15 Locci R. Streptomyces and Related Genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

- Baltimore: Williams Co, 1989. – Vol. 4. – P. 2451–2508.

16 Salha H.M., Al-Zahrani. Studies on the Antimicrobial Activity of Streptomyces // J. KAU Sci. – 2007. – Vol. 19. – P. 127-138.

17 Gupte M.D., Kulkarni P.R. A study of antifungal antibiotic production by Streptomyces chattanougensis MTCC 3423 using full factorial design // Lett. Appld. Microbiol. – 2002. – Vol. 35, № 1. – P. 22-26.

18 Vieira M.F., Sousa Q., Lopes C.E., Pereira N. J. Production of Actinomycin D by Streptomyces parvulus // Braz. Arch. Biol. Technol. – 2001. – Vol. 44, № 3. – P. 14-22.

19 ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.Изменение №2 к ГОСТ 12038-84 от 01.06.1995.

20 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 295 с.

References

1 Joo GJ (2005) Production of an antifungal substance for biological control of Phytophthoracapsici causing phytophthora blight in red-peppers by Streptomyces halstedii. BiotechnolLett, 27:201–205.

2 Aryantha PG, Guest ID (2006)Mycoparasitic and antagonistic inhibition on PhytophtoracinnamomiRands by microbial agents isolated from manure composts. Plant Pathology, 5:291-298.

3 Propagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S (2008) Antifungal potential of extracellular metabolites producer by Streptomyces hygroscopicusagaintsphytopathogenic fungi.IntJBiolSci, 4:330-337.

4 Degtjareva EA, Vinogradova KA, Aleksandrova AV, Filonenko VA, Kozhevin PA (2009) Soil actinomycetes as potential fungicides. News of Moscow University, ser. soil science[Pochvennyeaktinomicetykakpotencial'nyebiofungicidy. VestnikMoskovskogouniversiteta, ser. pochvovedenie] 2:22-26.(In Russian)

5 Snehal J, Shinde SK, Prashanthi PU, Krishnaraj J (2014) Identification and utilization of actinobacteria for biocontrol of rice sheath blight pathogen Rhizoctoniasolani. Asian Journal of Bio Science, 9:227-233.

6 Bouras N, Meklat A, Toumatia O, Mokrane S, Holtz MD, Strelkov SE, Sabaou N (2013) Bioactive potential of a new strain of Streptomyces sp. PP14 isolated from Canadian soil. Afr J Microbiol Res, 7:3199-3208.

7 Shirokih IG e a(2013) The effects of the introduction of Streptomyces hygroscopicus A4 in phytosphere naked oats.Grain farm in Russia [JeffektyintrodukciiStreptomiceshygroscopicus A4 v fitosferugolozernogoovsa. ZernovoehozjajstvoRossii] 3:52-56. (In Russian)

8 Brown ME(1972) Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. Journal of Applied Bacteriology, 35:443-451.

9 Martens DA, Frankenberger WT (1994) Assimilation of exogenous 2'-14C-indole acetic acid and 3'-14C-tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties. Plant and Soil, 166:281-290.

10 Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ (2002) Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving Streptomyces lydicus WYEC108 nd the Pea Plant (Pisumsativum). Applied and Environmental Microbiology, 68:2161-2171.

11 Waksman SA (1961) Classification, Identification and Description of Genera and Species. The Actinomycetes. Baltimore, Waverly Press.

12 Ilić S, Konstantinović S, Veljković B, Savić S, Gojgić-Cvijović G (2010) The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by Streptomyces hygroscopicus CH-7. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2:1337-1342.

13 Reddy NG, Ramakrishna D, Rajagopal S (2011) Optimization of culture conditions of Streptomyces rochei (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites. EgyptianJournalofBiology, 13:21-29.

14Egorov NS (2004) Fundamentals of theory of antibiotics [Osnovyuchenijaobantibiotikah].Moscow State University, Moscow, Russia (In Russian)

15 Locci R (1989) Streptomyces and Related Genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams Co, 4:2451–2508.

16 Salha HM, Al-Zahrani (2007) Studies on the Antimicrobial Activity of Streptomyces. J KAU Sci, 19:127-138.

17 Gupte MD, Kulkarni PR (2002)A study of antifungal antibiotic production by Streptomyces chattanougensis MTCC 3423 using full factorial design. LettAppldMicrobiol, 35:22-26.

18 Vieira MF, Sousa Q, Lopes CE, Pereira NJ (2001) Production of Actinomycin D by Streptomyces parvulus.BrazArchBiolTechnol, 44:14-22.

19 GOST 12038-84. Agricultural seeds. Methods for determining the germination. Change №2 to GOST 12038-84 from 01.06.1995 [GOST 12038-84. Semenasel'skohozjajstvennyhkul'tur. Metodyopredelenijavshozhesti. Izmenenie #2 k GOST 12038-84 ot 01.06.1995](In Russian)

20 Urbach VY (1975) Statistical analysis in biological and medical research[Statisticheskijanaliz v biologicheskihimedicinskihissledovanijah].Medicine,Moscow, Russia (In Russian)

6-бөлім

ИММУНОЛОГИЯ

Раздел 6

ИММУНОЛОГИЯ

Section 6

IMMUNOLOGY

[1]Абдолла Н.,
[1]Перфильева Ю.В., [1]Остапчук Е.О.,
[1]Оскольченко И.А.,
[2]Красноштанов В.К.,
[3]Северова Е.А., [3]Поминова Н.М.,
[3]Денисов Ю.Д., [1]Беляев Н.Н.

[1]М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Кардиология және ішкі аурулар ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.
[3]Онкология және радиология ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

Тәжірибелік созылмалы қабыну кезіндегі миелоидық супрессорлық жасушалар

Миелоидты супрессорлық жасушалар (MDSC) тышқандарда CD11b және Gr-1 жасушалық маркерлерінің экспрессиясы бойынша анықталған, цитотоксикалық Т-лимфоциттер мен NK-жасушалардың ісікке қарсы белсенділіктерін төмендетуге қабілетті, миеломоноцитарлық бағыттағы (нейтрофилдер және моноциттер) гемопоэтикалық бастапқы өзіндік гетерогенді популяция. Біз MDSC феномені ісік процесінде бірегей болмайды, қайта оның алдында болатын және онкогенезді белгілі деңгейде белсендендіретін созылмалы қабыну патогенезімен байланысты деп жорамалдаймыз. Жұмыстың мақсаты болып созылмалы қабынудың өзіндік классикалық моделі тышқандардағы адъювант артриттің даму динамикасындағы MDSC субпопуляциясын цитофлуориметриялық зерттеу. Біз толық адъювант Фрейндпен әсер етілген, CD-1 линиялы тышқандардың артқы аяқтарындағы созылмалы қабынудың дамуының 2- аптасының соңына қарай, көкбаурындағы екі MDSC фракцияларының (M және G) екі еседен көп жоғарлауы болатынын және ол 4-аптаның соңына дейін сақталатынын анықтадық. Бұдан басқа әртүрлі зерттеу мерзімінде CD184, CD195 және CD62L молекулаларын экспрессиялайтын CD11b+Gr-1+ жасушалар үлесі айтарлықтай жоғарлағаны белгілі болды. Бұл қабыну процесіне MDSC қатысатынын және олардың қабыну ошағына осы молекулалар көмегімен жылжитынын көрсетеді.

Түйін сөздер: созылмалы қабыну, MDSC, ағынды цитометрия, эрлих ісігі, адъювант артрит.

---

[1]Abdolla N.,
[1]Perfilyeva Yu.V., [1]Ostapchuk Ye.O.,
[1]Oskolchenko I.A.,
[2]Krasnoshtanov V.K.,
[3]Severova E.A., [3]Pominova N.M.,
[3]Denisov Yu.D., [1]Belyaev N.N.

[1]Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Kazakhstan, Almaty,
[2]Kazakh Research Institute of Oncology and Radiology, Kazakhstan, Almaty,
[3]Research Institute of Cardiology and Internal Diseases, Kazakhstan, Almaty

Myeloid derived suppressor cells in experimental chronic inflammation

Myeloid derived suppressor cells (MDSC) are a heterogenic population of hematopoietic progenitors of myelomonocytic branch, identified by expression of CD11b and Gr-1, and an ability to inhibit antitumor activity of NK and T cell. We suggested that MDSC phenomenon is not a prerogative of cancer process and is linked to pathogenesis of chronic inflammation, which precedes and to a certain extent induces carcinogenesis. The purpose of this work was a cytofluorimetric analysis of MDSC subsets in mice with adjuvant arthritis, a classic model of experimental chronic inflammation. We found that by the second week of chronic inflammation, induced in hind limbs of CD-1 mice by administration of complete Freund's adjuvant, both spleen MDSC fractions (M and G) were increased twofold, compared to intact mice, the increase persisted until forth week. An increase in MDSCs, expressing molecules of adhesion/chemotaxis (CD184, CD195, CD62L) was found at different times of investigation. Results suggest that chronic inflammation induces an increase in MDSC as well as their ability to migrate into the site of inflammation.

Key words: Chronic inflammation, MDSC, flow cytometry, Ehrlich carcinoma, adjuvant arthritis.

---

[1]Абдолла Н.,
[1]Перфильева Ю.В.,
[1]Остапчук Е.О.,
[1]Оскольченко И.А.,
[2]Красноштанов В.К.,
[3]Северова Е.А., [3]Поминова Н.М.,
[3]Денисов Ю.Д., [1]Беляев Н.Н

[1]Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы,
[2]Казахский научно-исследователский институт онкологии и радиологии, Казахстан, г. Алматы,
[3]Научно-исследовательский институт кардиологии и внутренних болезней, Казахстан, г. Алматы

Миелоидные супрессорные клетки при экспериментальном хроническом воспалении

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию гемопоэтических предшественников миеломоноцитарного ряда, идентифицированную у мышей по экспрессии клеточных маркеров CD11b и Gr-1, обладающих способностью угнетать противоопухолевую активность NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Мы предположили, что феномен MDSC не является прерогативой опухолевого процесса и связан с патогенезом хронического воспаления, которое предшествует и, в известной степени, индуцирует онкогенез. Целью работы явилось цитофлуориметрическое исследование различных субпопуляций MDSC у мышей в динамике развития адъювантного артрита, представляющего собой классическую модель экспериментального хронического воспаления. Мы установили, что уже к концу 2-й недели развития хронического воспаления в задней конечности мышей линии CD-1, индуцированного полным адъювантом Фрейнда, происходило более чем двукратное увеличение уровня обеих фракций MDSC (M и G) в селезенке, которое сохранилось к концу 4-й недели. Кроме того, было обнаружено значительное увеличение доли CD11b+Gr-1+ MDSC, экспрессирующих молекулы адгезии/хемотаксиса CD184, CD195 и CD62L, на разных сроках исследования. Таким образом, можно заключить, что хроническое воспаление индуцирует повышение уровня MDSC и их способности мигрировать в очаг воспаления.

Ключевые слова: хроническое воспаление, MDSC, проточная цитометрия, карциномы Эрлиха, адъювант артрит.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

ӘОЖ 612.017.11;
612.017.1:57.052; 616-002.2

[1*]Абдолла Н., [1]Перфильева Ю.В., [1]Остапчук Е.О., [1]Оскольченко И.А., [2]Красноштанов В.К., [3]Северова Е.А., [3]Поминова Н.М., [3]Денисов Ю.Д., [1]Беляев Н.Н.

[1]М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Қазақстан Республикасы, Алматы қ.
[2]Кардиология және ішкі аурулар ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан Республикасы, Алматы қ.
[3]Онкологиия және радиология ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан Республикасы, Алматы қ.
*E-mail: Nurshat777@mail.ru

ТӘЖІРИБЕЛІК СОЗЫЛМАЛЫ ҚАБЫНУ КЕЗІНДЕГІ МИЕЛОИДЫҚ СУПРЕССОРЛЫҚ ЖАСУШАЛАР

Кіріспе

Қазіргі уақытта қартаюмен байланысты аурудың ішінде жүрек-қантамырлар ауруы, қатерлі ісік, Альцгеймер ауруы, Паркинсон ауруы, артрит, диабет, семіру [1] сияқты ерекшеленгендердің морфологиялық негізі созылмалы қабыну болып саналады [2]. Ол созылмалы ауруларға алып келетін, ұлпалық зақымдалу процесстерін активтендіретін, хемокиндер, цитокиндер, арахидон қышқыл метаболиттері және бос радикалдардің түзілуі нәтижесінде пайда болады [3-5].

Созылмалы қабынудың механизімі іс жүзінде, морфологиялық көрнісінде мастоциттер, нейтрофилдер және макрофагтар орталық орынды иеленетін өткір қабынудың механизімінен өзгешеленеді. Аяқталмаған өткір қабыну жағыдайында себебтері бойынша толық анықталмаған, бірақ негізгі қатысушылары Т-лимфоциттер, макрофагтар және фибробластар болатын созылмалы қабыну дамиды. Өзара бұл жасушалар қабыну аймағында бір мезгілде қатысу феноменін құрайтын қабындырғыш (TNFα, IL−1β, IL−2, IL−6, IL−8) [6] және қабынуға қарсы (IL-10, IL-1RA, IL-27, TGFβ) [7, 8, 9, 10,] цитокиндерімен ұзақ уақытқа жалғасатын қабыну процесін тудырады.

Біз бұл процесстегі маңызды себебті буынды рөлге адамдарда CD14+HLA-DR–/low маркерлері, тышқандарда CD11b және Gr-1 жасушалық маркерлерінің экспрессиясы бойынша анықталған, миеломоноцитарлық бағыттағы (макрофагтар, нейтрофилдер және дендриттік жасушалар) гемопоэтикалық бастапқы өзіндік гетерогенді популяция миелоиды супрессорлық жасушалар (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC) деп аталатын жасушалар қатысуы мүмкін деп жорамалдаймыз [11-14]. Қалыпты кезде бұл жасушалар көп мөлшерде жілік кемігінде байқалғанмен, көкбауыр мен периферялық қанда негізінен анықталмаған. Жануарларда ісік процессінде олардың саны өседі, сонымен бірге ісіктің стромасында, ісікке қарсы иммунитеттің әлсіреуі мен сәйкес келеді (CTL, NK-жасушаларының ісікке қарсы активтілігінің төмендеуі). MDSC кейбір қосымша маркерлерінің болуы және ядро формасы бойынша:

моноцитарлы (M-MDSC) және гранулоцитарлы (G-MDSC) екі субпопуляцияға бөлінеді.

Тышқандар көкбауырында MDSC деңгейінің жоғарлауын тек қана ісіктің өсуінде ғана емес, өкпенің созылмалы туберкулез инфекциясы және бауырдың инфекция вирусы [15, 16], сонымен қатар, семіру кезінде де байқалған [17]. Паразитарлы немесе саңырауқұлақты инфекциямен байланысқан созылмалы қабыну да, MDSC активтілігінің күшейуіне алып келетіні көрсетілді [18, 19]. Біз MDSC феноменін ісік процессінде бірегей болмайды, қайта оның алдында болатын және онкогенезді белгілі деңгейде белсендендіретін созылмалы қабыну патогенезімен байланысты деп жорамалдаймыз. Ал MDSC жасушаларымен жұмыс жасау әдістерін жетілдіруде морфологиялық негізі созылмалы қабыну болып табылатын тышқандардағы Эрлих ісік моделін қолдандық. Бұл ісігінің өсіуіне MDSC қатысуы зерттелмеген.

Жұмыстың мақсаты болып созылмалы қабынудың өзіндік классикалық моделі тышқандарындағы адъювант артриттің даму динамикасындағы MDSC субпопуляциясын цитофлуориметриялық зерттеу.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Қолданылған жануарлар

Ісік процессін моделдеу үшін ҚР ДМ Онкологиия және радиология ҒЗИ вивариасында ұсталған салмақтары 20-25 г CBA линиалы аталық тышқандар қолданылды. Адъювант артрит моделдеу ҚР ДМ Кардилогия және ішік аурулар ҒЗИ конвенциональды вивариа жағыдайында ұсталған салмақтары 26-28 г CD1 линиалы аутбред тышқандарда жүргізілді. Лабораториялық жануарлармен болған барлық зерттеу жұмыстары, жануарларды қоғау, зерттеу және ғылыми мақсаттар үшін қолдану бойынша Европалық конвенция қабылдаған ережелерге сәйкес стандартты процедураға негізделген көпшілік мақұлдаған жануарлармен жұмыс этикалық нормасына сәйкес істелді [20].

Ісік процессін моделдеу

Ісік моделін алу үшін Эрлих ісік жасушалары жабайы ақ тышқандардың құрсақ қуысына залалсызданған физологиялық ерітіндіде 5-10 млн./мл жасушалық суспензияны енгізу арқылы көшірлді. 10-15 күннен кейін асцитті сұйықтық шприц көмегімен алынып, ол жасушалар 1000 об./мин 10 мин центрифугаланды, сосын физологиялық ерітіндіде суспензияланып CBA линиалы тышқандардың тері астына 500 мың /0,5 мл де Эрлих ісік жасушалары енгізілді [21]. 1-3 аптадан кейін тышқандардан хирургиялық жолмен көкбауыры мен тері асты ісігі алынды. Көкбауры көкбаур мононуклеар жасушаларын суспензиясын алу үшін қолданылды Ісіктің салмағы электрондық таразы арқылы май ұлпалары тазаланғанан кейін өлшенді.

Адъювант артритті моделдеу

Адъювант артрит сынақ тобындағы тышқандарға (12 бас) 0,1 мл толық адъювант Фрейндті (“Sigma-Aldrich”, АҚШ) арты аяғының табан ұлтаның астына 100 мкл ден бір рет енгізу арқылы тудырылды. Бақылау тобындағы тышқандарға адъювант Фрейндтің орнына физологиялық ертінді енгізілді. 2 және 4 аптадан кейін тышқандарың көкбауры хиругиялық жолмен алынып (әр топта 6 жануар) көкбаур мононуклеар жасушаларын алу үшін қолданылды.

Көкбауыр мононуклеарлық жасушалар суспензиясын алу

Сынақ және бақылау тобындағы тышқандардан хирургиялық жолмен алынған көкбаур айнек гомогенизатор көмегімен гомогенизацияланды. Алынағн жасушалық суспензия 20°C -та 1450 g кезінде 1,083 г/мл гистопак тығыздық градиентінде 20 мин бойы центрифугаланды (3k-30, Sigma, Германия). Сақина түрінде бөлектелген мононуклеар жасушалар фракциясы 300 g кезінде 10 мин бойы центрифугаланды және натрий фосфатты буферде (phosphate-buffered saline-PBS) суспензияланды.

