
СОДЕРЖАНИЕ

Номер 5, 2021

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

Химическая основа автотрофного палеометаболизма фиксации углерода

С. А. Маракушев, О. В. Белоногова

453

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Цитологические основы регулятивного развития иглокожих и детерминированного у моллюсков

А. Л. Дроздов

464

БИОХИМИЯ

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена у молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) при переходе из пресной среды в морскую

М. В. Чурова, Н. С. Шульгина, М. Ю. Крупнова, Д. А. Ефремов, Н. Н. Немова

470

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Изменение гормонального статуса и интенсивности фотосинтеза растений картофеля, трансформированных *Vt*-геном

Т. И. Пузина, В. В. Король, И. Ю. Макеева

479

ЗООЛОГИЯ

Жизненный цикл трематоды *Gynaecotyla adunca* (Trematoda: Microphallidae) в Черном море

Ю. В. Белоусова

486

Преобладание самок в некоторых выборках сеголеток и производителей трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* обусловлено не генетическими, а экологическими факторами

В. С. Артамонова, Н. В. Бардуков, П. В. Головин, Т. С. Иванова, М. В. Иванов, Д. Л. Лайус, А. А. Махров

495

Структура и формирование капсулы вокруг скребня *Corynosoma strumosum* в естественном паразитическом хозяине – рыбе *Hadropareia middendorffii*.
2. Экспериментальное изучение процесса инкапсуляции (предварительные результаты)

Е. М. Скоробрехова, В. П. Никишин

507

Изменение соотношения типов реореакции у рыб при голодании

Д. С. Павлов, В. В. Костин, В. Ю. Паршина, Е. Д. Павлов

521

Возрастная изменчивость рекламной песни мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) в условиях естественной и городской среды

А. Е. Бастрикова, С. И. Гашков, Н. С. Москвитина

528

ЭКОЛОГИЯ

Опыт оценки воздействия лесо-торфяных пожаров на гидрохимические свойства эутрофных болот

Т. Т. Ефремова, А. В. Пименов, С. П. Ефремов, А. Ф. Аврова, Д. Ю. Ефимов

537

Выявление и регуляция антагонистических свойств почвенного актиномицета *Streptomyces* sp. 89

Ю. М. Поляк, В. И. Сухаревич

547

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Некоторые показатели неспецифического иммунитета различных селекционных групп карпа в разные периоды годового цикла

*Д. В. Микряков, Г. И. Пронина, Т. А. Суворова, А. С. Соколова,
В. Р. Микряков, А. Б. Петрушин*

556

Contents

No. 5, 2021

Theoretical and Evolutionary Biology

Chemical Basis of Autotrophic Carbon Fixation Paleometabolism

S. A. Marakushev and O. V. Belonogova 453

Developmental Biology

Cytological Bases of Regulatory Development in Echinoderms
and Determined in Molluscs

A. L. Drozdov 464

Biochemistry

Activity of Energy and Carbohydrate Metabolism Enzymes in Juvenile Pink Salmon
Oncorhynchus gorbuscha (Walb.) During the Transition from Fresh Environment Marine

M. V. Churova, N. S. Shulgina, M. Yu. Krupnova, D. A. Efremov, and N. N. Nemova 470

Plant Physiology

The Changes in Hormonal Status and Photosynthesis of the Potato Plants
Transformed by the *Bt*-Gene

T. I. Puzina, V. V. Korol, and I. Yu. Makeeva 479

Zoology

The Life Cycle of the Trematode *Gynaecotyla adunca* (Trematoda: Microphallidae)
in the Black Sea

Yu. V. Belousova 486

Female-Biased Sex Ratio in Some Young of the Year and Spawner Samples
of Threespine Stickleback *Gasterosteus aculeatus* is Due Not to Genetic,
but Environmental Factors

*V. S. Artamonova, N. V. Bardukov, P. V. Golovin, T. S. Ivanova, M. V. Ivanov,
D. L. Lajus, and A. A. Makhrov* 495

Structure and Formation of a Capsule Around the Acanthocephalan *Corynosoma strumosum*
in a Natural Paratenic Host – Fish *Hadropareia middendorffii*. 2. Experimental Study
of the Encapsulation Process (Preliminary Results)

E. M. Skorobrekhova and V. P. Nikishin 507

Modification of the Ratio of Rheoreaction Types in Fish During Starvation

D. S. Pavlov, V. V. Kostin, V. U. Parshina, and E. D. Pavlov 521

Age-Related Variability of the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) Song in Natural
and Urban Environments

A. E. Bastrikova, S. I. Gashkov, and N. S. Moskvitina 528

Ecology

Experience in Assessing the Impact of Forest-Peat Fires on the Hydrochemical Properties of the Swamps

T. T. Efremova, A. V. Pimenov, S. P. Efremov, A. F. Avrova, and D. Yu. Efimov

537

Detection and Regulation of Antagonistic Properties of Soil Actinomycete
Streptomyces sp. 89

Y. M. Polyak and V. I. Sukharevich

547

Short Communications

Some Indicators of Nonspecific Immunity of Various Breeding Groups of Carp
in Different Periods of the Annual Cycle

D. V. Mikryakov, G. I. Pronina, T. A. Suvorova, A. S. Sokolova, V. R. Mikryakov, and A. B. Petrushin

556

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ
И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 550.41:577.37:553.492:576.8

ХИМИЧЕСКАЯ ОСНОВА АВТОТРОФНОГО
ПАЛЕОМЕТАБОЛИЗМА ФИКСАЦИИ УГЛЕРОДА

© 2021 г. С. А. Маракушев*, @, О. В. Белоногова*, @@

*Институт проблем химической физики РАН, пр. Академика Н. Семенова, 1,
Черниголова, Московской обл., 142432 Россия

@E-mail: marak@cat.icp.ac.ru

@@E-mail: ovbel@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 17.11.2019 г.

После доработки 04.03.2021 г.

Принята к публикации 04.03.2021 г.

На основе биомиметического, филониметического и термодинамического анализа современных путей ассимиляции CO_2 проведена палеофенотипическая реконструкция древних систем автотрофного метаболизма. В качестве химической основы CO_2 -фиксирующего палеометаболизма рассматриваются метаболические сети, способные к самовоспроизведению и эволюции; главным фактором саморазвития этой сети является обратимость реакций трансформации ее интермедиатов. Вещества системы С–Н–О, парагенетически связанные с углеводородами, создают фазовое пространство, представляющее собой совокупность универсальных интермедиатов химической сети автотрофного палеометаболизма. Предлагается концепция двух стратегий зарождения и развития палеометаболизма автотрофной фиксации углерода в окислительном (CO_2) и восстановительном (CH_4) редокс режиме дегазации древней Земли. Показано, что *P-T* и редокс условия гидротермальных систем раннего Архея были благоприятны для развития первичного метанотрофного метаболизма.

Ключевые слова: хемоавтотрофная фиксация CH_4 и CO_2 , биомиметические модели, универсальные интермедиаты метаболизма, сеть химических реакций, углеводороды, гидротермальные системы раннего Архея, первичность метанотрофии

DOI: 10.31857/S1026347021050097

Палеометаболизм представляет собой метаболизм филогенетически выявленных эволюционно древних организмов, а также метаболизм, существовавший в вымерших предшественниках современных организмов. Фиксация неорганического углерода в органический материал (автотрофия) является предпосылкой для жизни и отправной точкой биологической эволюции, а палеометаболизм автотрофной ассимиляции углерода, очевидно, являлся источником биомассы и основой функционирования первых протоклеток на древней Земле.

В современном создающим биоорганические вещества автотрофном метаболизме углерод ассимилируется главным образом в виде двуокиси углерода и существующие биохимические CO_2 фиксирующие пути являются фундаментом биомиметического моделирования автотрофного палеометаболизма на древней Земле. Однако существуют доказательства того, что атмосфера и гидросфера раннего Архея была обогащена водородом и метаном (Tian *et al.*, 2005; Catling, Kasting, 2017; Zahnle *et al.*, 2019), а континентальная кора раннего Ар-

хея по сравнению с современной была более восстановлена (Yang *et al.*, 2014).

Восстановительная гидротермальная обстановка на древней Земле подразумевает возможность того, что первые автотрофные метаболические системы способны были использовать метан, как основной источник углерода, т.е. обладать метан-фиксирующим палеометаболизмом, который впоследствии был утрачен в процессе эволюции или отброшен в экстремальные экологические ниши. В настоящей работе на основе биомиметического, филониметического и термодинамического анализов углерод-фиксирующих путей рассматриваются химические модели систем пребиотической фиксации CO_2 и CH_4 , являвшихся химической основой зарождающегося хемоавтотрофного палеометаболизма.

Палеометаболизм фиксации CO_2 . Природа использует альтернативные пути фиксации углерода и в настоящее время обнаружено шесть различных автотрофных CO_2 -фиксирующих путей, один линейный (восстановительный Вуда-Лунгдала (ВЛ)

путь (метаногенный и ацетогенный ацетил-СоА путь в археях и бактериях соответственно) и пять циклических: восстановительный цитратный (ВЦ) цикл (восстановительный цикл трикарбоновых кислот, цикл Арнона–Баханана), 3-гидроксипропионатный (3-ГП) бицикл, восстановительный дикарбоксилатный/4-гидроксипропионатный, 3-гидроксипропионатный/4-гидроксипропионатный циклы и восстановительный пентозо-фосфатный (ВПФ) цикл (цикл Кальвина–Бенсона–Бассама). Все шесть известных путей фиксации CO₂ являются окончательными ветвями эволюции предкового палеометаболического ядра последнего универсального общего предшественника (LUCA), который является подразумеваемым эволюционным интермедиатом, связывающим абиотическую фазу истории Земли с первыми следами микробной жизни (биологическая активность, строматолиты и микрофоссилии), которые обнаружены в породах с возрастом 3.7 млрд лет (Ga) (Nutman *et al.*, 2016). Однако LUCA уже является невероятно сложной структурой, окруженной мембраной с развитыми управляемыми ферментами системами репликации и метаболизма (Martin *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2018), который появился в результате эволюции химической системы С–Н–О в гидротермальных минеральных системах.

Современный ВЦ цикл, как один из самых эволюционно древних путей фиксации CO₂ был предложен и обоснован в качестве модели первичной анаболической химической системы фиксации CO₂ (Wächtershäuser, 1990, 1992; Smith, Morowitz, 2004; Hügler, Sievert, 2011). В то же время ряд аргументов свидетельствует о первичности ацето- и метаногенного ВЛ пути фиксации CO₂ (Russell, Martin, 2004; Martin, Russell, 2007; Weiss *et al.*, 2016 и др.) и 3-ГП бицикла фиксации CO₂ (Маракушев, 2008; Маракушев, Белоногова, 2013б).

Появление функциональности автономных химических функциональных систем, очевидно находится в основе биологической эволюции (Ruiz–Mirazo *et al.*, 2017). Формирование “самоподдерживающихся автокаталитических сетей” как химической основы возникающего палеометаболизма LUCA теоретически показано во многих исследованиях (напр., Hordijk, Steel, 2018), а погранично модулярная конструкция интермедиатов циклов фиксации CO₂ позволила создать модели протометаболических систем в виде химической сети симбиоза конкретных путей (Маракушев, 2008; Маракушев, Белоногова, 2010, 2013а, 2013б; Marakushev, Belonogova, 2013; Braakman, Smith, 2012, 2013). В этих моделях точки разветвления (узлы бифуркации) определяют развитие химической сети в различных направлениях в зависящих от изменений физико-химических условий окружающей среды. Термодинамиче-

скими расчетами показана возможность функционирования автотрофных циклов в прямом и обратном направлении (Маракушев, Белоногова, 2009, 2012, 2013а, 2013б), т.е. возможность зарождения окислительных или восстановительных циклов, приводящих к появлению автотрофного, гетеротрофного и миксотрофного метаболизма. Филометаболическое сравнение метаболических ядер глубоко укорененных микроорганизмов с родственными организмами как внутри, так и между соседними ветвями, также привело к модели первичной модулярной комбинаторной сети фиксации CO₂ (Braakman, Smith, 2012, 2013).

Минимальную комбинаторную химическую сеть автотрофного протометаболизма можно представить в виде комбинации ВЛ пути, ВЦ цикла и 3-ГП бицикла (рис. 1). Их сопряжение осуществляется в узловых реакциях изменения направления потока электронов. Реакция сукцинат ↔ фумарат связывает ВЦ и 3-ГП циклы, а реакцией ацетат ↔ пируват к этой сети добавляется ВЛ путь, состоящий из двух ветвей гидрогено-трофного (Ia) и метанотрофного (Ib) ацетогенеза. Карбоксилирование ацетата завершает ВЛ путь: CH₃COOH (ацетат) + CO₂ + H₂ = CH₃(CO)COOH (пируват) + H₂O или инициирует 3-ГП бицикл: CH₃COOH (ацетат) + CO₂ = CH₂(COOH)₂ (малонат).

Химические реакции (табл. 1) с отрицательной свободной энергией (экзергонические) термодинамически высвобождают энергию при их протекании. Очевидно, что обратимость реакций является ключевым фактором функционирования и эволюции этой сети. Например, свободная энергия ключевой реакции диспропорционирования цитрат → оксалоацетат + ацетат колеблется около нулевого значения как при физиологических температурах (–7.24 кДж), так и при 473 К (–15.15 кДж), (табл. 1), а недавние биохимические исследования показали полную обратимость цитратного цикла в *Nitrospirae*, что во многом определяется этой обратимой “лигазной” реакцией (Nunoura *et al.*, 2018; Mall *et al.*, 2018). Реакция сукцинат ↔ фумарат является редокс переключателем направления потока электронов между 3-ГП и ВЦ циклами, т.е. величину свободной энергии реакции сукцинат ↔ фумарат ($G_{298}^0 = -102.24$ кДж) (табл. 1) можно условно считать некоторым критерием и пределом обратимости реакций всех протометаболических циклов. Такой термодинамический контроль реализуется в многоступенчатости реакций с небольшим изменением свободной энергии Гиббса, что является важным фактором обратимости функционирования модулей суперцикла. Фосфоенолпируват уже не может стать интермедиатом этой метаболической сети, так как реакции фосфорилирования пирувата и оксалоацетата практически необратимы, (табл. 1), что свидетельствует в пользу гипотез

Таблица 1. Свободные энергии Гиббса для реакций карбоксилирования, гидратации, гидрогенизации и расщепления в ВЦ и 3-ГП циклах и ВЛ пути в водных растворах при температурах 298 и 473 К и давлении насыщения паров воды ($P_{НАС}$)

	Реакции интермедиатов CO ₂ фиксирующей сети	ΔG_{298}^0 , кДж	ΔG_{473}^0 , кДж
ВЛ путь	CO ₂ + H ₂ = CO + H ₂ O	11.04	13.51
	CO ₂ + CO + 3H ₂ = CH ₃ COOH(ацетат) + H ₂ O	-180.54	-128.87
ВЛ путь, ВЦ цикл	CH ₃ COOH(ацетат) + CO ₂ + H ₂ = CH ₃ (CO)COOH(пируват) + H ₂ O	45.46	71.91
	2CO₂ + 4H₂ = CH₃COOH(ацетат) + 2H₂O	-169.50	-115.3
ВЦ цикл	CH ₃ (CO)COOH(пируват) + CO ₂ = CH ₂ CO(COOH) ₂ (оксалоацетат)	13.11	35.03
	CH ₂ CO(COOH) ₂ (оксалоацетат) + H ₂ = CH ₂ CH(OH)(COOH) ₂ (малат)	-65.49	-55.78
	CH ₂ CH(OH)(COOH) ₂ (малат) = (CH) ₂ (COOH) ₂ (фумарат) + H ₂ O	5.68	-5.26
	(CH) ₂ (COOH) ₂ (фумарат) + H ₂ = (CH ₂) ₂ (COOH) ₂ (сукцинат)	-102.24	-88.88
	(CH ₂) ₂ (COOH) ₂ (сукцинат) + CO ₂ + H ₂ = (CH ₂) ₂ CO(COOH) ₂ (2-оксоглутарат) + H ₂ O	17.90	47.89
	(CH ₂) ₂ CO(COOH) ₂ (2-оксоглутарат) + CO ₂ + H ₂ = (CH ₂) ₂ C(OH)(COOH) ₃ (цитрат)	-18.11	1.82
	(CH ₂) ₂ CO(COOH) ₂ (2-оксоглутарат) + CO ₂ + H ₂ = (CH ₂) ₂ C(OH)(COOH) ₃ (изоцитрат)	-15.69	-
	(CH ₂) ₂ C(OH)(COOH) ₃ (изо-цитрат) = C ₆ H ₆ O ₆ (цис-аконитат) + H ₂ O	2.36	-
	C ₆ H ₆ O ₆ (цис-аконитат) + H ₂ O = (CH ₂) ₂ C(OH)(COOH) ₃ (цитрат)	-4.78	-
	(CH ₂) ₂ C(OH)(COOH) ₃ (цитрат) = CH ₂ CO(COOH) ₂ (оксалоацетат) + CH ₃ COOH(ацетат)	-7.24	-15.15
3-ГП бицикл	CH ₃ COOH(ацетат) + CO ₂ = CH ₂ (COOH) ₂ (малонат)	48.10	68.28
	CH ₂ (COOH) ₂ (малонат) + H ₂ = HCOCH ₂ COOH(малонат семиальдегид) + H ₂ O	-50.32	-49.96
	HCOCH ₂ COOH(малонат семиальдегид) + H ₂ = (OH)CH ₂ CH ₂ COOH(3-гидрокси-пропионат)	-43.93	-52.84
	(OH)CH ₂ CH ₂ COOH(3-гидроксипропионат) + H ₂ = CH ₃ CH ₂ COOH(пропионат) + H ₂ O	-89.92	-61.88
	CH ₃ CH ₂ COOH(пропионат) + CO ₂ = CHCH ₃ (COOH) ₂ (метилмалонат)	47.7	69.07
	CHCH ₃ (COOH) ₂ (метилмалонат) = (CH ₂) ₂ (COOH) ₂ (сукцинат)	-15.11	-15.66
	CH ₃ CH ₂ COOH(пропионат) + HCOCOOH(глиоксилат) = CHCH ₃ CH(OH)(COOH) ₂ (метилмалат)	-74.74	-52.35
	CHCH ₃ CH(OH)(COOH) ₂ (метилмалат) = CCH ₃ CH(COOH) ₂ (мезаконат) + H ₂ O	5.64	-5.61
	CCH ₃ CH(COOH) ₂ (мезаконат) + H ₂ O = (OH)CCH ₃ CH ₂ (COOH) ₂ (цитрамалат)	30.05	39.29
	(OH)CCH ₃ CH ₂ (COOH) ₂ (цитрамалат) = CH ₃ (CO)COOH(пируват) + CH ₃ COOH(ацетат)	19.35	1.73
	2CO₂ + 2H₂ = OHC(OH)COOH(глиоксилат) + H₂O	31.73	69.88
ВПФ цикл	CH ₃ (CO)COOH(пируват) + H ₃ PO ₄ = C ₃ H ₅ O ₆ P(фосфоенолпируват) + H ₂ O	875.73	917.27
	CH ₂ CO(COOH) ₂ (оксалоацетат) + H ₃ PO ₄ = C ₃ H ₅ O ₆ P + H ₂ O + CO ₂	865.62	882.24

Примечание. Жирным шрифтом показаны суммарные реакции циклов. Реакции фосфорилирования пирувата и оксалоацетата инициируют восстановительный пентозо-фосфатный (ВПФ) путь фиксации CO₂. Использованы термодинамические константы из работ (Amend, Shock, 2001; Маракушев, Белоногова, 2012; Marakushev, Belonogova, 2013 (Suppl. Mat)).

первичного бесфосфорного метаболизма (Goldford *et al.*, 2017).

На основе простого набора структурных ограничений, полученных из физических и химических соображений, был определен набор интермедиатов из 153 органических веществ (40 составов) системы С–Н–О для теоретических расчетов всех возможных комбинаций интерме-

диатов циклов фиксации CO₂ (Morowitz *et al.*, 2000). Компьютерное моделирование с использованием термодинамических и кинетических характеристик реакций карбоксилирования, гидратации, гидрогенизации и расщепления показывает, что “пространство” химических структур интермедиатов с оптимальными характеристиками для фиксации CO₂ в несколько раз превышает набор ин-

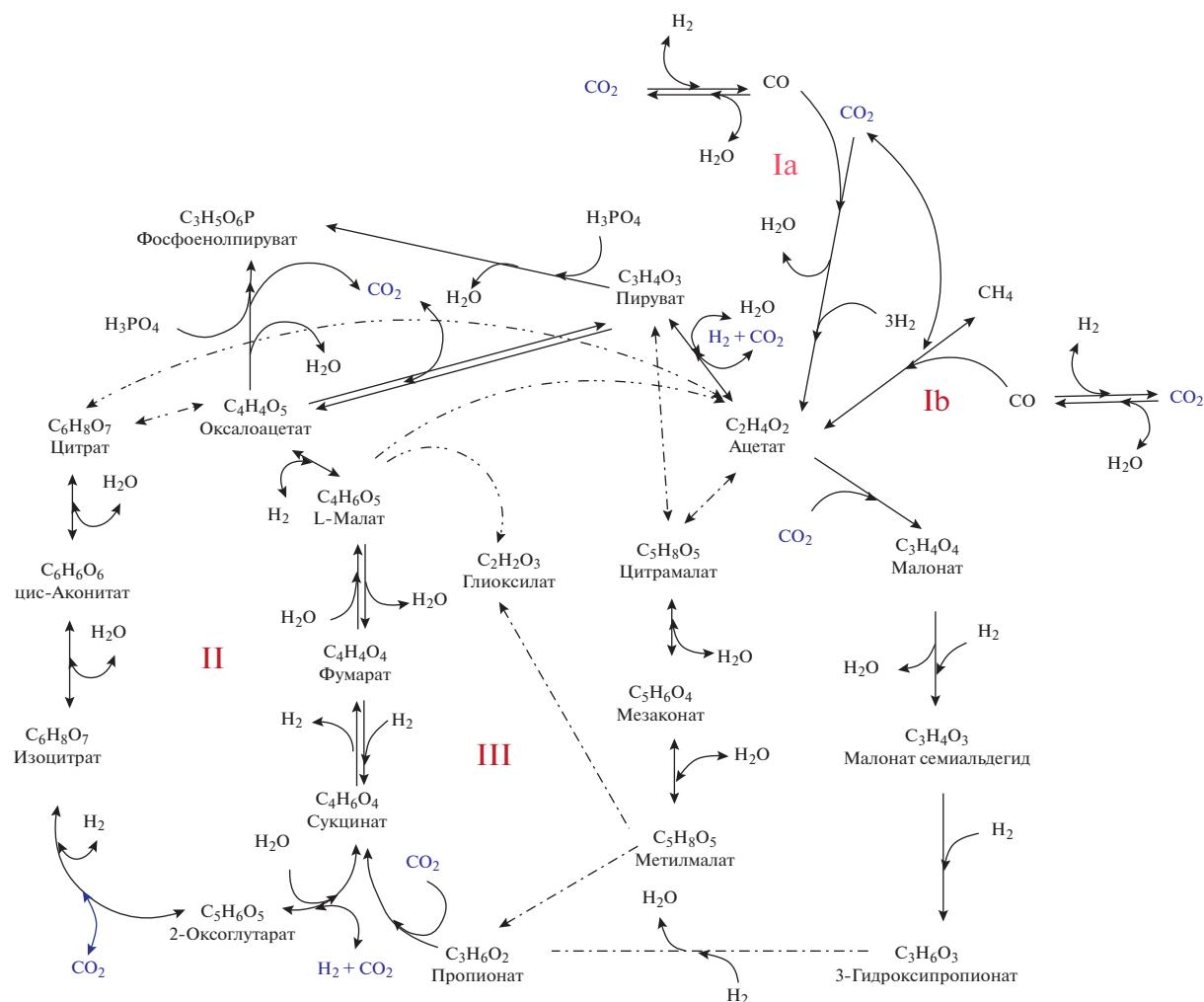


Рис. 1. Химическая сеть протометаболизма, состоящая из трех биомиметически реконструированных путей фиксации CO₂ с возможным коллективным автокатализом, как функциональное способное к развитию ядро. Реакции диспропорционирования малата, цитрата и цитрамалата показаны штрихпунктирными линиями. Биомиметические пути фиксации CO₂: Ia – гидрогенотрофный и Ib – метанотрофный ацетогенез, II – цитратный цикл, III – 3-гидроксипропионатный бицикл. Показаны выявленные в биохимии (Mall *et al.*, 2018) и модельных экспериментах (Muchowska *et al.*, 2017, 2019; Ralsler, 2018; Varma *et al.*, 2018) обратимые реакции. Необратимые реакции фосфорилирования пирувата и оксалоацетата инициируют ВПФ цикл фиксации CO₂ (образование фосфоенолпирувата).

термедиатов Моровитца (Meringer, Cleaves, 2017). Вся совокупность этих веществ можно представить на фазовой диаграмме составов, (рис. 2). Равновесие C–H₂O разделяет диаграмму на окислительную (I) и восстановительную (II) фации. Все составы веществ Моровитца, Мерингера располагаются в окислительной фации I. Набор интермедиатов для общего метаболического ядра может быть значительно расширен вовлечением углеводородов в протометаболическую сеть (Zubarev *et al.*, 2015). В этом случае “химическое пространство” интермедиатов существенно сдвигается в восстановительную фацию II, (рис 2). Важно, что в рамках этого пространства и располагаются все интермедиаты универсального ядра промежуточного метаболизма (Morowitz *et al.*,

2000; Маракушев и Белоногова, 2009, 2010; Braakman, Smith, 2012, 2013; Goldford *et al.*, 2017). На диаграмме составов C–H–O (рис. 2) все они локализованы внутри треугольника с углеводородным основанием CH₄–C₂H₄.