Ағынды иммуноцитофлуориметрия

Жасушалар фенотипі ағынды иммуноцитофлуориметрия көмегімен CD-маркерлерін анықтау жолымен бағаланды. Бұл үшін жасушалар суспензиясы фикоэритрин (PE), флуоресцеин-изотиоцианат (FITC) немесе Перидинин-хлорофилл белк (PerCP) таңбаларымен белгіленген CD-маркерлерге қарсы моноклональды антиденемен өндіруші фирмалар (BD Biosciences, АҚШ немесе Milenyi Biotec, Германия) хаттамасына сәйкес өңделді. Алынған жасуша препараттары ағынды цитометр (FACS Calibur, BD Biosciences, АҚШ) арқылы өткізілді және антиденемен байланысқан жасушалар үлесі сонымен бірге әр маркердің орташа интенсивті флуоресценциясы бағаланды.

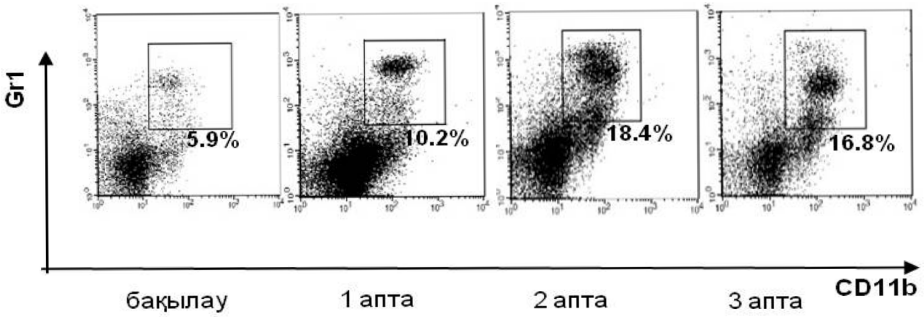
Мәліметтерді статистикалық өңдеу

Алынған мәліметтер математикалық статистика әдістерімен қолданбалы программалар t-Стьюдент критериасы (Ттест), арифметикалық орташа мәнді есептеу (M) және стандарты ауытқу (SD) Microsoft Excel қолданбалы программаларын қолданып компьютерде өңделді.

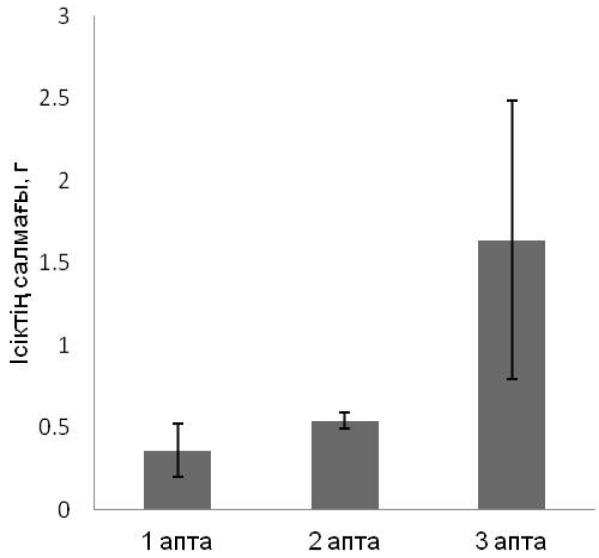
Екі орташа шамалардың айырмашылығы P≤0,05 мәнділік деңгейінде анық есептеді. Есептеулер (Ттест) үшін Excel 2010 және StatPlus Professional 2007 қолданбалы программалары қолданылды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Морфологиялық негізі созылмалы қабыну болатын Эрлих ісігі кезіндегі MDSC жасуша құрамының өзгерісін және оның ісік салмағына тәуелділігі зерттелді. Апта сайын әр топта 5 тышқаннан үш апта бойы хиругиалық жолмен көкбауры мен ісігі алынды және ісік ұлпасының салмағы өлшенді, сонымен қатар ағынды цитофлурометрия көмегімен көкбауырдағы мононуклеар жасушалар құрамындағы CD11b+Gr-1+ (MDSC) фенотипті жасушалар саналды (сурет 1). Бақылау динамикасында (Эрлих ісік жасушаларын енгізгеннен кейнгі 1-, 2-, 3-аптадан соң) ісік салмағының артуы байқалды (сурет 2). Сонымен қатар бақылау тобындағы тышқандармен салыстырғанда сынақ тобындағы тышқандардың көкбаурындағы MDSC үлесінің көбейетіні анықталды (сурет 3).



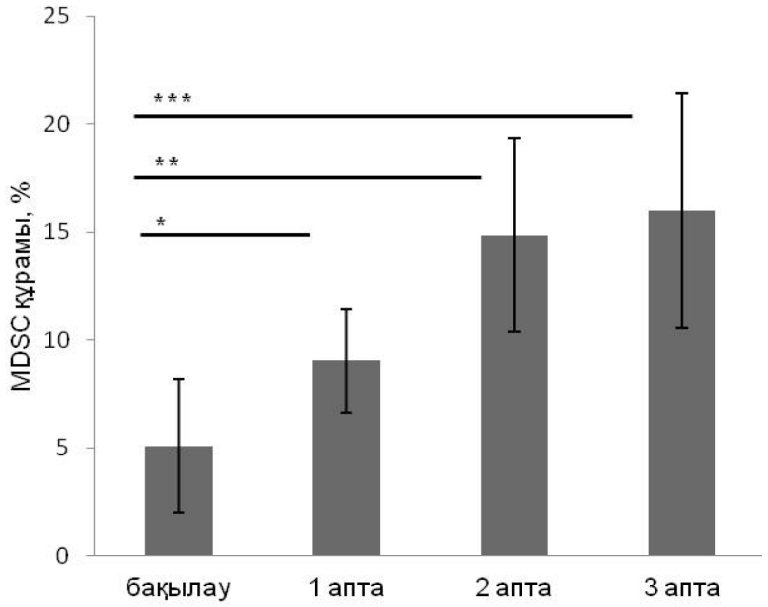
1-сурет – Бақылау және Эрлих ісігі бар тышқандар көкбаурындағы MDSC жалпы пулының репрезентатция мәліметтері



2-сурет – Ісік салмағының өзгеріс динамикасы

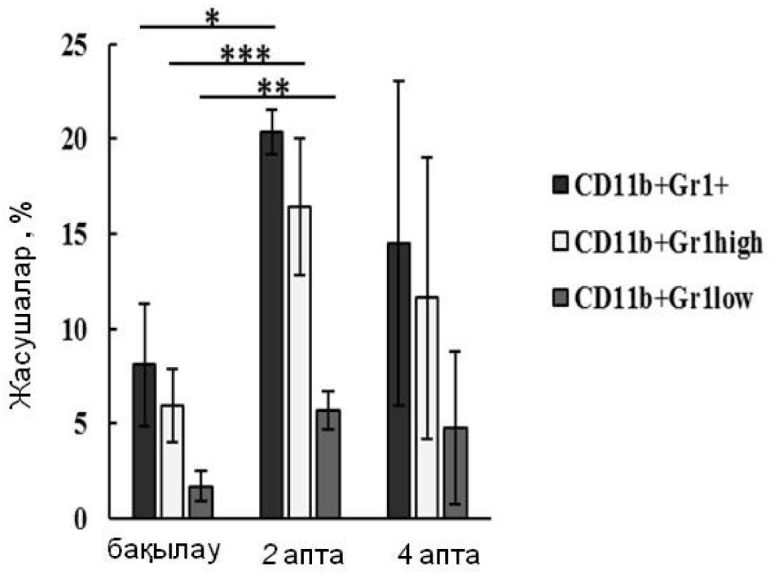
CBA линиялы тышқандардағы Gr-1^{+}CD11b MDSC деңгейінің жоғарлаумен жақсы арақатынаста болатын тері асты Эрлих ісігі өсіу моделінде бекітілген MDSC фенотипикалық бағалауға жарамды ағынды цитометрия әдісі негізінде созылмалы қабынудың өзіндік классикалық моделі адъювант артритт кезінде MDSC қатысуын зерттеу үшін әртүрлі жыныстағы 20 тышқанға жүргізіліп, түрлі бақылау динамикасында (2 апта және 4 апта) адгезия маркерлері бар MDSC субпопуляциясының көкбауырдағы құрамы зерттелді. Ағынды цитофлуориметрия көмегімен алынған

талдау мәліметтері, толық адъювант Фрейндті енгізгеннен кейінгі екі аптадан соң көкбауырдағы MDSC ($CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$) құрамының екі еседен көп көбейгенін көрсетті, бұған қоса Gr-1 маркерлерінің экспрессиялану деңгейі және ядро формасы бойынша айқындалатын супрессорлық фукциясы бар M-MDSC ($CD11b+Gr1^{low}$) фракциясы мен G-MDSC ($CD11b+Gr1^{high}$) фрак-циясы жоғарлағаны байқалды (сурет 4). Бұл қабыну аумағында супрессияның басталғаның көрсетеді. Сонымен қоса CD11b+Gr-1+CD184+ құрамы жоғарлағаны байқалды (сурет 5), бұл жілік кемігінен MDSC мобилизациясына SDF-1α (CD184) хемокинінің қатысу туралы ойды туралайды.



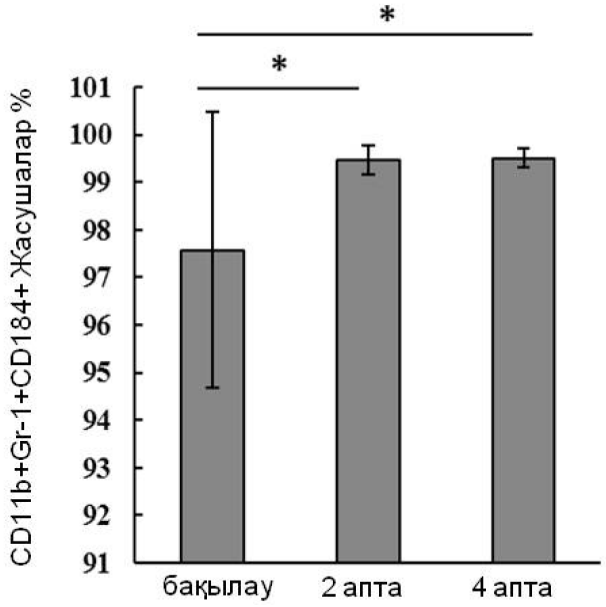
Ескерту – топтар арасындағы айрмашылықтың нақтылығы *P≤0,01,**P≤0,06, ***P≤0,01

3-сурет – Бақылау және Эрлих ісігі бар тышқандар көкбаурындағы CD11b+Gr-1+ MDSC жасушалар құрамының өзгеріс динамикасы



Ескерту – топтар арасындағы айрмашылықтың нақтылығы *P≤0,0001, **P≤0,01, ***P≤0,05.

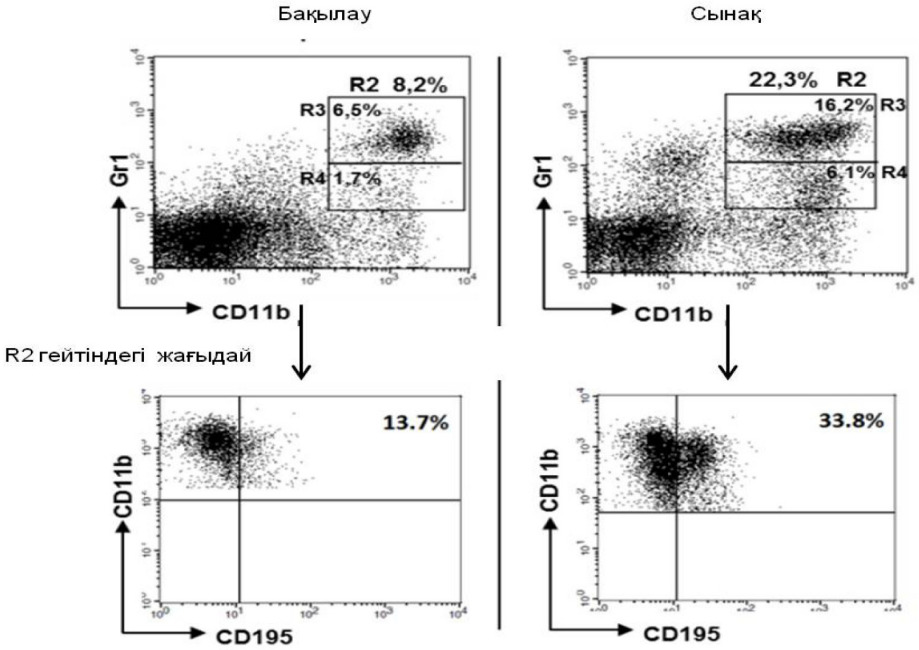
4-сурет – Бақылау және адъювант артрит даму динамикасындағы тышқандардың көкбаурындағы MDSC құрамы



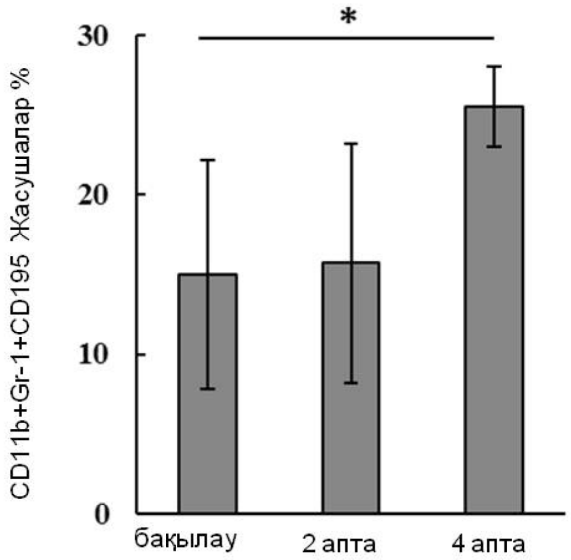
Ескерту – топтар арасындағы айрмашылықтың нақтылығы *P≤0,05 .

5-сурет – Бақылау және адъювант артрит даму динамикасындағы тышқандардың көкбаурындағы CD184^{+} MDSC құрамы

4-аптаның соңына қарай көкбауырдағы MDSC деңгейі бастапқы күйіне оралды, бірақта оларда SDF-1α (CD184) үшін CXCR4 рецепторы экспрессиясының жоғарлауы және RANTES хемокиндер үшін CD195 рецепторларының экспрессиясының көбеюі сақталды (сурет 6, 7). Бұл созылмалы қабынудың даму механизімімен байланысты процесстерде MDSC деңгейінің жоғарлауына және олардың SDF-1α және RANTES сияқты хемокиндерге рецепторлардың жоғары экспрессиясы есебінен қабыну ошағына жылжу қабілеттілігіне алып келетінін түсіндіреді.



6-сурет – Бақылау және адъювант артрит даму динамикасындағы тышқандар көкбаурындағы MDSC жалпы пулы мен субпопуляцияларының және CD195^{+} MDSC құрамының репрезентатция мәліметтері



Ескерту – топтар арасындағы айрмашылықтың нақтылығы *P≤0,005.

7-сурет – Бақылау және адъювант артрит даму динамикасындағы тышқандардың көкбаурындағы CD195^{+} MDSC құрамы

Адгезии маркері CD44 экспрессиясы екі бақылау мерзімдерінде жоғары деңгейде өзгеріссіз сақталды (бақылау - 96,0±2,5%, 2 апта – 96,5±2,1%, 4 апта – 96,3±3,8). Сонымен бірге 2-аптаның соңына қарай адгезияның басқада маркері CD62L экспрессиялану деңгейі жоғарлағаны байқалып, 4-аптаға дейін тенденция сақталды (бақылау – 28,9±5,0%, 2-апта – 38,5±2,8% (P=0,003), 4-апта – 35,0±15,7%). CD62L экспрессиясының жоғары деңгейінің сақталуы бұл жасушалардың қабыну кезінде жақсы миграцияланатынын көрсетеді.

Қорта келгенде осы зерттеу барысында миелоиды супрессорлық жасушаларды бөлу және фенотиптік сипаттамысн жасау әдістерін жетілдірдік және тышқандардың Эрлих ісігі кезінде MDSC құрамының көбейуі ісік салмағының артуына оң әсерін тигізетіні байқалды. Бұндай озгерістер қабыну аумағында жоғары супрессорлық фонның әсер нәтижесі болуы мүмкін. Осындай супресорлық әсерлер созылмалы қабынудың даму механизімімен байлансқан процесстерде MDSC деңгейінің жоғарлауына және олардың қабыну ошағына жылжу қабілеттілігіне алып келеді деп тұжырымдауға болады. Ұлпадағы ұзаққа сөзылған қабынудан организімде морфологиялық негізі созылмалы қабыну болып саналатын аурулар дамуы мүмкін.

Әдебиеттер

1 Prasad S., Sung B., Aggarwal B.B. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation // Prev Med. – 2012. – N54. – P.29–37. DOI:10.1016/j.ypmed.2011.11.011

2 Yu B.P., Chung H.Y. The inflammatory process in aging // Rev Clin Gerontol.- 2006.- N16.– P.179–187. DOI: 10.1017/S0959259807002110

3 Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark R.A., Roy A.K. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases // Exp Gerontol. – 2000. – N35. – P.521–532. DOI:10.1016/S0531-5565(00)00118-2

4 Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases // J Biochem Mol Biol. – 2003. – N36.– P.95–109. DIO: 10.5483/BMBRep.2003.36.1.095

5 Aggarwal B.B. Nuclear factor-kB: the enemy within // Cancer Cell.- 2004 - N6.– P.203–208. DIO:10.1016/j.ccr.2004.09.003

6 Roy S., Bagchi D., Raychandhuri S.P. Chronic inflammation Molecular pathophysiology, nutritional and therapeutic interventions. – USA: CRC Press, Talor@Francis Group L.L.C. – 2013. – 472 p.

7 Zeyda M., Farmer D., Todoric J., Aszmann O., Speiser M., Györi G., Zlabinger G.J., Stulnig T.M. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production // Int J Obes.- 2007. – N31. – P.1420–1428. DIO: 10.1038/sj.ijo.0803632

8 Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes // Biochem Biophys Res Com. – 2004. – N323. – P.630–635. DIO: 10.1016/j.bbrc.2004.08.145

9 Lan H.Y. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and Inflammation// Int J Biol Sci. – 2011. – N7. – P.1056-1067. DIO: 10.7150/ijbs.7.1056

10 Han G., Li F., Singh T.P., Wolf P., Wang X.J. The Pro-inflammatory Role of TGFβ1: A Paradox? // Int J Biol S. – 2012. – N8(2). – P.228-235. DIO: 10.7150/ijbs.8.228

11 Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system // Nature Rev Immunol. – 2009. – N9.– P.162-174. DIO: 10.1038/nri2506

12 Greten T.F., Manns M.P., Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases // Intern Immunopharm. – 2011. – N11. – P.802–807. DIO: 10.1016/j.intimp.2011.01.003

13 Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer // J Immunol. – 2009. – N182. – P.4499–4506. DOI: 10.4049/jimmunol.0802740

14 Peranzoni E., Zilio S., Marigo I., Dolcetti L., Zanovello P., Mandruzzato S., Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition // Curr Opin Immunol. – 2010. – N22. – P.238–244. DIO: 10.1016/j.coi.2010.01.021

15 Obregón-Henao A., Henao-Tamayo M., Orme I.M., Ordway D.J. Gr1intCD11b+ Myeloid-derived suppressor cells in Mycobacterium tuberculosis Infection // PLOS ONE. – 2013. – N8. – Issue 11 e80669. DIO: 10.1371/journal.pone.0080669

16 Chen S., Akbar S.M., Abe M., Hiasa Y., Onji M. Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus // Clin Exp Immunol.- 2011.- N166.- P.134–142. DIO: 10.1111/j.1365-2249.2011.04445.x

17 Xia S.h., Sha H., Yang L., Ji Y., Ostrand-Rosenberg S., Qi L. Gr-1 CD11b Myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity // J Biol Chem. – 2011. – N286(26). – P.23591–23599. DIO: 10.1074/jbc.M111.237123

18 Goni O., Alcaide P., Fresno M. Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+)) CD11b(+) immature myeloid suppressor cells // Int Immunol.- 2002.- N14(10).- P.1125-1131. DIO: 10.1093/intimm/dxf076

19 Mencacci A., Montagnoli C., Bacci A., Cenci E., Pitzurra L., Spreca A., Kopf M., Sharpe A.H., Romani L. CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis // J Immunol. – 2002. – N169. – P.3180-3189. DIO: 10.4049/jimmunol.169.6.3180

20 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes // CETS 123. Strasbourg. – 1986. – 11 p.

21 Subiza J.L.,Vinuela J.E., Rodriguez R., Gil J., Figueredo M.A., De la Concha E.G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice // Int J Cancer. – 1989. – N44. – P307-314. DIO: 10.1002/ijc.2910440220

References

1 Prasad S., Sung B., Aggarwal B.B. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation // Prev Med. – 2012. – N54. – P.29–37. DOI:10.1016/j.ypmed.2011.11.011

2 Yu B.P., Chung H.Y. The inflammatory process in aging // Rev Clin Gerontol.- 2006.- N16.– P.179–187. DOI: 10.1017/S0959259807002110

3 Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark R.A., Roy A.K. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases // Exp Gerontol. – 2000. – N35. – P.521–532. DOI:10.1016/S0531-5565(00)00118-2

4 Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases // J Biochem Mol Biol. – 2003. – N36.– P.95–109. DIO: 10.5483/BMBRep.2003.36.1.095

5 Aggarwal B.B. Nuclear factor-kB: the enemy within // Cancer Cell.- 2004 - N6.– P.203–208. DIO:10.1016/j.ccr.2004.09.003

6 Roy S., Bagchi D., Raychandhuri S.P. Chronic inflammation Molecular pathophysiology, nutritional and therapeutic interventions. – USA: CRC Press, Talor@Francis Group L.L.C. – 2013. – 472 p.

7 Zeyda M., Farmer D., Todoric J., Aszmann O., Speiser M., Györi G., Zlabinger G.J., Stulnig T.M. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production // Int J Obes.- 2007. – N31. – P.1420–1428. DIO: 10.1038/sj.ijo.0803632

8 Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes // Biochem Biophys Res Com. – 2004. – N323. – P.630–635. DIO: 10.1016/j.bbrc.2004.08.145

9 Lan H.Y. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and Inflammation// Int J Biol Sci. – 2011. – N7. – P.1056-1067. DIO: 10.7150/ijbs.7.1056

10 Han G., Li F., Singh T.P., Wolf P., Wang X.J. The Pro-inflammatory Role of TGFβ1: A Paradox? // Int J Biol S. – 2012. – N8(2). – P.228-235. DIO: 10.7150/ijbs.8.228

11 Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system // Nature Rev Immunol. – 2009. – N9.– P.162-174. DIO: 10.1038/nri2506

12 Greten T.F., Manns M.P., Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases // Intern Immunopharm. – 2011. – N11. – P.802–807. DIO: 10.1016/j.intimp.2011.01.003

13 Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer // J Immunol. – 2009. – N182. – P.4499–4506. DOI: 10.4049/jimmunol.0802740

14 Peranzoni E., Zilio S., Marigo I., Dolcetti L., Zanovello P., Mandruzzato S., Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition // Curr Opin Immunol. – 2010. – N22. – P.238–244. DIO: 10.1016/j.coi.2010.01.021

15 Obregón-Henao A., Henao-Tamayo M., Orme I.M., Ordway D.J. Gr1intCD11b+ Myeloid-derived suppressor cells in Mycobacterium tuberculosis Infection // PLOS ONE. – 2013. – N8. – Issue 11 e80669. DIO: 10.1371/journal.pone.0080669

16 Chen S., Akbar S.M., Abe M., Hiasa Y., Onji M. Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus // Clin Exp Immunol.- 2011.- N166.- P.134–142. DIO: 10.1111/j.1365-2249.2011.04445.x

17 Xia S.h., Sha H., Yang L., Ji Y., Ostrand-Rosenberg S., Qi L. Gr-1 CD11b Myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity // J Biol Chem. – 2011. – N286(26). – P.23591–23599. DIO: 10.1074/jbc.M111.237123

18 Goni O., Alcaide P., Fresno M. Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+)) CD11b(+) immature myeloid suppressor cells // Int Immunol.- 2002.- N14(10).- P.1125-1131. DIO: 10.1093/intimm/dxf076

19 Mencacci A., Montagnoli C., Bacci A., Cenci E., Pitzurra L., Spreca A., Kopf M., Sharpe A.H., Romani L. CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis // J Immunol. – 2002. – N169. – P.3180-3189. DIO: 10.4049/jimmunol.169.6.3180

20 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes // CETS 123. Strasbourg. – 1986. – 11 p.

21 Subiza J.L.,Vinuela J.E., Rodriguez R., Gil J., Figueredo M.A., De la Concha E.G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice // Int J Cancer.- 1989.- N44.- P307-314. DIO: 10.1002/ijc.2910440220

Киян В.С.

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Казахстан, г. Астана

Биохимические и иммунологические свойства экскреторно-секреторного антигена *Opisthorchis felineus*

В статье приводятся данные по изучению активности, специфичности и иммуногенности экскреторно-секреторного антигена возбудителя Opisthorchis felineus. Приведена схема получения антигенного продукта, основанная на культивировании марит описторха in vitro в искусственной среде RPMI-1640 и дальнейшей очистке методом центрифугирования. Сравнительные эксперименты по детекции белковых компонентов антигена показывают преимущество метода окраски оксидом серебра над стандартным методом, основанном на использовании раствора Кумасси. Установлено, что в состав экскреторно-секреторного антигена входит до 21 белковой фракции. Использование антигена в непрямом варианте ИФА с сыворотками зараженных собак показало его высокую активность и возможность применения для выявления специфических антител против возбудителя описторхоза. Кроме того, использование указанного антигена для иммунизации лабораторных мышей и сирийских хомяков показало высокую иммунологическую активность антигена и способность вызывать иммунный ответ в организме лабораторных животных.

Ключевые слова: иммунология, Opisthorchis felineus, мариты, экскреторно-секреторный антиген, электрофорез, иммуногенность.

Kiyan V.S.

S. Seifullin Kazakh Agro Technical University
Kazahstan, Astana

Biochemical and immunological properties of excretory-secretory antigen Opisthorchis felineus

The main component at statement of serological reactions is an antigen, which should have the necessary biochemical and immunological properties, high specificity and activity. The article presents data on the production of excretory-secretory antigens of the Opisthorchis felineus pathogen. Describes a scheme for obtaining an antigenic product which is obtained by culturing Opisthorchis pathogens in vitro in the RPMI-1640 synthetic medium and further purified by centrifugation. Comparable experiments for the detection of protein antigen components show advantage silver staining method over the standard method, which is based on using Coomassie solution. Considering this fact, by its author has been proven that in the excretory-secretory antigen includes up to 21 of the protein fraction. The article presents data on the study of activity, specificity and immunogenicity of excretory-secretory antigen. Using the antigen in indirect ELISA version with sera of infected dogs showed its high activity and the possibility of applying for the detection of specific antibodies against the opisthorchiasis pathogen. In addition, the use of said antigen for immunization of laboratory mice and Syrian hamsters showed high immunological activity of antigen and ability to induce an immune response in the organism of laboratory animals.

Key words: immunology, Opisthorchis felineus, a marita, excretory-secretory antigen, electrophoresis, immunogenicity.

Киян В.С.

С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті
Қазақстан, Астана қ.

Opisthorchis felineus экскреторлы-секреторлы антигеннің биохимиялық және иммунологиялық қасиеттері

Мақалада Opisthorchis felineus экскреторлы-секреторлы антигенін алу бойынша мәліметтер енгізілген. In vitro жағдайында описторх маритала-рын RPMI-1640 қоректік ортада культивирлеп, одан әрі тазартуын центрифугалау әдісімен жүзеге асырудың негізіндегі антигендік өнімді алу сызбасы көрсетілген. Антигеннің ақуыз компоненттерін анықтау үшін жасалынған салыстырмалы тәжірибелердің нәтижесінде Кумасси ерітіндісінде негізделген стандартты күміс оксидімен бояу әдісінің артықшылығы анықталған. Экскреторлы-секреторлы антигеннің құрамына 21 ақуыз фракциялары кіретіні анықталды. Жасалған эксперименттер мәліметтері бойынша алынған антигеннің құрамында ақуыздардың бар екендігі анықталды, сонымен қатар, иммунды ферменттік талдау реакциясында белсенділікке ие және оны описторозға қарсы түзілген телімді антиденелерді анықтауға мүмкіндік береді. Осымен қатар алынған мәліметтер бойынша, антиген иммуногенді белсенділікке ие және зертханалық жануарларда иммундық жауапты тудыра алатын қасиетке ие. Мақалада экскреторлы-секреторлы антигенінің белсенділігі, телімділігі, иммуногендігі бойынша мәлімет берілген.

Түйін сөздер: иммунология, Opisthorchis felineus, мариталар, экскреторлы-секреторлы антиген, электрофорез, иммуногенділік.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 576.8:57.083.3

Киян В.С.

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина,
Республика Казахстан, г. Астана
E-mail: vskiyan@gmail.com

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНОГО АНТИГЕНА *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Введение

Иммунология трематодных инфекций на данное время является одним из наименее изученных направлений, и литературные источники говорят лишь об ограниченных наблюдениях, а также содержат незначительные практические данные. Самый важный фактор затрудняющий изучение в данном направлении – это ограниченный доступ к экскреторным и белковым компонентам паразитов. Инфекционной формы возбудителя, необходимой для изучения иммунологических механизмов не всегда хватает. Кроме этого, определенные трудности наблюдаются в выращивании паразита *in vitro*, что также является важным препятствием для прогресса в этой области исследований. Иммунология инфекции *Opisthorchis* в значительной степени связана с серологией и иммунодиагностикой, где основными компонентами являются специфические антигены и иммуноглобулины [1].

В качестве антигенов для иммунодиагностики и количественного анализа иммунного ответа у зараженных хозяев используют различные компоненты паразитов. Они могут быть классифицированы как выделительный (экскреторно-секреторный) и соматический антигены [2-5].

Данные об антигенах *O. felineus* встречающиеся в литературных источниках, в значительной степени связаны с иммунодиагностикой. Были разработаны методы непрямой гемагглютинации, внутрикожного теста на основе использования неочищенного соматического экстракта взрослых червей [6, 7]. Сравнительный анализ этих методов показал, что ИФА является лучшим методом и полученные результаты коррелируют с интенсивностью течения инфекции. Тем не менее, авторами не было указано никакой информации о специфики данного теста. Другой пример отражает результаты исследований белкового состава в антигенах *O. felineus*, полученных из взрослых червей, экстрактов и яиц. Были охарактеризованы и обнаружены фракции с молекулярной массой 105, 74, 70 и 64 кДа, имеющих потенциал для иммунодиагностики [8, 9]. Встречаются данные по разработке специфических антител класса IgM к *O. felineus*, которые затем применены в диагностике острых инфекций [10].

Аналогичные или отличающиеся антигены находятся в разных стадиях развития паразита, начиная от личинок и до созревания взрослых особей. Соматические антигены, легко производимые, и их обычно получают в виде водных экстрактов из соответствующих стадий развития паразита, которые доступны в достаточном количестве, в то время как экскреторно-секреторный продукт паразита получают путем выращивания живых паразитов *in vitro* в небелковых культуральных средах [11, 12, 13]. Цель настоящей работы – отработка методики получения экскреторно-секреторного антигена *Opisthorchis felineus* и изучение его биохимических и иммунологических свойств.

Материалы и методы

При планировании и проведении экспериментов с участием лабораторных животных ориентировались на международные законы и правила, в которых отражены критерии гуманного обращения, содержания и кормления: Международные руководящие принципы для биомедицинских исследований с участием животных, 2012 г (*International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*); Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, 2005 г (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes*); Принципы эвтаназии для животных Американской Ветеринарной Медицинской Ассоциации, 2013 г (*American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals*). На проведение экспериментов с использованием лабораторных животных было получено разрешение Этической комиссии факультета Ветеринарии и технологии животноводства КазАТУ им. С.Сейфуллина, Протокол заседания №1 от 07.04.2015 г.

Половозрелые мариты *O. felineus* получали путем заражения золотых хомячков метацеркариями описторха, выделенных из рыб семейства карповых [14]. Через 80-90 дней после начала заражения, лабораторных животных усыпляли и извлекали печень для исследования на наличие половозрелых форм возбудителя описторхоза.

Для получения экскреторно-секреторного антигена (ЭСА) жизнеспособные мариты *O. felineus* тщательно отмывались от следов желчи и крови стерильным физиологическим раствором и по 100 экземпляров помещались в матрас с синтетической средой RPMI-1640 не содержащей белковые компоненты. Культивирование проводилось при 37°C и 5% содержании углекислого газа для накопления экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) возбудителя описторхоза. После 14-16 часов культивирования, проводили смену среды и дальнейшее культивирование в течение 5-6 суток для накопления максимальной концентрации ЭСП в питательной среде (рисунок 1).

Рисунок 1 – Схема получения экскреторно-секреторного антигена

После культивирования половозрелых марит *O. felineus* в условиях *in vitro*, проводили сбор культуральной среды, которую очищали от клеточного детрита с помощью центрифугирования в течение 10 минут при 15 000 оборотов в минуту. Измеряли концентрацию белка в полученной культуральной жидкости и использовали ее в качестве экскреторно-секреторного антигена.

Для детекции белков антигенного препарата проводили окраску двумя методами — раствором Кумасси и оксидом серебра. Электрофорез проводили в 4-15% градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия на аппарате для вертикального электрофореза («*BioRad*», США). Для разделения образцов нами использовались коммерческие градиентные гели 4-12% («*BioRad*», США). Буфер для разведения образцов готовили следующим образом: к 950 мкл 4$^{\times}$ буферу («*BioRad*», США), добавляли 50 мкл меркаптоэтанола. Образцы разводили в соотношении 1:1, кипятили в течение 5 минут при 100°С и охлаждали. Электрофорез проводили при двух режимах: при напряжении 125 В (10 мин) и 200 В (30 мин). В качестве белкового стандарта использовали маркер молекулярной массы 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25 и 20 кДа («*BioRad*», США). Процесс окраски гелей раствором серебра осуществляли согласно инструкции по применению набора «*SilverQuest Staining Kit*» («*Invitrogen*», США). Анализ антигенов на наличие количественного состава осуществляли с использованием программного обеспечения *Photo-Capt Version* 12.4 («*Vilber Lourmat*», Франция).

Иммунизация лабораторных животных. Для эксперимента использовались беспородные белые мыши одного пола, возрастом 1,5 – 2 месяцев, массой 12-14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Мышам в первый день иммунизации вводили внутрибрюшинно по 100 мкг антигена в 0,1 мл полного адъюванта Фрейда («Sigma», США). На 7 день по 100 мкг антигена в 0,1 мл неполного адъюванта Фрейда. На 11, 12, 13 дни иммунизации животным инъецировали по 100 мкг антигена в забуференном физиологическом растворе, pH 7,2-7,4 [15]. Группа сирийских хомяков формировалась из животных одного пола, возрастом 2-2,5 месяцев, массой 100-120 г. Схема иммунизации хомяков аналогична схеме при работе с мышами. Особенностью является то, для хомяков количество вводимого антигена составляло 200 мкг на одно животное.

Активность полученного антигена определяли в непрямом варианте ИФА. Антиген сенсибилизировали в лунки планшета кон-центрацией 10 мкг/мл в объеме 100 мкл. Затем проводили блокирование свободных участков 1% раствором БСА, после чего проводили титрование сывороток, начиная с разведения 1:100. Сыворотки от зараженных животных, используемые для проверки активности экскреторно-секреторного антигена, были получены в предыдущих экспериментах по изучению возможности искусственного заражения собак возбудителем описторхоза в лабораторных условиях [16], негативом служила сыворотка здорового животного. В качестве конъюгата использовали антивидовые антитела меченные ферментом пероксидазой хрена (*Anti-dog IgG*).

Результаты и их обсуждение

Объем полученного экскреторно-секреторного антигена составил 100 мл, концентрация белка в антигене была равна 1 мг/мл. Данный антиген использовался для изучения белкового состава.

При окрашивании антигенного препарата с помощью раствора Кумасси, детекция белковых компонентов была затруднена из-за низкого разрешения и размытости рисунка (рисунок 2), хотя наблюдается большое количество белковых полос в изучаемых образцах.

Поэтому дальнейшие наши эксперименты включали концентрирование имеющихся антигенов методом выпаривания и использования для окраски коммерческих наборов с высокой чувствительностью, основанных на окраске белков раствором оксида серебра.

Результаты подробного количественного белкового состава антигена, полученного в этом эксперименте, представлены на рисунке 3.

Результат, представленный на рисунке 3, позволяет более детально изучить количественный белковый состав антигена, что говорит о лучшей чувствительности данного метода окраски, по сравнению с другими методами. Так, в составе экскреторно-секреторного антигена нами был детектирован 21 мажорный белок с молекулярной массой 283, 262, 248, 237, 220, 212, 178, 119, 73, 67, 63, 55, 53, 51, 47, 46, 38, 30, 28, 27 и 25 кДа. При этом концентрация указанных белков была различной, что отчетливо видно на рисунке 3 по интенсивности окраски белковых полос.