Углеводороды часто обнаруживают в газожидких включениях минералов глубинной генерации (Potter, Konnerup-Madsen, 2003), а недавним замечательным открытием является обнаружение включений абиогенных углеводородов и простых органических веществ в Архейском кварце из Австралийских конгломератов Джек Хиллс (Schreiber *et al.*, 2017), которые в те времена могли являться источниками углерода возникающего метаболизма. На диаграмме составов (рис. 2) они большей частью расположены в системе

Таблица 2. Свободные энергии реакций МФ ветви (I) бицикла и суммарная реакция фиксации CH₄ с участием окисленных форм азота и железа в качестве окислителей в гидротермальных условиях при температурах 298 и 473 К и P_{НАС}

Реакции МФ цикла	ΔG_{298}^0 , кДж	ΔG_{473}^0 , кДж
$(\text{CH})_2(\text{COOH})_2(\text{фумарат}) + \text{CH}_4 = (\text{CH}_2)(\text{CH}_3\text{CH})(\text{COOH})_2(\text{метилсукцинат})$	-44.95	-29.97
$(\text{CH}_2)(\text{CH}_3\text{CH})(\text{COOH})_2(\text{метилсукцинат}) + \text{H}_2\text{O} = (\text{CH}_3\text{CH})\text{CH}(\text{OH})(\text{COOH})_2(\text{цитрамалат}) + \text{H}_2$	96.57	94.14
$(\text{CH}_3\text{C}=\text{CH})(\text{COOH})_2(\text{мезаконат}) + \text{H}_2 = (\text{CH}_2)(\text{CH}_3\text{CH})(\text{COOH})_2(\text{метилсукцинат})$	-66.53	-54.85
$(\text{CH}_3\text{C}=\text{CH})(\text{COOH})_2(\text{мезаконат}) + \text{H}_2\text{O} = (\text{CH}_3\text{CH})\text{CH}(\text{OH})(\text{COOH})_2(\text{цитрамалат})$	30.05	39.29
$\text{CH}_3\text{CH}\text{CH}(\text{OH})(\text{COOH})_2(\text{цитрамалат}) = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2(\text{ацетат}) + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3(\text{пируват})$	19.35	1.73
Суммарная фиксация метана		
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4(\text{фумарат}) + \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2(\text{ацетат}) + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3(\text{пируват}) + \text{H}_2$	70.97	65.9
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + 0.5\text{O}_2 = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$	-192.22	-182.53
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + 2\text{HNO}_2 = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}$	-115.77	-143.28
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + 2\text{NO} = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{N}_2\text{O}$	-274.7	-250.83
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + \text{NO} = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + 0.5\text{N}_2$	-276.93	-264.48
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + \text{Fe}_3\text{O}_4 + 1.5\text{SiO}_2 = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + 1.5\text{Fe}_2\text{SiO}_4$	45.08	25.21
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + 3\text{Fe}_2\text{O}_3 = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + 2\text{Fe}_3\text{O}_4$	22.38	13.87
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{CH}_4 + 0.75\text{FeS}_2 + 0.25\text{Fe}_3\text{O}_4 = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + 1.5\text{FeS}$	38.78	31.54

Примечание. Свободные энергии образования водных веществ по данным (Amend, Shock, 2001; Marakushev, Belonogova, 2013 (Suppl. mat.)).

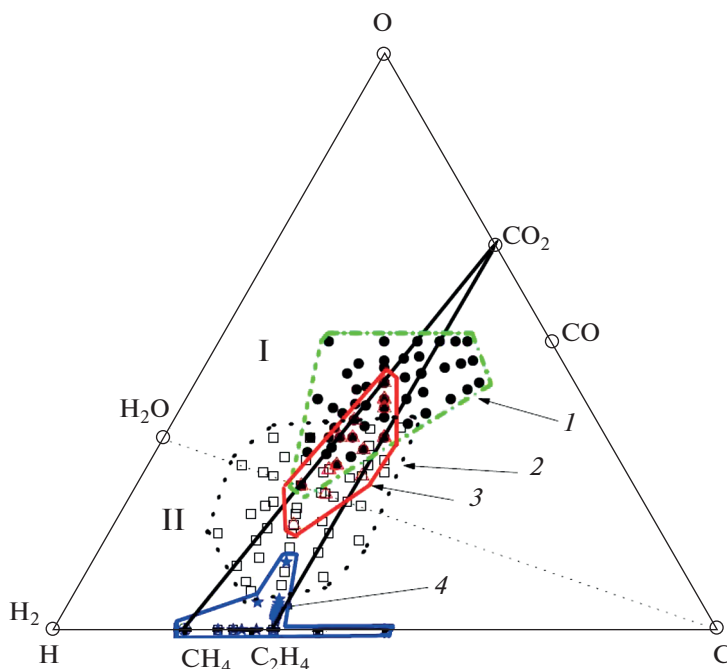


Рис. 2. Фазовое пространство интермедиатов автотрофного метаболизма на диаграмме составов системы С–Н–О. Представлены возможные интермедиаты хемоавтотрофных систем фиксации CO₂ согласно Моровитцу, Мерингеру (1 – залитые кружки, оконтурено зеленым штрих-пунктиром) (Morowitz *et al.*, 2000; Meringer, Cleaves, 2017) и Зубареву (2 – квадраты, оконтурено черным пунктиром) (Zubarev *et al.*, 2015). 3 – Универсальные интермедиаты палеометаболизма (треугольники, оконтурено красным цветом) (Маракушев, Белоногова, 2009, 2010; Braakman, Smith 2012, 2013), 4 – включения углеводородов и простых органических веществ в Архейском кварце (звезды, оконтурено синим) (Schreiber *et al.*, 2017).

$\text{CH}_4\text{--CO}_2\text{--C}_2\text{H}_4$, охватывающие все интермедиаты универсального ядра метаболизма и, как отмечалось нами ранее (Маракушев, 2008), легкие углеводороды (от метана до этилена и его производных) могли являться химическим источником (и анаэробными составляющими) возникающих интермедиатов циклов фиксации CO_2 .

Таким образом, “химическое пространство” веществ системы C--H--O является термодинамически контролируемой сетью реакций интермедиатов, создающей модулярные конструкции развивающиеся в определенных физико-химических условиях в конкретные хемоавтотрофные системы фиксации CO_2 . И все же, возникающий автотрофный палеометаболизм мог быть несколько иным, если основным источником углерода для автотрофных химических сетей была не двуокись углерода, а эндогенный метан.

Автотрофный палеометаболизм фиксации метана. Недавние исследования изотопного фракционирования углерода в древних породах показали, что возраст первых возможных следов жизни существенно сдвинулся в сторону Катархея: 3.77 млрд лет (Ga) (Dodd *et al.*, 2017), 3.83 Ga (McKeegan *et al.*, 2007), 3.95 Ga (Tashiro *et al.*, 2017), 4.10 Ga (Bell *et al.*, 2015) и, очевидно, что окружающие условия в это время определяли пути эволюции возникающих метаболических сетей. Континентальная кора и верхняя мантия ранней Земли были значительно более восстановлены по сравнению с современными аналогами (Yang *et al.*, 2014), а метан видимо был преобладающим газом в гидросфере и атмосфере (Pavlov *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2005; Zahnle *et al.*, 2019). Газово-жидкие включения углеводородов и органических веществ в Архейском кварце (Touret, 2003; Schreiber *et al.*, 2017) также указывают на достаточно восстановительную обстановку в этот период времени. Возможно, что высокое парциальное давление метана, существовавшее в гидротермальных системах древней Земли, приводило к формированию первичных метан ассимилирующих автотрофных протометаболических систем.

Модель первичного древнего анаэробного метанотрофного пути ацетогенеза, в котором источником углерода является метан вместо CO_2 , была предложена в работах (Nitschke, Russell, 2013; Russell, Nitschke, 2017), в которых обратный ВЛ путь (обозначенный на рис. 1 цифрой Ib) был предложен в качестве биомиметической основы автотрофного метаболизма. Окислителем метана в этом пути предполагается активированная окись азота (NO), образованная в процессе трансформации нитрат/нитрит, и авторы предполагают, что этот путь фиксации CH_4 (“денитрифицирующий метанотрофный ацетогенез”) был первой энергетической системой метаболизма в гидротермальных выбросах ранней Земли.

Недавние исследования показали, что архея *Methanosarcina acetivorans* образует ацетат в обратном ВЛ пути когда окисление метана сопряжено восстановлением железа (III) (Soo *et al.*, 2016; Timmers *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2018). Стехиометрия реакции обратного ВЛ пути в археях предполагает механизм, в котором четыре молекулы метана окисляются и две молекулы CO_2 восстанавливаются с образованием трех молекул ацетата (Soo *et al.*, 2016). Этот путь карбокси-метанотрофного ацетогенеза также можно рассматривать в качестве биомиметической модели первичной метаболической системы фиксации CH_4 . Он термодинамически очень выгоден с использованием NO в качестве окислителя: $\text{CH}_4 + 0.5\text{CO}_2 + 2\text{NO} + \text{H}_2 = 0.75\text{CH}_3\text{COOH} + \text{N}_2 + 1.5\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G_{298}^0 = -629.17$; $\Delta G_{473}^0 = -592.04$ кДж/моль CH_4 и достаточно благоприятен при сопряжении с восстановлением трехвалентного железа – составляющая минерала гематита: $\text{CH}_4 + 0.5\text{CO}_2 + 6\text{Fe}_2\text{O}_3$ (гематит) + $\text{H}_2 = 0.75\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{Fe}_3\text{O}_4$ (магнетит) + $1.5\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G_{298}^0 = -30.54$; $\Delta G_{473}^0 = -35.34$ кДж/моль CH_4 .

Иницирующим шагом в анаэробном окислении как ароматических, так и алифатических углеводородов является связывание их с фумаратом (Haynes, Gonzalez, 2014), а реакция метана с фумаратом $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ (фумарат) + $\text{CH}_4 = \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ (2-метилсукцинат) удовлетворяет энергетическим требованиям для автотрофного роста (Thauer, Shima 2008; Beasley, Nunny, 2012; Aversch, Kracke, 2018). Это предполагает возможность ее участия в зарождающемся автотрофном метаболизме (Marakushev, Belonogova, 2019), именно внутри рассмотренного выше универсального “химического пространства” интермедиатов: карбокси- и α -кетокислот.

Рассмотрим конструкцию метаболической сети, объединяющую часть рассмотренного выше универсального ядра палеометаболизма (последовательность ВЦ цикла) (рис. 1), с предполагаемым метано-фумаратным (МФ) циклом (Marakushev, Belonogova, 2019), как модель метанотрофного метаболизма (рис. 3), зародившегося и функционировавшего в восстановительных гидротермальных системах раннего Архея при высоком парциальном давлении метана. Представлена комбинация части ВЦ цикла фиксации CO_2 с метано-фумаратной ветвью фиксации CH_4 , как предполагаемая химическая основа первичного автотрофного палеометаболизма (ВЦ-МФ бицикл). В этом химическом симбиозе циклов точкой бифуркации является фумарат, который трансформируется в сукцинат (инициация ВЦ цикла) или 2-метилсукцинат (инициация МФ цикла).

Ассимиляция метана осуществляется при присоединении метана к фумарату с образованием

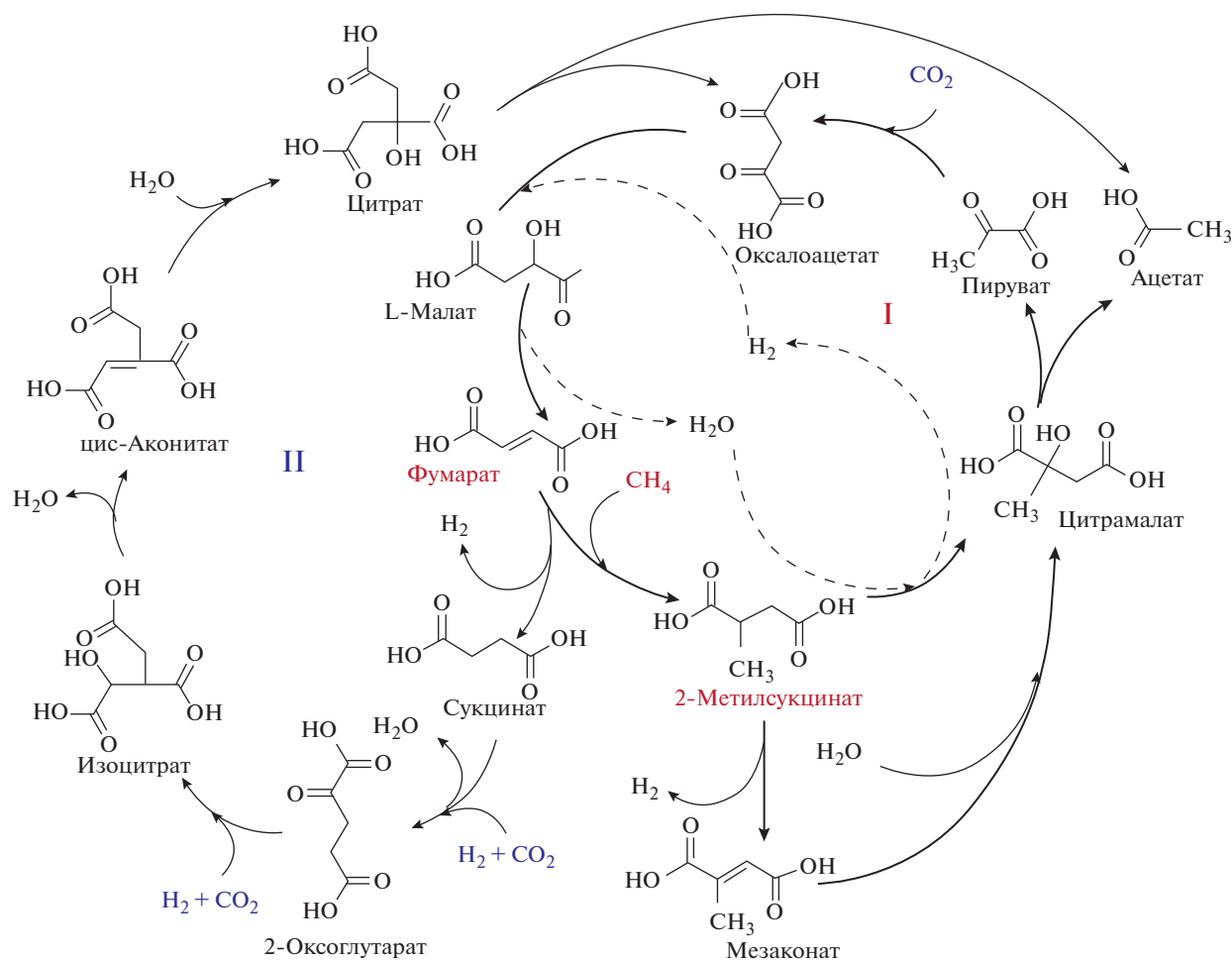


Рис. 3. Схема сопряжения метан-фумаратного (МФ) цикла (I, жирные стрелки) с ВЦ циклом фиксации CO₂ (II) на основе общей последовательности реакций оксалоацетат → малат → фумарат. Углерод метана внедряется в фумарат, а углерод CO₂ в пируват, сукцинат и 2-оксоглутарат с образованием С–С связи. Фумарат является точкой бифуркации в направлении гидрогенотрофного (образование сукцината) или метанотрофного (образование 2-метилсукцината) метаболизма.

2-метилсукцината, анаэробное окисление которого приводит к образованию ацетата и пирувата. Образование пирувата (центральный “хаб” промежуточного метаболизма) открывает путь внедрения углерода метана в универсальное химическое пространство интермедиатов автотрофного метаболизма. Пируват ассимилирует CO₂ с образованием оксалоацетата, который трансформируется в фумарат в реакциях компонентов восстановительного цитратного цикла. Фумарат, снова ассимилируя метан, начинает новый автокаталитический МФ цикл, в одном обороте из молекул метана и двуокиси углерода образуется молекула ацетата. Общая для ВЦ и МФ циклов последовательность реакций дикарбоновых кислот оксалоацетат → малат → фумарат → сукцинат недавно экспериментально продемонстрирована с протонированными интермедиатами при катализе комбинацией самородного железа с ионами

Zn²⁺ и Cr³⁺ (Varma *et al.*, 2018). Проблема протекания наиболее энергетически неблагоприятной реакции трансформации 2-метилсукцината в цитрамалат ($\Delta G_{298}^0 = 96.57$ кДж/моль, табл. 2) может быть решена использованием в реакции окислителей, таких как окислы азота и железа. Анаэробную фиксацию метана в МФ цикле можно представить в виде реакции $C_4H_4O_4$ (фумарат) + CH_4 + [O] = $C_2H_4O_2$ (ацетат) + $C_3H_4O_3$ (пируват), где [O] – неорганический окислитель. Свободная энергия реакций с участием окисленных форм азота и железа приведена в табл. 2. Автокаталитическая природа МФ цикла связана с разветвлением цитрамалата на пируват и ацетат и может быть выражена в виде реакции: $C_4H_6O_5$ (малат) + $1.5CH_4$ + $2.5CO_2$ = $2C_4H_6O_5$ (два малата). Этот тип автотрофного метаболизма, как и в случае упомянутого выше обратного ВЛ пути, можно

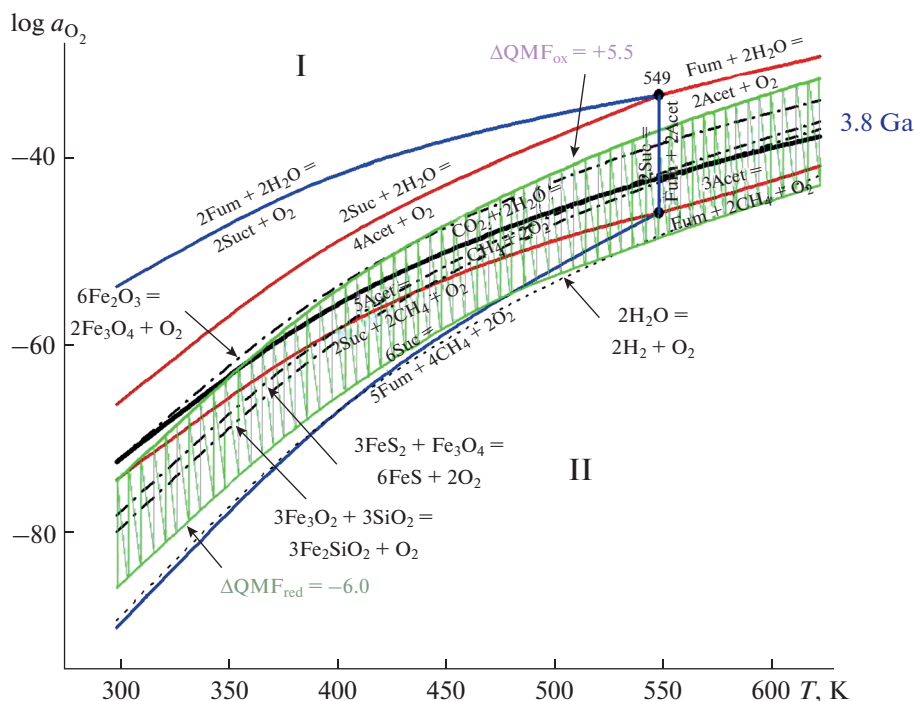


Рис. 4. Диапазон изменения редокс состояния (активности O_2) континентальной коры Архея 3.8 Ga назад (заштрихованная зеленая область) на диаграмме логарифм активности кислорода ($\lg a_{O_2}$) – температура (T , K) в гидротермальных условиях при P_{HAC} . Фазовые пространства термодинамической устойчивости веществ и их парагенезисов (assemblages) рассчитывали согласно методике (Marakushev, Belonogova, 2009). Жирная линия – равновесие $CO_2 \leftrightarrow CH_4$, разделяющее области их термодинамической устойчивости (I и II). Фашия сукцината околнурена синими линиями равновесий, а фашия ацетата – красными. Штриховые линии – равновесия минеральных буферов: гематит-магнетит, Fe_2O_3/Fe_3O_4 (HM), пирит-пиррогин-магнетит, $FeS_2 + Fe_3O_4/FeS$ (PPM) и кварц-магнетит-фаялит, $SiO_2 + Fe_3O_4/Fe_2SiO_4$ (QMF). ΔQMF – диапазон изменения относительно равновесия QMF буфера в логарифмических единицах фугитивности O_2 . Обозначения: Acet – ацетат, Suc – сукцинат, Fum – фуларат. Свободные энергии водных веществ по данным (Amed, Shock, 2001).

определить как карбокси-метанотрофный ацетогенез (табл. 2).

Зарождение химических систем палеометаболизма определялось физико-химическими условиями существования древней гидротермальной системы, модель которой представлена в виде фазовой диаграмме химический потенциал кислорода – температура (рис. 4). Диаграмма представляет собой двухкомпонентную систему (C и H – экстенсивные параметры), т. к. кислород, представленный логарифмом активности O_2 в растворе переходит в число интенсивных параметров наряду с температурой и давлением. Соответственно, при произвольном давлении инвариантные равновесия на диаграмме (точки) состоят из четырех фаз, а трехфазные равновесия (линии) разделяют дивариантные поля устойчивости (фашии) двухфазных равновесий.

Диаграмма разделяется равновесием $CH_4 + 2O_2 = CO_2 + 2H_2O$ (жирная линия) на два фазовых пространства, обозначенные римскими цифрами I и II, соответствующие окислительным и восстановительным условиям гидротермальной

системы. Метастабильные равновесия формируют фазовые пространства устойчивости (фашии) парагенезисов (ассоциаций) интермедиатов ВЦ-МФ бицикла – ацетата, сукцината и фуларата. Фашии фуларата и сукцината расположены по обе стороны стабильного равновесия CH_4/CO_2 , однако фашия сукцината ограничена температурой 549 K. В гидротермальном растворе парагенезисы компонентов фуларатного цикла устойчивы, как в фашии CO_2 , так и в фашии CH_4 , т.е. них могут развиваться системы фиксации углерода, ассимилируемого в виде CO_2 или CH_4 . Фашия ацетата полностью охватывает равновесие $CH_4 + O_2 = CO_2 + H_2O$, а вся система при изменении химического потенциала кислорода может развиваться в направлении образования низкотемпературного (Suc – H_2O) и высокотемпературного (Fum – H_2O) парагенезиса в фашии CO_2 (I) или образование низкотемпературного (Suc – CH_4) и высокотемпературного (Fum – CH_4) парагенезиса в фашии CH_4 (II). Таким образом, метановая фашия (II) это широкая область термодинамической устойчивости систем асси-

миляции CH_4 органическими кислотами и кетокислотами в водной среде.

Минеральные буферы, определяющие окружающую редокс обстановку, до температуры 549 К располагаются в фации сукцината, однако равновесие гематит-магнетит (НМ) находится в области термодинамической устойчивости CO_2 (фация I), а пирит-пирротин-магнетит (РРМ) и кварц-магнетит-фаялит (QMF) равновесия в фации II (устойчивость метана). Два последних определяют температурные редокс условия для фундаментального равновесия $2\text{Suc} + 2\text{CH}_4 + \text{O}_2 = 5\text{Acet}$, как основы метанотрофного ацетогенеза. Фация магнетита (Fe_3O_4), входящая в состав минеральных редокс буферов, охватывает равновесие CH_4/CO_2 практически во всем диапазоне температур, рассматриваемой гидротермальной системы. Очевидно, что системы фиксации CO_2 должны были развиваться выше равновесия $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{CH}_4$, тогда как системы фиксации CH_4 – ниже него. Видимо одновременная фиксация CO_2 и CH_4 с образованием ацетата (карбокси-метанотрофия) (рис. 3) происходила в фации магнетита (Fe_3O_4) и оба эти субстрата могли быть источником углерода для развития палеометаболизма в области термодинамической устойчивости дикарбоновых кислот – универсальных интермедиатов промежуточного метаболизма.

На основе анализа микроэлементов магматических цирконов корового происхождения (в основном данные оксигарметра на основе церия), было показано, что континентальная кора Катархея была значительно более восстановленной по сравнению с современной и испытала прогрессивное окисление в раннем Архее ~ 3.6 млрд лет назад (Yang *et al.*, 2014). В этот период возможного зарождения жизни редокс состояние земной коры ($\log f\text{O}_2$) периодически изменялось относительно равновесия фаялит-магнетит-кварцевого буфера (ΔQMF). Например, в цирконах с возрастом 3.8 Ga ΔQMF составляла от -6.0 до $+5.5$ и этот редокс диапазон представлен на диаграмме (рис. 4). Это пространство полностью охватывает как равновесие CH_4/CO_2 , так и магнетитовую фацию, однако в большей степени принадлежит к низкотемпературной восстановительной метановой фации (II), включающую все рассмотренные равновесия ассимиляции метана. Вплоть до 3.6 Ga и, может быть, даже до великого окислительного события (GOE) 2.2–2.4 Ga, окислительный потенциал редокс пар магнетита земной коры, по видимому, определял химический потенциал кислорода в древних подводных минералогических системах. Таким образом, рассмотренные гидротермальные редокс и *P-T*-условия раннего Архея чрезвычайно благоприятны для развития метанотрофных и карбокси-метанотрофных систем палеометаболизма.

* * *

Совокупность универсальных интермедиатов автотрофного палеометаболизма образует фазовое пространство веществ системы С–Н–О, химическим фундаментом которого являются легкие углеводороды. Определенное “химическое пространство” веществ является термодинамически контролируемой сетью интермедиатов, комбинацией которых создавались различные системы автотрофного палеометаболизма. Современные автотрофные пути фиксации углерода, видимо, образовывались в результате сочетания отдельных модулей метаболических систем, созданных предковым метаболизмом, обратимость реакций которого, позволяла осуществлять различные стратегии реализации автотрофной ассимиляции углерода.

Автотрофный метаболизм предполагает ассимиляцию неорганического углерода исключительно в форме CO_2 , однако и метан является глубинным, неорганическим веществом и поэтому его фиксация это также проявление автотрофного метаболизма. Анаэробная фиксация метана универсальными компонентами протометаболических сетей в гидротермальных условиях термодинамически благоприятна. В условиях углеводородной дегазации ранней Земли фиксация углерода в форме углеводородов могла преобладать, но с переходом к режиму CO_2 дегазации нашей планеты реликтовые формы метанотрофии неизбежно должны были или вымереть или эволюционировать в метаногенные формы или быть отброшенными в экстремальные экологические ниши. Даже древние микрофоссилии могут не иметь прямого отношения к LUCA и его потомкам, а являться останками других вымерших предшественников. Если предположить существование до LUCA более ранних предшественников (Cornish-Bowden, Cárdenas, 2017), то количество углерод-фиксирующих систем метаболизма в предполагаемых популяциях пре-LUCA организмов должно быть значительно больше, чем известно в настоящее время. Возможно также, что современные пути метанотрофии – это реликты палеометаболизма Архейского метанотрофного преевхождения прокариот. Исследование “химического пространства” протометаболических сетей и экстраполяция результатов к условиям зарождающейся жизни является частью молекулярной палеонтологии, и многие еще не ясные ответы на фундаментальные вопросы происхождения автотрофного метаболизма могут быть скрыты в составе и архитектуре современных биохимических реакционных сетей.

Работа выполнена по теме государственного задания (АААА-А19-119071190045-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маракушев С.А. Трансформация углеводов в компоненты архаической автотрофной системы фиксации CO₂ // Докл. РАН. 2008. Т. 418. № 3. С. 412–418.
- Маракушев С.А., Белоногова О.В. Физико-химические условия образования и самоорганизации компонентов архаического цикла фиксации CO₂ в гидротермальных системах // Биофизика. 2009. Т. 54. № 4. С. 748–759.
- Маракушев С.А., Белоногова О.В. Эволюция архаической хемоавтотрофной системы фиксации двуокиси углерода в гидротермальных системах // Докл. РАН. 2010. Т. 433. № 2. С. 262–268.
- Маракушев С.А., Белоногова О.В. Термодинамические факторы естественного отбора в автокаталитических химических системах // Докл. РАН. 2012. Т. 444. № 1. С. 92–97.
- Маракушев С.А., Белоногова О.В. Происхождение предкового метаболизма бактерий // Палеонтол. журн. 2013а. Т. 47. № 9. С. 109–119.
- Маракушев С.А., Белоногова О.В. Зарождение примитивного хемоавтотрофного метаболизма в гидротермах и происхождение предковых таксонов прокариот // Проблемы зарождения и эволюции биосферы / Ред. Галимов Э.М. М.: УРСС. 2013б. С. 414–433.
- Amend J.P., Shock E.L. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. P. 175–243.
- Averesch N.J.H., Kracke F. Metabolic network analysis of microbial methane utilization for biomass formation and upgrading to bio-fuels // Frontiers. Energy Res. 2018. V. 6. P. 1–16.
- Beasley K.K., Nanny M.A. Potential energy surface for anaerobic oxidation of methane via fumarate addition // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. P. 8244–8252.
- Bell E.A., Boehnke P., Harrison T.M., Mao W.L. Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon // PNAS. 2015. V. 112. P. 14518–14521.
- Braakman R., Smith E. The emergence and early evolution of biological carbon-fixation // PLoS Comput. Biol. 2012. V. 8. P. 1–16.
- Braakman R., Smith E. The compositional and evolutionary logic of metabolism // Phys. Biol. 2013. V. 10. P. 1–63.
- Cailling D.C., Kasting J.F. Atmospheric evolution on inhabited and lifeless worlds. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2017. 556 p.
- Cornish-Bowden A., Cardenas M.L. “Life before LUCA” // J. Theor. Biol. 2017. V. 434. P. 68–74.
- Dodd M.S., Papineau D., Grenne T., Slack J.F., Rittner M., Pirajno F., O’Neil J., Little C.T.S. Evidence for early life in Earth’s oldest hydrothermal vent precipitates // Nature. 2017. V. 543. P. 60–64.
- Goldford J.E., Hartman H., Smith T.F., Segre D. Remnants of an ancient metabolism without phosphate // Cell. 2017. V. 168. P. 1–9.
- Hordijk W., Steel M. Autocatalytic networks at the basis of life’s origin and organization // Life. 2018. V. 8. P. 62–73.
- Haynes C.A., Gonzalez R. Rethinking biological activation of methane and conversion to liquid fuels // Nat. Chem. Biol. 2014. V. 10. P. 331–339.
- Hügler M., Sievert S.M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean // Ann. Rev. Mar. Sci. 2011. V. 3. P. 261–289.
- Mall A., Sobotta J., Huber C., Tschirner C., Kowarschik S., Bačnik K., Mergelsberg M., Boll M., Hügler M., Eisenreich W., Berg I.A. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium // Science. 2018. V. 359. P. 563–567.
- Marakushev S.A., Belonogova O.V. The parageneses thermodynamic analysis of chemoautotrophic CO₂ fixation archaic cycle components, their stability and self-organization in hydrothermal systems // J. Theoret. Biol. 2009. V. 257. P. 588–597.
- Marakushev S.A., Belonogova O.V. The divergence and natural selection of autocatalytic primordial metabolic systems // Orig. Life Evol. Biosph. 2013. V. 43 P. 263–281.
- Marakushev S.A., Belonogova O.V. Ideas and perspectives: Development of nascent autotrophic carbon fixation systems in various redox conditions of the fluid degassing on early Earth // Biogeosciences. 2019. V. 16. P. 1817–1828.
- Martin W., Russell M.J. On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 2007. V. 362. P. 1887–1926.
- Martin W.F., Weiss M.C., Neukirchen S., Nelson-Sathi S., Sousa F.L. Physiology, phylogeny, and LUCA // Microbial Cell. 2016. V. 3. P. 582–587.
- McKeegan K.D., Kudryavtsev A.B., Schopf J.W. Raman and ion microscopic imagery of graphitic inclusions in apatite from the >3830 Ma Akilia supracrustals, West Greenland // Geology. 2007. V. 35. P. 383–397.
- Meringer M., Cleaves J. Computational exploration of the chemical structure space of possible reverse tricarboxylic acid cycle constituents // Sci. Reports. 2017. V. 7. P. 1–12.
- Morowitz H.J., Kostelnik J.D., Yang J., Cody G.D. The origin of intermediary metabolism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 7704–7708.
- Muchowska K.B., Varma S.J., Chevallot-Beroux E., Lethuillier-Karl L., Li G., Moran J. Metals promote sequences of the reverse Krebs cycle // Nat. Ecol. Evol. 2017. V. 1. P. 1716–1721.
- Muchowska K. B., Chevallot-Beroux E., Moran J. Recreating ancient metabolic pathways before enzymes // Bioorg. Med. Chem. 2019. V. 27. P. 2292–2297.
- Nitschke W., Russell M.J. Beating the acetyl-CoA pathway to the origin of life // Phil. Trans. Royal Soc. London. B. 2013. V. 368. P. 20120258.
- Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori K., Kato Y., Miyazaki M., Shimamura S., Yanagawa K., Shuto A., Ohkouchi N., Fujita N., Takaki Y., Atomi H., Takai K. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile // Science. 2018. V. 359. P. 559–563.
- Nutman A.P., Bennett V.C., Friend C.R.L., Van Kranendonk M.J., Chivas A.R. Rapid emergence of life shown by discovery of 3.700-million-year-old microbial structures // Nature. 2016. V. 537. P. 535–539.
- Pavlov A.A., Kasting J.F., Brown L.L., Rages K.A., Freedman R. Greenhouse warming by CH₄ in the atmosphere of early Earth // J. Geophys. Res. 2000. V. 105. P. 11981–11990.
- Potter J., Konnerup-Madsen J. A review of the occurrence and origin of abiogenic hydrocarbons in igneous rocks / Hydrocarbons in Crystalline Rocks / Eds Petford N., McCaffrey K.J.W. / Special Publications. 2003. V. 214. Geol. Soc. London. P. 151–173.

- Ralser M.* An appeal to magic? The discovery of a non-enzymatic metabolism and its role in the origins of life // *Biochem. J.* 2018. V. 475. P. 2577–2592.
- Ruiz-Mirazo K., Briones C., de la Escosura A.* Chemical roots of biological evolution: the origins of life as a process of development of autonomous functional systems // *Open Biol.* 2017. V. 7. 170050.
- Russell M.J., Martin W.* The rocky roots of the acetyl-CoA pathway // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 358–363.
- Russell M.J., Nitschke W.* Methane: fuel or exhaust at the emergence of life? // *Astrobiol.* 2017. V. 17. P. 1053–1066.
- Schreiber U., Mayer C., Schmitz O.J., Rosendahl P., Bronja A., Greule M., Keppler F., Mulder I., Sattler T., Schöler H.F.* Organic compounds in fluid inclusions of Archean quartz—analogs of prebiotic chemistry on early earth // *PLoS ONE.* 2017. V. 12. P. e0177570.
- Smith E., Morowitz H.G.* Universality in intermediary metabolism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 13168–13173.
- Soo V.W.C., McAnulty M.J., Tripathi A., Zhu F., Zhang L., Hatzakis E., Smith P., Agrawal S., Nazem-Bokaei H., Gopalakrishnan S., Salis H.M., Ferry J.G., Maranas C.D., Patterson A.D., Wood T.K.* Reversing methanogenesis to capture methane for liquid biofuel precursors // *Microb. Cell Factories.* 2016. V. 15. P. 11–25.
- Tashiro T., Ishida A., Hori M.* Early trace of life from 3.95 Ga sedimentary rocks in Labrador, Canada // *Nature.* 2017. V. 549. P. 516–518.
- Thauer R.K., Shima S.* Methane as fuel for anaerobic microorganisms // *Ann. NY Acad. Sci.* 2008. V. 1125. P. 158–170.
- Tian F., Toon O.B., Pavlov A.A., De Sterck H.* A hydrogen-rich early Earth atmosphere // *Science.* 2005. V. 308. P. 1014–1017.
- Timmers P.H.A., Welte C.U., Koehorst J.J., Plugge C.M., Jetten M.S.M., Stams A.J.M.* Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic Archaea // *Archaea.* 2017. V. 17. P. 1–22.
- Touret J.L.R.* Remnants of early Archean hydrothermal methane and brines in pillow-breccia from the Isua-Greenstone Belt, West Greenland // *Precamb. Res.* 2003. V. 126. P. 219–233.
- Varma S.J., Muchowska K., Chatelain P., Moran J.* Native iron reduces CO₂ to intermediates and end-products of the acetyl-CoA pathway // *Nat. Ecol. Evol.* 2018. V. 2. P. 1019–1024.
- Wächtershäuser G.* Evolution of the first metabolic cycles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 200–204.
- Wächtershäuser G.* Groundworks for an evolutionary biochemistry – the iron-sulfur world // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 1992. V. 58. P. 85–201.
- Weiss M.C., Preiner M., Xavier J.C., Zimorski V., Martin W.F.* The last universal common ancestor between ancient Earth chemistry and the onset of genetics // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. № 8. P. e1007518.
- Weiss M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F.* The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nature Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16116.
- Yan Z., Joshi P., Gorski C.A., Ferry J.G.* A biochemical framework for anaerobic oxidation of methane driven by Fe(III)-dependent respiration // *Nature Commun.* 2018. V. 9. № 1642. P. 1–9.
- Yang X., Gaillard F., Scaillet B.* A relatively reduced Hadean continental crust and implications for the early atmosphere and crustal rheology // *Earth Planet. Sci. Letters.* 2014. V. 393. P. 210–219.
- Zahnle K.J., Gacesa M., Catling D.C.* Strange messenger: A new history of hydrogen on Earth, as told by Xenon // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2019. V. 244. P. 56–85.
- Zubarev D.Y., Rappoport D., Aspuru-Guzik A.* Uncertainty of prebiotic scenarios: the case of the non-enzymatic reverse tricarboxylic acid cycle // *Sci. Reports.* 2015. V. 5(8009). P. 1–7.

Chemical Basis of Autotrophic Carbon Fixation Paleometabolism

S. A. Marakushev^{1, #} and O. V. Belonogova^{1, ##}

¹*Institute of Problems of Chemical Physics RAS, Academician Semionov av. 1, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia*

[#]*e-mail: marak@cat.icp.ac.ru*

^{##}*e-mail: ovbel@icp.ac.ru*

On the basis of biomimetic, philometabolic and thermodynamic analysis of modern CO₂ assimilation pathways, a paleophenotypic reconstruction of ancient autotrophic metabolism systems was carried out. As a chemical basis for CO₂ fixing paleometabolism, metabolic networks capable of self-reproduction and evolution are considered, and the reversibility of the transformation of its intermediates is the most important factor of this network self-development. The substances of the C–H–O system, paragenetically associated with hydrocarbons, create a phase space, which is a set of universal intermediates of the autotrophic paleometabolism network. The concept of two strategies for the origin and development of paleometabolism of autotrophic carbon fixation in oxidized (CO₂) and reduced (CH₄) redox degassing regime of the ancient Earth is proposed. It was shown that P, T and redox conditions of hydrothermal systems of the early Archean were favorable for the development of primary methanotrophic metabolism.

Keywords: chemoautotrophic fixation of CH₄ and CO₂, biomimetic models, universal intermediates of metabolism, chemical reaction network, hydrocarbons, hydrothermal systems of early Archean, primary methanotrophy

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯТИВНОГО РАЗВИТИЯ ИГЛОКОЖИХ И ДЕТЕРМИНИРОВАННОГО У МОЛЛЮСКОВ

© 2021 г. А. Л. Дроздов®

Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского ДВО РАН,
ул. Пальчевского, 17, Владивосток, 690041 Россия

®E-mail: anatoliyld@mail.ru

Поступила в редакцию 07.11.2020 г.

После доработки 19.11.2020 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Первичноротые (Protostomia) и вторичноротые (Deuterostomia) целомические животные имеют детерминированное (мозаичное) и регуляторное развитие. Эмбриогенез первичноротых не имеет тенденции к регуляции, которая напротив хорошо развита у вторичноротых. В наших работах была исследована способность иглокожих регулировать развитие, в том числе компенсировать влияние гравитационных полей на эмбриогенез. После центрифугирования зигот морского ежа в некоторых случаях бластула разделяется пополам и развиваются идентичные близнецы. Частота встречаемости близнецов коррелирует с жесткостью кортекса, которая определяется организацией кортикального цитоскелета яиц и эмбрионов. У хитонов и двустворчатых моллюсков близнецы после центрифугирования зигот не образуются, но в некоторых случаях развиваются полиэмбриональные элементы. В отличие от морских ежей, кортикальный цитоскелет у моллюсков окончательно формируется в овогенезе и не перестраивается при оплодотворении. Обсуждается морфогенетическая роль кортекса яиц и эмбрионов в регулятивном развитии Deuterostomia и детерминированном (мозаичном) развитии Protostomia.

DOI: 10.31857/S1026347021040065

Целомические животные принадлежат к двум эволюционным линиям: Protostomia и Deuterostomia. По современным оценкам эти ветви были разделены ~700 млн лет назад (рис. 1). Представители первичноротых имеют детерминированное (мозаичное) развитие, а у вторичноротых – регулятивное. Кроме того, представители этих двух групп различаются пятью основными признаками: 1) базовым характером дробления зигот (спиральное у первичноротых и радиальное у вторичноротых); 2) способом формирования мезодермы (телобластическое у первичноротых и энтероцельное у вторичноротых); 3) судьбой blastopora (остается первичным ртом у первичноротых и становится анусом у вторичноротых); 4) типом первичной личинки (трохофора у первичноротых и диплеврула у вторичноротых); 5) организацией нервной системы (брюшная нервная цепочка у первичноротых и дорзальная нервная трубка у вторичноротых). Кроме того, скелет вторичноротых мезодермального происхождения, а скелет первичноротых – эктодермального. Кожа вторичноротых является двухслойной: эктодермальный эпителий и мезодермальная соединительная ткань.

Цитологические основы существенных различий в механизмах эмбриогенеза животных с регулятивным и детерминированным развитием далеки от понимания. В эмбриологии популярна гипотеза о позиционной информации – системе морфогенетических детерминантов – морфогенов, распределенных в цитоплазме яйца и бластомеров, которые определяют дифференциацию эмбрионов (Равен, 1964; Дэвидсон, 1972; Корочкин, 1977; Schroeder, 1980; Левин, Шварцман, 1980; Левин, 1982; Wessels, 1982; Исаева, 1984). Локализация морфогенов создается в ходе овогенеза, а полностью стабилизируется после оплодотворения уже в цитоплазме зиготы или при первых делениях дробления. У некоторых животных ей может предшествовать т.н. цитоплазматическая сегрегация – интенсивные перемещения как поверхностной (кортикальной), так и внутренней цитоплазматической овоплазмы (Kirschner, Gerhart, 1981; Sawada, 1983; Sawada, Osanai, 1984; Преснов, Исаева, 1985; Sardet *et al.*, 1989; Shimizu, 1999). Существенную роль в локализации морфогенов и цитоплазматической сегрегации играет цитоскелет овоцитов, яиц и зигот. Это показано на модельных видах животных, принадлежащих к раз-

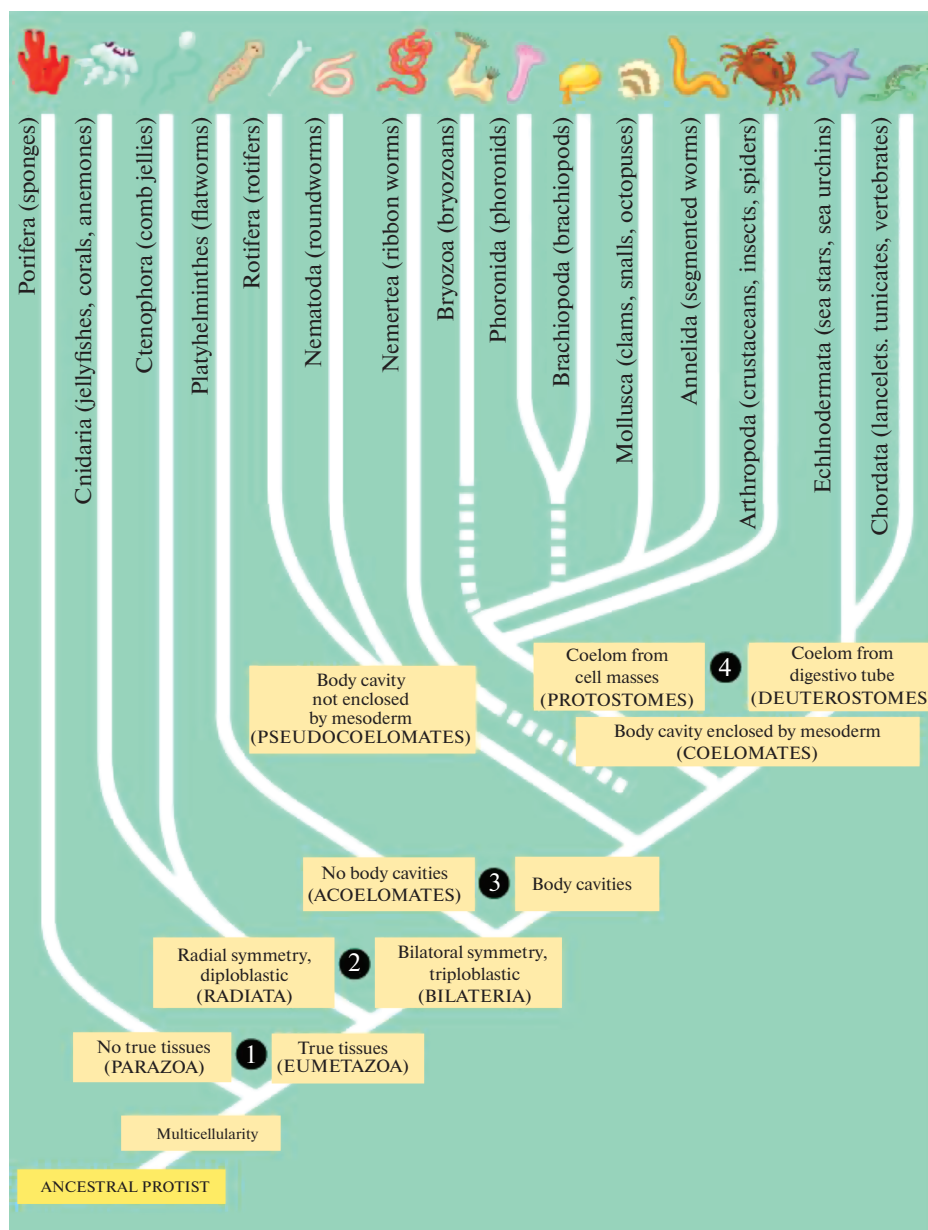


Рис. 1. Филогенетическое дерево многоклеточных животных. (Интернет ресурс: [https://www.mun.ca/biology/scarr/Phylogen of Animalia.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/Phylogen%20of%20Animalia.html), посещение 16.11.2020).

ным таксонам: морских звездах (Santella *et al.*, 2014), лягушках (Geertje *et al.*, 1983), рыбах (Becker, Hart, 1999), дрозофил (Bearer, 1992) и других (Speksnijder *et al.*, 1990; Singer, 1992; Shimizu, 1999). Биохимический состав морфогенетических детерминантов до конца не изучен. Вероятнее всего они представлены рибопротеиновыми (РНП) частицами (Исаева, 1984). Одним из подходов при изучении потенций эмбрионов к регулированию развития является исследование полиэмбрионии, т.е. формирование однойцевых близнецов. У некоторых животных экспериментальным путем уда-

валось получать до четырех однойцевых близнецов (Driesch, 1900; Loeb, 1909; Harvey, 1940). Эмбрионы морских ежей более полутора веков служат модельным объектом для изучения особенностей регулятивного развития животных. Ранее мы исследовали динамику развития близнецов при действии центрифугирования на оплодотворенные яйца морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и ее связь с перестройками кортикального цитоскелета яиц (Дроздов, Святогор, 1987). Показано, что легче всего близнецы развиваются при центрифугировании зигот с 1-й по 6-ю мин развития (рис. 2).



Рис. 2. Однояйцевые близнецы морских ежей. (а) – стадия поздней бластулы; (б) – личинка на стадии плутеуса. Масштаб: 50 мкм (по Дроздов, Святогор, 1987).

Через 10 мин после оплодотворения число близнецов, развивающихся после центрифугирования, заметно снижается. Через полчаса и до появления первой борозды дробления их можно получить, добавляя в среду алкалоид цитохалазин В, который разрушает актиновые микрофиламенты цитоскелета.

Эмбриогенез первичноротых не имеет тенденции к регуляции, которая хорошо развита у вторичноротых. Двустворчатые моллюски и хитоны являются первичноротыми животными, для которых характерно спиральное детерминированное развитие, называемое иногда “мозаичным”. Зародыш рассматривается как мозаика зачатков, преформированных уже в неоплодотворенном яйце. Нами (Дроздов, Святогор, 1989) исследовано развитие эмбрионов двустворчатых моллюсков, имеющих гетеро-квадрантное и гомоквадрантное дробление, центрифугированных в течение 5 мин при 2000 g в период от оплодотворения до первого деления дробления. Эмбрионы с гетероквадрантным дроблением гигантской устрицы *Crassostrea gigas* развиваются с образованием полярной лопасти, а эмбрионы мактры китайской *Macra chinensis* – без образования полярной лопасти. Также нами исследовано яйцо хитона *Ischnochiton hakodadensis*, имеющее гомоквадрантное дробление. Использование этих трех видов моллюсков позволило сравнить возможности формирования близнецов у моллюсков при разных типах дробления. У всех трех видов отмечены случаи полиэмбрионии, проявляющиеся в развитии близнецовых уродств (рис. 3). Частота их появления не зависит от времени центрифугирования зигот, но ее можно повысить при центрифугировании в присутствии цитохалазина В. Центрифугирование яиц моллюсков в присутствии цитохалазина В (ЦхВ) в отличие от центрифугирования в морской воде без него приводит к более резкой стратификации яйцеклетки, к некоторому увеличению частоты появления aberrантных эмбрионов

и незначительному возрастанию доли близнецовых форм. Других внешне выраженных отличий зародышей, центрифугированных в ЦхВ, от зародышей, центрифугированных в морской воде без ЦхВ, отмечено не было.

Поскольку в работе многих авторов (обзор Исаева, 1984) показана существенная роль кортикального цитоскелета в распределении и механической фиксации морфогенетических детерминантов в яйцах и эмбрионах животных, мы исследовали цитоскелет кортекса неоплодотворенных и оплодотворенных яиц морских ежей и двустворчатых моллюсков. В кортексе неоплодотворенных яиц морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* нами (Дроздов и др., 1987) выявлена редкая сеть коротких микрофиламентов и фибрилл различного диаметра, связанных друг с другом, с поверхностью кортикальных гранул и со сгущениями электронно-плотного материала.

После оплодотворения в яйцах морского ежа происходит реорганизация кортекса: в кортикальном слое происходит формирование мощного цитоскелета, и кортекс становится плотным и стабильным. В нем выявляются одиночные и собранные в пучки актиновые микрофиламенты. Выделяющееся в перивителлиновое пространство содержимое кортикальных гранул разбухает, формируя оболочку оплодотворения. Она пронизана выростами цитоплазмы – микроворсинками, которые армированы пучками микрофиламентов (рис. 4). Нами показано (Дроздов, 1989), что у мактры в неоплодотворенных яйцах существует мощная сеть, состоящая из пучков актиноподобных филаментов, хорошо выявляющихся при электронно-микроскопическом исследовании “тритоновых теней” яиц (рис. 5). После оплодотворения принципиальных изменений цитоскелета не происходит.

Таким образом, распределение морфогенов различается у первичноротых и вторичноротых. Оно определяется организацией цитоскелета, который

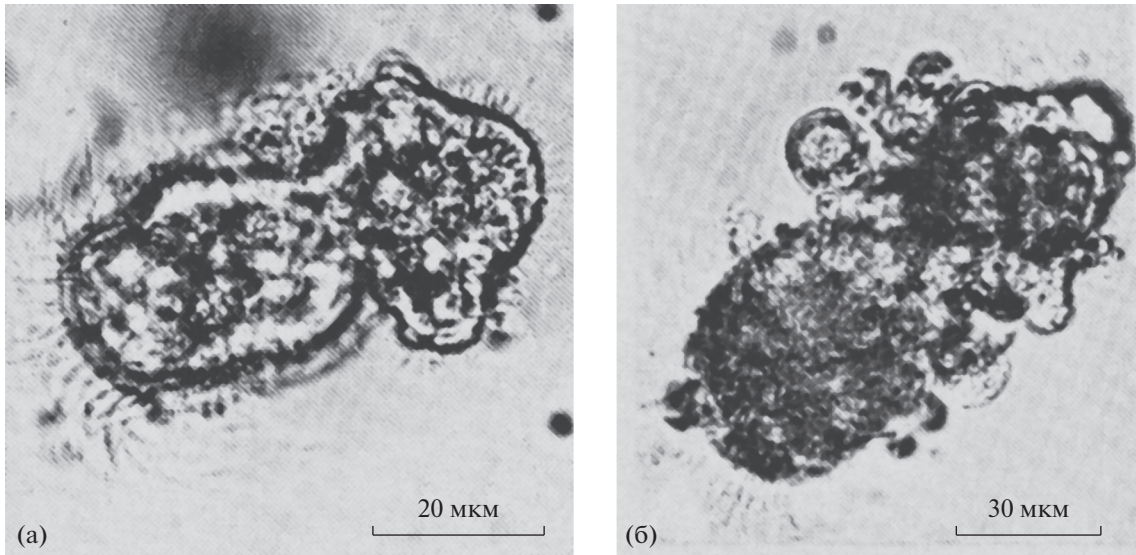


Рис. 3. Элементы полиэмбрионии после центрифугирования зигот устрицы (а) и мактры (б). Масштаб: (а) – 20, (б) – 30 мкм (по Дроздов, Святогор, 1989).