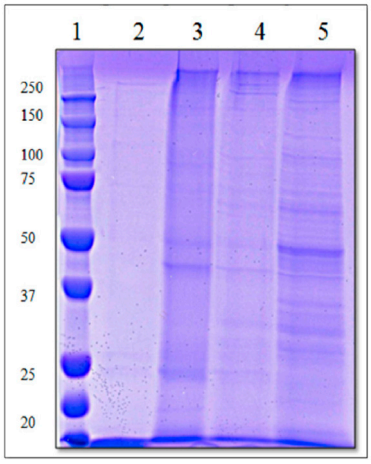


Рисунок 2 – Результаты электрофоретического разделения антигенных препаратов в 4-15% градиентном ПААГ и окраски раствором Кумасси: 1 – маркер (кДа), 2- ЭСП, 3 – 1 фракция СА, 4 – 2 фракция СА, 5 – яичный антиген

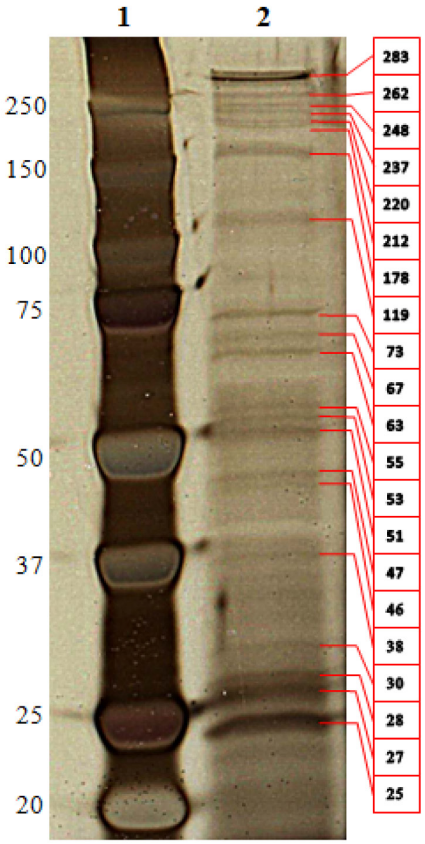
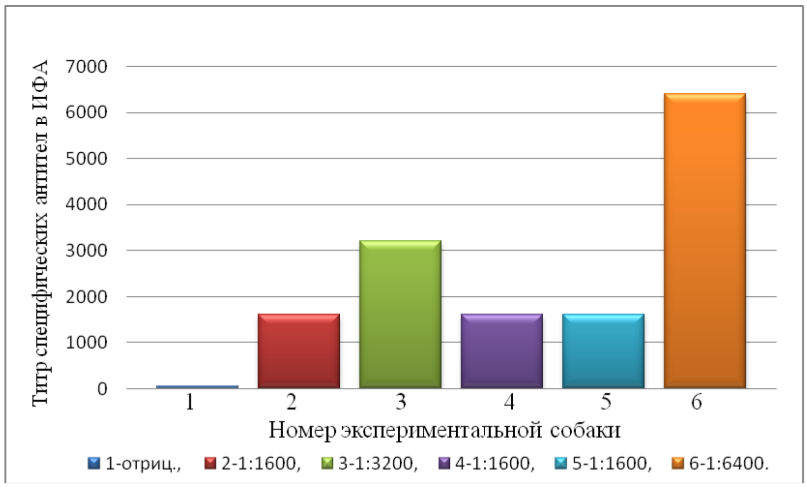


Рисунок 3 – Результаты электрофоретического разделения ЭСА: 1 – белковый маркер, 2 – экскреторно-секреторный антиген

Активность полученного антигена была в непрямом варианте ИФА и показала довольно высокие показатели при использовании специфических сывороток (рисунок 4).



Рисуок 4 – Активность экскреторно-секреторного антигена в непрямом ИФА

Из рисунка 4 видно, что полученный экскреторно-секреторный антиген обладает довольно хорошей активностью и специфичностью. При использовании позитивных сывороток, средний титр составил 1:2400±0,78. Негативная сыворотка показала отрицательный результат. Эти данные позволяют использовать ЭСА при определении специфических антител против возбудителя описторхоза, а сыворотки зараженных собак – для детекции и идентификации иммуногенных белков, входящих в состав ЭСА. Иммуногенность экскреторно-секреторного антигена была проверена путем иммунизации лабораторных животных, среди которых беспородные лабораторные мыши и сирийские хомячки. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку не иммунизированного животного. Результаты иммунизации лабораторных животных и титры антител представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты тестирования сыворотки лабораторных животных, иммунизированных ЭСА

№ п/п	Показатели титров антител	
	Беспородные лабораторные мыши	Сирийские хомячки
1	1:3200	1:6400
2	1:200	1:6400
3	1:200	1:3200
4	1:1600	1:800
5	1:200	1:400
6 (К-)	-	-
В среднем	1080±0,84	3440±0,76

Данные таблицы 1 показывают, что полученный экскреторно-секреторный антиген обладает достаточной иммуногенностью, чтобы вызывать образование специфических антител. Стоит отметить, что титры иммунизированных сирийских хомяков были в пределах 1:400-1:6400, что намного выше титров иммунизированных мышей, которые находились в пределах 1:200-1:3200. Эти данные указывают на способность компонентов, входящих в состав данного экскреторно-секреторного антигена вызывать специфический иммунитет в организме хозяина, в котором идет паразитирование описторхов.

Таким образом, в результате проделанной работы можно сделать вывод, что полученный по указанной схеме экскреторно-секреторный антиген в своем составе имеет более 21 белковой фракции, обладает иммуногенными свойствами и может служить в качестве антигенного материала при детекции специфических антител к возбудителю *O. felineus*.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках научного проекта №0115RK00487 на 2015-2017 гг.

Литература

1 Wongratanacheewin S., Sermswan R.W., Sirisinha S. Immunology and molecular biology of Opisthorchis viverrini infection // Acta Trop. – 2003. – Vol. 88(3). – P. 195-207. DOI:10.1016/j.actatropica.2003.02.002

2 Sun T., Gibson J.B. Antigens of Clonorchis sinensis in experimental and human infections // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1969. – Vol. 18. – P. 241-252.

3 Sun T., Gibson J.B. Metabolic products of adult Clonorchis sinensis: their composition and antigenic potential // J. Helminthol. – 1969. – Vol. 43. P. 395-402.

4 Kojima S., Yokogawa M., Tada T. Production and properties of reaginic antibodies in rabbits infected with Clonorchis sinensis or Schistosoma japonicum // Exp. Parasitol. – 1974. – Vol. 35. – P. 141-149.

5 Chen C.Y., Hsieh W.C., Shih H.H., Chen S.N. Immunodiagnosis of clonorchiasis by enzyme-linked immunosorbent assay // Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health. – 1988. – Vol. 19. – P. 117-121.

6 Klebanovskaia I.A. Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. I. A method of isolating erythrocyte samples and the results of their diagnostic use in experimental opisthorchiasis in golden hamsters // Med. Parazitol. (Mosk). – 1981. – Vol. 50. – P. 20-23.

7 Klebanovskaia I.A. Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. 3. An economic method of obtaining a dried, erythrocyte opisthorchid antigenic diagnostic agent // Med. Parazitol. (Mosk). – 1985. – Vol. 54. – P. 25-27.

8 Glupov V.V., Khokhlova N.I., Khvoshchevskaia M.F., Vodianitskaia S.N., Iurlova, N.I. The use of immunoblotting for studying Opisthorchis felineus (Rivolta, 1884) antigens // Med. Parazitol. (Mosk). – 1997. – Vol. 66. – P. 17-19.

9 Kotelkin A.T., Razumov I.A., Pokrovskii I.V., Loktev V.B. A comparative study of the somatic, excretory-secretory and egg antigens of Opisthorchis felineus // Med. Parazitol. (Mosk). – 1997. – Vol. 66. – P. 12-16.

10 Meniavtseva T.A., Ratner G.M., Struchkova S.V., Kolmakova M.V., Stepanova T.F., Lepekhin A.V., Maier V.A., Postnikova T.F. Immunoenzyme analysis in the diagnosis of opisthorchiasis. I. The development of an immunoenzyme method for determining IgM antibodies to the Opisthorchis antigen // Med. Parazitol. (Mosk). – 1996. – Vol. 65. – P. 41-43.

11 Wongratanacheewin S., Sirisinha S. Analysis of Opisthorchis viverrini antigens: physicochemical characterization and antigen localization // Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health. – 1987. – Vol. 18. – P. 511-520.

12 Wongratanacheewin S., Chawengkirttikul R., Bunnag D., Sirisinha S. Analysis of Opisthorchis viverrini antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis // Parasitology. – 1988. – Vol. 96. – P. 119-128.

13 Боровиков С.Н., Куйбагаров М.А., Сураншиев Ж.А., Баешева Д.А., Атыгаева С.К., Халикова А.С. Получение и изучение иммунохимических свойств антигенов описторхов // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – №4. – С. 70-74.

14 Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of Opisthorchis felineus and Opisthorchis viverrini in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke // Parasitol Int. – 2012. – Vol. 61(1). – P. 167-172. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.005.

15 Фридлянская И.И. Получение поликлональных антител // Методы культивирования клеток: Сб. науч. трудов, Л.: Наука. – 1988. – С. 194-205.

16 Киян В.С., Токпан С.С., Байболин Ж.К., Тетерин А.В., Мертасов А.Г. Гематологические показатели собак при искусственном заражении описторхозом // Вестник ПГУ. Серия Химико-биологическая, Павлодар. – 2015. – №3. – С. 12-20.

References

1 Wongratanacheewin S, Sermswan RW, Sirisinha S (2003) Immunology and molecular biology of Opisthorchis viverrini infection, Acta Trop, 88:195-207. DOI:10.1016/j.actatropica.2003.02.002

2 Sun T, Gibson JB (1969) Antigens of Clonorchis sinensis in experimental and human infections, Am. J. Trop. Med. Hyg., 18:241-252.

3 Sun T, Gibson JB (1969) Metabolic products of adult Clonorchis sinensis: their composition and antigenic potential, J. Helminthol., 43:395-402.

4 Kojima S, Yokogawa M, Tada T (1974) Production and properties of reaginic antibodies in rabbits infected with Clonorchis sinensis or Schistosoma japonicum, Exp. Parasitol., 35:141-149.

5 Chen CY, Hsieh WC, Shih HH, Chen SN (1988) Immunodiagnosis of clonorchiasis by enzyme-linked immunosorbent assay, Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health., 19:117-121.

6 Klebanovskaia I.A. (1981) Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. I. A method of isolating erythrocyte samples and the results of their diagnostic use in experimental opisthorchiasis in golden hamsters, Med. Parazitol. (Mosk)., 50:20-23.

7 Klebanovskaia IA (1985) Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. 3. An economic method of obtaining a dried, erythrocyte opisthorchid antigenic diagnostic agent, Med. Parazitol. (Mosk)., 54:25-27.

8 Glupov VV, Khokhlova NI, Khvoshchevskaia MF, Vodianitskaia SN, Iurlova NI (1997) The use of immunoblotting for studying Opisthorchis felineus (Rivolta, 1884) antigens, Med. Parazitol. (Mosk)., 66:17-19.

9 Kotelkin AT, Razumov IA, Pokrovskii IV, Loktev VB (1997) A comparative study of the somatic, excretory-secretory and egg antigens of Opisthorchis felineus, Med. Parazitol. (Mosk)., 66:12-16.

10 Meniavtseva TA, Ratner GM, Struchkova SV, Kolmakova MV, Stepanova TF, Lepekhin AV, Maier VA, Postnikova TF (1996) Immunoenzyme analysis in the diagnosis of opisthorchiasis. I. The development of an immunoenzyme method for determining IgM antibodies to the Opisthorchis antigen, Med. Parazitol. (Mosk)., 65:41-43.

11 Wongratanacheewin S, Sirisinha S (1987) Analysis of Opisthorchis viverrini antigens: physicochemical characterization and antigen localization, Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health., 18:511-520.

12 Wongratanacheewin S, Chawengkirttikul R, Bunnag D, Sirisinha S (1988) Analysis of Opisthorchis viverrini antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis, Parasitology, 96:119-128.

13 Borovikov SN, Kuibagarov MA, Suranshiev ZhA, Baesheva DA, Atygaeva SK, Khalikova AS (2010) Preparation and study immunochemical properties of the opistorchis antigens [Poluchenie i izuchenie immunokhimicheskikh svoistv antigenov opistorkhov], Biothechnology. Theory and practice, 4:70-74. (In Russian)

14 Lvova MN, Tangkawattana S, Balthaisong S, Katokhin AV, Mordvinov VA, Spira B (2012) Comparative histopathology of Opisthorchis felineus and Opisthorchis viverrini in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke, Parasitol Int., 61:167-172. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.005.

15 Fridlianskaia II (1988) Preparation the polyclonal antibody. Cell culture techniques [Poluchenie poliklonal'nykh antitel. Metody kul'tivirovaniia kletok], Bullet of scientific papers, Nauka, Leningrad, 194-205. (In Russian)

16 Kiyan VS, Tokpan SS, Baibolin ZhK, Teterin AV, Mertasov AG (2015) Hematologic indicators of the dogs under artificial infection by opisthorchiasis [Gematologicheskie pokazateli sobak pri iskusstvennom zarazhenii opistorkhozom], Bulletin of PSU. A series of chemical and biological, Pavlodar, 3:12-20. (In Russian)

7-бөлім

МИКРОБИОЛОГИЯ

Раздел 7

МИКРОБИОЛОГИЯ

Section 7

MICROBIOLOGY

[1]Кушнаренко С.В., [1]Утегенова Г.А., [2]Шегебаева А.А., [3]Озек Г., [3]Озек Т., [4]Абидкулова К.Т., [5]Котухов Ю.А., [5]Данилова А.Н.

[1]Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы
[2]Республиканская коллекция микроорганизмов, Казахстан, г. Астана
[3]Анатолийский университет, Турция, г. Эскишехир
[4]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[5]Алтайский ботанический сад, Казахстан, г. Риддер

Антимикробная активность эфирных масел некоторых растений Казахстана

Определена антимикробная активность 15 образцов эфирных масел, выделенных из 9 видов растений Казахстана: Artemisia kotuchovii Kupr., Artemisia scoparia Waldst. et Kit., Artemisia absinthium L., Ferula iliensis Krasn. ex Korovin, Ferula ovina (Boiss.) Boiss., Heracleum dissectum Ldb., Angelica decurrens (Ledeb.) B. Fedtsch., Thymus marschallianus Willd. и Juniperus sabina L. Эфирные масла были получены из отдельных частей растений на разных фазах вегетации. Наибольший ингибирующий эффект в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов имело эфирное масло Thymus marschallianus, которое в концентрации 0,31 мкг/мл полностью ингибировало рост Staphylococcus aureus, Escherichia coli и Candida albicans. Высокой антимикробной активностью также обладали эфирные масла из корней эндемичного вида Ferula iliensis: в концентрации 0,31 мкг/мл. Эти эфирные масла полностью подавляли рост Candida albicans, а в концентрации 2,5 мкг/мл ингибировали рост Staphylococcus aureus и Escherichia coli. Эфирное масло, выделенное из цветков и листьев полыни Котухова, в концентрации 1,25 мкг/мл подавляло рост всех исследуемых нами штаммов микроорганизмов. Это первое исследование, демонстрирующее антимикробную активность эндемичных видов Казахстана – Ferula iliensis и Artemisia kotuchovii.

Ключевые слова: эфирные масла, антимикробная активность, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans.

---

[1]Kushnarenko S.V., [1]Utegenova G.A., [2]Shegebaeva A.A., [3]Ozek G., [3]Ozek T., [4]Abidkulova K.T., [5]Kotukhov Y.A., [5]Danilova A.N.

[1]Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty
[2]Republican Collection of Microorganisms, Kazakhstan, Astana
[3]Anadolu University, Turkey, Eskishehir
[4]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[5]Altai Botanical Garden, Kazakhstan, Ridder

Antimicrobial activity of essential oils from several Kazakhstan plants

Antimicrobial activity of 15 essential oil samples extracted from nine Kazakhstan plant species: Artemisia kotuchovii Kupr., Artemisia scoparia Waldst. et Kit., Artemisia absinthium L., Ferula iliensis Krasn. ex Korovin, Ferula ovina (Boiss.) Boiss., Heracleum dissectum Ldb., Angelica decurrens (Ledeb.) B. Fedtsch., Thymus marschallianus Willd. and Juniperus sabina L. has been determined. Essential oils were obtained separately from various plant parts at different phases of vegetation. Essential oil from Thymus marschallianus had the highest inhibitory effect on all the strains of microorganisms tested; at 0.31 μg/ml, it completely inhibited the growth of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. High antimicrobial activity also possessed the essential oils from roots of endemic species Ferula iliensis; at 0.31 μg/ml these essential oils completely inhibited the growth of Candida albicans, and at 2.5 μg/ml also inhibited the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Essential oil extracted from the flowers and leaves of Artemisia kotuchovii at 1.25 μg/ml inhibited the growth of all the microorganisms studied. This is the first study demonstrating the antimicrobial activity of Kazakhstan's endemic species – Ferula iliensis and Artemisia kotuchovii.

Key words: essential oils, antimicrobial activity, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans.

---

[1]Кушнаренко С.В., [1]Утегенова Г.А., [2]Шегебаева А.А., [3]Озек Г., [3]Озек Т., [4]Абидкулова К.Т., [5]Котухов Ю.А., [5]Данилова А.Н.

[1]Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы, Қазақстан, Астана қ.
[3]Анадолу университеті, Түркия, Эскишехир қ.
[4]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[5]Алтай ботаникалық бағы, Қазақстан, Риддер қ.

Қазақстанның кейбір эндем өсімдіктерінің эфир майларының антимикробтық белсенділігі

Қазақстанның өсімдіктерінің 9 түрінен: Artemisia kotuchovii Kupr., Artemisia scoparia Waldst. et Kit., Artemisia absinthium L., Ferula iliensis Krasn. ex Korovin, Ferula ovina (Boiss.) Boiss., Heracleum dissectum Ldb., Angelica decurrens (Ledeb.) B. Fedtsch., Thymus marschallianus Willd. және Juniperus sabina L. бөліп алынған эфир майларының 15 үлгілерінің антимикробтық белсенділігі анықталды. Эфир майлары әртүрлі вегетация фазасындағы өсімдіктердің жеке мүшелерінен бөліп алынды. Микроорганизмдердің барлық зерттелген штаммдарына қатысты ең жоғары тежеуші әсерді Thymus marschallianus эфир майы көрсетті. Thymus marschallianus эфир майы 0,31 мкг/мл концентрацияда Staphylococcus aureus, Escherichia coli және Candida albicans өсуін толығымен тежеді. Эндем түр Ferula iliensis тамырларынан алынған эфир майлары жоғары антимикробтық белсенділікке ие болды: 0,31 мкг/мл концентрацияда Candida albicans өсуін толығымен тежеді, ал 2,5 мкг/мл концентрацияда Staphylococcus aureus және Escherichia coli өсуін тежеді. Котухов жусанының гүлдері және жапырақтарынан бөліп алынған эфир майы 1,25 мкг/мл концентрацияда зерттелген барлық микроорганизмдердің өсуін тежеді. Бұл Қазақстанның эндем өсімдіктері – Ferula iliensis және Artemisia kotuchovii антимикробтық белсенділігін көрсететін бірінші зерттеу жұмысы.

Түйін сөздер: эфир майлары, антимикробтық белсенділік, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 581.19; 547.52/.68

[1*]Кушнаренко С.В., [1]Утегенова Г.А., [2]Шегебаева А.А., [3]Озек Г., [3]Озек Т., [4]Абидкулова К.Т., [5]Котухов Ю.А., [5]Данилова А.Н.