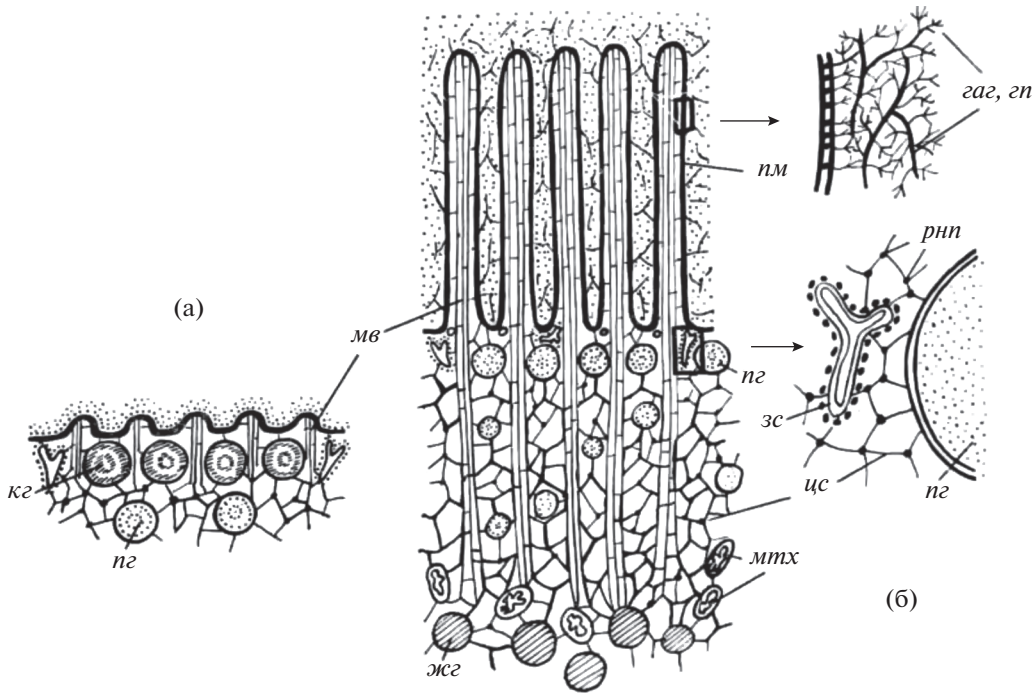


Рис. 4. Схема организации кортекса неоплодотворенного (а) и оплодотворенного (б) яиц морского ежа. *гаг, гп* – гликозаминогликаны и гликопротеины внеклеточного вещества яйцевых оболочек, *жг* – желточные гранулы, *кг* – кортикальные гранулы, *мв* – микроворсинки с пучком актиновых филаментов, *мтх* – митохондрии, *пг* – пигментные гранулы, *пм* – плазматическая мембрана, *рпн* – комплекс РНК с белком, *цс* – цитоскелетная сеть, связывающая мембранные органоиды и макромолекулярные комплексы кортикального слоя, *эс* – эндоплазматическая сеть с рибосомами (по Дроздов и др., 1987).

динамичен у эмбриона *Deuterostomia* и способен к перестройке, тогда как цитоскелет *Protostomia* является жестким и практически не изменяется во время оплодотворения и морфогенеза. Как следствие, морфогены занимают устойчивое положение

в яйцеклетке, зиготе и эмбрионе, строго определяя течение эмбриогенеза.

Возможно, одним из следствий таких различий в организации цитоскелета первичноротых и вторичноротых является поведение их клеток в

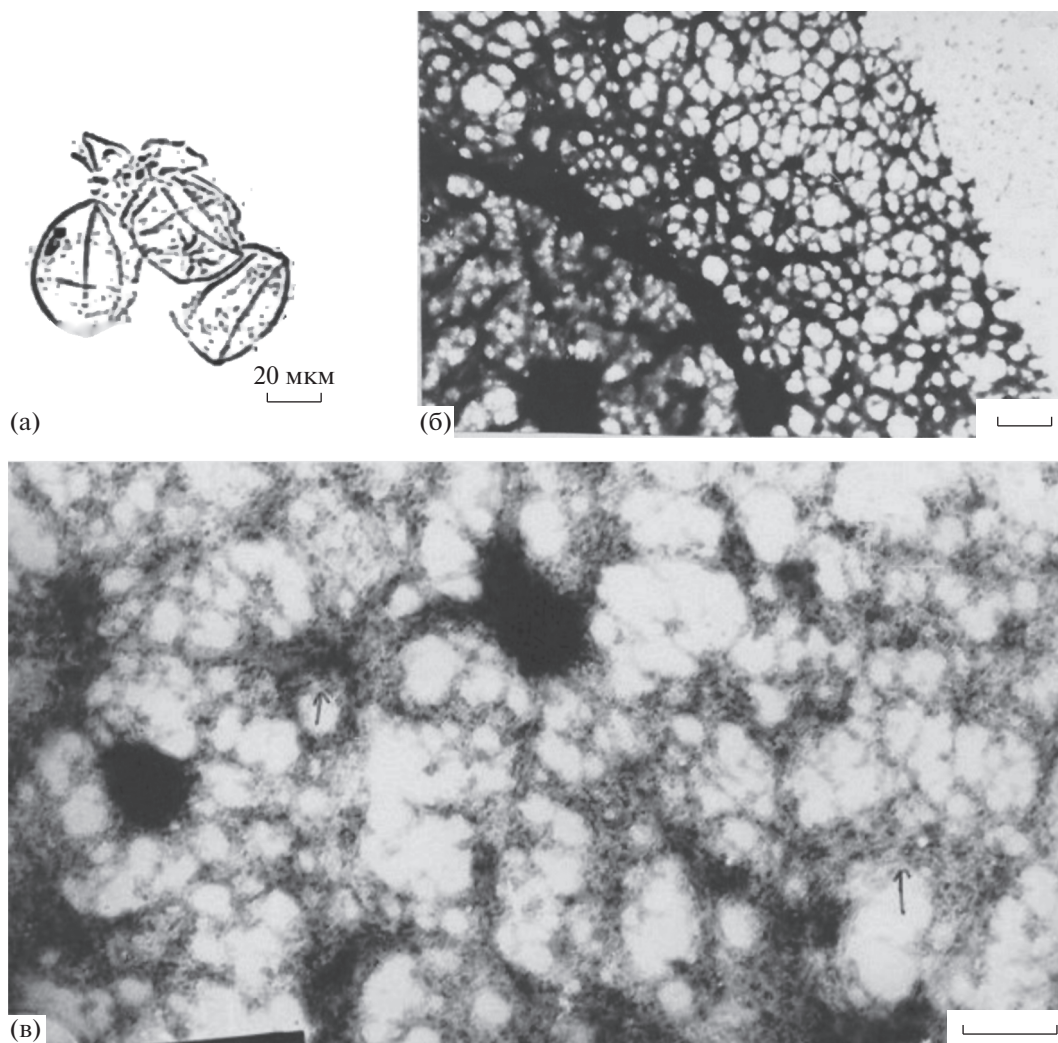


Рис. 5. Кортиксы неоплодотворенных яиц мактры китайской. (а) – тритоновые “тени” в световом микроскопе, (б), (в) – в просвечивающем электронном микроскопе. Масштаб: (а) – 20, (б) – 0.2, (в) – 0.1 мкм (по Дроздов, 1989).

культуре. Клетки представителей типа хордовых сравнительно легко вводятся в культуру, которая широко применяется во многих биомедицинских и биотехнологических лабораториях по всему миру (Basic Cell Culture, 2002; Butler, 2003; Freshney, 2010; Animal Cell Culture, 2015 и др.). В то же время, несмотря на значительные за последние 50 лет усилия по введению в культуру клеток первичноротых животных, исследователи, как правило, ограничиваются наблюдениями за первичными культурами. Получать перевиваемые культуры практически не удается (Cai, Zhang, 2014; Potts *et al.*, 2020). Можно полагать, что эти различия в поведении в культуре клеток первичноротых и вторичноротых связаны с регуляторными потенциями их цитоскелета. Расхождения в организации цитоскелета произошли ~ 700 млн лет тому назад, и они определяют детерминированные и регуля-

тивные физико-химические особенности клеток и тканей этих двух главных ветвей царства многоклеточных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дроздов А.Л. Кортикальный цитоскелет неоплодотворенных и оплодотворенных яиц мактры китайской // Цитология. 1989. Т. 31. С. 652–656.
- Дроздов А.Л., Исаева В.В., Подгорная О.И. Кортикальный цитоскелет неоплодотворенных и оплодотворенных яиц морского ежа // Цитология. 1987. Т. 29. С. 267–272.
- Дроздов А.Л., Святогор Г.П. Морфогенетическая роль кортекса в развитии близнецов у морского ежа // Онтогенез. 1987. Т. 18. С. 540–546.
- Дроздов А.Л., Святогор Г.П. Развитие центрифугированных яиц гигантской устрицы, мактры китайской и хитона // Онтогенез. 1989. Т. 20. С. 135–140.
- Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М.: Мир, 1972. 342 с.

- Исаева В.В. О морфогенетической роли кортикального цитоскелета и плазматической мембраны яйцеклетки // Цитология. 1984. Т. 26. С. 5–13.
- Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977. 280 с.
- Левин В.Л. К вопросу о детерминантах, действующих на первых этапах соматогенеза у дрозофилы // Цитология. 1982. Т. 24. С. 604–609.
- Левин В.Л., Шварцман П.Я. Новые данные о детерминации клеток в развитии дрозофилы (обзор литературы) // Цитология. 1980. Т. 22. С. 1259–1283.
- Преснов Е.В., Исаева В.В. Перестройки топологии при морфогенезе. М.: Наука, 1985. 191 с.
- Равен Х. Оогенез: Накопление морфогенетической информации. М.: Мир, 1964. 304 с.
- Animal Cell Culture*. Cell Engineering, 9. Ed. M. Al-Rubeai. Springer International Publishing Switzerland. 2015. 763 p.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_21
 Basic Cell Culture, 2nd ed. Ed. J. M. Davis. Oxford University Press. 2002. 381 p.
- Bearer E.L. Cytoskeleton in Development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1992. V. 26. P. 1–7.
- Becker K.A., Hart N.H. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. P. 97–110.
- Butler M. *Animal Cell Culture and Technology*. London: Taylor & Francis Group, 2003–2004. 256 p.
<https://doi.org/10.4324/9780203427835>
- Cai X., Zhang Y. Marine invertebrate cell culture: a decade of development. // *J. Oceanography*. 2014. V. 70. P. 405–414.
<https://doi.org/10.1007/s10872-014-0242-8>
- Driesch H. Die isolierten Blastomeren des Echinidenkeimes // *Arch. Entwickl. mech. Organismen*. 1900. Bd 10. S. 361–384.
- Freshney R.I., *Culture of Animal Cells. A manual of basic technique and specialized applications*. Wiley-Blackwell, 2010. 732 p.
<https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- Geertje A.U., Hara K., Koster C.H., Kirschner M.W. Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in *Xenopus laevis* eggs // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1983. V. 77. P. 15–37.
- Harvey E.B. A new method of producing twins, triplets and quadruplets in *Arbacia punctulata* and their development // *Biol. Bull.* 1940. V. 78. P. 202–216.
- Kirschner M.W., Gerhart J.C. Spatial and temporal changes in the amphibian egg // *Bio Science*. 1981. V. 31. P. 381–388.
- Loeb J. Ober chemischen Bedingungen für die Entstehung einliger Zwillinge beim Seeigel // *Entwicklungsmech. Organismen*. 1909. Bd 27. S. 119–140.
- Potts R.W.A., Gutierrez A.P., Cortés-Araya Y., Houston R.D., Bean T.P. Developments in marine invertebrate primary culture reveal novel cell morphologies in the model bivalve *Crassostrea gigas* // *PeerJ*. 2020. V. 8. P. 9180.
<https://doi.org/10.7717/peerj.9180>
- Santella L., Limatola N., Chun J.T. Actin Cytoskeleton and Fertilization in Starfish Eggs // Sawada H., Inoue N., Iwano M. (eds.), *Sexual Reproduction in Animals and Plants*, Chapter 13. Springer Open. 2014. P. 141–156.
https://doi.org/10.1007/978-4-431-54589-7_13
- Sardet C., Speksnijder J., Inoue S., Jaffe L. Fertilization and ooplasmic movements in the ascidian egg // *Development*. 1989. V. 105. P. 237–249.
- Sawada T. How ooplasm segregates bipolarly in ascidian eggs // *Bull. Mar. Biol. Station, Asamushi, Tohoku Univ.* 1983. V. 17. P. 123–140.
- Sawada T., Osanai K. The cortical contraction related to the ooplasmic segregation in *Ciona intestinalis* eggs // *W. Boux's Arch. Devel. Biol.* 1984. V. 190. P. 208–214.
- Schroeder T.E. Expressions of the prefertilization polar axis in sea urchin eggs // *Develop. Biol.* 1980. V. 79. P. 428–443.
- Shimizu T. Cytoskeletal mechanisms of ooplasmic segregation in annelid eggs // *Int. J. Dev. Biol.* 1999. V. 43. P. 11–18.
- Singer R.H. The cytoskeleton and mRNA localization // *Current Opinion in Cell Biology*. 1992. V. 4. P. 15–19.
- Speksnijder J.E., Christian Sardet Ch., Jaffe L.F. The Activation Wave of Calcium in the Ascidian Egg and Its Role in Ooplasmic Segregation // *J. Cell Biol.* 1990. V. 110. P. 1589–1598.
- Wessells N.K. A catalogue of processes responsible for metazoan morphogenesis // *Life Sci. Res. Reports*. 1982. V. 22. P. 115–154.

Cytological Bases of Regulatory Development in Echinoderms and Determined in Molluscs

A. L. Drozdov[#]

Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Palchevsky St. 17, Vladivostok, 690041 Russia

[#]e-mail: anatoliyld@mail.ru

Protostomia and Deuterostomia coelomic animals have deterministic (mosaic) and regulatory development. The embryogenesis of the Protostomia have no tendency to regulation, which, on the contrary, is well developed in the Deuterostomia ones. In our works, the ability to regulate the development of echinoderms, including the effect of gravitational fields on embryos, was investigated. After centrifugation of the sea urchin zygotes, in some cases the blastula is split in half and identical twins develop. The frequency of twins correlates with cortex rigidity, which is determined by the organization of the cortical cytoskeleton of eggs and embryos. Whereas in chitons and bivalves, twins do not form after centrifugation of zygotes, but in some cases polyembryonic elements develop. and the deterministic development of Protostomia. Unlike sea urchins, the cortical cytoskeleton in mollusks is finally formed in oogenesis and does not rearrange during fertilization. The morphogenetic role of the cortex of eggs and embryo in the regulatory development of Deuterostomia and deterministic of Protostomia is discussed.

УДК 577:[57.017:597.552.511]

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У МОЛОДИ ГОРБУШИ *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) ПРИ ПЕРЕХОДЕ ИЗ ПРЕСНОЙ СРЕДЫ В МОРСКУЮ

© 2021 г. М. В. Чурова*, @, Н. С. Шульгина*, М. Ю. Крупнова*, Д. А. Ефремов*, Н. Н. Немова*

*Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ “Карельский научный центр Российской академии наук”, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

@E-mail: mchurova@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

После доработки 10.09.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Исследовали биохимические адаптации энергетического обмена и некоторых путей окисления глюкозы при смене солености среды у личинок и смолтов горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.), обитающей в Белом море. Изучали активность ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром *c* оксидазы ЦО, лактатдегидрогеназы, ЛДГ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, Г6ФДГ, 1-глицерофосфатдегидрогеназы, 1-ГФДГ и альдолазы) у личинок горбуши в коротком аквариальном и у смолтов горбуши в длительном садковом экспериментах, моделирующих переход молоди из пресной среды в морскую. Показано снижение активности ЦО, ЛДГ, 1-ГФДГ и альдолазы уже в первый час после переноса личинок в морскую воду. У смолтов, выдержанных в эстуарии и в море, по сравнению с особями из реки, установлены низкие уровни активности 1-ГФДГ и альдолазы. Повидимому, у исследуемой молоди горбуши происходит перераспределение углеводов между реакциями аэробного и анаэробного обмена в пользу анаэробного синтеза АТФ. Изменений в активности фермента пентозофосфатного пути – Г-6-ФДГ как у личинок, так и у смолтов по сравнению с особями, выдержанными в пресной воде, установлено не было. Поддержание необходимого уровня анаэробного обмена и пентозо-фосфатного пути, вероятно, является одним из механизмов биохимической адаптации горбуши к изменению соленостного режима.

DOI: 10.31857/S1026347021040041

Жизненный цикл лососевых включает в себя различные стадии развития со сложной системой адаптаций. Стадия смолтификации – генетически запрограммированный процесс, при котором лососевые, живущие в пресной воде, физиологически готовятся к миграции в море и обитанию в условиях повышенной солености (McCormick, 2012). В то время как у большинства лососевых период до наступления смолтификации может продолжаться до нескольких лет, молодь горбуши *O. gorbuscha* (Walb.) мигрирует в море непосредственно после выхода из грунта в состоянии малька, оставляя сравнительно мало времени для смолтификации (Grant *et al.*, 2009, 2010). Из-за маленького размера молоди (0.2 г) в период миграции большое соотношение площади поверхности тела к его объему дополнительно затрудняет поддержание ионного и водного баланса в морской воде. Однако было показано (Weisbart, 1967), что на самой ранней стадии жизни ювенильные особи горбуши лучше других видов тихоокеанских лососей *Oncorhynchus* способны регулировать ионы в плазме крови при резком переходе в

морскую воду. Так, мальки нерки *Oncorhynchus nerka* (Walb), кижуча *Oncorhynchus kisutch* (Walb) и чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* (Walb), не прошедшие смолтификацию, гибли при переносе в морскую воду, в то время как мальки горбуши приспосабливались к новым условиям (Weisbart, 1967; Grant *et al.*, 2009). Ранее на мигрирующей молоди горбуши (0.2 г) было показано, что при переносе ее в соленую воду в организме (в пересчете на грамм сырой массы) увеличивается концентрация Na^+ и Cl^- , которая некоторое время (до 2 недель) сохраняется на одном уровне. Авторы связывают это с тем, что увеличение ионов в организме является адаптационной стратегией вида, направленной на уменьшение ионного градиента с окружающей средой (Grant *et al.*, 2009, 2010). При этом обезвоживания у молоди горбуши не наблюдали, а увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы (основного фермента осморегуляции) до максимального уровня происходило не сразу, а постепенно, в течение некоторого времени после изменения солености (Grant *et al.*, 2009, 2010). Однако данных исследований биохимических механизмов, обес-

печивающие при этом перестройку метаболических процессов у горбуши все еще недостаточно.

Известно, что процессы адаптации рыб к изменению солёности среды, опосредованные глюкокортикоидными гормонами, такими как кортизол (McCormick, 2001), включают изменения в осморегуляторной системе и перераспределение энергетических ресурсов (Soengas *et al.*, 2007; Ruiz, Jarabo, 2019). Данные исследований интенсивности потребления кислорода у рыб при изменении солёности среды указывают на увеличение расходования энергии для модуляции и стимуляции процессов транспорта ионов (Soengas *et al.*, 2007; Tseng, 2008). Перестройка в метаболизме в целом и изменения в интенсивности и направлении путей энергетического и углеводного обмена, в частности, направлены на удовлетворение возросших потребностей молоди рыб в энергии, связанных с их акклиматизацией к солёности. Показано, что энергия, необходимая осморегуляторным органам рыб, включая жабры и почки, в первую очередь, поддерживается окислением глюкозы и лактата, поступающих из кровеносных путей (Tseng, 2008). Энергетические траты на регуляцию метаболизма при изменении солёности среды могут быть проанализированы двумя подходами: 1) оценкой общего метаболизма по степени поглощения кислорода; 2) изменениями в количестве энергетических субстратов или активности ферментов, контролируемых их метаболизм (Soengas *et al.*, 2007). По активности ключевых ферментов аэробного и анаэробного синтеза АТФ, основных путей окисления глюкозы, можно судить об энергетическом статусе и функциональной активности органов рыб. Так, ЦО – ключевой фермент дыхательной цепи митохондрий, активность которого свидетельствует об уровне аэробного метаболизма (Goolish, Adelman, 1987). ЛДГ, фермент гликолиза, может служить показателем анаэробного обмена (Gauthier *et al.*, 2008). Активность альдолазы характеризует степень использования углеводов в гликолизе (Johansen., Overturf, 2006). Фермент 1-ГФДГ катализирует реакцию образования 1-глицерофосфата, который является предшественником структурных и запасных липидов. Фермент Г6ФДГ участвует в функционировании пентозофосфатного пути (ПФП) (Tian *et al.*, 1998). Различия в характере изменения активности этих ферментов при адаптации к солёности были ранее показаны в исследованиях на эвригаллиных и анадромных рыбах (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003; Le Francois, Blier, 2003; Le Francois *et al.*, 2004; Чурова и др., 2018).

Принимая во внимание особенности физиолого-биохимических адаптаций у горбуши, связанные с миграцией мальков в морскую среду сразу после выхода из грунта, что требует сравнительно быстрой ответной реакции организма на смену солёности среды обитания, можно предположить, что энергетически этот процесс обеспе-

чивается изменением направления и интенсивности путей энергетического обмена и окисления глюкозы. Следует выяснить каким образом распределяются субстраты между аэробным и анаэробным путями энергетического обмена, пентозофосфатного пути, какова пластичность (обратимость изменений) вышеназванных реакций при возвратном переносе мальков горбуши в морскую воду из пресной.

Таким образом, целью настоящей работы было изучение активности ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром с оксидазы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 1-глицерофосфатдегидрогеназы и альдолазы) у личинок и смолтов горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) при изменении солёности в краткосрочном аквариальном и долгосрочном садковом экспериментах. Для достижения этой цели и проверки вышеуказанной гипотезы были поставлены два эксперимента по изучению адаптивных возможностей молоди горбуши к смене солёности среды на ранней стадии (личинки, вышедшей из гнезда) и смолтов в период ската. Первый (краткосрочный) эксперимент был направлен на исследование устойчивости личинок горбуши к переносу в морскую воду и пластичности реакции при возврате в пресную. Во втором (длительном) эксперименте в сравнительном аспекте изучали биохимические адаптации смолтов на разных по солёности участках их покатуной миграции: реки, эстуария, моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аквариальный краткосрочный эксперимент по влиянию смены солёности на личинок горбуши (при переносе в морскую воду из пресной)

Эксперимент проводили с личинками горбуши из нерестового гнезда, обнаруженного 20 июня в реке Ольховка (бассейн Белого моря) (рис. 1). Остаток желточного мешка у личинок на этот момент составлял 10–15%. Во всех экспериментах молодь горбуши фиксировали в жидком азоте, а затем хранили при -80°C до начала анализа.

Собранных личинок поместили в садок в той же реке и 21 июня начали аквариальный эксперимент. Рыб из садка разделили на две группы, 20 особей из первой группы зафиксировали для анализа (контроль), вторую поместили в ёмкость с морской водой при температуре воды 14.6°C . Затем через 1 ч отловили 20 особей и зафиксировали. Через 24 ч были отобраны для анализа ещё 20 рыб. Оставшихся личинок пересадили в рядом стоящую ёмкость с пресной водой и через 24 ч зафиксировали. В ходе эксперимента в ёмкости с мальками горбуши подавали воздух с помощью компрессора Sera air 275R. Размерно-весовые характеристики рыб представлены в табл. 1. Гибели личинок в процессе эксперимента не наблюдали.

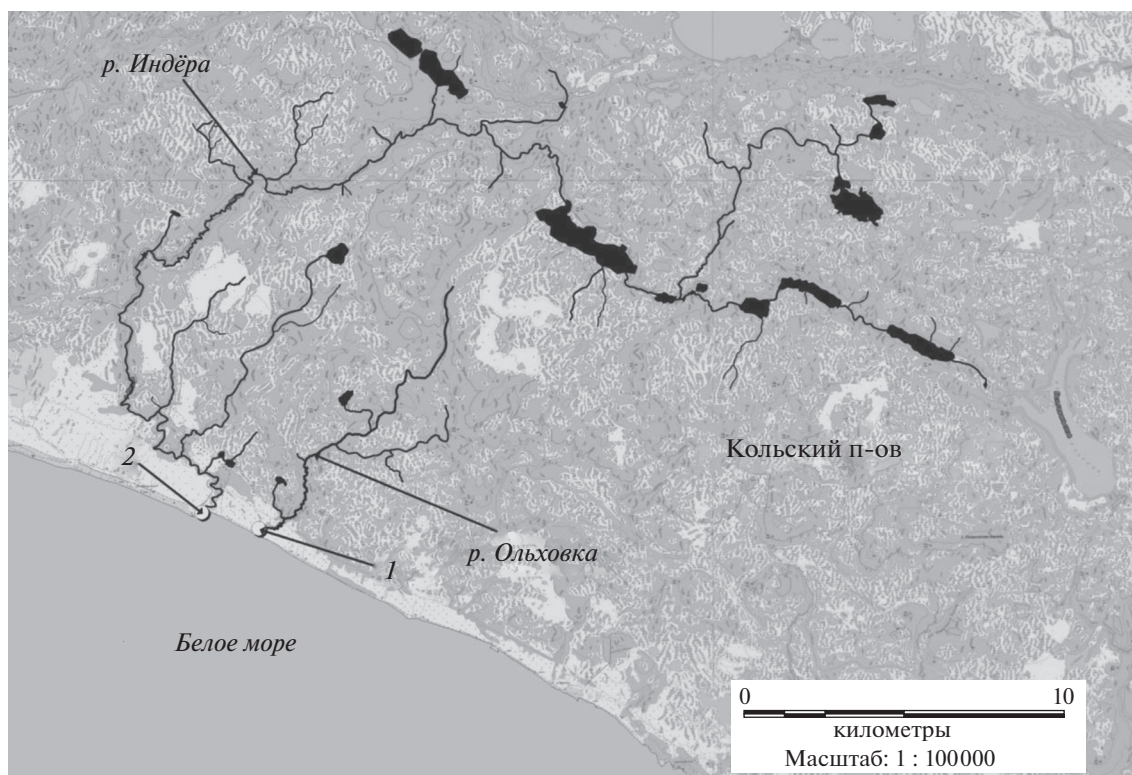


Рис. 1. Место сбора проб и проведения эксперимента. 1 – место лова личинок горбуши; 2 – место проведения эксперимента в садках.

Садковый долгосрочный эксперимент по влиянию переноса смолтов горбуши из пресной воды в эстуарий и в море

14 июня на реке Индера (бассейн Белого моря) были отловлены 100 смолтов горбуши малой лобушкой мережного типа, при температуре воды 8.8°C. Затем молодь разделили на 4 группы по 25 шт. в каждой (рис. 2.). Первую группу зафиксировали (контроль) для последующего анализа. Вторую группу поместили в русловой садок в пресную воду (садок “река”), который был на 60% погружен в воду (течение 0.3–0.4 м/с) при температуре 8.8°C. Эксперимент завершили 24 июня при температуре воды 14.5°C, отобрали пробы и зафиксировали их для дальнейшего анализа. Третью группу смолтов поместили в морской садок (садок “море”) с соленостью воды 28‰ (постоянная) и температурой 3.9°C. Смолтов предварительно выдержали 1 ч в

воде пресная : морская 1 : 1, и еще 1 ч – в 100% морской воде. Садок был расположен на расстоянии 400 м от берега с глубинами 4–5 м, на расстоянии 1 м от дна, на растяжках, и независимо от прилива/отлива находился в толще воды. Сбор проб на биохимический анализ осуществили 24 июня при температуре воды 11.5°C.