[1]Институт биологии и биотехнологии растений, Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Республиканская коллекция микроорганизмов, Республика Казахстан, г. Астана
[3]Анатолийский университет, Турецкая Республика, г. Эскишехир
[4]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы
[5]Алтайский ботанический сад, Республика Казахстан, г. Риддер
[*]E-mail: svetlana_bio@mail.ru

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ КАЗАХСТАНА

Введение

Эфирные масла обладают широким спектром биологической активности, что обусловлено присутствием в их составе активных компонентов, таких как моно- и сесквитерпены, ароматические и алифатические фенольные производные. С точки зрения фармакологии, наиболее важными эффектами эфирных масел являются их антимикробное, цитотоксическое, иммуномодулирующее, противовоспалительное, противовирусное и антиоксидантное действие, именно на исследованиях этих свойств нацелены усилия ученых всего мира [1-3].

Во многих исследованиях приводятся экспериментальные данные, что эфирные масла оказывают антимикробное действие на устойчивые формы микроорганизмов, например, на стафилококки, резистентные к антибиотикам [4, 5]. Изучение новых веществ с антимикробной активностью – это одно из важнейших направлений преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов. Биологическая активность эфирных масел связана с активностью основных компонентов масла [6]. В работе казахстанских исследователей эфирные масла полыни гладкой, мяты перечной и тимьяна Маршалла, основные компоненты 1,8-цинеол и тимол, а также хлорпроизводное лимонена и терахлокарбенпроизводное γ-терпинена при высокой концентрации ингибировали рост и размножение *S. aureus* и *E. coli* [7]. Также было проверено влияние эфирных масел растений семейства *Lamiaceae* Акмолинской области. Эфирные масла *Satureja hortensis* L. и *Ocimum basilicum* L. проявили значительную антимикробную активность в отношении тест-культур микроорганизмов *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *S.aureus* и *Bacillus cereus* [8]. Основными компонентами, определяющими антимикробные свойства эфирных масел, считаются окисленные терпеноиды, такие как спирты и фенольные терпены [9-13]. Механизмы противомикробного действия компонентов эфирных масел включают в себя последовательное торможение общего биохимического пути, ингибирование защитных ферментных систем бактерий и изменение проницаемости клеточной стенки, что способствует повышению поглощения других противомикробных препаратов [10]. Нетрадиционные методы

лечения натуральными веществами могут являться эффективным средством против бактериальных инфекций и использоваться в качестве альтернативы антибиотикам.

В связи с этим, целью проводимых исследований являлось изучение *in vitro* антимикробной активности 15 образцов эфирных масел в отношении трех условно-патогенных тест-штаммов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Материалы и методы

Объекты исследования

Для выделения эфирных масел были использованы 9 видов растений Казахстана, относящиеся к 4 семействам, собранные в естественных местах произрастания в Восточно-Казахстанской и Алматинской областях: Asteraceae: *Artemisia kotuchovii* Kupr. (полынь Котухова), *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. (полынь метельчатая), *Artemisia absinthium* L. (полынь горькая); Apiaceae: *Ferula iliensis* Krasn. ex Korovin (ферула илийская), *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. (ферула овечья), *Heracleum dissectum* Ldb. (борщевик рассеченный), *Angelica decurrens* (Ledeb.) B. Fedtsch. (дягиль низбегающий), Lamiaceae: *Thymus marschallianus Willd.* (тимьян Маршалла); Cupressaceae: *Juniperus sabina* L. (можжевельник казачий). Два вида из перечисленных – *Artemisia kotuchovii* и *Ferula iliensis* являются эндемиками Казахстана [14, 15].

Сбор растительного материала, экстракция эфирных масел и идентификация компонентов эфирных масел

Сбор образцов растений проводили согласно методике рендомизированного отбора с указанием географических координат точки сбора (широта, долгота, высота над уровнем моря), определяемых с помощью GPS-навигатора eTREX®H («Garmin», Тайвань). Экстракцию эфирных масел проводили методом гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера («Ildam», Турция) из воздушно сухой массы растительного сырья. Компонентный состав эфирных масел был определен методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (GC-FID) и масс-спектрометрией (GC/MS). GC-FID анализ проводили с использованием системы Agilent 6890N GC; GC/MS анализ – с использованием системы Agilent 5975 GC-MSD («Agilent», США; SEM Ltd., Турция). Идентификация компонентов эфирных масел проведена путем сравнения их хроматографических пиков времени удерживания и масс-спектров со стандартами, проанализированными в этих же условиях, а также путем сравнения индекса удерживания (индекс Ковача) с литературными данными. Были использованы стандартные растворы n-алканов А С9–С20 производства (Fluka, Buchs, Швейцария). Сравнение образцов при масс-спектрометрии проводилось со стандартами в базах данных Wiley GC/MS Library (Wiley, New York, NY, USA), MassFinder software 4.0 (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg, Germany), Adams Library и NIST Library, а также в базе данных “Baser Library of Essential Oil Constituents” Анатолийского университета, г. Эскишехир, Турция.

Изучение антимикробной активности эфирных масел

Антимикробную активность эфирных масел определяли в отношении тест-штаммов: *Staphylococcus aureus* B-RKM 0470, *Escherichia coli* B-RKM 0447 и *Candida albicans* Y-RKM 0475 из РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» (Казахстан, г. Астана). Для определения антимикробной активности использовали метод серийных разведений в жидкой питательной среде [16]. *S. aureus* и *E. coli* культивировали на питательном бульоне (Hi-Media, Индия); *C. albicans* – на бульоне Сабуро (Оболенск, Россия). Образцы эфирных масел растворяли в 90% этиловом спирте. Посев культур микроорганизмов проводили в пробирки с 0,5 мл питательного бульона, содержащие следующие концентрации эфирных масел: 0,075; 0,15; 1,31; 0,62; 1,25; 2,5 и 5,0 мкг/мл. Освеженную (суточную) культуру исследуемых бактерий вносили в количестве 0,5 мл титром клеток: *S. aureus* – $1,6\times10^8$ КОЕ/мл, *E. coli* – $2,5\times10^8$ КОЕ/мл, *C. albicans* – $2,5\times10^8$ КОЕ/мл. Инкубацию проводили при температуре 37°С в течение 24-48 ч. В качестве положительного контроля использовали питательный бульон в сочетании с этиловым спиртом (90%); отрицательного – инокулят микроорганизмов в питательном бульоне.

Эксперименты проводили в 3-х повторностях. Статистический анализ осуществляли по общепринятым методикам.

Результаты и их обсуждение

Антимикробная активность была определена у 15 образцов эфирных масел, выделенных из девяти видов растений. Эфирные масла были получены из отдельных частей растений на разных фазах вегетации:

Artemisia scoparia (полынь метельчатая), надземная часть, фаза цветения; место сбора – Алматинская область;

Ferula iliensis (ферула илийская), соцветия; место сбора – Алматинская область;

Ferula iliensis (ферула илийская), корень в фазе цветения;

Ferula iliensis (ферула илийская), зонтики с семенами;

Ferula iliensis (ферула илийская), корень в фазе плодоношения;

Ferula ovina (ферула овечья), зонтики с семенами; место сбора – Алматинская область;

Ferula ovina (ферула овечья), корень в фазе плодоношения;

Angelica decurrens (дягиль низбегающий), зонтики с семенами; место сбора – Восточно-Казахстанская область;

Artemisia absinthium (полынь горькая), бутоны + листья, фаза бутонизации; место сбора – Восточно-Казахстанская область;

Artemisia absinthium (полынь горькая), стебли, фаза бутонизации;

Artemisia кotuchovii (полынь Котухова), цветки + листья, фаза цветения; место сбора – Восточно-Казахстанская область;

Artemisia кotuchovii (полынь Котухова), стебли, фаза цветения;

Heracleum dissectum (борщевик рассеченный), зонтики с семенами; место сбора – Восточно-Казахстанская область;

Juniperus sabina (можжевельник казачий), побеги, фаза роста побегов; место сбора – Восточно-Казахстанская область;

Thymus marschallianus (тимьян Маршалла), листья + стебли+цветки, фаза цветения; место сбора – Восточно-Казахстанская область.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии антимикробной активности различной степени выраженности исследуемых эфирных масел (таблица 1-3). Наибольший ингибирующий эффект в отношении всех взятых в эксперимент культур микроорганизмов имело эфирное масло *Thymus marschallianus*, которое в концентрации 0,31 мкг/мл полностью ингибировало рост *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* после суток культивирования.

Значительная антимикробная активность эфирного масла *Thymus marschallianus* обусловлена высоким содержанием в нем монотерпеновых фенолов, таких как тимол и карвакрол. В исследуемом нами образце *Thymus marschallianus*, собраном в Южном Алтае, содержание тимола составило 37,1%, карвакрола – 2,2% от общей массы эфирного масла.

Наивысшая антимикробная активность в отношении представителя условно патогенной микрофлоры человека – *C. albicans*, также выявлена у эфирного масла *Ferula iliensis*, выделенного из корней в фазе цветения и корни в фазе плодоношения. В концентрации 0,31 мкг/мл эти эфирные масла (*Ferula iliensis*, корни в фазе цветения и корни в фазе плодоношения) полностью подавляли рост патогена, и даже в минимальной испытанной концентрации 0,075 мкг/мл показатели жизнеспособности *C. albicans* были ниже на 3-6 порядков по сравнению с контролем. Эти же образцы эфирных масел в концентрации 2,5 мкг/мл также полностью подавляли рост *S. aureus* и *E. coli*.

Кроме этого, эфирные масла из зонтиков с семенами *Ferula iliensis* и *Ferula ovina* эффективны в концентрации 2,5 мкг/мл для ингибирования роста *S. aureus*. Значительная антимикробная активность эфирного масла *Ferula iliensis* может быть обусловлена высоким содержанием в нем сераорганических соединений, таких как *trans*-пропенил сек бутил дисульфид и *cis*-пропенил сек бутил дисульфид, которые составляют 63,8% от общей массы эфирного масла. Так, в литературе сообщается об антимикробной активности эфирного масла, полученного из *Ferula assa-foetida* – вида ферулы, произрастающего в Иране [17]. В эфирном масле этого растения также идентифицированы органические дисульфиды – (*Z*)-1-пропенил сек-бутил дисульфид (27,7%) и (*E*)-1-пропенил сек-бутил дисульфид (20,3%).

Высокой антимикробной активностью также обладали эфирные масла из *Artemisia кotuchovii* и *Angelica decurrens*. Эфирное масло, выделенное из цветков и листьев полыни Котухова, при концентрации 1,25 мкг/мл полностью подавляло рост всех исследуемых нами штаммов микроорганизмов. Доминирующими компонентами эфирного масла *Artemisia кotuchovii* являются метилхавикол (эстрагол) (75,1- 76,6%), метил эвгенол (4,3-4,6%), (*Z*)-β-оцимен (3,8-3,9%) и (*E*)-β-оцимен (4,4-5,3%) [18]. Метилкавикол – органическое вещество фенольного ряда, а также монотерпены ((*Z*)-β-оцимен и и (*E*)-β-оцимен) могут обуславливать высокую антимикробную активность эфирного масла *Artemisia кotuchovii*.

Как показали проведенные нами исследования, основными компонентами эфирного масла *Angelica decurrens*, вида, произрастающего в Восточном Казахстане, являются монотерпены: в листьях они составляют 79,2% от общего объема эфирного масла, в зонтиках с семенами – 90,7%, в стеблях – 44, 3%, в корнях – 92,1%. В образце эфирного масла *Angelica decurrens*, который мы использовали для тестирования на антимикробную активность – в зонтиках с семенами, главным образом преобладает β-фелландрен, составляющий 55,5% эфирного масла. Можно предполагать, что монотерпены, составляющие эфирного масла *Angelica decurrens*, определяют его высокие антимикробные свойства.

Таблица 1 – Влияние эфирных масел на жизнеспособность Staphylococcus aureus

Образцы эфирных масел	Концентрация эфирных масел, мкг/мл							Этанол 90%	Контроль
	5,0	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075		
Показатель жизнеспособности, КОЕ/мл, (п = 3; M±m)									
Artemisia scoparia	0	0	0	19,5±0,5 x 10^{10}	24,5±1,5 x 10^{10}	25,0±0,6 x 10^{10}	25,5±0,5 x 10^{10}	22,4±1,5 x 10^{8}	49,3±1,1 x 10^{10}
F. iliensis соцветия	0	32,7±3,7 x 10^{9}	40,0±5,8 x 10^{10}	43,0±3,5 x 10^{10}	43,3±1,5 x 10^{10}	40,7±0,7 x 10^{10}	45,0±2,1 x 10^{10}		
F. iliensis корни в фазе цветения	0	0	53,3±3,3 x 10^{10}	45,0±2,9 x 10^{10}	47,7±3,0 x 10^{10}	49,3±2,4 x 10^{10}	50,3±2,6 x 10^{10}		
F. iliensis зонтики с семенами	0	0	35,0±2,9 x 10^{10}	37,3±3,7 x 10^{10}	33,7±2,3 x 10^{10}	31,3±2,9 x 10^{10}	29,7±2,7 x 10^{10}		
F.iliensis корни в фазе плодоношения	0	0	20,3±0,9 x 10^{10}	26,7±1,8 x 10^{10}	32,0±1,2 x 10^{10}	37,7±1,5 x 10^{10}	39,3±5,2 x 10^{10}		
Ferula ovina, зонтики с семенами	0	0	16,0±3,1 x 10^{10}	19,0±2,7 x 10^{10}	26,7±3,3 x 10^{10}	31,3±1,8 x 10^{10}	38,7±1,3 x 10^{10}		
Ferula ovina, корни в фазе плодоношения	0	2,7±0,3 x 10^{3}	63,7±1,9 x 10^{10}	58,3±1,7 x 10^{10}	55,7±0,3 x 10^{10}	53,3±1,8 x 10^{10}	48,0±2,5 x 10^{10}		
Angelica decurrens	0	0	0	26,7±3,3 x 10^{10}	27,3±3,7 x 10^{10}	25,7±2,3 x 10^{10}	23,0±3,0 x 10^{10}		
Artemisia absinthium, бутоны + листья	0	1,0±0,5 x 10^{10}	2,5±0,5 x 10^{10}	19,5±0,4 x 10^{10}	30,0±1,0 x 10^{10}	33,0±1,5 x 10^{10}	39,0±2,0 x 10^{10}		
Artemisia absinthium, стебли	0	9,0±0,5 x 10^{10}	14,0±1,0 x 10^{10}	26,5±1,5 x 10^{10}	38,5±0,5 x 10^{10}	43,5±2,5 x 10^{10}	50,5±5,5 x 10^{10}		
Artemisia kotuchovii, цветки + листья	0	0	0	1,0±0,45 x 10^{10}	1,5±0,50 x 10^{10}	2,8±2,6 x 10^{10}	24,0±1,0 x 10^{10}		
Artemisia kotuchovii, стебли	0	0	1,5±0,50 x 10^{5}	2,3±0,45 x 10^{7}	19,0±1,0 x 10^{10}	20,0±1,4 x 10^{10}	23,0±2,0 x 10^{10}		
Heracleum dissectum	0	3,3±0,3 x 10^{4}	35,0±2,9 x 10^{10}	43,3±3,3 x 10^{10}	58,3±1,7 x 10^{10}	58,0±4,2 x 10^{10}	44,0±2,3 x 10^{10}		
Juniperus sabina	0	1,0±0,3 x 10^{10}	2,0±1,0 x 10^{10}	12,0±2,5 x 10^{10}	18,0±1,0 x 10^{10}	19,5±1,6 x 10^{10}	21,0±1,0 x 10^{10}		
Thymus marschallianus	0	0	0	0	0	19,0±0,5 x 10^{10}	23,0±1,0 x 10^{10}		
Примечания: КОЕ – колониеобразующая единица; М – среднее значение; m – ошибка среднего									

Таблица 2 – Влияние эфирных масел на жизнеспособность Escherichia coli

Образцы эфирных масел	Концентрация эфирных масел, мкг/мл							Этанол 90%	Контроль
	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075		
Показатель жизнеспособности, КОЕ/мл, (n=3, M±m)									
Artemisia scoparia	0	0	0	8,0±2,0 x 10^{10}	9,0±1,0 x 10^{10}	9,0±1,0 x 10^{10}	8,5±0,5 x 10^{10}	25,3± 1,6 x 10^{8}	39,4± 2,6 x 10^{10}
F. iliensis, соцветия	0	0	52,3±2,9 x 10^{10}	48,7±1,3 x 10^{10}	46,3±0,9 x 10^{10}	41,7±0,9 x 10^{10}	38,3±1,9 x 10^{10}		
F. iliensis, корни в фазе цветения	0	0	13,3±1,9 x 10^{10}	44,0±1,2 x 10^{10}	49,3±0,7 x 10^{10}	40,0±1,0 x 10^{10}	39,7±0,3 x 10^{10}		
F. iliensis, зонтики с семенами	0	2,3±0,3 x 10^{9}	17,7±1,5 x 10^{10}	26,7±3,3 x 10^{10}	24,7±2,4 x 10^{10}	21,0±2,5 x 10^{10}	19,0±2,5 x 10^{10}		
F. iliensis, корни в фазе плодоношения	0	0	33,3±3,3 x 10^{10}	38,3±4,4 x 10^{10}	36,7±6,7 x 10^{10}	37,0±3,5 x 10^{10}	38,7±4,7 x 10^{10}		
Ferula ovina, зонтики с семенами	0	8,0±0,6 x 10^{10}	15,0±2,9 x 10^{10}	45,0±2,9 x 10^{10}	46,7±2,4 x 10^{10}	50,3±2,9 x 10^{10}	48,3±5,0 x 10^{10}		
Ferula ovina, корни в фазе плодоношения	0	3,3±0,3 x 10^{9}	37,3±3,7 x 10^{10}	46,0±3,1 x 10^{10}	48,7±2,4 x 10^{10}	50,0±0,6 x 10^{10}	52,3±2,0 x 10^{10}		
Angelica decurrens	0	0	26,7±3,3 x 10^{10}	25,3±2,9 x 10^{10}	23,0±1,5 x 10^{10}	21,7±2,7 x 10^{10}	18,3±2,0 x 10^{10}		
Artemisia absinthium бутоны + листья	0	2,0±1,5 x 10^{10}	4,0±1,0 x 10^{10}	13,0±0,5 x 10^{10}	16,5±1,5 x 10^{10}	18,0±2,0 x 10^{10}	20,5±0,5 x 10^{10}		
Artemisia absinthium, стебли	0	8,5±2,0 x 10^{10}	10,5±0,5 x 10^{10}	11,0±0,5 x 10^{10}	4,0±1,0 x 10^{10}	12,0±1,5 x 10^{10}	32,5±2,5 x 10^{10}		
Artemisia кotuchovii, цветки + листья	0	0	0	21,0±2,0 x 10^{10}	28,5±1,5 x 10^{10}	17,5±0,5 x 10^{10}	5,5±1,50 x 10^{10}		
Artemisia кotuchovii, стебли	0	0	0	18,5±1,5 x 10^{10}	22,0±2,0 x 10^{10}	14,0±1,2 x 10^{10}	6,0±1,0 x 10^{10}		
Heracleum dissectum	0	6,3±0,3 x 10^{10}	52,3±1,5 x 10^{10}	46,7±1,3 x 10^{10}	44,7±2,9 x 10^{10}	42,0±1,2 x 10^{10}	35,3±1,3 x 10^{10}		
Juniperus sabina	0	8,5±0,5 x 10^{10}	10,5±0,5 x 10^{10}	9,0±1,5 x 10^{10}	10,5±0,5 x 10^{10}	13,5±1,5 x 10^{10}	18,5±0,5 x 10^{10}		
Thymus marschallianus	0	0	0	0	0	10,0±1,0 x 10^{10}	13,0±2,0 x 10^{10}		
Примечания: КОЕ – колониеобразующая единица; М – среднее значение; m – ошибка среднего									

Наименьшим подавляющим эффектом на рост микроорганизмов обладало эфирное масло из *Ferula ovina* (корень в фазе плодоношения), которое ингибировало рост патогенов только при самой высокой концентрации – 5 мкг/мл, а при 2,5 мкг/мл заметного влияния на жизнеспособность уже не наблюдалось. Также низкая антимикробная активность из проверенных эфирных масел выявлена у *Heracleum dissectum*. В концентрации 2,5 мкг/мл этот образец несколько снижал прирост бактериальной биомассы *S. aureus*, а уже при концентрации 1,25 мкг/мл показатели не отличались от контрольных.