Четвертую группу 14 июня поместили в садок в эстуарии (садок “эстуарий”), но эксперимент был прерван действиями третьих лиц (форс-мажор), поэтому посадку в садок в эстуарии повторили 17 июня. Во время отлива садок находился на струе пресной воды при температуре воды 8.8°C, затопленный на 50% (скорость потока 0.3–0.4 м/с); во время прилива садок был погружен в воду на расстоянии 0.4–0.5 м от дна, вода соленая/распресненная (в зависимости от направления ветра и локального течения). Два раза в сутки во время

Таблица 1. Размерно-весовые характеристики молоди горбуши в аквариальном (краткосрочном) эксперименте

Группа	Длина (АВ), см	Масса, г
Контроль	3.2 ± 0.03	0.14 ± 0.004
Морская вода 1 ч	3.16 ± 0.03	0.14 ± 0.002
Морская вода 24 ч	3.18 ± 0.04	0.14 ± 0.009
Возврат в пресную воду	3.2 ± 0.02	0.14 ± 0.001

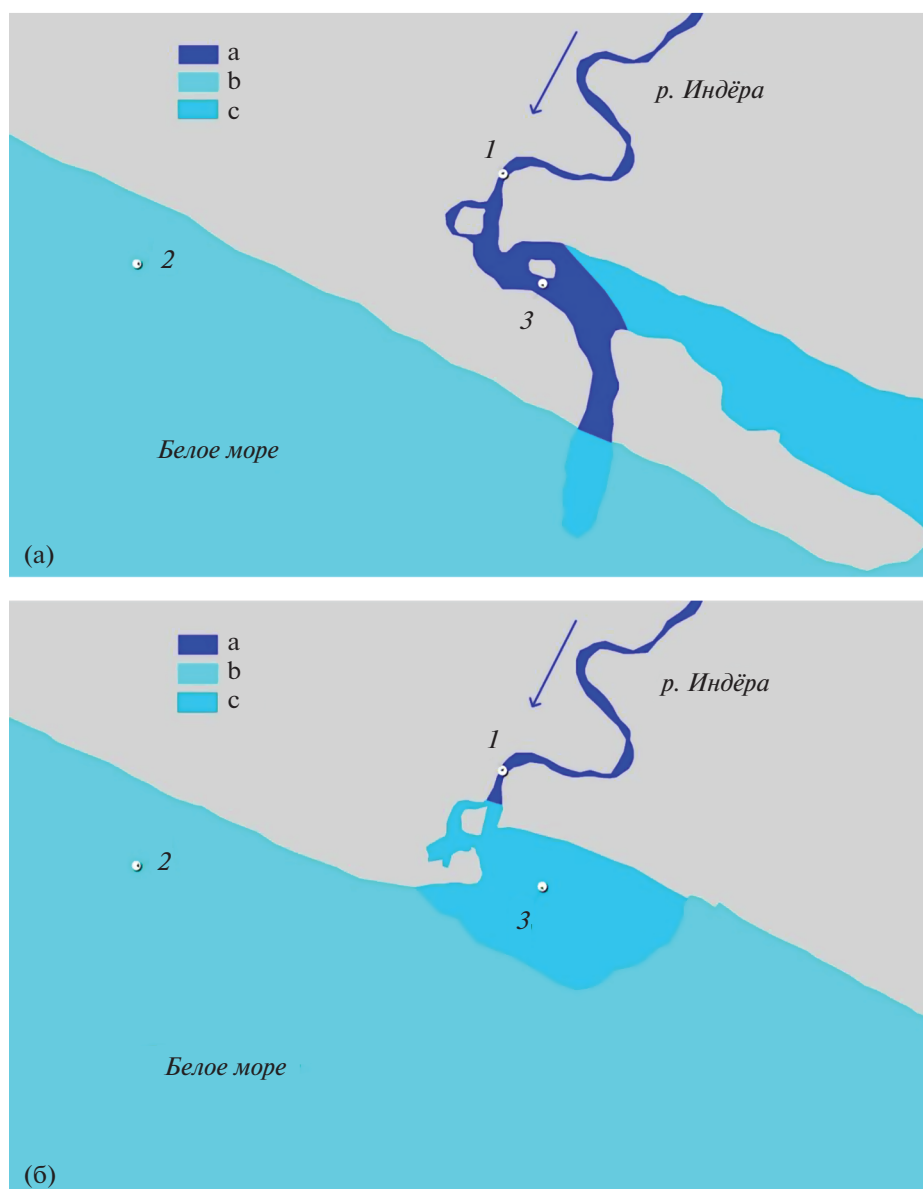


Рис. 2. Положение экспериментальных садков в районе устья реки Индера. (а) во время отлива, (б) во время прилива: 1 – садок в пресной воде; 2 – садок в морской воде; 3 – садок в эстуарии; а – пресная вода; б – соленая вода; с – распресненная вода; серым цветом показана суша.

полного прилива и полного отлива садок находился в воде с циклом пресная/соленая/пресная/соленая вода и т.д. каждые 24 ч. Одновременно менялась температура воды, пресная вода прогревалась быстрее, соленая вода медленнее, в каждый прилив вода становилась холодной, в каждый отлив – теплой (амплитуда до 10 градусов). Эксперимент закончили 27.06.18 при температуре воды 18.1°C во время отлива.

Время экспозиции для второй, третьей и четвертой групп составило 9 дней 11 ч (226 ч). Гибели смолтов за время исследования не наблюдалось.

Размерно-весовые характеристики рыб представлены в табл. 2.

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена определяли индивидуально для каждой особи. Активность цитохром с оксидазы (КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Смита (Smith, 1955), измеряя увеличение количества окисленного цитохрома с. Общую активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, 1.1.1.49), 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, 1.1.1.49) определяли, измеряя количество восстановленных НАД и НАДФ по общепринятым методикам (Кочетов, 1980). Ак-

Таблица 2. Размерно-весовые характеристики молоди горбуши в садковом (длительном) эксперименте

Группа	T, °C (в день сбора)	Длина (АВ), см	Масса, г
14.06 до эксперимента, река	8.8	3.35 ± 0.06	0.17 ± 0.013
24.06 река	14.5	3.53 ± 0.03	0.16 ± 0.010
27.06 эстуарий	18.1	3.51 ± 0.05	0.19 ± 0.007
24.06 море	11.5	3.41 ± 0.02	0.17 ± 0.006

тивность альдозазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Векс в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность ферментов представлена в мкмоль/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению пептидной связи при длине волны 220 нм (Noble, Bailey, 2009). Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность исследуемых ферментов у личинок горбуши при переносе в морскую воду из пресной (краткосрочный аквариальный эксперимент)

Получены данные, указывающие на различия в изменениях активности исследуемых ферментов энергетического и углеводного обмена у личинок горбуши при их прямом переносе из пресной в морскую воду. При этом показано, что активности ферментов ЦО, ЛДГ, 1-ГФДГ и альдозазы снижаются фактически в первый час после переноса особей в морскую воду (рис. 3), что указывает как на снижение аэробного и анаэробного обмена, так и на снижение использования углеводов в гликолизе и в синтезе глицерофосфата (в частности). Как ранее было показано (Grant *et al.*, 2009, 2010), перенос молоди горбуши в соленую воду сопровождается увеличением в организме концентрации Na^+ и Cl^- , которая некоторое время (до 2 недель) сохраняется на одном уровне, при этом увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы до максимального уровня происходит постепенно. В нашем эксперименте активность Na^+/K^+ -АТФазы у личинок горбуши при переносе ее в морскую воду (Немова и др., 2021) постепенно возрастала через час эксперимента и далее – через сутки. Вышеуказанное снижение активности исследуемых ферментов энергетического и углеводного обмена у личинок горбуши при резком увеличении концентрации ионов в организме, по-видимому, согласуется с “запуском” механизмов перераспределения энергии между осморегуляцией и други-

ми энергозатратными метаболитическими процессами, такими как рост и развитие (Sangiao-Alvallos *et al.*, 2003, Le Francois *et al.*, 2004).

Поскольку при возврате в пресную воду активность ЛДГ, 1-ГФДГ и альдозазы (рис. 3б, 3г и 3д) у личинок возвращается к исходному уровню, то можно говорить о пластичности ответной реакции исследуемых метаболитических путей при резкой смене солености/опреснения. Активность ЦО (фермента аэробного обмена) повышается незначительно.

Активность фермента пентозофосфатного пути Г6ФДГ у личинок горбуши на протяжении эксперимента не изменялась (рис. 3в), что согласуется с данными литературы (Soengas *et al.*, 1993) об отсутствии изменений активности Г6ФДГ в мышцах молоди форели при переносе в морскую воду. Вероятно, что сохранение активности пентозофосфатного пути является необходимым для поддержания уровня НАДФН, используемого в реакциях биосинтеза жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, сфинголипидов (Tian *et al.*, 1998). В условиях гиперосмотического шока происходит активация синтеза стероидов, в том числе и стероидных гормонов, участвующих в регуляции осморегуляторных механизмов (McCormick, 2001; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2019).

Активность исследуемых ферментов у смолтов горбуши, выдержанных в реке, эстуарии, море (длительный садковый эксперимент)

В садковом эксперименте установлено снижение активности ЦО (рис. 4а) у смолтов горбуши, выдержанных в эстуарии и в море, по сравнению с особями, оставшимися в пресной воде, что согласуется с вышеприведенными данными аквариального краткосрочного эксперимента по снижению активности фермента аэробного обмена при переносе личинок в морскую воду. Ранее в исследовании на молоди палии 1+ (*Salvelinus fontinalis*) было также показано, что перемещение ее в морскую воду из пресной на месяц приводит к снижению активности ЦО в жабрах на фоне увеличения активности Na^+/K^+ -АТФазы (Le Francois, Blier, 2003). У молоди (1+) пятнистой зубатки при выдерживании в течение 14 и 19 недель в воде с разной соленостью (7, 14, 21, 28‰) низкая активность ЦО в жабрах была установлена в среде с

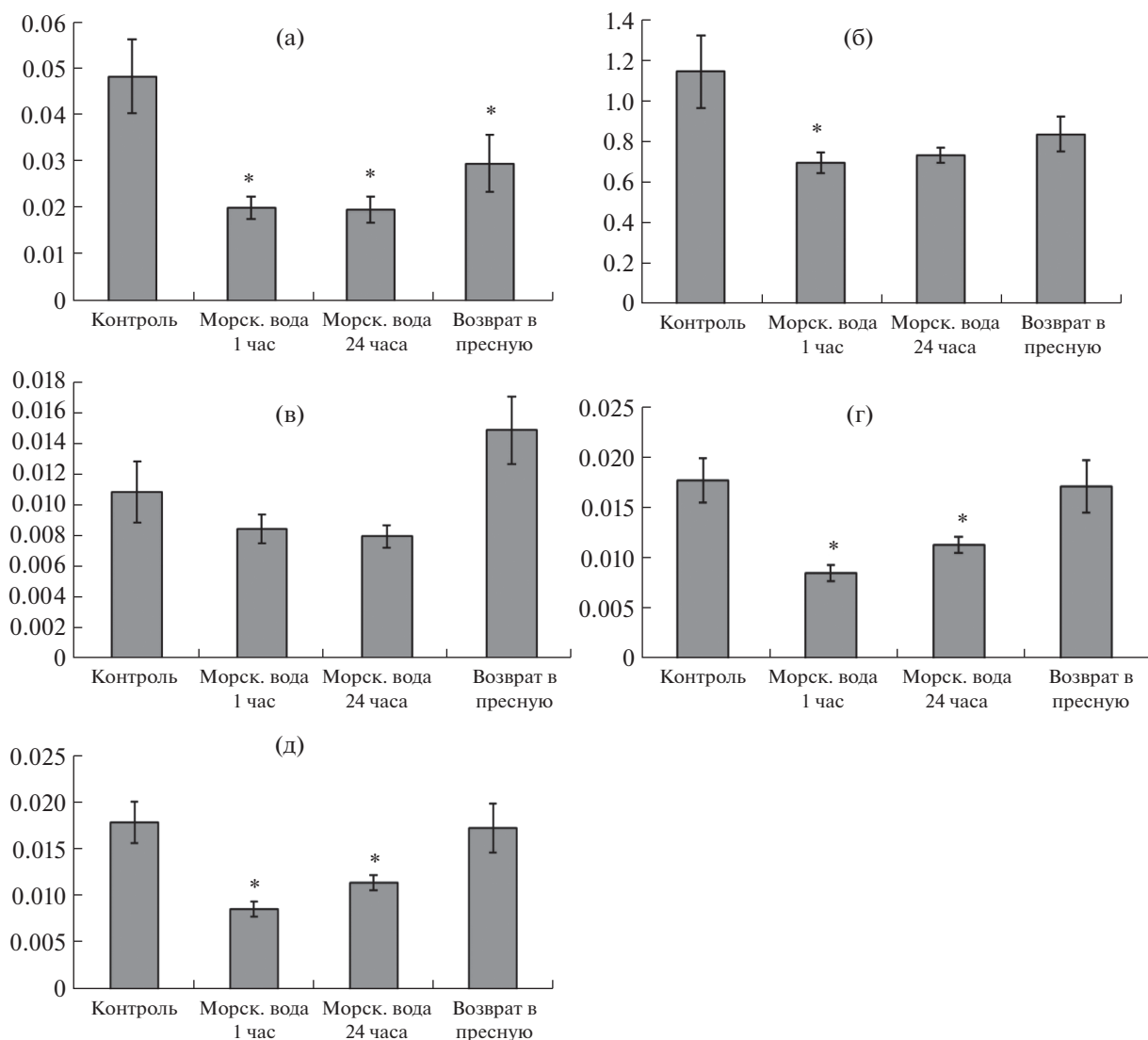


Рис. 3. Относительная активность ферментов ЦО (а), ЛДГ (б), Г-6-ФДГ (в), 1-ГФДГ (г), альдолазы (д) (мкмоль/мин/мг белка) у личинок горбуши при переносе в морскую воду в краткосрочном эксперименте. * – различия по сравнению с контрольной точкой достоверны ($p < 0.05$).

наименьшей соленостью (7‰), а при остальных концентрациях различия не наблюдалось, при этом корреляции между изменением активности Na^+/K^+ -АТФазы и ЦО установлено не было (Le Francois *et al.*, 2004). Было сделано предположение (Le Francois *et al.*, 2004), что у разных видов рыб существуют определенные различия в регуляции активности ЦО при изменении солености.

Низкая аэробная емкость у молоди горбуши в море и в эстуарии компенсируется, вероятно, анаэробным синтезом АТФ, на что указывает отсутствие различия в уровне активности ЛДГ у этих групп рыб при сравнении с таковой у особей из русла реки (рис. 4б) на фоне уменьшения активности ЦО. Согласно данным литературы (Tseng, Hwang, 2008), анаэробный метаболизм углеводов

выполняет ведущую роль в адаптивных реакциях водно-солевого обмена к обитанию в морской воде, являясь механизмом, быстро реагирующим на изменение в потребности энергии АТФ. Так, в исследованиях адаптации молоди зубатки к разным условиям солености (7, 14, 21, 28‰) показано, что наряду с увеличением активности Na^+/K^+ -АТФазы повышалась активность ЛДГ и пируваткиназы (ПК) (Le Francois *et al.*, 2004). У зрелых особей палии *S. fontinalis* в исследовании чувствительности к изменению солености в репродуктивный период, изменение активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах при выдерживании в морской воде не было связано с изменением ПК и ЛДГ, в то время как у стерильных, не зрелых особей активность и ЛДГ и Na^+/K^+ -АТФазы в

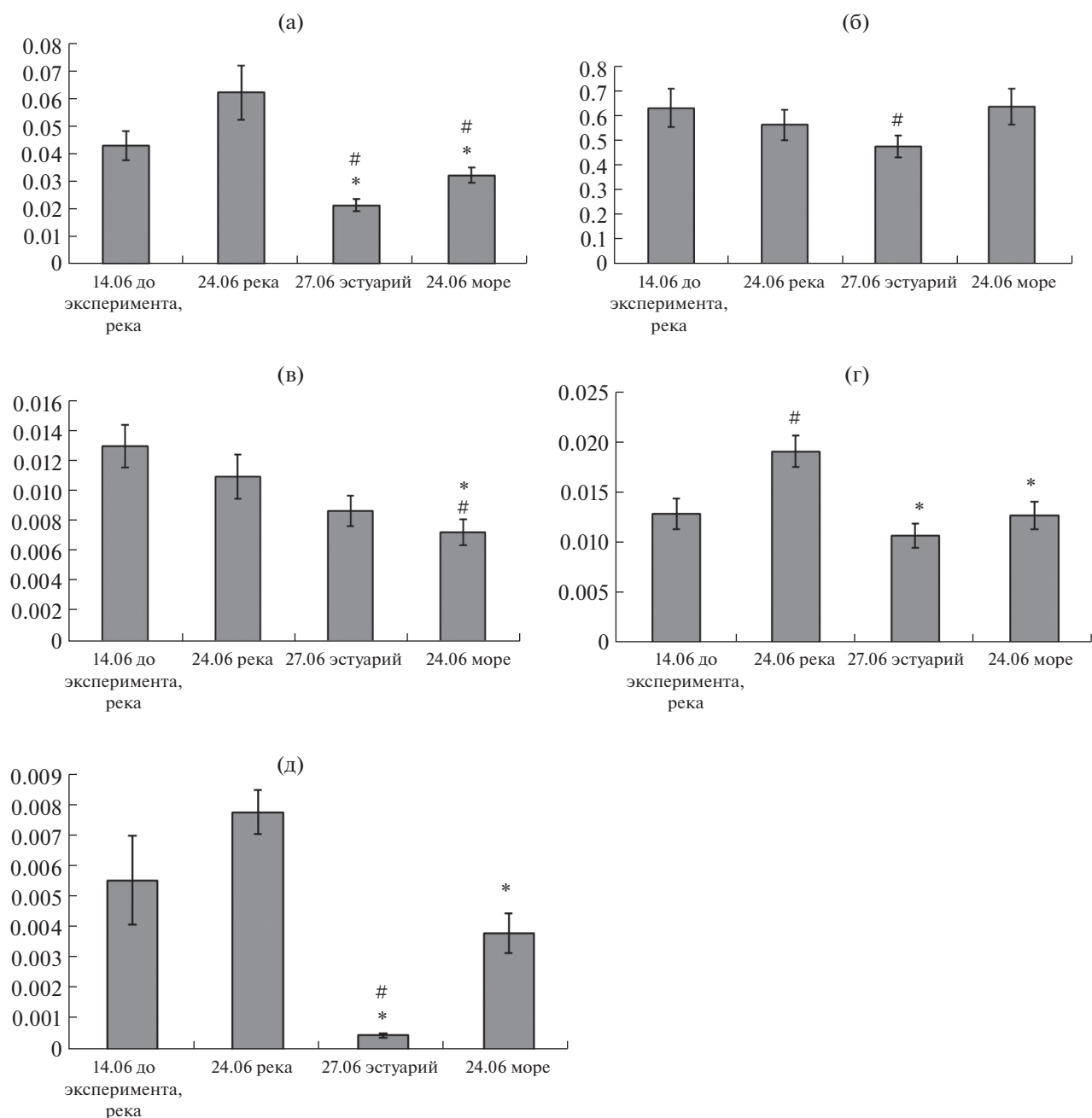


Рис. 4. Относительная активность ферментов ЦО (а), ЛДГ (б), Г-6-ФДГ (в), 1-ГФДГ (г), альдозаза (д) (мкмоль/мин/мг белка) у смолтов горбуши при выдерживании в эстуарии и в море в долгосрочном эксперименте. * – различия по сравнению с данными “24.06 река” достоверны ($p < 0.05$); # – различия по сравнению с данными “14.06 до эксперимента” достоверны ($p < 0.05$).

жабрах была выше в морской воде (Le Francois, Blier, 2003; Le Francois *et al.*, 2004). О значении анаэробного обмена (гликолиза) у рыб в энергообеспечении при изменении солености среды свидетельствует увеличение уровня окисления глюкозы и лактата, которые становятся основными источниками энергии при адаптации разных видов рыб к солености (Soengas *et al.*, 2007).

У особей, выдержанных в эстуарии и в море, по сравнению с особями из реки установлены низкие уровни активности 1-ГФДГ и альдозаза (рис. 4в, 4г), что также согласуется с результатами аквариального эксперимента (краткосрочного) на личинках горбуши (рис. 3в, 3г). Это указывает на снижение использования углеводов в гликолизе и синтезе глицерофосфата у смолтов. Посколь-

ку активность ЦО снижается, а ЛДГ не изменяется, то, вероятно, у исследуемой молоди горбуши происходит перераспределение углеводов между реакциями аэробного и анаэробного обмена в пользу анаэробного синтеза АТФ. Обращает на себя внимание также и самый низкий уровень активности альдолазы у молоди горбуши в эстуарии. В эстуарии смолты в большей степени подвержены влиянию изменяющихся условий (смена пресной и соленой воды, температур, скорости потока). Вероятно, что у смолтов горбуши, находящихся в условиях эстуария, имеет место наибольшая трата энергетических субстратов.

Изменений в активности фермента пентозо-фосфатного пути – Г-6-ФДГ у смолтов в эстуарии по сравнению с особями, выдержанными в пресной воде установлено не было. Эти результаты согласуются с данными, полученными в краткосрочном аквариальном эксперименте, и подтверждают важность сохранения активности ПФП при изменении условий солености среды. Низкий уровень активности Г-6-ФДГ наблюдается у особей, выдержанных в море (рис. 4в). Снижение Г-6-ФДГ при длительном нахождении в морской воде может быть связано и с другими факторами, влияющими на общий метаболизм молоди горбуши, такими, например, как наличие пищи или изменение температуры воды.

Таким образом, результаты проведенных исследований изменений активности ферментов энергетического и углеводного обмена у личинок горбуши, отобранных из нерестового гнезда в кратковременном аквариальном эксперименте и у мигрирующих смолтов горбуши в долговременном садковом эксперименте при изменении солености среды обитания, свидетельствуют о наличии у них адаптивных перестроек в аэробном и анаэробном обмене, функционировании пентозо-фосфатного пути. Данные экспериментов показывают, что метаболические перестройки, связанные с увеличением солености воды, свойственны молоди горбуши уже на стадии личинки. Использование анаэробного пути синтеза АТФ и поддержание функционирования ПФП, а также пластичность регуляции этих процессов, являются, по-видимому, одним из механизмов биохимической адаптации молоди горбуши к резкой смене солености среды обитания, что имеет значение в подготовке молоди горбуши к покатной миграции в море.

Работа выполнена при финансировании из средств государственного бюджета, выделенных по темам (0218-2019-0076 и 0218-2019-0081).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Колб В.Г., Камышников В.Г. Клиническая биохимия. Минск: Изд-во Беларусь, 1976. 311 с.

Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. 272 с.

Немова Н.Н., Кяйвярайнен Е.И., Рендаков Н.Л., Никерова К.М., Ефремов Д.А. Содержание кортизола и активность Na^+/K^+ -АТФазы при адаптации молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmonidae) к изменению солености среды // Вопросы ихтиологии. 2021. в печати

Чурова М.В., Шульгина Н.С., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена в органах колюшки в период нереста из разных биотопов Белого моря // Доклады Академии наук. 2018. Т. 482. № 1. С. 111–113.

Gauthier C., Campbell P., Couture P. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2008. V. 151. P. 526–532.

Goolish E.M., Adelman I.R. Tissue specific cytochrome c oxidase activity in largemouth bass: the metabolic cost of feeding and growth // Physiol. Zoology. 1987. V. 60. P. 454–464.

Grant A., Gardner M., Nendick L., Sackville M, Farrell A.P., Brauner C.J. Growth and ionoregulatory ontogeny of wild and hatchery-raised juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Can. J. Zoology. 2009. V. 87. P. 221–228.

Grant A.M., Gardner M.L., Hanson L.M., Farrell A.P., Brauner C.J. Early life stage salinity tolerance of wild and hatchery-reared juvenile pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* // J. Fish Biol. 2010. V. 77. № 6. P. 1282–1292.

Johansen K.A., Overturf K. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout //Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 144. P. 119–127.

Le Francois N.R., Blier P.U. Reproductive events and associated reduction in the seawater adaptability of brook charr (*Salvelinus fontinalis*): evaluation of gill metabolic adjustments // Aquat. Living Resour. 2003. 16. P. 69–76.

Le Francois N.R., Lamarre S.G., Blier P.U. Tolerance, growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities. // Aquaculture. 2004. V. 236(1–4). P. 659–675.

McCormick S.D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish // Amer. zoologist. 2001. V. 41. № 4. P. 781–794.

McCormick S.D. Smolt Physiology and Endocrinology // Euryhaline Fishes / Eds. S.D. McCormick, A.P. Farrell, C.J. Brauner. 2012. P. 199–251.

Noble J.E., Bailey M.J.A. Quantitation of Protein // Methods in Enzymology. 2009. V. 463. P. 73–95.

Ruiz-Jarabo I., Tinoco A.B., Vargas-Chacoff L., Martos-Sitcha J.A., Rodríguez-Rúa A., Cárdenas S., Mancera J.M. Environmental salinity affects growth and metabolism in fingerling meagre (*Argyrosomus regius*) // Fishes. 2019. V. 4. P. 6.

Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., Guzmán J.M., Martí'n del Río M.P., Miguez J.M., Mancera J.M., Soengas J.L. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonos-

- moregulatory organs // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003. V. 285. P. 897–907.
- Soengas J.L., Barciela P., Fuentes J., Otero J., Andrés M.D., Aldegunde M. Changes in muscle carbohydrate-metabolism in domesticated rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) after transfer to seawater // *Comp. Biochem. Phys. Part B: Comp. Biochem.* 1993. V. 104. № 1. P. 73–179.
- Soengas J.L., Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., Mancera J.M. Energy metabolism and osmotic acclimation in teleost fish. In *Fish Osmoregulation*; Baldiserotto B., Mancera J.M., Kapoor, B.G., Eds.; Science Publishers: Enfield, NH USA. 2007. P. 277–307.
- Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // *Methods in Biochem. Analysis.* 1995. V. 2. P. 427–434.
- Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J., Stuhlmeier K.M., Xi Q.C., Tian X., Stanton R.C. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 10609–10617.
- Tseng Y.C., Hwang P.P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish // *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 2008. V. 148. P. 419–429.
- Weisbart M. Osmotic and ionic regulation in embryos, alevins, and fry of the five species of *Pacific salmon* // *Can. J. Zool.* 1967. V. 46. P. 385–397.

Activity of Energy and Carbohydrate Metabolism Enzymes in Juvenile Pink Salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) During the Transition from Fresh Environment Marine

M. V. Churova^{1, #}, N. S. Shulgina¹, M. Yu. Krupnova¹, D. A. Efremov¹, and N. N. Nemova¹

¹*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya st. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

[#]*e-mail: mchurova@yandex.ru*

Biochemical adaptations of energy metabolism and some pathways of glucose oxidation during a change in salinity of environment in larvae and smolts of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) inhabiting the White Sea were studied. The activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes (cytochrome c oxidase COX, lactate dehydrogenase, LDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH, 1-glycerophosphate dehydrogenase, 1-GPDH, and aldolase) in larvae of pink salmon we assayed in the short-term aquarium experiment and in smolts of pink salmon in the long-term cage experiment, modeling the transition of juveniles from freshwater to marine. A decrease in the activity of COX, LDH, 1-GPDH, and aldolase was shown already in the first hour after the transfer of larvae to sea water. Smolts kept in the estuary and in the sea had low activity levels of 1-GPDH and aldolase, in comparison with individuals from the river. Probably, there is, a redistribution of carbohydrates between the reactions of aerobic and anaerobic metabolism in favor of anaerobic ATP synthesis in the studied pink salmon juveniles. No changes in the enzyme activity of the pentose phosphate pathway, G-6-PDH, were found in both larvae and smolts compared with individuals kept in fresh water. Maintaining the required levels of anaerobic metabolism and pentose phosphate pathway is probably one of the mechanisms of biochemical adaptation of pink salmon to changes in salinity.

ИЗМЕНЕНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА И ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *Vt*-ГЕНОМ

© 2021 г. Т. И. Пузина*^{*,@}, В. В. Король*, И. Ю. Макеева*

*ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева»,
ул. Комсомольская, 95, Орел, 302026 Россия

@E-mail: tipuzina@gmail.com

Поступила в редакцию 16.07.2019 г.

После доработки 27.03.2020 г.

Принята к публикации 03.09.2020 г.

Изучен гормональный статус, интенсивность фотосинтеза и продуктивность нетрансформированных и трансформированных *Vt*-геном растений картофеля сорта Суперитор. Показано, что в период вынужденного покоя в глазах клубней трансформированных растений содержание АБК было в два раза выше нетрансформированных, тогда как содержание ИУК и зеатина – в 1.5 раза меньше. Отношение зеатин/АБК и, в большей степени, ИУК/АБК было ниже контроля. В листьях трансгенных растений уровень АБК на 40% был меньше нетрансформированных, низким оставалось отношение зеатин/АБК, но возросло отношение ИУК/АБК. На фоне данной гормональной ситуации в листьях трансгенных растений на 24% повысилась ассимиляция $^{14}\text{CO}_2$, однако отмечена меньшая продуктивность (на 21%) при выращивании в почвенной культуре. У трансформированных растений выявлено меньшее количество клубней в кусте и снижение содержания в них крахмала, что может свидетельствовать как о нарушении инициации процесса клубнеобразования, так и оттока ассимилятов из листьев.

DOI: 10.31857/S1026347021050139

Генно-инженерные технологии все чаще используются в фундаментальных исследованиях для изучения механизмов роста и развития растений (Аксенова и др., 2005; Giannarelli *et al.*, 2009; Дерябин, Трунова, 2014). Трансгенные растения являются моделью для исследования стрессовых ответов на действие биотических и абиотических факторов (Пирузян и др., 2000; Астахова и др., 2011; Scalabrin *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018). В последнее время пристальное внимание уделяется исследованию растений с усиленным или ослабленным синтезом фитогормонов, что позволяет изучить молекулярно-генетические основы гормонального действия и снять вопросы, связанные с поступлением, транспортом и метаболизмом при их экзогенном применении (Nishiyama *et al.*, 2011; Ермошин и др., 2013; Kolachevskaya *et al.*, 2015; Данилова и др., 2016). Наряду с этим имеются работы как отечественных, так и зарубежных авторов по изучению содержания гормонов у растений, трансформированных генами, не связанными с их синтезом или метаболизмом (Абдеев и др., 2004; Загорская и др., 2009; Debast *et al.*, 2011; Eschen-Lippold *et al.*, 2012). Изучение гормонального статуса таких трансгенных растений должно быть одним из приоритетных направлений, так как фитогормо-

ны являются ведущими регуляторами жизнедеятельности растений.

В настоящее время во всем мире увеличивается выращивание сельскохозяйственных растений, трансформированных *Vt*-геном из грам-положительной аэробной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis*. Данные растения содержат δ -эндотоксин, губительно действующий на личинки насекомых, в том числе и колорадского жука. Основное внимание исследователи уделяют изучению генетических аспектов трансформации растений *Vt*-геном, а также экологическим рискам, возникающим при возделывании трансгенных культур (Zwahlen *et al.*, 2003; Catarino *et al.*, 2015; Викторова, 2017; Xu *et al.*, 2018), в некоторых работах показано влияние на скорость развития растений (Lumbierres *et al.*, 2004), содержание в них азота (Escher *et al.*, 2000). При этом не найдено сведений о реакции гормональной системы растений, в том числе и картофеля, на введение *Vt*-гена.

Цель исследования – изучение содержания и соотношения фитогормонов в прорастающих клубнях и листьях растений картофеля сорта Су-

периор, трансформированных *Bt*-геном, а также интенсивности ассимиляции CO_2 листьями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Суперитор и полученные на их основе компанией “Monsanto” трансгенные растения с *Bt*-геном. Клубни трансгенных растений были предоставлены лабораторией генетики ВНИИ КХ (Россия). *Bt*-ген встроен с маркерным геном *npt-II*. *Bt*-ген продуцирует белки *CRY*-дельта-эндотоксины, специфичные к различным видам насекомых. Для колорадского жука токсичен белок *CRN111A*. В исследованиях (Watanabe *et al.*, 2004) методом ПЦР-анализа подтверждено наличие встроенного *Bt*-гена у картофеля сорта Суперитор. Опыты проводили с клубнями, находящимися в состоянии вынужденного покоя (хранились в овощехранилище при температуре +4°C), в первые 72 ч прорастания после перенесения в лабораторию (20 ± 2°C), через 14 сут после начала прорастания, а также с растениями, выращенными в почвенной культуре в условиях вегетационного домика на агробиостанции Орловского госуниверситета. В почвенной культуре использовали серую лесную средне-суглинистую почву. В период закладки опытов в почву вносили оптимальные для картофеля количества азота, фосфора и калия – соответственно: 2.3, 0.7, 3.1 г на сосуд. В сосуде с 10 кг почвы выращивали одно растение и поддерживали влажность почвы 60% от полной влагоемкости.

Анализировали средние пробы апикальных глазков клубней, 14-дневных проростков, листьев 7 яруса срединной формации в фазе бутонизации. В конце вегетации растений учитывали их продуктивность и содержание крахмала в клубнях.

Фитогормоны экстрагировали 80%-ным этанолом из исследуемого растительного материала, зафиксированного в жидком азоте. После очистки экстракта фитогормонов с помощью хроматографии по методике (Веселов, 1998) определяли содержание ауксинов, цитокининов и абсцизовой кислоты методом твердофазного иммуноферментного анализа (Кудоярова и др., 1986, 1990). В лунки полистиролового планшета вносили конъюгат гормона с белком, а затем сыворотку с антителами к соответствующему гормону и раствор стандартного гормона или экспериментальных образцов. Количество антител, специфически связанных с белковым конъюгатом гормона, определяли с помощью бараньих антител против иммуноглобулинов кролика, меченых пероксидазой. Для определения активности связавшейся пероксидазы использовали ортофенилендиамин. Интенсивность хромофорного ответа определяли на микрофотометре Dombi plate (ЗАО “Пикон”, Россия) при длине волны 492 нм. Для анализов

использовали отечественные реактивы фирмы “Уралинвест” (Россия). В качестве стандартных растворов фитогормонов были взяты ИУК, зеатин и АБК (“Serva”, Германия).

Интенсивность фотосинтеза определяли с помощью радиоактивного изотопа ^{14}C (Петрухин, Константинова, 1982). $^{14}\text{CO}_2$ получали в газгольдере из смеси 4 мг радиоактивной соды и 2.525 г чистой соды. В фазе бутонизации растений интактный лист 7 яруса экспонировали 10 мин в камере-прищепке, в которую вводили 10 мл $^{14}\text{CO}_2$ из газгольдера с помощью медицинского шприца при температуре 19°C, влажности воздуха 49% и освещенности 13000 лк. Удельная радиоактивность в атмосфере $^{14}\text{CO}_2$ – 0.0334 мБк/нМ, концентрация $^{14}\text{CO}_2$ – 0.6%. Для определения скорости фотосинтеза лист фиксировали при температуре 105°C 30 мин. Затем высушивали при 60°C. Измерение радиоактивности проводили на торцовом счетчике Т-25-БФЛ (“Изотоп”, Россия).

Для определения сухой массы клубни и листья высушивали в сушильно-стерилизационном шкафу ШСС-80 (“Гродненский завод пищевого машиностроения”, Беларусь) при 105°C до постоянной массы.

Продуктивность растений картофеля, выращенных в почвенной культуре в условиях вегетационного домика, учитывали путем взвешивания клубней из каждого сосуда.

Содержание крахмала в клубнях определяли в конце вегетации растений на сахариметре СУ-4 (“Аналитприбор”, Россия) по методике (Радов и др., 1971). Навеску клубней подвергали гидролизу с 1.124%-ной HCl , затем охлаждали и добавляли 30%-ный ZnSO_4 и 15%-ный железистосинеродистый калий. Фильтратом наполняли поляризационную трубку и делали отсчет по шкале сахариметра. Содержание крахмала вычисляли по формуле: $\frac{k\alpha \times 100}{100 - w}$ где k – переводной коэффициент (для картофеля 1.912), α – показатель сахариметра в градусах шкалы, w – влажность навески в %.

В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения из девяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Аналитическая повторность – 7-кратная. Достоверность результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента. Достоверными различия были при уровне доверительной вероятности выше 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты определения содержания фитогормонов в апикальных глазках клубней, находящихся в состоянии вынужденного покоя, свидетельствуют о различном гормональном статусе транс-

Таблица 1. Содержание и соотношение фитогормонов в глазках клубней, находящихся в состоянии вынужденного покоя

Вариант	Содержание фитогормонов, мкг/г сухой массы			Соотношение фитогормонов	
	зеатин	ИУК	АБК	зеатин/АБК	ИУК/АБК
Нетрансформированные растения	0.75 ± 0.04	0.28 ± 0.01	1.10 ± 0.11	0.68	0.25
Трансгенные растения	0.51 ± 0.02	0.19 ± 0.01	2.22 ± 0.20	0.23	0.09

Таблица 2. Содержание и соотношение фитогормонов в глазках клубней через 72 ч прорастания

Вариант	Содержание фитогормонов, мкг/г сухой массы			Соотношение фитогормонов	
	зеатин	ИУК	АБК	зеатин/АБК	ИУК/АБК
Нетрансформированные растения	9.6 ± 0.3	0.71 ± 0.04	0.66 ± 0.06	14.5	1.10
Трансгенные растения	8.0 ± 0.3	0.28 ± 0.02	1.26 ± 0.09	6.3	0.22

формированных *Vt*-геном и нетрансформированных растений (табл. 1). Так, клубни трансгенных растений характеризовались меньшим количеством ауксинов (ИУК) и цитокининов (зеатина) в полтора раза. Напротив, уровень абсцизовой кислоты (АБК) в них был в два раза выше. В результате соотношение ИУК/АБК и зеатин/АБК в глазках клубней трансгенных растений было почти в три раза меньше.

Через 72 ч от начала прорастания глазков клубней уровень абсцизовой кислоты снизился в 1.7 раза как у нетрансформированных, так и трансгенных растений (табл. 2). Вместе с тем, значительно (более чем на порядок) увеличилось содержание зеатина в глазках клубней обоих вариантов. Однако, и в данном случае, их уровень был незначительно (на 17%), но достоверно ниже в глазках клубней трансгенных растений. Содержание ИУК повысилось в 2.5 раза в клубнях нетрансформированных растений и в меньшей степени – в 1.5 раза у трансгенных (табл. 1, табл. 2).

Таким образом, к концу третьих суток прорастания глазки клубней растений, трансформированных *Vt*-геном и нетрансформированных, имели разный гормональный баланс. Так, у трансгенных растений отношение зеатин/АБК было меньше более чем в два раза, а ИУК/АБК – меньше в пять раз по сравнению с нетрансформированными.

Через 14 сут после начала прорастания глазков высота ростков клубней трансгенных растений и их сырая масса была меньше на 32% по сравнению с нетрансформированными растениями (рис. 1).

В отличие от прорастающих глазков клубней в листьях трансгенных растений в фазе бутонизации уровень абсцизовой кислоты был ниже на 41% по сравнению с нетрансформированными (табл. 3). При этом сохранилась закономерность в содержании ИУК и зеатина. Оно было ниже, чем у нетрансформированных растений. Надо заметить, что в отличие от прорастающих глазков клубней, в листьях растений, трансформированных *Vt*-геном, в большей степени уменьшился

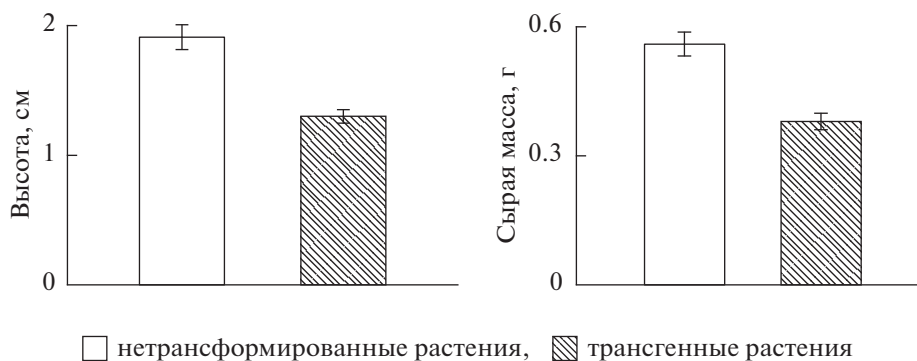


Рис. 1. Роствые показатели ростков клубней трансформированных *Vt*-геном и нетрансформированных растений.

Таблица 3. Содержание и соотношение фитогормонов в листьях растений картофеля

Вариант	Содержание фитогормонов, мкг/г сухой массы			Соотношение фитогормонов	
	зеатин	ИУК	АБК	зеатин/АБК	ИУК/АБК
Нетрансформированные растения	50.2 ± 3.2	100.2 ± 5.7	2.04 ± 0.18	24.6	49.1
Трансгенные растения	17.8 ± 1.0	79.6 ± 4.5	1.20 ± 0.11	14.8	66.3

уровень цитокининов – на 64%, тогда как ауксинов только на 20%. В результате изменения в гормональном статусе листьев трансгенных растений привели к меньшему соотношению зеатин/АБК (на 40%), но большему (на 35%) ИУК/АБК (табл. 3).

В этот период онтогенеза высота трансгенных растений практически не отличалась от нетрансформированных (рис. 2). Ее некоторое снижение находилось в пределах ошибки опыта.

Наряду с гормональными изменениями в листьях трансгенных растений наблюдали изменение интенсивности фотосинтеза, о котором судили по поглощению $^{14}\text{CO}_2$ (рис. 3). У растений, трансформированных *Bt*-геном, интенсивность ассимиляции CO_2 листьями была на 24% выше.

Продуктивность трансгенных растений картофеля, выращенных в почвенной культуре в условиях вегетационного домика при отсутствии пораженности колорадским жуком, была на 21% ниже по сравнению с нетрансформированными растениями (рис. 4). Трансгенные растения отличались меньшим количеством клубней в кусте (на 19%) и пониженным содержанием крахмала (на 20%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ имеющихся работ по внедрению чужеродных генов в растения картофеля, не связанных с гормональным метаболизмом, свидетельствует о

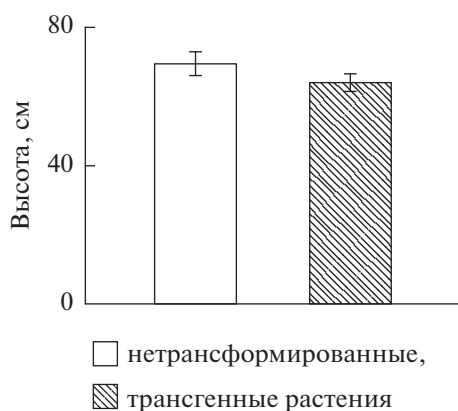


Рис. 2. Высота растений, трансформированных *Bt*-геном и нетрансформированных растений (фаза бутонизации).

чувствительности их гормональной системы к данной трансформации. При этом следует заметить, что авторы исследуют в основном содержание какой-то одной группы фитогормонов, в основном относящейся к ингибиторам роста. Так, в исследовании (Debast *et al.*, 2011) показано изменение содержания АБК у картофеля с измененным уровнем трегалозо-6-фосфата под влиянием трансформации *OtsA*-геном. Увеличение уровня АБК отмечено в картофеле, трансформированном *SaBZ1*-геном, повышающем устойчивость к солевому и осмотическому стрессам (Moon *et al.*, 2015). У модифицированных растений картофеля с уменьшенной экспрессией гена *StSYR1*, ответственного за устойчивость к фитофторозу, отмечали снижение уровня салициловой кислоты и неизменное содержание жасмоновой кислоты (Eschen-Lippold *et al.*, 2012).

Нами не найдено сведений о действии трансформации *Bt*-геном растений картофеля на их гормональный статус. Имеется лишь работа, в которой показано, что у трансформированных *Bt*-геном растений тополя в культуре *in vitro* увеличивалось содержание ИУК и гибберелловой кислоты (Han *et al.*, 2007).

Проведенное нами исследование показало, что у трансформированных растений картофеля сорта Суперитор по гену *Bt* был иной гормональный баланс по сравнению с нетрансформированными растениями. При этом имела значение фаза онтогенеза. В период вынужденного покоя в глаз-

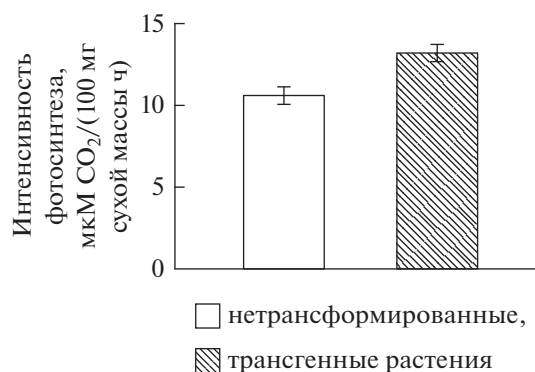


Рис. 3. Интенсивность фотосинтеза трансформированных *Bt*-геном и нетрансформированных растений картофеля.

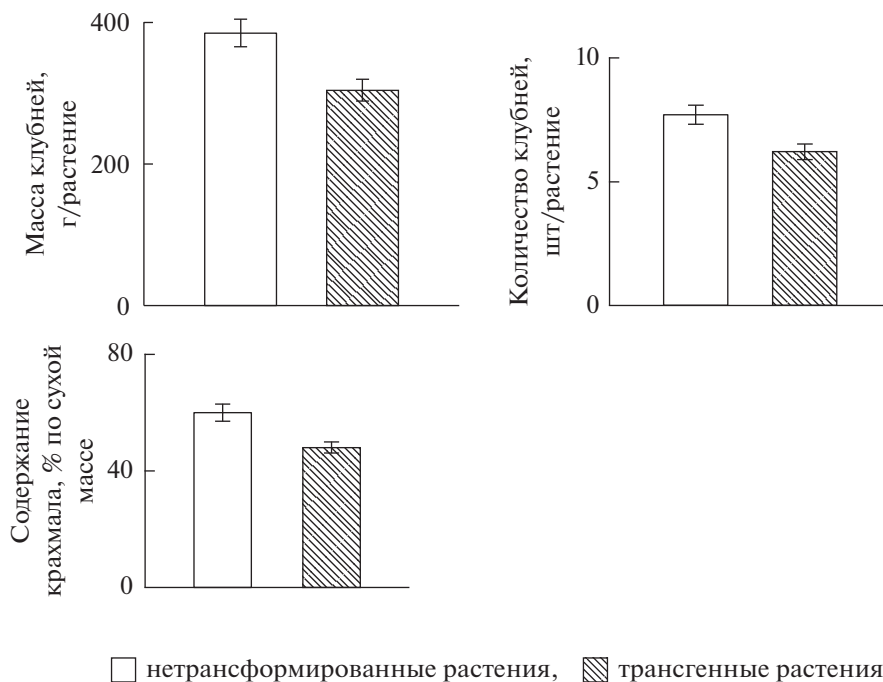


Рис. 4. Продуктивность картофеля и содержание крахмала в клубнях трансформированных *Vt*-геном и нетрансформированных растений.

ках клубней трансгенных растений выявлено высокое содержание АБК и меньшее соотношение ИУК/АБК, зеатин/АБК. Через трое суток после начала прорастания глазков у трансгенных растений в меньшей степени увеличилось содержание ауксинов по сравнению с цитокининами. Поэтому отношение ИУК/АБК было существенно ниже, чем зеатин/АБК. Уровень АБК оставался высоким. Иная гормональная ситуация наблюдалась в листьях трансгенных растений в фазе бутонизации. Произошло значительное снижение уровня АБК по сравнению с нетрансформированными растениями и увеличение отношения ИУК/АБК.

Известно, что фитогормоны занимают важное место в эндогенной регуляции фотосинтеза (Якушкина, Похлебаев, 1980; Чернядьев, 2009; Sugiurani *et al.*, 2015). В ранних исследованиях мы показали, что наивысшему соотношению ИУК/АБК в листьях растений картофеля соответствует максимум фотосинтетической активности, а именно, реакции Хилла, фотофосфорилирования и интенсивности ассимиляции CO_2 (Пузина и др., 1998). Выявленное в работе повышение интенсивности ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ у растений картофеля, трансформированных *Vt*-геном, возможно также связано с увеличением в листьях отношения ИУК/АБК, главным образом, за счет уменьшения уровня АБК.

Вызывает интерес тот факт, что растения картофеля, трансформированные *Vt*-геном, в условиях почвенной культуры были менее продуктивны по

сравнению с нетрансформированными, несмотря на более интенсивный фотосинтез. Возможно, это связано с нарушением инициации процесса клубнеобразования, на что указывает меньшее количество клубней в кусте. Известно, что процесс закладки клубней на столонах во многом зависит от уровня цитокининов (Ewing, Straik, 1992). Трансгенные растения в фазе бутонизации, когда происходит процесс клубнеобразования, характеризовались меньшим содержанием зеатина и низким соотношением зеатин/АБК. Не исключено, что меньшая продуктивность может быть связана и с нарушением донорно-акцепторных отношений. Не всегда существует прямая корреляция между интенсивностью фотосинтеза и продуктивностью сельскохозяйственных растений (Чиков, 2008). Известно, что эндогенная регуляция транспорта ассимилятов зависит, прежде всего, от гормональной ситуации, которая складывается на определенном этапе онтогенеза. Ранее мы выявили, что смена акцепторной функции листа на донорную у картофеля происходит на фоне снижения соотношения ИУК/АБК (Пузина и др., 2000). У растений, трансформированных *Vt*-геном, в фазе бутонизации, когда интенсивно идет процесс клубнеобразования, этого не наблюдалось. Меньшее содержание крахмала в клубнях трансгенных растений может указывать на торможение оттока ассимилятов из листьев.