Работа выполнена в рамках гранта Министерства образования и науки Республики Казахстан №2117/GF4 «Фармакологические эффекты эфирных масел и их компонентов из растений Казахстана».

Таблица 3 – Влияние эфирных масел на жизнеспособность Candida albicans

Образцы эфирных масел	Концентрация эфирных масел, мкг/мл							Этанол 90%	Контроль
	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075		
Показатель жизнеспособности, КОЕ/мл, (n=3, M±m); «-» отсутствие жизнеспособных микроорганизмов									
Artemisia scoparia	0	0	0	13,5±0,4 x 10^{10}	11,5±1,5 x 10^{10}	15,0±1,0 x 10^{10}	5,5±1,5 x 10^{10}	16,0± 1,0 x 10^{7}	36,0± 1,0 x 10^{10}
F. iliensis, соцвет	0	0	0	0	2,7±0,3 x 10^{5}	2,7±0,7 x 10^{6}	2,7±0,7 x 10^{6}		
F. iliensis, корни в фазе цветения	0	0	0	0	0	1,7±0,3 x 10^{3}	1,0±0,04 x 10^{4}		
F. iliensis, зонтики с семенами	0	0	0	2,3±0,3 x 10^{5}	2,3±0,9 x 10^{6}	2,3±0,9 x 10^{6}	2,3±0,9 x 10^{6}		
F.iliensis, корни в фазе плодоношения	0	0	0	0	0	1,3±0,3 x 10^{7}	1,3±0,3 x 10^{7}		
Ferula ovina, зонтики с семенами	0	0	0	1,7±0,3 x 10^{5}	1,7±0,3 x 10^{5}	2,3±0,3 x 10^{5}	7,3±0,3 x 10^{4}		
Ferula ovina, корни в фазе плодоношения	0	0	2,3±0,7 x 10^{4}	5,3±0,7 x 10^{5}	4,0±1,5 x 10^{5}	2,0±0,6 x 10^{5}	3,0±0,6 x 10^{5}		
Angelica decurrens	0	0	0	7,0±0,6 x 10^{3}	2,0±0,6 x 10^{5}	2,7±0,3 x 10^{6}	1,3±0,3 x 10^{6}		
Artemisia absinthium, бутоны + листья	0	1,0±0,5 x 10^{10}	5,0±1,0 x 10^{10}	8,5±2,0 x 10^{10}	13,5±0,5 x 10^{10}	15,0±1,0 x 10^{10}	21,5±0,5 x 10^{10}		
Artemisia absinthium, стебли	0	7,5±2,5 x 10^{10}	10,0±1,0 x 10^{10}	16,5±2,0 x 10^{10}	22,5±2,5 x 10^{10}	30,0±0,5 x 10^{10}	34,0±1,0 x 10^{10}		
Artemisia кotuchovii, цветки + листья	0	0	0	6,5±0,5 x 10^{10}	14,0±1,0 x 10^{10}	19,0±1,0 x 10^{10}	28,5±1,5 x 10^{10}		
Artemisia кotuchovii, стебли	0	26,0±1,0 x 10^{10}	37,5±2,5 x 10^{10}	42,5±1,5 x 10^{10}	46,0±1,0 x 10^{10}	47,0±1,5 x 10^{10}	47,5±2,5 x 10^{10}		
Heracleum dissectum	0	0	0	2,7±0,3 x 10^{4}	1,7±0,3 x 10^{6}	2,0±0,0 x 10^{6}	2,7±0,3 x 10^{6}		
Juniperus sabina	0	10,0±0,5 x 10^{10}	25,5±1,0 x 10^{10}	20,0±1,5 x 10^{10}	37,5±1,5 x 10^{10}	29,0±1,0 x 10^{10}	33,5±1,5 x 10^{10}		
Thymus marschallianus	0	0	0	0	0	2,5±0,4 x 10^{9}	1,5±0,5 x 10^{9}		
Примечания: КОЕ – колониеобразующая единица; М – среднее значение; m – ошибка среднего									

Литература

1 Mancini E., Senatore F., Del Monte D., De Martino L., Grulova D., Scognamiglio M., Snoussi M., De Feo V. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils // Molecules. – 2015. – Vol. 20, No. 7. – P. 12016-12028. DOI: 10.3390/molecules200712016.

2 Melo J.O., Fachin A.L., Rizo W.F., Jesus H.C.R., Arrigoni-Blank M.F., Alves P.B., Marins M.A., França S.C., Blank A.F. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and

normal human fibroblasts // Genetics and Molecular Research. – 2014. – Vol. 13, No. 2. – P. 2691-2697. DOI: 10.4238/2014.April.8.12.

3 Seema F., Vijaya P.P, Manivannan V. Immunomodulatory activity of geranial, geranial acetate, gingerol, and eugenol essential oils: evidence for humoral and cell-mediated responses // Avicenna J Phytomed. – 2013. – Vol. 3, No. 3. – P. 224-230.

4 Chao S., Young G., Oberg C., Nakaoka K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils // Flavour Fragr. J. – 2008. – Vol. 23, No. 6. – P. 444-449. DOI: 10.1002/ffj.1904.

5 Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 17. – P. 142–145. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.05.007.

6 Juliani H.R., Biurrun F., Koroch A.R., Oliva M.M., Demo M.S., Trippi V.S., Zygadlo J.A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica* mold // Planta Med. – 2002. – Vol. 68. – P. 756-762. DOI: 10.1055/s-2002-33803.

7 Торина А.К., Бисенова Г.Н., Шегебаева А.А., Ибраева А., Рязанцев О., Атажанова Г.А. Антимикробная активность основных компонентов эфирных масел и их некоторых производных // Вестник науки Казахского Агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2014. – №3. – С.54-62.

8 Паршина Г. Н., Айткельдиева С.А., Мукиянова У.С., Бейсетбаева Г.М. Содержание эфирных масел и их антимикробная активность в лекарственных растениях семейства *Lamiaceae* Lindl., культивируемых в Акмолинской области // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия биологическая и медицинская. – 2014. – № 2. – С. 19-24.

9 Bassole I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Nebie R.C., Dicko M.H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination // Molecules. – 2010. – Vol. 10. – P. 7825-7839. DOI: 10.3390/molecules15117825.

10 Bassole I.H.N., Juliani H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – P. 3989-4006. DOI: 10.3390/molecules17043989.

11 Burt S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – Vol. 94. – P. 223-253. DOI: org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

12 Koroch A., Juliani H.R., Zygadlo J.A. Bioactivity of essential oils and their components // Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and sustainability, Berger, R.G., Ed.; Springer Verlag: Berlin, Germany. – 2007. – P. 87-115. ISBN 978-3-540-49338-9.

13 Delaquis P.J., Stanish K., Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils // Int. J. Food Microbiol. – 2002. – Vol. 74. – P. 101-109. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00734-6.

14 Котухов Ю.А., Ануфриева О.А. *Artemisia kotuchovii* Kupr. (Asteracea) – редкий исчезающий вид флоры Казахстана // Ботанические исследования Сибири и Казахстана. – 2016. – № 22. – С. 60-70.

15 Красная книга Казахстана. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. Т. 2: Растения. – Астана, ТОО «АртPrintXXI». – 2014. – С. 222. ISBN 978-601-80334-7-6.

16 Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolke R.H. Manual of clinical microbiology. 7th ed. – Washington: ASM, 1995. – P. 1773. ISBN 000-1555811264.

17 Kavoosi G., Rowshan V. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 138. – P. 2180-2187. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.131.

18 Schepetkin I.A., Kushnarenko S.V., Özek G., Kirpotina L.N., Utegenova G.A., Kotukhov Y.A., Danilova A.N., Özek T., Başer K.H.C., Quinn M.T. Inhibition of human neutrophil responses by essential oil of *Artemisia kotuchovii* and its constituents – J. Agric. Food Chem. – 2015. – Vol. 63. – P. 4999-5007. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01307.

References

1 Mancini E, Senatore F, Del Monte D, De Martino L, Grulova D, Scognamiglio M, Snoussi M, De Feo V (2015) Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. Molecules, 20:12016-12028. DOI: 10.3390/molecules200712016.

2 Melo JO, Fachin AL, Rizo WF, Jesus HCR, Arrigoni-Blank MF, Alves PB, Marins MA, França SC, Blank AF (2014) Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. Genetics and Molecular Research, 13:2691-2697. DOI: 10.4238/2014.April.8.12.

3 Seema F, Vijaya PP, Manivannan V (2013) Immunomodulatory activity of geranial, geranial acetate, gingerol, and eugenol essential oils: evidence for humoral and cell-mediated responses. Avicenna J Phytomed, 3:224-230.

4 Chao S, Young G, Oberg C, Nakaoka K (2008) Inhibition of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by essential oils. Flavour Fragr. J, 23:444-449. DOI: 10.1002/ffj.1904.

5 Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J (2010) Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Phytomedicine, 17:142–145. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.05.007.

6 Juliani HR, Biurrun F, Koroch AR, Oliva MM, Demo MS, Trippi VS, Zygadlo JA (2002) Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica* mold. Planta Med, 68:756-762. DOI: 10.1055/s-2002-33803.

7 Torina AK, Bisenova GN, Shegebaeva AA, Ibraeva A, Rjazancev O, Atazhanova GA (2014) Antimicrobial activity of main constituents of essential oils and some their derivatives. Bulletin of Science of S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University [Antimi-

krobnaja aktivnost' osnovnyh komponentov jefirnyh masel i ih nekotoryh proizvodnyh. Vestnik nauki Kazahskogo Agrotehnicheskogo universiteta im. S. Sejfullina] 3:54-62. (In Russian).

8 Parshina GN, Ajtkel'dieva SA, Mukijanova US, Bejsetbaeva GM (2014) Content of essential oils and their antimicrobial activity in medicinal plants from *Lamiaceae* Lindl. Family cultivated in Akmola region. Bulletin of National Academy of Sciences of Republic of Kazakhstan. Biological and Medical Series [Soderzhanie jefirnyh masel i ih antimikrobnaja aktivnost' v lekarstvennyh rastenijah semejstva Lamiaceae Lindl., kul'tiviruemyh v Akmolinskoj oblasti. Izvestija Nacional'noj akademii nauk Respubliki Kazahstan. Serija biologicheskaja i medicinskaja]. 2:19-24. (In Russian).

9 Bassole IHN, Lamien-Meda A, Bayala B, Tirogo S, Franz C, Novak J, Nebie RC, Dicko MH (2010) Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha* x *piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules,10:7825-7839. DOI: 10.3390/molecules15117825.

10 Bassole IHN, Juliani HR (2012) Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, 17:3989-4006. DOI: 10.3390/molecules17043989.

11 Burt S (2004) Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microbiol, 94:223-253. DOI: org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

12 Koroch A, Juliani HR, Zygadlo JA (2007) Bioactivity of essential oils and their components. Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and sustainability, Berger, R.G., Ed.; Springer Verlag: Berlin, Germany, 87-115. ISBN 978-3-540-49338-9.

13 Delaquis PJ, Stanish K, Girard B, Mazza G (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int. J. Food Microbiol, 74:101-109. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00734-6.

14 Kotuhov JuA, Anufrieva OA (2016) *Artemisia kotuchovii* Kupr. (Asteracea) – rare endangered species of Kazakhstan flora. Botanical Research in Siberia and Kazakhstan [*Artemisia kotuchovii* Kupr. (Asteracea) – redkij ischezajushhij vid flory Kazahstana. Botanicheskie issledovanija Sibiri i Kazahstana] 22:60-70 (In Russian).

15 Red Data Book of Kazakhstan (2014) The 2nd edition revised and supplemented. Vol. 2: Plants. Astana, LTD «АртPrintXXI», 222. ISBN 978-601-80334-7-6.

16 Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolke R.H. Manual of clinical microbiology. 7th ed. – Washington: ASM, 1995. – P. 1773. ISBN 000-1555811264.

17 Kavoosi G, Rowshan V (2013) Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. Food Chemistry, 138:2180-2187. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.131.

18 Schepetkin IA, Kushnarenko SV, Özek G, Kirpotina LN, Utegenova GA, Kotukhov YA, Danilova AN, Özek T, Başer KHC, Quinn MT (2015) Inhibition of human neutrophil responses by essential oil of *Artemisia kotuchovii* and its constituents. J. Agric. Food Chem, 63:4999-5007. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01307.

[1]Ултанбекова Г.Д.,
[1]Треножникова Л.П.,
[1]Балгимбаева А.С.,
[1]Галимбаева Р.Ш.,
[1]Байдыльдаева Ж.,
[1]Нысанбаева А.А.,
[2]Салхожаева Г.М.

[1]Институт микробиологии и вирусологии, Казахстан, г. Алматы
[2]Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана

Изучение состава микробоценозов ризосферы облепихи крушиновидной, растущей в экосистемах Алматинской области

В Казахстане наиболее распространена облепиха крушиновидная, полезные свойства которой свидетельствуют о необходимости расширения её плантаций и повышения её продуктивности. Ризосфера облепихи крушиновидной может быть источником получения микроорганизмов с высоким биотехнологическим потенциалом и её исследование является актуальной проблемой.

Изучен состав микробоценозов ризосферной зоны облепихи крушиновидной, полученной из разных экосистем Алматинской области. Проведенные исследования показали, что ризосфера облепихи крушиновидной заселена разнообразными эколого-трофическими группами микроорганизмов, среди которых доминирующее положение занимают хемоорганотрофы – $1,2\cdot10^7$-$1,3\cdot10^8$ КОЕ/г почвы, актиномицеты – 1,5-$7,7\cdot10^5$ КОЕ/г почвы и олиготрофы – $6,7\cdot10^5$ -$3,0\cdot10^6$ КОЕ/г почвы. В ризосфере облепихи количество азотфиксирующих микроорганизмов рода Azotobacter составляет 20-80%, в контрольных образцах – 8-50%.

В ризосфере облепихи крушиновидной всех исследованных типов почв наблюдалось увеличение разнообразия качественного состава актиномицетов, которое проявлялось, прежде всего, в появлении окрашенных форм актиномицетов серий Violaceus, Ruber и Coerulescens.

Ключевые слова: актиноризные растения, облепиха крушиновидная, микробоценоз, хемоорганотрофы, олиготрофы, актиномицеты.

---

[1]Ultanbekova G.D.,
[1]Trenozhnikova L.P,
[1]Balgimbaeva A.S.,
[1] Galimbaeva R.Sh., [1] Baydyldaeva Zh.,
[1]Nysanbayeva A.A.,
[2]Salkhozhaeva G.M.

[1]Institute of Microbiology and Virology, Kazakhstan, Almaty
[2]L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana

Studies on the composition of rhizosphere microbiocenoses of sea buckthorn growing in ecosystems of Almaty oblast

Microbiocenosis composition of the sea buckthorn rhizosphere zone from various ecosystems of Almaty oblast was examined. Studies have shown that the sea buckthorn rhizosphere is inhabited with diverse ecological and trophic groups of microorganisms, among which the dominant position is occupied by hemoorganotrophs – $1.2*10^7$-$1.3*10^8$ CFU / g of soil, actinomycetes – 1.5-7.7-10^5 CFU/g of soil, and oligotrophs – $6.7*10^5$ -$3.0*10^6$ CFU / g of soil. In the rhizosphere of sea buckthorn of all investigated soil types, an increase in diversity of the qualitative composition of actinomycetes was observed, which manifested itself primarily through appearance of the colored forms of actinomycetes of the Violaceus, Ruber and Coerulescens series.

Because sea buckthorn forms a symbiotic relationship with nitrogen-fixing bacteria of the genus Frankia and enriches the soil with nitrogen, it was important to establish the quantitative presence of free nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and its control soil samples. In the rhizosphere buckthorn number of nitrogen-fixing Azotobacter genus of microorganisms is 20-80%, in the control samples – 8-50%.

Key words: actinorhizal plants, sea buckthorn, microbiocenosis, hemoorganotrophs, oligotrophs, actinomycetes.

---

[1]Ұлтанбекова Г.Д.,
[1]Треножникова Л.П.,
[1]Балғымбаева А.С.,
[1]Галимбаева Р.Ш.,
[1]Байдыльдаева Ж.,
[1]Нысанбаева А.А.,
[2]Салхожаева Г.М.

[1]Микробиология және вирусология институты, Қазақстан, Алматы қ.
[2] Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.

Алматы облысының экожүйесінде өсетін шырғанақ өсімдігі ризосфера микробоценозының құрамын зерттеу

Алматы облысының экожүйесінде өсетін шырғанақ өсімдігі ризосфера микробиоценозының құрамы зерттелді. Жасалған зерттеу көрсеткіштері бойынша талқыласақ, шырғанақтың ризосферасында әртүрлі эколого-трофикалық микроағзалар тобы кездеседі, басым бөлігін хемоорганотрофтар – $1,2\cdot10^7$-$1,3\cdot10^8$ КТБ/г топырақта, актиномицеттер – 1,5-$7,7\cdot10^5$ КТБ/г топырақта және олиготрофтар – $6,7\cdot10^5$ -$3,0\cdot10^6$ КТБ/г топырақта кездеседі. Әртүрлі зерттелген топырақ түрлерінде өсетін шырғанақ өсімдігінің ризосферасында әртүрлі актиномицеттердің сандық құрамының артқаны байқалады, түрлі-түсті актинмицеттер сериясына жататын Violaceus, Ruber и Coerulescens түрлері кездесті.

Актиноризді өсімдіктердің тамырында түйнектер түйетін Frankia туысына жататын актиномицеттер атмосферадағы азотты сіңіріп, топырақты және бұталы өсімдіктерді азотпен құнартады. Сонымен қатар актиноризді өсімдіктер азоттың топырақтағы айналысын белсенділетіп, құнарын арттырады. Бүлінген топырақтарды азотпен құнарландыру Frankia туысымен симбиозды тіршілігі басқа өсімдіктердің жақсы өсуіне себебін тигізеді. Бұл топырақ микробоценозына және шаруашылық-құнды өсімдіктердің өнімділігіне жақсы әсерін тигізеді. Шырғанақ Frankia туысына жататын актиномицеттермен симбиоз құратындықтан және топырақты азотпен құнарлайтын қасиетіне байланысты олардың ризосферасындағы және бақылау топырақтармен салыстырғанда қаншалықты бос азотсіңіргіштердің кездесетінін білу осы аталып отырған жұмысқа қажет болды. Шырғанақтың ризосферасында кездесетін Azotobacter құрамы 20-80%, бақылау үлгілерінде 8-50% құратындығы анықталды.

Түйін сөздер: актиноризді өсімдіктер, шырғанақ, микробоценоз, хемоорганотрофтар, олиготрофтар, актиномицеттер.

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 579.873.31

[1*]Ултанбекова Г.Д., [1]Треножникова Л.П., [1]Балгимбаева А.С., [1]Галимбаева Р.Ш., [1]Байдыльдаева Ж., [1]Нысанбаева А.А., [2]Салхожаева Г.М.

[1]Институт микробиологии и вирусологии, Республика Казахстан, г. Алматы
[2]Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Республика Казахстан, г. Астана
*E-mail: ultanbekova77@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА МИКРОБОЦЕНОЗОВ РИЗОСФЕРЫ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ, РАСТУЩЕЙ В ЭКОСИСТЕМАХ АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Введение

В последние годы в мире значительно прогрессирует деградация земель из-за изменения климатических факторов и вмешательства человека, что приводит к снижению биоразнообразия и продуктивности сельского хозяйства.В Казахстане данная проблема обостряется в связи с высоким уровнем засоления почв, климатическими особенностями и значительным преобладанием техногенно-нарушенных почв [1].

Современные экологические проблемы, возникшие в результате антропогенной перегрузки и нерационального использования природных ресурсов, негативно влияют на состояние почвенного покрова Казахстана и требуют мероприятий по предотвращению деградации почв, восстановлению плодородия эрозированных, дегумифицированных и техногенно-нарушенных почв.

Облепиху широко используют как фитомелиорант [2]. Такое применение способствует повышению биологической продуктивности нарушенных земель и вовлечению их в повторный народно-хозяйственный оборот. Техногенно-нарушенные земли с успехом можно применять для выращивания облепихи с целью обеспечения населения ценными плодами. Из-за мощной корневой системы облепиха используется для закрепления склонов, оврагов, откосов и выемок железных дорог, шоссе и каналов, для укрепления песчаных почв и профилактики оползней [3]. Облепиха крушиновиднаяявляется первым растением, способным осваивать бедные почвы и породы. По мере окультуривания почвы она вытесняется другими кустарниками и деревьями.

Плантации древесных актиноризных растений, адаптированых к неблагоприятным условиям, являются перспективным инструментом для восстановления деградированных земель. Актиноризные азотфиксирующие растения, образующие азотфиксирующие клубеньки в симбиозе с актиномицетами рода *Frankia,* могут быть использованы в народном хозяйстве при рекультивации и мелиорации земель, создании лесозащитных полос, в пищевой промышленности и медицине. К таким растениям относятся многолетние древесные и

кустарниковые растения: облепиха, лох, ольха и другие[2]. Актиномицеты рода *Frankia*, образующие клубеньки на корнях актиноризных растений, способны фиксировать атмосферный азот и обогащать им почву и древесные растения [3-6]. При этом актиноризные растения увеличивают содержание азота и активируют его круговорот в почве. Обогащение деградированных почв азотом в результате симбиоза растений с бактериями рода *Frankia* делает их плодородными для других растений [7-8]. Это, в свою очередь, оказывает положительное влияние на почвенные микробоценозы и повышает продуктивность хозяйственно-ценных растений.

Облепиха с каждым годом приобретает все большее народно-хозяйственное значение во многих странах мира. Богатый биохимический состав ягод, полиморфность вида, скороплодность, высокая продуктивность, экологическая пластичность обеспечили ей широкое распространение и использование в фармакологии, пищевой промышленности, косметологии, лесомелиорации и рекультивации земель [9].

Облепиховое масло используется для лечения лучевых поражений кожи, ожогов, пролежней, туберкулёза кожи, экзем, гинекологических заболеваний [10].

Семена облепихи содержат около 190 полезных микроэлементов и витаминов. Идентифицировано свыше 70 биологически активных соединений, формирующихся в плодах и листьях облепихи, они способны защитить людей от негативного воздействия факторов природной среды. После установления целебных свойств плодов и масла облепихи, её культивируют как ценное витаминное растение и выращивают на промышленных плантациях[9].

В последние годы получены данные об успешном использовании облепихи при облесении песков и шахтных отвалов. Она является первым растением, способным осваивать бедные почвы и породы. По мере окультуривания почвы она вытесняется другими кустарниками и деревьями[10].

Актиноризные растения могут извлечь до 70% от необходимого уровня азота через N_2-фиксацию. Часто они также связаны с экто- или эндомикоризой, которые увеличивают засухоустойчивость растений и поглощение питательных веществ, таких, как фосфор.Поэтому актиноризные растения способны колонизировать сложные среды обитания, например, вулканические отложения, ледниковые морены или эродированные земли. Следовательно, актиноризные растения имеют широкий спектр потенциального использования в лесном хозяйстве [11].

Эффективность инокуляционных работ актиноризных растений во многом определяется устойчивостью вводимых растений к неблагоприятным экологическим фактором среды данного региона. В процессе эволючионного развития некоторые растения выработали адаптационную способность, позволяющую им занимать новые экологические условия произрастания. Каждое растение имеет определенный набор свойств, способствующий занятию новых экологических ниш. При этом растения имеют различную экологическую амплитуду. Значение толерантности определенного вида растения позволяет оценить его адаптационную способность к местным климатическим условиям.

В целом, впервые в Казахстаненами изучен состав микробоценозовризосферной зоны облепихи крушиновидной, полученной из разных экосистем Алматинской области.Количество накопление аборигенных микроорганизмов в ризосфере облепихи крушиновидной в природе и разных экосистемах Алматинской областипозволяет выявить различия в росте, развитии и приспособленности популяций данного вида[11].

Ризосфера облепихи крушиновидной может быть источником получения микроорганизмов с высоким биотехнологическим потенциалом и её исследование является актуальной проблемой.

Цель работы заключается в изучении состава микробиоценозовризосферной зоны облепихи крушиновидной, полученной из разных экосистем Алматинской области.

Материалы и методы

Образцы почвы и корней облепихи крушиновидной получали в маршрутных исследованиях из экосистем Алматинской области: поймы рек и горной местности. Почву и корни растений помещали в стерильные пакеты и хранили в холодильнике при температуре 2-8^{0}С.

Для микробиологического анализа отбирали по 300 г природного субстрата для сохранения его свойств при транспортировке.

Образцы ризосферы получали механическим встряхиванием корней в течение 5 минут. Изучение количественного и качественного состава микробоценозов ризосферы облепихи крушиновидной проводили методом посева почвенной суспензии на селективные питательные среды [12]. Почву высыпали на стерильную пергаментную бумагу, тщательно перемешивали

шпателем и раскладывали ровным слоем. Навеску почвы, используемую для приготовления первого разведения, доводили путем добавления небольшого количества стерильной водопроводной воды до пастообразного состояния, растирали в течение 5 минут. Затем готовили первое разведение (1:10), т.е. 10^{-1} почвы в стерильной водопроводной воде, проводили предварительную обработку почвы встряхиванием в течение 20 мин на роторном шейкере при 200 об/мин. Из каждого разведения делали посев не менее двух объемов по 0,1 или 0,05 куб. см на поверхность соответствующего агара, разлитого в стерильные чашки Петри, и равномерно шпателем растирали по всей поверхности чашки.

Состав сред приведен в г/л.

МПА: пептон – 5,0; натрий хлорид – 5,0, мясной экстракт – 1,5; дрожжевой экстракт – 1,5; агар – 20,0; вода дистиллированная – 1000 мл; pH 7,2-7,4.

Агар Чапека-Докса: сахароза – 30,0; $NaNO_3$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4 \cdot H_2O$ – 0,01; агар – 20,0; вода дистиллированная – 1000 мл.

Минеральный агарГаузе 1: крахмал (растворимый) – 20,0; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4$ – 0,5; KNO_3 – 1,0; NaCl – 0,5; $FeSO_4 x 7H_2O$ – 0,01; агар – 20,0; вода дистиллированная – 1000 мл, pH 7,2-7,4.

АгарБеннета: глюкоза – 5,0; дрожжевой экстракт – 0,5; гидролизат казеина – 1,0; мясной экстракт – 0,5; агар – 10,0; вода водопроводная – 1000 мл, pH 7,0-7,3.

Голодный агар: агар-агар-15,0; NaCl – 5,0; вода водопроводная – 1000 мл; pH 6,8-7,0.

Агар Эшби: маннит – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4 x 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; агар – 20,0; вода дистиллированная – 1000 мл; pH 7,0.

Чашки Петри с посевами почвенной суспензии выдерживали в термостате при температуре 28±1^{0}С в течение 3 суток для определения присутствия бактериальных микроорганизмов, актиномицетов и грибов – 7-14 суток. Учет результатов проводили следующим образом: количество колоний на чашках суммировали, делили на количество повторностей и умножали на степень разведения. Результат выражали числом колониеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы).

Изучение состава микробоценозов проводили на агаровых средах: МПА (учет хемоорганотрофных бактерий), минеральном агаре Чапека-Докса (учет грибов), минеральном агареГаузе 1 (учет актиномицетов), агареБенннета (учет актиномицетов), голодном агаре (учет олиготрофов), агаре Эшби (учет азотфиксаторов).

Общая численность актиномицетов изучена на двух средах – органическом агареБеннета и минеральном агареГаузе 1[13].

Изучение состава микробоценозов ризосферы облепихи крушиновидной и почвогрунтов осуществляли методом посева на селективные питательные среды в разведениях 10^2 -10^8. Образцы ризосферы получали механическим встряхиванием корней в течение 5 минут.

Таблица 1 – Характеристика места забора почвенных образцов и ризосферы облепихи крушиновидной (Алматинская область)

Номера образцов	Природная климатическая зона	Эко-система	Широ-та места	Долгота места	Высота места	Тип почвы	pH почвы
1 (почва)	Горы	Пойма реки Чарын	43°37	79°12	860	Серо-бурые	7,3
2 (ризосфера)							
3 (почва)	Горы	Пойма реки Большая Алматинка	43°15	76°55	787 м	Аллю-виаль-ные	6,6
4 (ризосфера)							
5 (почва)	Горы	Пойма реки Тургень	43°40	77°59	1400 м	Аллю-виаль-ные	6,7
6 (ризосфера)							
7 (почва)	Горы	Предгорья Иле Алатауского заповед-ника	43°04	77°10	1650 м	Горные лесные	7,0
8 (ризосфера)							

Все исследования выполнены в двух повторностях, для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [14].

Результаты и их обсуждение

В ризосфере облепихи крушиновидной широко представлены все эколого-трофические группы микроорганизмов. Полученные данные приведены в таблицах 2-3.

Таблица 2 – Количественный состав основных эколого-трофических групп микроорганизмов в образцах ризосферы облепихи крушиновидной (Алматинская область)

Номера образцов	Количественный состав микроорганизмов, КОЕ/г почвы		
	хемоорганотрофы	грибы	олиготрофные микроорганизмы
1 (почва)	$(7,3\pm0,10)\cdot10^{6}$	$(1,1\pm0,12)\cdot10^{4}$	$(2,9\pm0,14)\cdot10^{5}$
2 (ризосфера)	$(1,3\pm0,11)\cdot10^{8}$	$(1,8\pm0,12)\cdot10^{4}$	$(3,0\pm0,10)\cdot10^{6}$
3 (почва)	$(1,7\pm0,10)\cdot10^{7}$	$(1,0\pm0,15)\cdot10^{2}$	$(3,8\pm0,16)\cdot10^{5}$
4 (ризосфера)	$(4,6\pm0,12)\cdot10^{7}$	$(2,0\pm0,15)\cdot10^{3}$	$(9,6\pm0,19)\cdot10^{5}$
5 (почва)	$(1,1\pm0,13)\cdot10^{6}$	$(5,0\pm0,16)\cdot10^{4}$	$(2,0\pm0,14)\cdot10^{5}$
6 (ризосфера)	$(1,2\pm0,15)\cdot10^{7}$	$(2,0\pm0,15)\cdot10^{5}$	$(8,6\pm0,11)\cdot10^{5}$
7 (почва)	$(8,1\pm0,14)\cdot10^{5}$	$(4,0\pm0,16)\cdot10^{4}$	$(1,3\pm0,11)\cdot10^{4}$
8 (ризосфера)	$(7,7\pm0,11)\cdot10^{6}$	$(3,0\pm0,15)\cdot10^{5}$	$(6,7\pm0,11)\cdot10^{5}$

Установлено, что в ризосфере облепихи крушиновидной преобладают хемоорганотрофы, группа актиномицетов и олиготофы. Причем их количество в ризосфере и контрольных образцах почвы, взятых на расстоянии 5-6 метров от растения различно.

В ризосфере облепихи крушиновидной общее количество микроорганизмов и их представительство по группам значительно возрастает. Это свидетельствует об интенсификации микробиологической активности в корневой зоне. Ризосфера богато заселена микроорганизмами, оказывающими полифункциональное влияние на растения.

В ризосферу из корней активно поступают разнообразные органические источники энергии и углерода, что обусловливает ее высокую микробиологическую активность и образование отличающихся от почвенного микробоценоза специфических ризосферных микробных сообществ.

Облепиха является ценным хозяйственным растением, играющим большую роль в восстановлении плодородия почв, однако сведения о закономерностях, определяющих формирование микробиологического ценоза в зоне корня, недостаточны.

Таблица 3 – Количественный состав азотфиксирующих микроорганизмов в образцах ризосферы облепихи крушиновидной (Алматинская область)

Номера образцов	Азотфиксирующие микроорганизмы,%
1 (почва)	8
2 (ризосфера)	20
3 (почва)	10
4 (ризосфера)	30
5 (почва)	20
6 (ризосфера)	60
7 (почва)	50
8 (ризосфера)	80

Количественный и качественный состав актиномицетов на изученных агаровых средах различается, причем минеральный агар Гаузе является более оптимальной средой для исследования актиномицетного сообщества в ризосфере облепихи крушиновидной. Полученные данные приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Количественный состав актиномицетов в образцах ризосферы облепихи крушиновидной (Алматинская область)

Номера образцов	Актиномицеты (агар Гаузе 1), КОЕ/г	Актиномицеты (агар Беннета), КОЕ/г
1 (почва)	$(8,0\pm0,14)\cdot10^4$	$(1,2\pm0,20)\cdot10^5$
2 (ризосфера)	$(1,5\pm0,15)\cdot10^5$	$(3,0\pm0,12)\cdot10^5$
3 (почва)	$(2,0\pm0,14)\cdot10^5$	$(8,7\pm0,13)\cdot10^5$
4 (ризосфера)	$(3,9\pm0,11)\cdot10^6$	$(6,8\pm0,21)\cdot10^6$
5 (почва)	$(2,4\pm0,12)\cdot10^5$	$(7,0\pm0,17)\cdot10^5$
6 (ризосфера)	$(7,7\pm0,16)\cdot10^5$	$(9,2\pm0,11)\cdot10^5$
7 (почва)	$(1,5\pm0,23)\cdot10^3$	$(6,2\pm0,13)\cdot10^3$
8 (ризосфера)	$(1,9\pm0,14)\cdot10^5$	$(8,4\pm0,19)\cdot10^5$

Установлено, что в ризосфере облепихи крушиновидной, растущей в экосистемах Алматинской области, преобладают хемоорганотрофы – $1,2\cdot10^7$-$1,3\cdot10^8$ КОЕ/г почвы, актиномицеты – 1,5-$7,7\cdot10^5$ КОЕ/г почвы и олиготофы – $6,7\cdot10^5$ -$3,0\cdot10^6$ КОЕ/г почвы. Причем, их количество в ризосфере и контрольных образцах почвы, взятых на расстоянии 5-6 метров от растения, различно.

Таблица 5 – Качественный состав актиномицетов в образцах ризосферы облепихи крушиновидной (Алматинская область)

Номера образцов	Серии актиномицетов (агар Гаузе 1)	Серии актиномицетов (агар Беннета)
1 (почва)	*Albus, Helvolus, Aureus*	*Albus, Flavus, Helvolus, Lavendulae-roseus, Aureus*
2 (ризосфера)	*Albus, Helvolus, AureusLavendulae-roseus*	*Albus, Flavus, Helvolus, Lavendulae-roseus, Coerulescens, Violaceus, Roseoviolaceus, Aureus*
3 (почва)	*Albus, Achromogenes, Chromogenes*	*Albus, Achromogenes, Chromogenes, Helvolus*
4 (ризосфера)	*Albus, AchromogenesRuber*	*Albus, Achromogenes, Chromogenes, Helvolus, Lavendulae-roseus, Ruber*
5 (почва)	*Albus, Helvolus, Lavendulae-roseus*	*Albus, Helvolus, Lavendulae-roseus, Ruber, Aureus, Flavus*
6 (ризосфера)	*Albus, Chromogenes, Ruber, Aureus*	*Albus, Chromogenes, Helvolus, Flavus, Coerulescens, Violaceus, Ruber, Aureus*
7 (почва)	*Albus, Helvolus*	*Albus, Helvolus*
8 (ризосфера)	*Albus, Helvolus,Flavus*	*Albus, Achromogenes, Chromogenes, Helvolus, Flavus, Lavendulae-roseus, Coerulescens*

В ризосфере облепихи крушиновидной общее количество микроорганизмов и их представительство по группам значительно возрастает. Это свидетельствует об интенсификации микробиологической активности в корневой зоне растений. Ризосфера богато заселена микроорга-

низмами, оказывающими полифункциональное влияние на растения. В ризосферу из корней активно поступают разнообразные органические источники энергии и углерода, что обусловливает ее высокую микробиологическую активность и образование отличающихся от почвенного микробоценоза специфических ризосферных микробных сообществ. Облепиха крушиновидная является пластичным растением по отношению к различным неблагоприятным экологическим условиям Алматинской области. Иными словами можно сказать, что облепиха обладает высокой экологической валентностью. Способность переносить морозы и повышенные температуры воздуха, примиримость к эдафическим условиям местопроизрастания, а также широкий спектр областей производства, где облепиха может с успехом применяться, придают ей существенные преимущества по сравнению с другими кустарниковыми видами.