Таким образом, в ходе исследования показано, что растения картофеля сорта Супериор, транс-

формированные *Bt*-геном, отличаются от нетрансформированных по содержанию и соотношению фитогормонов как на начальном этапе прорастания почек клубней, так и в ходе дальнейшей вегетации растений. При этом отмечена специфичность в гормональном статусе листьев трансгенных растений, проявившаяся в снижении содержания АБК и увеличении отношения ИУК к АБК по сравнению с нетрансформированными растениями, тогда как в прорастающих клубнях наблюдали противоположную картину. Выявлена меньшая продуктивность трансгенных растений картофеля в контролируемых условиях вегетационного опыта, несмотря на некоторое повышение интенсивности процесса фотосинтеза. Одной из вероятных причин снижения продуктивности может быть как нарушение процесса инициации клубнеобразования в условиях меньшего содержания цитокининов, так и снижение оттока ассимилятов в формирующиеся клубни из листьев с высоким соотношением ИУК/АБК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдеев Р.М., Мусийчук К.А., Голденкова И.В., Сотченков Д.В., Салехи Джузани Г.Р., Алявина А.К., Загоскина Н.В., Пирузян Э.С. Изменение морфологии и фитогормонального статуса у трансгенных растений табака в результате экспрессии бактериальной термостабильной целлюлазы // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 5. С. 714–720.
- Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Ложникова В.Н., Голяновская С.А., Гукасян И.А., Гатс К., Романов Г.А. Фотопериодическая и гормональная зависимость клубнеобразования у картофеля, трансформированного геном *RNYV Arabidopsis* // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 5. С. 701–707.
- Астахова Н.В., Демин И.Н., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Влияние гена *desA Δ12*-ацил-липидной десатуразы на структуру хлоропластов картофеля, в связи с устойчивостью к гипотермии // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 1. С. 21–27.
- Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа: БГУ, 1998. 138 с.
- Викторов А.Г. Эколого-физиологические особенности *Bt*-растений, приводящие к вспышкам численности вторичных вредителей // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 4. С. 243–250.
- Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Дорошенко А.С., Забродин Д.А., Виноградов Н.С., Кузнецов В.В. Молекулярные и физиологические ответы растений *Arabidopsis thaliana*, дефектных по генам рецепции и метаболизма АБК и цитокининов, на тепловой шок // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 3. С. 327–338.
- Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Морфофизиологические и биохимические характеристики растений картофеля, экспрессирующих ген *SUC2* инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*, при выращивании *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2014. Т. 4. № 28. С. 150–168.
- Ермошин А.А., Кондратов П.В., Алексеева В.В., Рукавцова Е.Б. Развитие арбускулярной микоризы у трансгенных растений табака с измененным синтезом изопреноидов и растений с гиперпродукцией ауксинов // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2013. Т. 1. № 1. С. 146–150.
- Загорская А.А., Сидорчук Ю.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Динамика ИУК и цитокининов в тканях цветков трансгенных растений табака с мутантным фенотипом // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 6. С. 917–925.
- Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И., Гюли-Заде В.З., Гимаева Р.М., Загидуллин Н.В., Шакирова Ф.М. Иммуноферментное определение индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. растений. 1986. Т. 33. № 6. С. 1221–1227.
- Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н., Гюли-Заде В.З., Чередова Е.П., Мустафина А.Р., Мошкова И.Е., Кулаева О.Н. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиол. растений. 1990. Т. 37. № 1. С. 193–199.
- Петрухин Ю.А., Константинова Л.М. Фотосинтетический метаболизм углерода в листьях хлорофитума // Биологические науки. 1982. № 7. С. 95–99.
- Пирузян Э.С., Кобец Н.С., Метт В.Л., Серебрянская Т.С., Неумывакин Л.В., Ализаде Х., Ленец А.А., Симонова М.Л., Шевелуха В.С., Голденкова И.В. Трансгенные растения с экспрессируемыми чужеродными генами как модель для изучения стрессовых ответов и источник создания устойчивых форм // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 3. С. 370–381.
- Пузина Т.И., Кириллова И.Г., Якушкина Н.И. Влияние ауксина на фотосинтетическую деятельность и рост клубней картофеля // Докл. РАСХН. 1998. № 6. С. 29–31.
- Пузина Т.И., Кириллова И.Г., Якушкина Н.И. Динамика индолилуксусной кислоты в органах картофеля на разных этапах онтогенеза и ее роль в регуляции роста клубня // Изв. Академии Наук. Сер. биологическая. 2000. № 2. С. 170–177.
- Радов А.С., Пустовой И. В., Корольков А. В. Практикум по агрохимии. М.: Колос, 1971. 335 с.
- Чернядьев И.И. Протекторное действие цитокининов на фотосинтетический аппарат и продуктивность растений при стрессе (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 389–402.
- Чиков В.И. Эволюция представлений о связи фотосинтеза с продуктивностью растений // Физиол. растений. 2008. Т. 55. № 1. С. 140–154.
- Якушкина, Н.И., Похлебаев С.М. Особенности гормонального регулирования фотохимической активности хлоропластов // Биол. науки. 1980. № 3. С. 67–70.
- Catarino R., Ceddia G., Areal F.J., Park J. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) crops // Plant Biotech. J. 2015. V. 13. P. 601–612.
- Debast S., Nunes-Nesi A., Hajirezaei M.R., Hofmann J., Sonnwald U., Fernie A.R., Boernke F. Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hor-

- mones during Sprouting // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 1754–1771.
- Eschen-Lippold L., Lubken T., Smolka U., Rosahl S. Characterization of potato plants with reduced StSYR1 expression // *Plant Signal. Behavior.* 2012. V. 7. P. 559–562.
- Escher N., Kaech B., Nentwig W. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) // *Basic Appl. Ecology.* 2000. № 1. P. 161–169.
- Ewing E.E., Struik P.C. Tuber formation in the potato: induction, initiation and growth // *Horticultural Rev.* 1992. V. 14. P. 89–198.
- Giannarelli S., Muscatello B., Bogani P., Spiriti M.M., Buatti M., Fuoco R. Comparative determination of some phytohormones in wild-type and genetically modified plants by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 2009. V. 398. P. 60–68.
- Gururani, M.A., Mohanta T.K., Bae H. Current understanding of the interplay between phytohormones and photosynthesis under environmental stress // *Intern. J. Mol. Sciences.* 2015. V. 16. P. 19055–19085.
- Han H.-J., Zhang F.-Y., Yang M.-S., Liang H.-Y. and Zhang H.-X. Effects of NaCl stress on the exogenous gene expression in transgenic poplar plants // *J. Plant Physiol. Mol. Biology.* 2007. V. 33. P. 435–440.
- Kolachevskaya O.O., Alekseeva V.V., Sergeeva L.I., Rukavitsova E.B., Getman I.A., Vreugdenhil D., Buryanov Ya.I., Romanov G.A. Expression of auxin synthesis gene *tms1* under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization *in vitro* // *J. Integr. Plant Biol.* 2015. P. 734–744.
- Lumbierres B., Albajes R. and Pons X. Transgenic *Bt* maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance // *Ecol. Entomol.* 2004. P. 309–317.
- Moon S.-J., Han S.-Y., Kim D.-Y., Yoon I.S., Shin D., Byun M.-O., Kwon H.-B., Kim B.-G. Ectopic expression of a hot pepper bZIP-like transcription factor in potato enhances drought tolerance without decreasing tuber yield // *Plant Mol. Biol.* 2015. V. 89. P. 421–431.
- Nishiyama R., Watanabe Y., Fujita Y., Le D.T., Kojima M., Werner T., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kakimoto T., Sakakibara H., Schmölling T. and Tran L.S. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis // *Plant Cell.* 2011. P. 2169–2183.
- Scalabrin E., Radaelli M., Capodaglio G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses // *Plant Phys. Biochem.* 2016. P. 53–60.
- Xu C., Cheng J.H., Lin H.Y., Lin C.Y., Gao J.H., Shen Z.C. Characterization of transgenic rice expressing fusion protein Cry1Ab/Vip3A for insect resistance // *Sci. Reports.* 2018. P. 1–8.
- Watanabe T., Kuribara H., Mishima T, Kikuchi H., Kodama T., Futo S., Kasama K., Toyota A., Nouno M., Saita A., Takahashi K., Hino A., Akiyama H., Maitani T. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes // *Biol. Pharmac. Bulletin.* 2004. V. 27. P. 1333–1339.
- Zwahlen C., Hilbeck A., Gugerli P., Nentwig W. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field // *Mol. Ecology.* 2003. V. 12. P. 765–775.

The Changes in Hormonal Status and Photosynthesis of the Potato Plants Transformed by the *Bt*-Gene

T. I. Puzina^{1, #}, V. V. Korol¹, and I. Yu. Makeeva¹

¹Orel State University named of I.S. Turgenyev, Orel State University, ul. Komsomolskaya, 95, Orel, 302026 Russia

[#]e-mail: tipuzina@gmail.com

The hormonal status, photosynthesis rate and productivity of non-transformed and *Bt*-gene transformed potato plants of the Superior variety were studied. It was shown that during forced dormancy in the eyes of tubers of transformed plants, the ABA content was two times higher than non-transformed ones, while the content of IAA and zeatin was 1.5 times lower. The ratio of zeatin/ABA and, to a greater extent, IAA/ABA was below control. In the leaves of transgenic plants, the ABA level was 40% lower than the non-transformed ones, the zeatin/ABA ratio remained low, but the IAA/ABA ratio increased. Against the background of this hormonal situation, the assimilation of ¹⁴CO₂ in the leaves of transgenic plants increased by 24%, but lower productivity (by 21%) when grown in soil culture was noted. In transformed plants, a smaller number of tubers in the bush and a decrease in the starch content in them were revealed, which may indicate a violation of the initiation of the tuberization process and the outflow of assimilates from the leaves.

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ТРЕМАТОДЫ *Gynaecotyla adunca* (TREMATODA: MICROPHALLIDAE) В ЧЕРНОМ МОРЕ

© 2021 г. Ю. В. Белоусова®

ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”,
пр. Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия

®E-mail: julls.belousova@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2020 г.

После доработки 14.07.2020 г.

Принята к публикации 14.07.2020 г.

В настоящей работе описаны полный жизненный цикл и стадии развития трематоды *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905) (Yamaguti, 1939) из двух различных биотопов. Показано, что в Черном море для трематод *G. adunca* первыми промежуточными хозяевами являются брюхоногие моллюски *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805), а вторыми промежуточными – креветки *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837). Окончательным хозяином, согласно нашим исследованиям, является серебристая чайка *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763). Приведены промеры, рисунки и морфологические характеристики данного вида трематоды на всех стадиях развития.

Ключевые слова: *Gynaecotyla*, Microphallidae, нематода, жизненный цикл, Черное море

DOI: 10.31857/S102634702105005X

Семейство Microphallidae включает 30 родов, из которых 4 встречаются в Черном море. Род *Gynaecotyla* представлен одним видом *G. adunca* (Определитель паразитов..., 1975).

Впервые жизненный микрофаллидной трематоды цикл *G. adunca* в акватории Средиземного моря описал Превот (Prévot, 1974). Жизненный цикл *G. adunca* в Черном море пока неизвестен.

Средиземное море характеризуется большим спектром промежуточных хозяев для гельминтов, в то время как черноморская фауна хозяев является более бедной по сравнению со средиземноморской. Поэтому представляет интерес рассмотреть жизненный цикл и уточнить круг хозяев для трематоды *G. adunca* в акватории Черного моря.

В моллюсках *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805) из Севастопольской (эстуарий р. Черная) и Казачьей бухт Севастополя нами обнаружены микрофаллидные церкарии, определенные первоначально как *Cercaria sevilla* (Russell-Pinto, Bartoli, 2002) [syn. *C. misenensis* Palombi, 1940 sensu Долгих, 1965], а в креветках *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837) – метацеркарии *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905) (Yamaguti, 1939) (Microphallidae) [syn. *Gynaecotyla longiintestina* Leonov, 1958]. Недавние молекулярно-генетические исследования (Pina et al., 2007), основанные на сборах личинок трематод от ракообразных *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) и моллюсков *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) у побережья Португалии (эстуарий Авейру)

показали, что *Cercaria sevilla* является личинкой микрофаллидной трематоды *G. adunca*.

Род *Gynaecotyla* (Yamaguti, 1939) описан в 1939 г. (Rankin, 1939) под названием *Cornucopula* (Rankin, 1939); созданный Ранкином новый род отличался от остальных представителей Microphallidae наличием двух брюшных присосок и строением копулятивного органа. В 1940 г. Ранкин (Rankin, 1940) определяет роды *Cornucopula* и *Gynaecotyla* как синонимы, а также впервые приводит данные о цикле развития трематоды *G. nassicola* в акватории Массачусетса (Вудс Хол).

Жизненный цикл трематоды *G. adunca* в Черном море до настоящего времени не расшифрован. Цель настоящего исследования – описание основных жизненных стадий и жизненного цикла этого вида трематоды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моллюсков *H. acuta* собирали в течение 2012 г. ежемесячно в двух различных биотопах – эстуарии реки Черная (Севастополь, Черное Море) (44°27'49" N, 33°51'37" E) (рис. 1) и бухта Казачья (44°36'29" N, 33°35'54" E) (рис. 2). Пробы гидробионтов собирали в биотопах, расположенных в месте впадения реки Черная в Севастопольскую бухту: I – биотоп, в котором соленость на протяжении исследования (2011–2013 гг.) колебалась в пределах 4–5‰, расположен ~ в 1.5 км выше

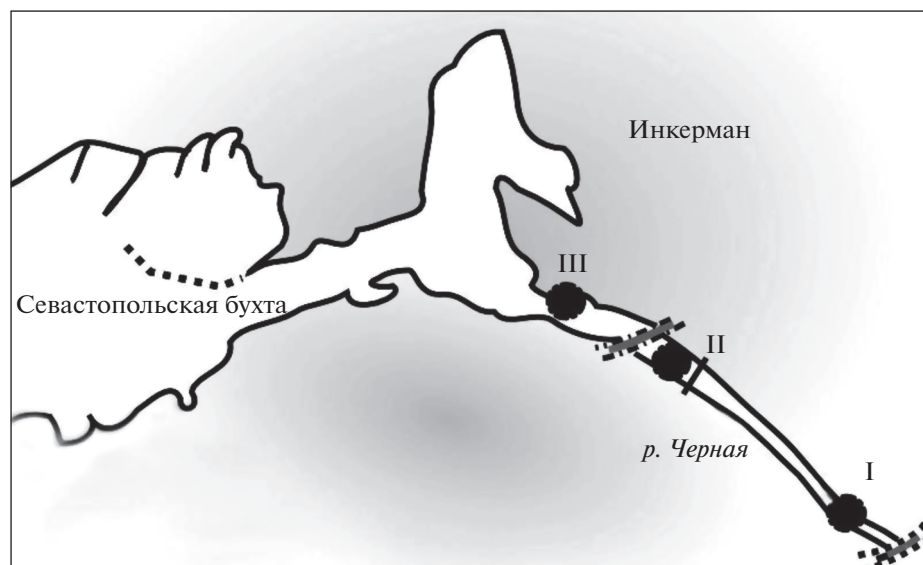


Рис. 1. Станции отбора проб (I–III) в экосистеме эстуарного типа, расположенной в районе впадения р. Черная в Севастопольскую бухту (Черное море).

устья реки, II – в устье реки, где соленость воды была 12–16‰ и III – в куту Инкерманской бухты, где соленость составляла 17–18‰ (рис. 1). С помощью метода полного гельминтологического вскрытия (Быховская-Павловская, 1969) изучено 6790 экз. моллюсков. Нога, жабры, мантия, гонады и печень *H. acuta* были исследованы компрессорным методом (Быховская-Павловская, 1969) между двумя предметными стеклами. Отлов травяной креветки *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837) был осуществлен в июне 2013 г. в эстуарии р. Черная (Севастополь) (рис. 1) неводом 1 × 0.4 м, с ячейками 6–8 мм.

Найденных партенит трематод исследовали живыми с помощью микроскопа Olympus CX41, оснащенного фотокамерой CX50 с программным обеспечением Infinity Analyze. Церкарий исследовали живыми, метациркарий и марит обследовали окрашенными ацетокармином по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Степень окраски дифференцировали “железной водой” ($H_2O + Fe_2O_3$) и подкисленным спиртом (70%-ный этанол + 3%-ная HCl). После дегидратации в этаноле различной концентрации (70, 80, 90 и 100°) и просветления в гвоздичном масле трематод заключали в канадский бальзам (Роскин, Левинсон, 1957). Все измерения были проведены на живых и окрашенных паразитах. Экскреторную систему личинок исследовали на живых особях при подкрашивании личинок нейтральным красным, в результате чего наблюдали мерцание пламенных клеток. Для каждого морфологического параметра вычисляли среднее арифметическое со стандартной ошибкой (μm).

Также были изучены препараты № 1.5 и 1.6 марит сем. Microphallidae от серебристой чайки *Larus argentatus* (Pontoppidan) из акватории бухты Омега, приготовленные в 1977 г. Т.Н. Мордвиновой, и препараты № 204.Tr.3f.VI-5 от травяной креветки *P. adspersus* из эстуария р. Черная, созданные в феврале 2006 г. В.К. Мачкевским (материалы подколлекции паразитических организмов Коллекции гидробионтов Мирового океана ФИЦ ИнБЮМ, (<http://marineparasites.org>)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Далее приводится морфологическое описание каждой жизненной стадии от соответствующего хозяина.

Партениты *G. adunca* паразитируют в гонадах брюхоногих моллюсков *H. acuta*. Материнская спороциста и мирацидий не обнаружены. Гемипопуляция партенит представлена несколькими генерациями дочерних спороцист, микрогемипопуляции которых имеют, в зависимости от сезона, различный состав.

Известно, что в условиях северных широт становление локальной гемипопуляции микрофаллид начинается с момента внедрения мирацидия в моллюска-хозяина. В этот момент личинка претерпевает метаморфоз. Недифференцированные клетки формируют герминальную массу, которая впоследствии может частично фрагментироваться. Отделившиеся фрагменты дают начало самостоятельным герминальным массам, которые продуцируют дочерних спороцист. Численность локальных группировок дочерних спороцист ограничивается репродуктивным потенциалом. Впоследствии все

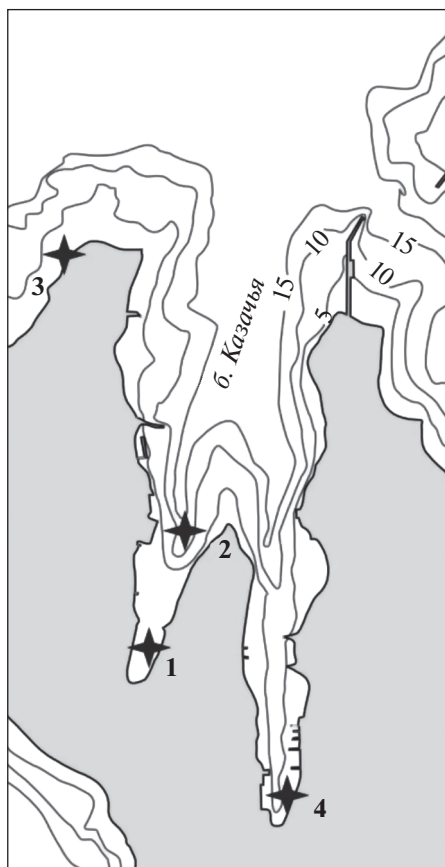


Рис. 2. Станции отбора проб (1–4) в акватории бухты Казачьей (Черное море).

генеративные клетки созревают и приступают к дроблению. Одновозрастность состава спороцист связана с тем, что для микрофаллид характерен одновременный процесс дробления клеток (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

При проведении паразитологических вскрытий моллюсков в зависимости от характера и стадии развития рождаемого спороцистами потомства было условно выделено 4 типа дочерних спороцист:

I тип – дочерние спороцисты, содержащие только зародышевые шары (ЗШ); II тип – дочерние спороцисты, содержащие зародышевые шары и эмбрионы церкарий (ЭЦ-ЗШ) (рис. 3); III тип – дочерние спороцисты, содержащие только эмбрионы (ЭЦ) (рис. 4); IV тип – дочерние спороцисты, содержащие только зрелые церкарии (ЗЦ).

Зараженность *H. acuta* партенидами, различающимися по стадиям развития и характеру рождаемого потомства, заметно варьирует на протяжении года (рис. 5, рис. 6).

Дочерняя спороциста, продуцирующая следующее поколение дочерних спороцист, была обнаружена нами единоразово в ноябре в эстуарии реки

Черная. В дальнейшем такого типа микрогемипопуляция не отмечалась.

Таким образом, вероятнее всего, в ноябре происходило полное обновление гемипопуляции партенид.

В зимний период (с декабря по март) в моллюсках встречались только спороцисты, содер-

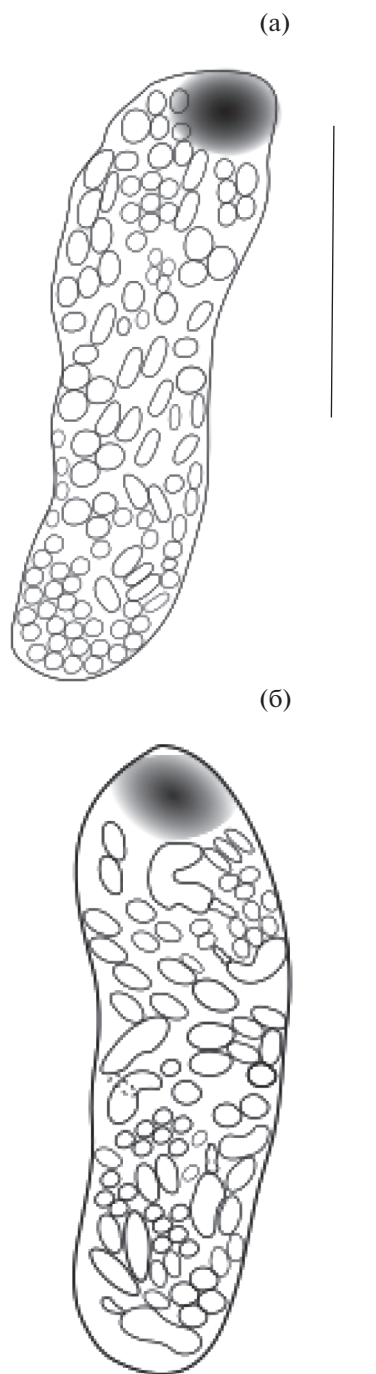


Рис. 3. Партениды трематод *Gynaecotyla adunca*. (а) – содержащие только зародышевые шары; (б) – содержащие зародышевые шары и эмбрионы церкарий. Масштабная линейка: (а) – 150, (б) – 200 мкм.

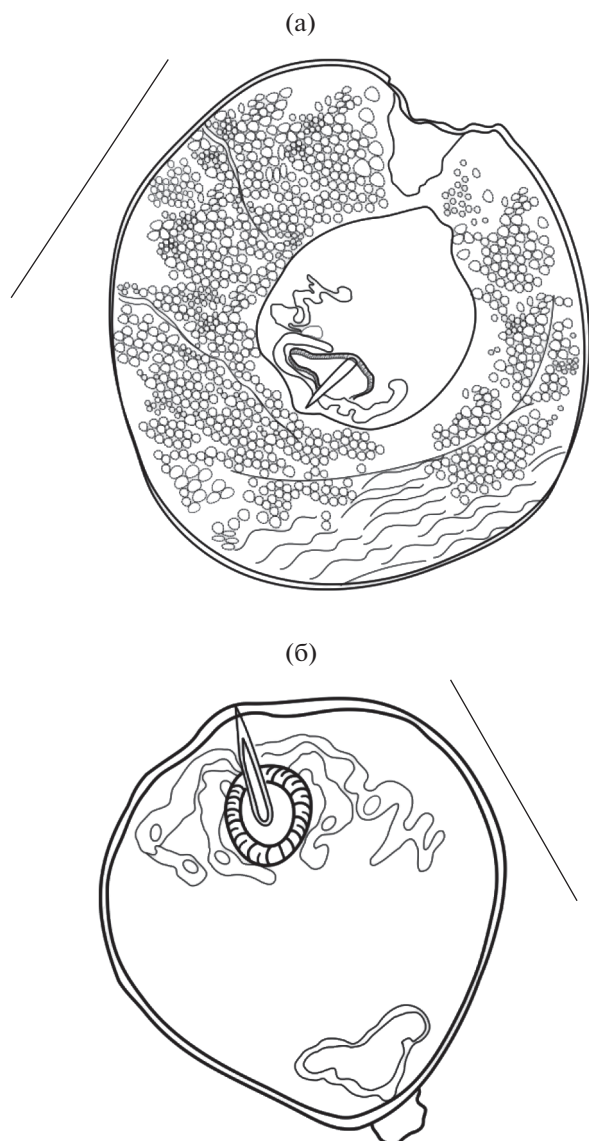


Рис. 4. Дочерняя спорозиста, содержащая эмбрионов церкарий *Gynaecotyla adunca* (а), (б) – извлеченная из спорозисты церкария на стадии формирования. Масштабная линейка (а) – 100, (б) – 50 μm .

жащие зародышевые шары, и преобладала дочерние спорозисты с зародышевыми шарами.

В марте появилась микрогемипопуляция партенит со смешанным содержимым (зародышевые шары и эмбрионы церкарий). Таким образом, происходит формирование партенит II и III типов, в результате развития молодых, преобладавших в зимние месяцы спорозист.

В апреле–мае доля этих группировок резко снизилась, вплоть до полного исчезновения. Все моллюски, зараженные личинками *Gynaecotyla*, в период с мая по октябрь, содержали в гонадах значительное количество зрелых церкарий (IV тип). Однако полностью рождение нового поко-

ления партенит не прекращается, что приводит к увеличению количества партенит в моллюсках (рис. 5)

В ноябре у части спорозист происходит переопределение характера рождаемого потомства. Это приводит к тому, что к наступлению холодов в моллюсках увеличивается число относительно молодых спорозист с зародышевыми шарами, которые, по всей видимости, легче переносят неблагоприятные условия. В дальнейшем происходит формирование партенит II и III типов в результате развития молодых спорозист I типа

В другом исследованном биотопе – в бухте Качачья – динамика несколько отличалась (рис. 6). В зимние месяцы в моллюсках доминировали группировки, состоящие из спорозист, содержащих эмбрионы церкарий, небольшую долю составляли спорозисты с зародышевыми шарами, но также встречались и зрелые группировки. Весной доля группировок I типа уменьшилась, в моллюсках доминировали группировки, состоящие из спорозист со смешанным содержимым (группировки II типа). Летом на смену им пришли группировки, включающие спорозисты с эмбрионами церкарий и небольшая часть зрелых группировок. А осенью преобладали спорозисты со зрелыми церкариями (IV тип).

Таким образом, в этом биоценозе зрелые эмбрионы и сформированные церкарии встречались в моллюсках практически весь год. Формирование зрелых церкарий происходит практически круглый год с пиками в конце весны и осенью. В целом, можно сказать, что для партенит *G. adunca* характерно несинхронное отрождение дочерних спорозист и церкарий.

Церкарии (рис. 7) мелкие. Тело церкарий овальной формы. Длина их тела $84 \pm 3 \mu\text{m}$, ширина – $36 \pm 2 \mu\text{m}$. Ротовая присоска размером $16 \pm 1 \times 15 \pm 0.5 \mu\text{m}$, расположена субтерминально и вооружена крупным стилетом ($10 \pm 0.5 \mu\text{m}$) (рис. 7б), идущим из центра ротовой присоски. Острие стилета может немного выступать над передним краем тела церкарии. Две пары стилетных желез открываются в передней части тела у начала ротовой присоски. Зачатки брюшной присоски просматриваются между железами проникновения. Пищеварительная система не развита. Выделительный пузырь имеет Y-образную форму. Выделительная система трематоды хорошо дифференцируется на живых объектах, формула экскреторной системы $2(2 + 2) = 8$ (рис. 7а). Хвост длиной $78 \pm 3 \mu\text{m}$, сужается к своему концу (рис. 7а)

На основании указанных морфологических признаков (форма и положение стилета, формула выделительной системы), анализируемые личинки трематод нами отнесены к семейству Microphallidae. Из всех представителей семейства по основному си-

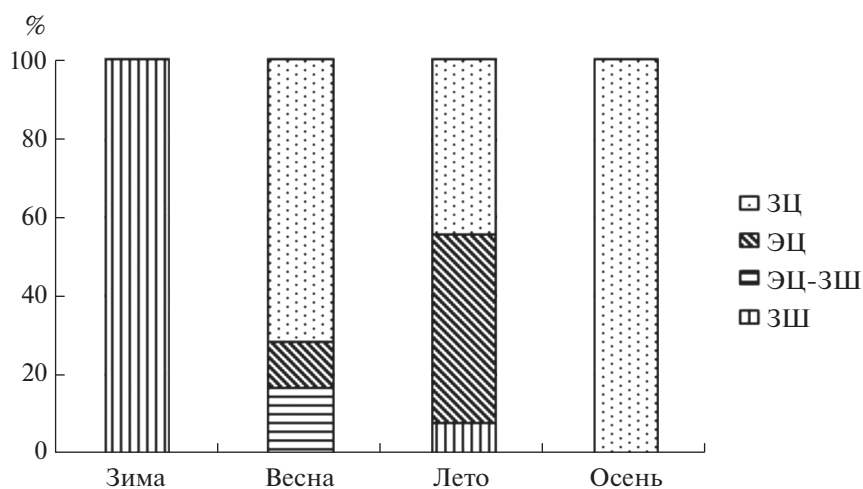


Рис. 5. Соотношение различных типов дочерних спорозоитов *Gynaecotyla adunca* на протяжении года в эстуарии реки Черная (Севастополь).