Поскольку облепиха образует симбиоз с азотфиксирующими бактериями рода *Frankia* и обогащает почву азотом было важно установить количественное присутствие свободных азотфиксаторов в её ризосфере и контрольных почвенных образцах [10].

В ризосфере облепихи количество азот фиксирующих микроорганизмов рода *Azotobacter* составляет 20-80%, в контрольных образцах – 8-50%.

Показано, высокое количество олиготрофов в ризосфере облепихи крушиновидной и контрольных почвах, их уровень в ризосфере – $6,7 \cdot 10^5$ -$3,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы, в контрольных образцах -$1,3 \cdot 10^4$ – $3,8 \cdot 10^5$ КОЕ/г почвы.

Общая численность актиномицетов изучена на двух средах – органическом агаре Беннета и минеральном агаре Гаузе 1. Их количественный и качественный состав на изученных агаровых средах различается, установлено, что минеральный агарГаузе 1 является оптимальной средой для исследования актиномицетного сообщества.

Количественный состав актиномицетов на минеральном агаре Гаузе 1 в образцах ризосферы облепихи крушиновидной составляет $3,0 \cdot 10^5$ – $6,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы. В образцах контрольных почв количество актиномицетов понижается – $6,2 \cdot 10^3$–$8,7 \cdot 10^5$ КОЕ/г почвы.

Качественный состав актиномицетов более разнообразен в ризосфере, по сравнению с почвенными образцами. В комплексе актиномицетов, наблюдаемых в ризосфере, типичными доминирующими видами являются виды пигментных серий: *Coerulescens, Ruber, Violaceus, Lavendulaeroseus, Roseoviolaceus.* С высокой частотой встречаются также серии *Albus* и *Chromogenes.* В контрольных образцах почв наблюдается отсутствие ряда пигментных серий (*Coerulescens, Ruber, Violaceus)*.

Присутствие в этих почвах актиномицетов в качестве основного компонента микробоценозов свидетельствует об их способности к адаптации и высокой деструктивной способности.

Таким образом, ризосфера облепихи крушиновидной заселена разнообразными эколого-трофическими группами микроорганизмов, среди которых доминирующее положение занимают хемоорганотрофы, олиготрофы и актиномицеты. Видовое разнообразие актиномицетов проявляется в увеличении видовых серий и секций и появлении видов пигментных серий в ризосфере. В ризосфере облепихи крушиновидной всех исследованных типов почв наблюдалось увеличение разнообразия качественного состава актиномицетов, которое проявлялось, прежде всего, в появлении окрашенных форм актиномицетов серий *Violaceus, Ruber*и*Coerulescens*.

Литература

1 Березин Л.В., Сапаров А.С., Кан В.М., Шаяхметов М.Р. Технология комплексной мелиорации экосистем России и Казахстана. – Алматы: Спринт. – 2013. – С.11-12.

2 Саданов А.К., Смирнова И.Э. Целлюлитические бактерии и их применение в сельском хозяйстве.-Алматы: Литера. – 2015. – 260 с.

3 Wall L.G. The actinorhizal symbiosis // Journal of Plant Growth Regulation. – 2000. – Vol. 19, N 2. – P. 167–182.

4 Schwencke J., Carú M. Advances in actinorhizal symbiosis: host plant-Frankia interactions, biology, and applications in arid land reclamation. A review // Arid Land Research and Management. – 2001. – Vol. 15, № 4. – P. 285–327.

5 Baker, D., and J. G. Torrey. Characterization of an effective actinorhizalmicrosymbiont, Frankia sp. AvcI1 (Actinomycetales) //Journal of Applied Microbiology– 1980. – Vol. 26. – P. 1066-1071.

6 Bouras N., Meklat A., Toumatia O., Mokrane S., Holtz M.D., Strelkov S.E., Sabaou N. Bioactive potential of a new strain of Streptomyces sp. PP14 isolated from Canadian soil // Journal of Applied Microbiology – 2013. – Vol. 7, N 25. – P. 3199-3208.

7 Diagne N.,Arumugam K., Ngom M., Nambiar-Veetil M.,Franche C., Kumar Narayanan K.,Laplaze L. Use of Frankia and Actinorhizal Plants for Degraded Lands Reclamation // BioMed Research International, 2013. – Vol. 21, N 1. – P. 151–165.

8 Sayed W.F. Improving Casuarina growth and symbiosis with Frankia under different soil and environmental conditions-review // Folia Microbiologica. – 2011. – Vol. 56, N. 1. – P. 1–9.

9 Berry, A. M., and J. G. Torrey. Root hair deformation in the infection process of Alnusrubra// Journal of Applied Microbiology. – 1983. Vol. 61. – P 2863-2976.

10 Baker, D. D., and B. C. Mullin. Diversity of Frankia nodule endophytes of the actinorhizal shrub Ceanothus as assessed by RFLP patterns from single nodule lobes // Soil. Biol. Biochem. – 1994. Vol. 26.-P547-552.

11 Berg R.H., Liu L., Dawson J.O., Savka A.M. Induction of Pseudoactinorhizae by the Plant Pathogen Agrobacterium rhizogenes// Plant Physiology. – 1992. Vol. 98. – P777–779.

12 Echbab H., Arahou M., Ducousso M. et al. Successful nodulation of Casuarina by Frankia in axenic conditions // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – Vol. 103, N. 5. – P. 1728–1737.

13 Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 283 с.

14 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.:Медицина, 1975. – 295 с.

References

1 Berezin LV, Saparov AS, Kan VM, SHayahmetov MR (2013) Technology of complex reclamation of Russia and Kazakhstan ecosystems [Tekhnologiya kompleksnoj melioracii ehkosistem Rossii i Kazahstana]. ISBN: 978-601-80286-3-2. (In Russian)

2 Sadanov AK, Smirnova IEH (2015) Tsellyuliticheskie bacteria and their use in agriculture [Cellyuliticheskiebakteriiiihprimenenie v sel'skomhozyajstve]. ISBN:978-604-7437-04-6. (In Russian)

3 Wall LG (2000) Theactinorhizal symbiosis, Journal of Plant Growth Regulation.19: 167–182.

4 Schwencke J., Carú M. (2001) Advances in actinorhizal symbiosis: host plant-Frankia interactions, biology, and applications in arid land reclamation. A review, Arid Land Research and Management, 15(4): 285–327.

5 Baker D, Torrey JG(1980) Characterization of an effective actinorhizalmicrosymbiont, Frankia sp. AvcI1 (Actinomycetales),Journal of Applied Microbiology, 26:1066-1071.

6 Bouras N, Meklat A, Toumatia O, Mokrane S, Holtz D, Strelkov E, Sabaou N (2013) Bioactive potential of a new strain of Streptomyces sp. PP14 isolated from Canadian soil Journal of Applied Microbiology, 7(25):3199-3208.

7 Diagne N, Arumugam K, Ngom M, Nambiar-Veetil M, Franche C, Kumar Narayanan K, Laplaze L (2013) Use of Frankia and Actinorhizal Plants for Degraded Lands Reclamation,BioMed Research International, 21 (1): 151–165.

8 Sayed WF(2011) Improving Casuarina growth and symbiosis with Frankia under different soil and environmental conditions-review, Folia Microbiologica,56 (1): 1–9.

9 Berry A M, Torrey J G (1983) Root hair deformation in the infection process of Alnusrubra, Journal of Applied Microbiology, 61: 2863-2976.

10 Baker D D, Mullin BC (1994) Diversity of Frankia nodule endophytes of the actinorhizal shrub Ceanothus as assessed by RFLP patterns from single nodule lobes, Soil. Biol. Biochem, 26:547-552.

11 Berg RH, Liu L, Dawson JO, Savka AM(1992) Induction of Pseudoactinorhizae by the Plant Pathogen Agrobacterium rhizogenes, Plant Physiology,98: P777–779.

12 Echbab H, Arahou M, Ducousso M (2007) Successful nodulation of Casuarina by Frankia in axenic conditions, Journal of Applied Microbiology, 103: 1728–1737.

13 Semenov SM (1990)Laboratory environment for fungi and actinomycetes [Laboratornyesredydlyaaktinomicetovigribov]. Agropromizdat, Moscow, Russia.(In Russian)

14 Urbach VY (1975) Statistical analysis in biological and medical research [Statisticheskijanaliz v biologicheskihimedicinskihissledovanijah].Medicine, Moscow, Russia. (In Russian)

МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

1-бөлім Ботаника **Раздел 1 Ботаника**

Курбатова Н.В., Каржаубекова Ж.Ж., Гемеджиева Н.Г., Букина Е.Л.
Анатомо-морфологические и фитохимические исследования *Peganum harmala L* 4

Нестерова С.Г., Инелова З.А., Ерубаева Г.К., Запарина Е.Г., Сейткадыр К.А.
Анализ разнообразия семейства *Lamiaceae Lindl.* Заилийского Алатау 16

Туякова А.Т., Иманбаева А.А., Ишмуратова М.Ю., Джумахан Д.М., Оразова С.Б.
Анатомические особенности надземных органов *Crataegus ambigua* C.A. Mey.,
произрастающих в ущельях Западного Каратау полуострова Мангышлак 24

2-бөлім Өсімдіктер физиологиясы және биохимиясы **Раздел 2 Физиология и биохимия растений**

Абугалиева А.И., Абугалиева С.И., Чудинов В.А., Туруспеков Е.К.
Фенотипирование сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана по показателям качества зерна 34

Тажибаева Т.Л., Абугалиева А.И., Кожахметов К.К., Полякова С.Е.
Засухоустойчивость диких, культурных и интрогрессивных форм озимой пшеницы 50

3-бөлім Адам және жануарлар физиологиясы **Раздел 3 Физиология человека и животных**

Кайрат Б.К., Жумалиева Г.Т., Оразова С.Б., Шалгимбаева С.М., Койшибаева С.К.
Влияние различных условий аквакультивирования на некоторые биохимические показатели молоди тилапии 64

4-бөлім Молекулалық биология және генетика **Раздел 4 Молекулярная биология и генетика**

Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е.
Гены, связанные с развитием сердечно-сосудистых заболеваний 74

Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А., Пинский И.В., Пыркова А.Ю., Алыбаева А.Ж.,
Акимниязова А.Н., Мамирова А.А., Макашев Е.К.
МикроРНК и гены, связанные с инфарктом миокарда 82

Кожамкулов У.А., Каиров У.Е., Рахимова С.Е., Ережепов Д.А.,
Ахметова А.Ж., Молкенов А.Б., Утюбаев А., Акильжанова А.Р.
Идентификация генетических маркеров лекарственной устойчивости на основе полных геномов
клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* 94

Сагындыкова М.С., Иманбаева А.А., Сарсенбаев К.Н., Ахметоллаев И.А.
Популяционная изменчивость геномной ДНК *Ferulafoetida (Bunge) Regel.,* в условиях пустыни Мангистау 104

Тайпакова С.М., Смекенов И.Т., Бисенбаев А.К.
Создание рекомбинантных штаммов дрожжей для получения биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья 116

Усенбеков Е.С., Яковлев А.Ф., Акимжан Н.А.
Результаты мониторинга быков-производителей на носительство генетических дефектов 128

Хусаинова Э.М., Джантаева К.Б., Амиргалиева А.С., Муратова Ф.Т.,
Скворцова Л.А., Нуржибек,Утегенова К.С., Перфильева А.В., Бекманов Б.О.
Изучение полиморфизмовгенов, участвующих в антиоксидантных реакциях у людей,
подвергшихся действию радиации 140

5-бөлім Раздел 5
Биотехнология Биотехнология

Мустафин К.Г., Ахметсадыков Н.Н., Бисько Н.А., Сулейменова Ж.Б., Нармуратова Ж.Б., Садуева Ж.К.
Подбор оптимальных условий культивирования для повышенного синтеза биомассы базидиального гриба *Trametes versicolor* 150

Смирнова И.Э., Саданов А.К, Сабденова А.А., Султанова А.Ж., Нурмуханбетова А.М.
Создание ЭМ-ассоциаций, изучение их влияния на пастбищные культуры и биологическую активность деградированных почв 160

Треножникова Л.П., Ултанбекова Г.Д., Балгимбаева А.С., Галимбаева Р.Ш., Масирбаева А.
Оптимизация условий культивирования штаммов рода *Streptomyces,* составляющих биопрепарат для растениеводства 168

6-бөлім Раздел 6
Иммунология Иммунология

Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Оскольченко И.А., Красноштанов В.К., Северова Е.А., Поминова Н.М., Денисов Ю.Д., Беляев Н.Н.
Тәжірибелік созылмалы қабыну кезіндегі миелоидық супрессорлық жасушалар 178

Киян В.С.
Биохимические и иммунологические свойства экскреторно-секреторного антигена *Opisthorchis felineus* 188

7-бөлім Раздел 7
Микробиология Микробиология

Кушнаренко С.В., Утегенова Г.А., Шегебаева А.А., Озек Г., Озек Т., Абидкулова К.Т., Котухов Ю.А., Данилова А.Н.
Антимикробная активность эфирных масел некоторых растений Казахстана 198

Ултанбекова Г.Д., Треножникова Л.П., Балгимбаева А.С., Галимбаева Р.Ш., Байдыльдаева Ж., Нысанбаева А.А., Салхожаева Г.М.
Изучение состава микробоценозов ризосферы облепихи крушиновидной, растущей в экосистемах Алматинской области 208

CONTENTS

Section 1
Botany

Kurbatova N.V., Karzhaubekova Zh.Zh., Gemejyieva N.G., Bukina E.L.
Anatomo-morphological and phytochemical studies of *Peganum harmala L* 4

Nesterova S.G., Inelova Z.A., Yerubayeva G.K., Zaparina E.G, Seitkadyr K.A.
Analysis of diversity of the family Lamiaceae Lindl. Of Trans-Ili Alatau 16

Tuyakova A.T., Imanbaeva A.A., Ishmuratova M.Yu., Dzhumakhan D.M.,Orazova S.B.
Anatomical features of overground organs of *Crataegus ambigua* C.A. Mey., native to
Western Karatau Gorges of the Mangyshlak Peninsula 24

Section 2
Plants physiology and biochemistry

Abugalieva A.I., Abugalieva S.I., Chudinov V.A., Turuspekov Y.K.
Phenotyping of spring bread wheat cultivars from Kazakhstan based on grain quality traits 34

Tazhibaeva T.L., Abugalieva A.I., Kozhakhmetov K.K., Polyakova S.E.
Drought resistance of wild, cultivars and introgressive forms of winter wheat 50

Section 3
Human and animal physiology

Kairat B., Zhumalieva G., Orazova S., Shalgimbaeva S., Koishybayeva S.
Influence of different aquaculture conditions on some biochemical indices of juvenile tilapia 64

Section 4
Molecular biology and Genetics

Atambayeva S.A., Ivashchenko A.T., Niyazova R.Y.
The genes associated with the development of cardiovascular diseases 74

Ivashchenko A.T., Niyazova R.Y., Atambayeva S.A., Pyrkova A.Y., Pinsky I.V., Alybayeva A.Z.,
Akimniyazova A.N., Mamirova A.A., Makashev E.K.
microRNAs and mRNAs genes associated with the development of myocardial infarction 82

Kozhamkulov U.A., Kairov U.E., Rakhimova S.E., Yerezhepov D.A.,
AkhmetovaA.Zh., Molkenov A.B., Utyubayev A., Akilzhanova A.R.
Identification of genetic markers of drug resistance based on whole genomes of clinical isolates of *M. Tuberculosis* 94

Sagyndykova M.S., Imanbaeva A.A., Sarsenbaev K.N., Ahmetollaev I.A.
Population variability of Ferula foetida genomic DNA, growing in arid Mangistau environment 104

Taipakova S.M., Smekenov I.T., Bissenbaev A.K.
Development of recombinant yeast strains for production of bioethanol from cellulosic feedstock 116

Ussenbekov Y.S., Yakovlev A.F., Akimzhan N.A.
Results of monitoring bulls carrier genetic defects 128

Khussainova E.M., Djantaeva K.B., Amirgalieva A.S., Muratova F.T., Skvortsova L.A.,
Nurzhibek, Utegenova K.S., Perfilyeva A.V., Bekmanov B.O.
The study of polymorphisms of genes involved in antioxidant reactions in people exposed to radiation 140

Section 5
Biotechnology

Mustafin K.G., Ahmetsadykov N.N., Bisko N.A., Suleimenova Zh.B., Narmuratova Zh.B., Saduyeva Zh.K.
Selection of the optimal culture conditions for high biomass synthesis by *Trametes versicolor* 150

Smirnova I.E., Sadanov A.K., Sabdenova A.A, Sultanov A.Z., Nurmuhanbetova A.M.
Creating EM-associations, study their effects on the pasture grasses and biological activity of degraded soils 160

Trenozhnikova L.P., Ultanbekova G.D., Balgimbaeva A.S., Galimbaeva R.Sh., Masirbaeva A.
Optimization of culture conditions for strains of the genus *Streptomyces* formulatingbiopreparation for plant cultivation..... 168

Section 6
Immunology

Abdolla N., Perfilyeva Yu.V., Ostapchuk Ye.O., Oskolchenko I.A., Krasnoshtanov V.K., Severova E.A., Pominova N.M., Denisov Yu.D., Belyaev N.N.
Myeloid derived suppressor cells in experimental chronic inflammation 178

Kiyan V.S.
Biochemical and immunological properties of excretory-secretory antigen *Opisthorchis felineus* 188

Section 7
Microbiology

Kushnarenko S.V., Utegenova G.A., Shegebaeva A.A., Ozek G., Ozek T., Abidkulova K.T., Kotukhov Y.A., Danilova A.N.
Antimicrobial activity of essential oils from several Kazakhstan plants..... 198

Ultanbekova G.D., Trenozhnikova L.P, Balgimbaeva A.S., Galimbaeva R.Sh., Baydyldaeva Zh., Nysanbayeva A.A., Salkhozhaeva G.M.
Studies on the composition of rhizosphere microbiocenoses of sea buckthorn growing in ecosystems of Almaty oblast 208

УСПЕЙТЕ ПОДПИСАТЬСЯ НА СВОЙ ЖУРНАЛ

АКЦИЯ!!!

Каждому подписчику ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ БЕСПЛАТНО!!!

- **Акция действительна при наличии квитанции об оплате годовой подписки.**
- **Статья должна соответствовать требованиям размещения публикации в журнале.**
- **Статья печатается в той серии журнала, на которую подписался автор.**
- **Все нюансы, связанные с публикацией статьи, обсуждаются с ответственным секретарем журнала.**

АКЦИЯ!!!

Издательский дом
«Қазақ университеті»
г. Алматы,
пр. аль-Фараби, 71
8 (727) 377 34 11, 221 14 65

АО «КАЗПОЧТА»
г. Алматы,
ул. Богенбай батыра, 134
8 (727 2) 61 61 12

ТОО «Евразия пресс»
г. Алматы,
ул. Жибек Жолы, 6/2
8 (727) 382 25 11

ТОО «Эврика-пресс»
г. Алматы,
ул. Кожамкулова, 124, оф. 47
8 (727) 233 76 19, 233 78 50