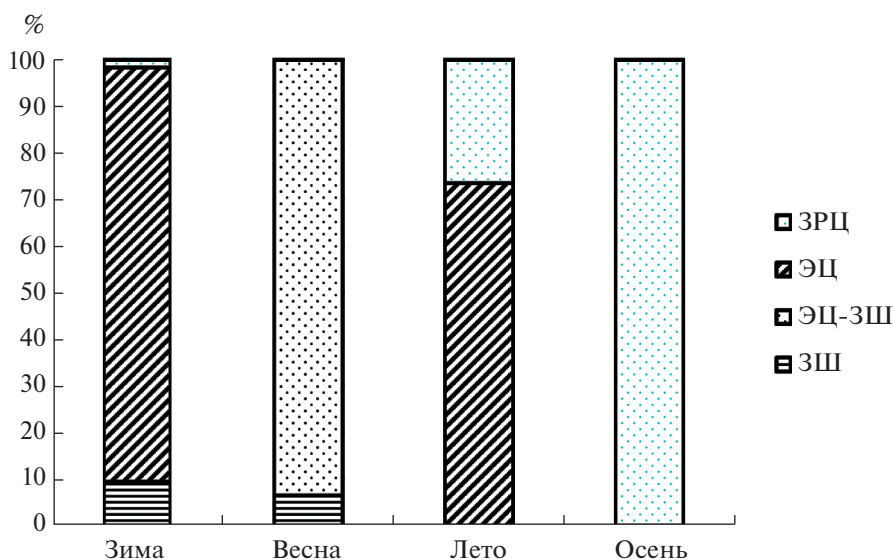


Рис. 6. Соотношение различных типов дочерних спорозоитов *Gynaecotyla adunca* на протяжении года в бухте Казачья (Севастополь, Черное море).

стематическому признаку — форме стилета — наша церкария наиболее близка к роду *Gynaecotyla*.

У берегов Крыма церкарии этого вида найдены нами впервые. В Черном море до нас микрофаллидную церкарию нашла А.В. Долгих (Долгих, 1965) под названием *C. misenensis*. Церкарии *C. sevellana* от моллюска *Nassarius reticulatus* (L.) у берегов Португалии (Pinto, Bartoli, 2002) идентичны церкариям, найденным Долгих (Долгих, 1965) в том же виде моллюска в акватории Черного моря, однако ошибочно названы *C. misenensis* (Palombi, 1940), которые являются паразитами моллюсков *Cerithium rupeste* (Risso, 1826). *C. sevellana* отличается от *C. misenensis* формой и размером

выделительного пузыря, длиной и формой хвоста, а также поведенческими реакциями. Эти морфологические отличия были показаны в работе португальских авторов (Pinto, Bartoli, 2002).

Найденные нами церкарии по всем параметрам совпадают с последним морфологическим описанием: Y-образная форма мочевого пузыря обнаруженной нами церкарии *G. adunca* vs грушевидной формы у *C. misenensis*, ребристая структура хвоста vs гладкая у *C. misenensis* (Долгих, 1965), положение и форма стилета.

Метацеркарии паразитируют в мышцах карапакса и абдомена травяной креветки *P. adspersus* (Rathke) (интенсивность 3–20 экз, экстенсив-



(а)

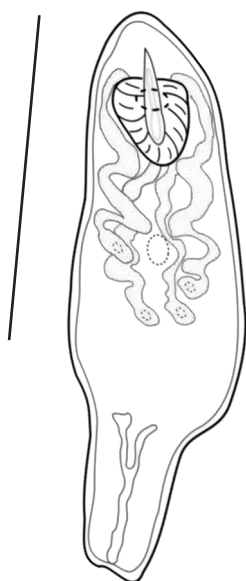


Рис. 7. Церкария *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905) (Yamaguti, 1939) (рисунок с живого гельминта) от черноморских моллюсков *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805). (а) – пламенные клетки экскреторной системы; (б) – форма и положение стилета. Масштабная линейка: 50 μm .

ность 27 экз). Метацеркарии заключены в овальные цисты размером 444–516 \times 252–322 μm . Тело метацеркарий (рис. 8) овальной формы. Длина их

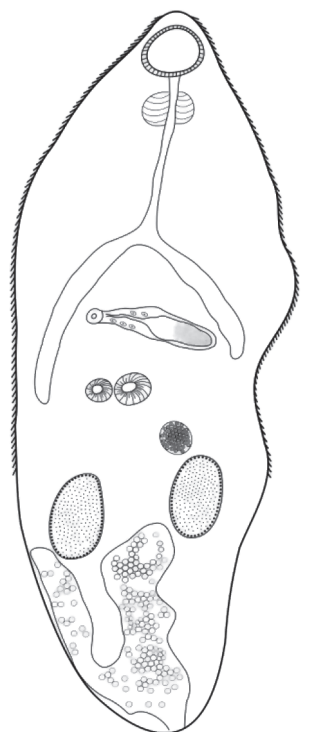


Рис. 8. Метацеркария *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905) (Yamaguti, 1939) (рисунок живого гельминта) от креветок *Palaemon adspersus* в Черном море. Масштабная линейка 200 μm .

тела 969 \pm 29, ширина 297 \pm 20 μm . Тегумент покрыт шипиками, достигающими уровня семенников. Ротовая присоска субтерминальная размером 74 \pm 6 \times 84 \pm 5 μm . Посередине тела располагаются две брюшных присоски: одна более крупная размером 70 \pm 5 \times 73 \pm 4 μm , другая меньше диаметром 57 \pm 4 \times 63 \pm 4 μm . Префаринкс короткий 99 \pm 12 μm , пищевод длинный 125 \pm 38 μm . Фаринкс крупный округлой формы 59 \pm 4 \times 65 \pm 4 μm . Семенники цельнокрайние, располагаются в одной плоскости. Длина левого семенника 119 \pm 4, при ширине 78 \pm 2 μm . Длина правого семенника 105 \pm 8, при ширине 74 \pm 3 μm . Округлый яичник размером 67 \pm 7 \times 70 \pm 6 μm , находится над двумя семенниками, под бурсой. Удлиненной формы бурса размером 174 \pm 14 \times 41 \pm 3 μm располагается горизонтально над двумя брюшными присосками – под бифуркацией кишечника. Кишечные ветви подходят до уровня брюшных присосок, иногда немного выступая за их нижние границы. На конце бурсы имеется половая пора диаметром 28 \pm 3 \times 28 \pm 3 μm . Выделительный пузырь, заполненный гранулами, имеет Y-образную форму.

Сведения в литературе о метацеркариях, паразитирующих у черноморских ракообразных, многочисленны. В 1980-х гг. Т.Н. Мордвиновой (Мордвинова, 1980) проведено крупное диссертаци-

ционное исследование гельминтофауны черноморских ракообразных и отмечено паразитирование метацеркарий *G. adunca* у ракообразных *Macropipus hosatus* в акватории Карадага.

Марита. Впервые морфология мариты *G. adunca* была описана Ранкином в 1939 г. (Rankin, 1939) на материале от мелких околородных песчанок *Crocethia alba* у побережья Массачусетса (Вудс Хол).

Тело мариты (рис. 9) овальной формы $1542 \pm 58 \mu\text{m}$, при ширине $588 \pm 28 \mu\text{m}$. Тегумент покрыт шипиками, достигающими уровня семенников. Ротовая присоска субтерминальная, диаметром $110 \pm 3 \times 128 \pm 6 \mu\text{m}$. Для данного вида трематод характерно наличие двух брюшных присосок. Одна брюшная присоска более мелкая, имеет диаметр $107 \pm 11 \times 110 \pm 5 \mu\text{m}$, вторая – $104 \pm 16 \times 121 \pm 4 \mu\text{m}$. Префаринкс – короткий длиной $56 \pm 10 \mu\text{m}$. Фаринкс – крупный, хорошо выражен. Пищевод – длинный $366 \pm 11 \mu\text{m}$. У взрослых особей кишечные ветви достигают заднего края семенников. Семенники – цельнокрайние, располагаются под яичником. Длина левого семенника $155 \pm 2 \mu\text{m}$ при ширине $103 \pm 15 \mu\text{m}$. Правый семенник всегда плохо просматривался на препаратах, поскольку в зоне его локализации мы отмечаем большое скопление яиц. Овальный яичник занимает место под бурсой. Длина яичника $100 \pm 15 \mu\text{m}$, ширина $101 \pm 16 \mu\text{m}$. Вытянутой формы бурса располагается под местом бифуркации кишечника, над двумя брюшными присосками. Длина бурсы $347 \pm 15 \mu\text{m}$, ширина $74 \pm 9 \mu\text{m}$. Половая пора расположена в генитальном предсердии, в котором находится копулятивный орган. Желточники состоят из желточных фолликулов овальной формы – по 6 с каждой стороны, позади яичника и семенников. Яйца овальные, коричневого цвета с плотной оболочкой. Длина яиц $15 \pm 5 \mu\text{m}$, при ширине $10 \pm 5 \mu\text{m}$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В Черном море до настоящего времени была зарегистрирована марита 1 рода *Gynaecotyla* – *G. adunca* (Смогоржевская, 1976).

Форма тела, расположение и форма внутренних органов, наличие двух брюшных присосок у обнаруженных нами метацеркарий и марит *G. adunca* сходны с таковыми у метацеркарий и марит от других хозяев (Rankin, 1939; Мордвинова, 1980), что позволяет отнести обнаруженных нами трематод к виду *G. adunca*.

Изучение гельминтов рыбающих птиц было начато более 50 лет назад Сааковой (1952), Скрябиным (1952), Леоновым (1958), Смогоржевской (1976). В акватории половозрелые формы *G. adunca* (syn. *G. longiinstinata*) впервые описал Леонов (1958) от серебристой чайки *L. argentatus*.

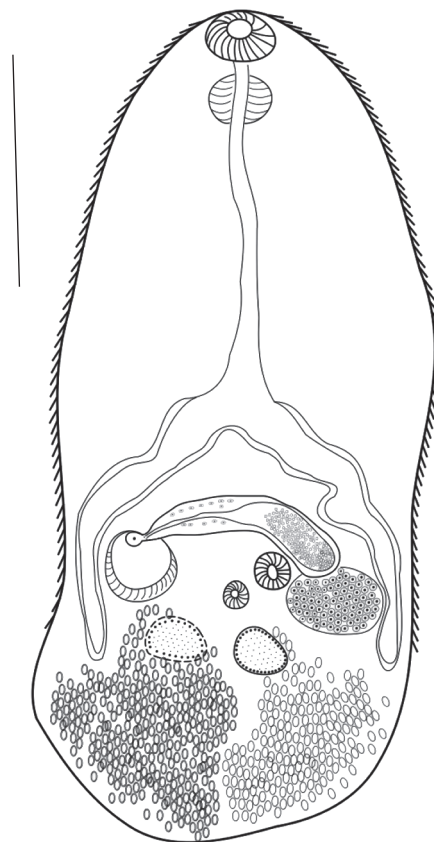


Рис. 9. Марита *Gynaecotyla adunca* из серебристой чайки в акватории бухты Казачьей (Севастополь, Черное море). Масштабная линейка 500 μm .

Результаты многолетних исследований были обобщены в монографии Смогоржевской “Гельминты водоплавающих и болотных птиц фауны Украины” (1976). Однако эти литературные данные являются последней крупной публикацией в настоящее время.

Последние данные о численности микрофаллидных трематод от водоплавающих птиц Севастопольских бухт получены в 2010 г. (регистрационный код отчета 0106U001630) Отдела экологической паразитологии, ИнБЮМ В.К. Мачкевским (Machkevsky, 2010). В работе были представлены первичные данные по видовому составу и показателям зараженности околородных птиц микрофаллидными трематодами. Согласно данным НИР, экстенсивность инвазии представителями семейства Microphallidae составила: у лысухи в бухте Омега *Levinseniella pellucida* (Jägerskiöld, 1909) – 10%, в бухте Соленая *Microphallus papillorobustus* (Rankin, 1940), (Baer, 1944) – 7%. *Levinseniella brachysoma* (Creplin, 1837) Stossich, 1899 – 7%. У кряквы в бухте Соленая – *Maritrema subdolum*, (Jägerskiöld, 1909) – 80%, *Maritrema papillorobustus* – 80%, *L. brachysoma* – 90%. У крякв из б. Омега Мачкев-

ским (2010) было отмечено наибольшее видовое разнообразие представителей семейства Microphallidae *Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881) – 50%, *Microphallus similis* (syn. *M. excellence*) (Jägerskiöld, 1900) (Nichol, 1906) – 50%, *L. brachysoma* – 17%, *Maritrema echinocirratum* (Leonov, 1958) – 67%, *M. subdolum* – 34%.

Жизненный цикл *G. adunca* в Средиземном море впервые описал Превот (Prevot, 1974). Согласно его данным, первым промежуточным хозяином является *Tritia neritea* (Linnaeus, 1758) (syn. *Cyclonaeca neritea* (Linnaeus, 1758)), вторым краб *Carcinus aestuarii* (Nardo, 1847) (syn. *C. mediterraneus* (Czerniavsky, 1884)), а дефинитивным серебристая чайка *L. argentatus*. Наши исследования показали, что в акватории Черного моря серебристая чайка *Larus argentatus* является окончательным хозяином для трематоды *G. adunca*, церкарии которой отмечаются в севастопольских бухтах у гастропод *Hydrobia acuta*, а метацеркарии – у креветок рода *Palaemon*.

Таким образом, наша работа дает полное морфологическое описание всех стадий развития трематоды *G. adunca* в акватории Черного моря и демонстрирует, что жизненный цикл *G. adunca* полностью реализуется в исследуемых нами биоценозах и протекает аналогично средиземноморскому.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН (тема АААА-А18-118020890074-2).

Благодарности. Автор выражает благодарность М. Макарову (ФИЦ ИнБЮМ) за помощь в сборе и определении видового состава моллюсков; Т.Н. Мордвиновой за приготовление препаратов трематод от серебристой чайки; В.К. Мачкевскому за отбор проб креветок *Palaemon adspersus* и Ю.М. Корнийчук за научную консультацию при подготовке статьи к печати.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Быховская–Павловская И.Е.* Паразитологическое исследование рыб. Ленинград: Наука, 1969. 108 с.
- Долгих А.В.* Личинки трематод паразиты моллюсков крымского побережья Черного моря: Автореферат дис. канд. биол. наук. Севастополь-Львов, 1965. 24 с.
- Леонов В.А.* Гельминтофауна чайковых птиц Черноморского заповедника и сопредельной территории Херсонской области // Ученые записки Горьк. пед. ин-та. Биол.-географ. ф-т. 1958. Т. 20. С. 266–296.
- Мачкевский В.К.* Видовая структура сообществ и параметры популяции паразитов околородных птиц в условиях естественной неоднородности параметров их среды обитания в азово-черноморском регионе // Отчет НИР “Изучение механизмов адаптации и трансформации паразитарной составляющей морских прибрежных сообществ в условиях неоднородности среды и антропогенного влияния”. № госрегистрации 0106U001630. Раздел 2. 2010. С. 50–59.
- Мордвинова Т.Н.* Гельминтофауна высших ракообразных крымского побережья и северо-западной части Черного моря: Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1980. 24 с.
- Определитель паразитов позвоночных Черного и Азовского морей. Паразиты беспозвоночных рыб, рыбоядных птиц и морских млекопитающих / Под ред. А.В. Гаевской, А.В. Гусева, С.Л. Делямура и др. АН УССР. Ин-т биологии юж. морей им. А.О. Ковалевского. Киев: Наук. Думка, 1975. 551 с.
- Роскин Г.И., Левинсон Л.Б.* Микроскопическая техника: учеб. пособие для вузов. / Под ред. Г.И. Роскина. 3-е изд. М.: Совет. Наука, 1957. 466 с.
- Саакова Э.О.* Фауна паразитических червей птиц дельты Дуная: Автореф. дис. канд. биол. наук. Ленинград, 1952. 24 с.
- Смогоржевская А.А.* Гельминты водоплавающих и болотных птиц фауны Украины. Киев: Наукова думка, 1976. 416 с.
- Скрябин К.И.* Трематоды животных и человека. Основы трематодологии. Том VI. Изд. Академии наук СССР. М., 1952. 689 с.
- Galaktionov K.V., Dobrovolskij A.A.* The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes. Kluwer Academic Publishing. London, 2003. 594 p.
- Pina S., Russell-Pinto F., Rodrigues P.* Clarification of *Cercaria sevillaana* (Digenea: Microphallidae) life cycle using morphological and molecular data // J. Parasitology. 2007. V. 93. № 2. P. 318–322.
- Prevot G.* 1974. Recherches sur le cycle biologique et l'écologie de quelques Trématodes nouveaux de *Larus argentatus* michaellis Naumann dans le Midi de la France. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Droit. Economie & Sciences d'Aix-Marseille, 1974. 319 p.
- Rankin J.S.* Studies on the trematode family Microphallidae Travassos, 1921. I. The genus *Levinseniella* Stiles and Hassall, 1901, and description of the new genus *Cornucopula* // Trans. Amer. micr. Soc. 1939. V. 58. P. 431–447.
- Rankin J.S.* Studies on the Trematode family Microphallidae Travassos, 1921. IV. The life cycle and ecology of *Gynaecotyla nassicola* (Cable and Hunninen, 1938) (Yamaguti, 1939) // Biol. Bull. Woods Hole. 1940. V. 79. P. 439–451.
- Russel-Pinto F., Bartoli P.* *Cercaria sevillaana* n. sp., a new cercaria (Digenea: Microphallidae) from *Nassarius reticulatus* (L.) (Mollusca: Prosobranchia) in Portugal // System. Parasit. 2002. V. 53. P. 175–182.

The Life Cycle of the Trematode *Gynaecotyla adunca* (Trematoda: Microphallidae) in the Black Sea

Yu. V. Belousova[#]

Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Nakhimov avenue, 2, Sevastopol, 299011 Russia

[#]*e-mail: julls.belousova@gmail.com*

The complete life cycle and developmental stages of the trematoda *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905) (Yamaguti, 1939) are described in this work. The results of present researchers showed that in the Black Sea for trematodes *G. adunca* the first intermediate hosts are gastropods *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805), and the second intermediate hosts are the shrimps *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837). The definitive host according our researches is a silver gull *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763). Measurements, figures and morphological characteristics of the species at all stages of development are given.

Keywords: *Gynaecotyla*, Microphallidae, trematoda, life cycle, Black Sea

УДК 591.3:597

**ПРЕОБЛАДАНИЕ САМОК В НЕКОТОРЫХ ВЫБОРКАХ
СЕГОЛЕТОВ И ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ТРЕХИГЛОЙ КОЛЮШКИ
Gasterosteus aculeatus ОБУСЛОВЛЕНО НЕ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ,
А ЭКОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ**

© 2021 г. В. С. Артамонова*, Н. В. Бардуков*, П. В. Головин**, Т. С. Иванова**,
М. В. Иванов**, Д. Л. Лайус**, А. А. Махров*, **, @

*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

**С.-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199934 Россия

@E-mail: makhrov12@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2020 г.

После доработки 12.12.2020 г.

Принята к публикации 12.12.2020 г.

В настоящей работе с помощью генетических маркеров (полоспецифичные локусы Ga1 и Ga2) было изучено соотношение полов в выборках, собранных на разных этапах онтогенеза трехиглой колюшки. В потомстве всех самок, тестированных индивидуально, присутствовали как самки, так и самцы, а достоверных отклонений от 1:1 в соотношении полов в развивающейся икре из природных гнезд не выявлено. Равное соотношение полов у молоди сохранялось, по крайней мере, в течение первых полутора–двух месяцев жизни, но в дальнейшем у сеголеток на нерестилищах доля самок достоверно превышала долю самцов (этот факт отмечен впервые). Среди производителей преобладали самки – это связано, в значительной мере, с преимущественной элиминацией самцов в нерестовый и постнерестовый периоды, вероятные причины которой обсуждаются в работе.

DOI: 10.31857/S1026347021050036

Трехиглая колюшка – один из модельных объектов популяционной биологии (обзоры: Зюганов, 1991; Paepke, 1996; Östlund–Nilsson *et al.*, 2007; Bell, Aguirre, 2013; Hendry *et al.*, 2013), а для специалистов в области эволюционных исследований – даже “супермодельный” (Gibson, 2005). Этот вид, способный размножаться как в пресной, так и соленой воде, играет важную роль не только в речных и озерных, но и в морских экосистемах. Так, в последнее десятилетие трехиглая колюшка стала самым многочисленным видом рыб в Белом море (Ivanova *et al.*, 2016; Лайус и др., 2020; Lajus *et al.*, 2020).

Для представителей данного вида характерно сложное нерестовое поведение, в частности, охрана самцом территории на нерестилище и постройка гнезда, куда откладывают икру 3–5 самок, для которых, как считается, характерен порционный нерест (Зюганов, 1991). Впоследствии самцы охраняют не только развивающуюся икру, но и вышедших из нее личинок до их перехода на внешнее питание.

Во многих выборках производителей трехиглой колюшки отмечено выраженное отклонение в соотношении полов в пользу самок (Мухомеди-

яров, 1966; Aneer, 1973; Hagen, Gilberton, 1973; Kynard, 1978; Arnold *et al.*, 2003; Пичугин и др., 2003; Saat, Turovski, 2003; Niksirat *et al.*, 2010; Patimar *et al.*, 2010; Yerhov, Sukhotin, 2015; Rollins *et al.*, 2017; Golovin *et al.*, 2019). Объяснения этого явления в литературе нам найти не удалось. Между тем, соотношение полов особей – важная характеристика, от которой напрямую зависит популяционная плодовитость и, соответственно, характер динамики численности популяций колюшек (Wootton *et al.*, 1995).

На соотношение полов у рыб может влиять ряд причин. С одной стороны, генетические механизмы определения пола у низших позвоночных несовершенны, и, кроме того, значительное влияние на формирование пола в онтогенезе могут оказывать факторы среды, в связи с чем у рыб может наблюдаться несоответствие генетического пола фенотипическому (обзоры: Брыков, 2014; Heule *et al.*, 2014). Гипотеза о смене пола в онтогенезе у трехиглой колюшки высказана в работе Lindsey (1962). Смена пола наблюдалась в экспериментах по воздействию стероидных гормонов на особей этого вида на ранних стадиях онтогенеза (Hahlbeck *et al.*, 2004).

Кроме того, у рыб достаточно широко распространён гиногенез, при котором все потомки некоторых самок оказываются самками (обзор: Devlin, Nagahama, 2002). У трехиглой колюшки гиногенетическое потомство получено экспериментально (Samonte-Padilla *et al.*, 2011). Недавно описан интересный факт развития икры в полости тела самки трехиглой колюшки из природной популяции: хотя часть этих эмбрионов имели отца, из 56 изученных особей 42 были генетическими самками (Dean *et al.*, 2019).

И, наконец, самцы и самки у некоторых видов рыб сильно отличаются по своему поведению, и, следовательно, пространственному распределению, что может оказывать влияние на соотношение полов в выборке, собранной в определенной точке в то или иное время года. К тому же, различия в поведении могут приводить к разной продолжительности жизни самцов и самок, а это оказывает влияние на соотношение полов во всей популяции (обзор: Wootton, Smith, 2015). Такое объяснение преобладания самок у производителей было предложено и для трехиглой колюшки (см. ссылки в работе: Golovin *et al.*, 2019).

Целью данной работы стала проверка гипотез о влиянии перечисленных выше причин на соотношение полов в популяции трехиглой колюшки, в которой регулярно регистрировали примерно двукратное преобладание самок на нерестилищах (Golovin *et al.*, 2019). Для этого мы проверили соответствие фенотипического пола генетическому у производителей, чтобы исключить возможность переопределения пола рыб в онтогенезе (*гипотеза 1*). Далее, было установлено соотношение полов в развивающейся икре трехиглой колюшки, с целью выяснить, наблюдается ли у этого вида естественный гиногенез (*гипотеза 2*). Наконец, мы собрали материал по соотношению полов в разных возрастных группах колюшки для проверки гипотезы о различии в темпе роста и миграционном поведении самцов и самок и/или выявления различий в их выживаемости, начиная со стадии личинки до возраста 1 год и половозрелости (*гипотеза 3*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в лагуне Колюшковая, расположенной в Керетском архипелаге Кандалакшского залива Белого моря, на побережье Республики Карелия (субъект Российской Федерации). В ранних работах (например, Rybkina *et al.*, 2016) это местообитание называли безымянной лагуной. Детальная характеристика колюшки этой лагуны дана в работе (Golovin *et al.*, 2019). Для сравнения взяты выборки из трех других участков беломорского побережья. Места сбора проб показаны на рис. 1. Рыб отлавливали неводом длиной

7.5 м, высотой 1.5 м, с ячеей в крыльях 5 мм, в куту – 1 мм.

При изучении соответствия фенотипического пола генетическому, из выборки, где доля фенотипических самок составляла 70%, были отобраны зрелые самцы ($n = 50$) и самки ($n = 50$) трехиглой колюшки. Производители были отловлены 22 июня 2014 г. в лагуне Колюшковая. Для того, чтобы исключить ошибки при определении фенотипического пола, все особи, взятые для генетических исследований, были вскрыты: половую принадлежность подтверждали на основании визуального анализа гонад.

Сбор развивающейся икры для определения соотношения полов на стадии эмбриогенеза проводили 28 июня 2014 г. в лагуне Колюшковая. Три гнезда колюшек были локализованы по характерному поведению самца, икра собрана вручную. Дополнительно, с целью выявления гиногенетических самок в популяции лагуны Колюшковая и оценки соотношения полов на стадии эмбриогенеза, было выполнено искусственное осеменение икры четырех самок из данной популяции (каждую партию осеменяли спермой одного самца). Из каждой партии развивающейся икры 28 июня 2014 г. для генетического анализа было взято по 4–7 эмбрионов (всего 23 эмбриона).

В 2014 г. сеголетки колюшки были собраны в четырех локальностях: Кондостров (5 августа, 44 особи), губа Сельдяная (20 августа, 80 особей), лагуна Колюшковая (20 августа, 41 особь), губа Кислая (16 сентября, 43 особи). Рыбы были пойманы мальковым неводом 7.5×1.5 м с мельничным газом в кутке или сачком из мельничного газа диаметром 30 см.

В 2015 г. выборки сеголетков отбирали в лагуне Колюшковая 27 июня (94 особи) и 15 июля (33 особи). Мелких неполовозрелых рыб (всего 65 особей) отобраны при облове, проведенном с целью количественного учета производителей трехиглой колюшки в лагуне Колюшковая 15 июня. Они не имели брачной окраски. Их возраст (годовики) был подтвержден анализом отолитов (Yurtseva *et al.*, 2019).

Сроки начала нереста в 2014 и 2015 гг. соответствовали среднегодовым, т.е. первые производители появлялись на нерестилищах 2–4 июня, а 6–8 июня нерестилища оказывались заполненными колюшкой.

15–25 июня 2018 г. были собраны выборки половозрелых годовиков трехиглой колюшки в трех местообитаниях: лагуне Колюшковая (34 особи), Сельдяной губе (86 особей), и проливе Сухая Салма (29 особей). Половую принадлежность этих особей определяли на основании визуального анализа гонад.

Ткани половозрелых рыб, развивающуюся икру и молодь трехиглой колюшки, предназначенные

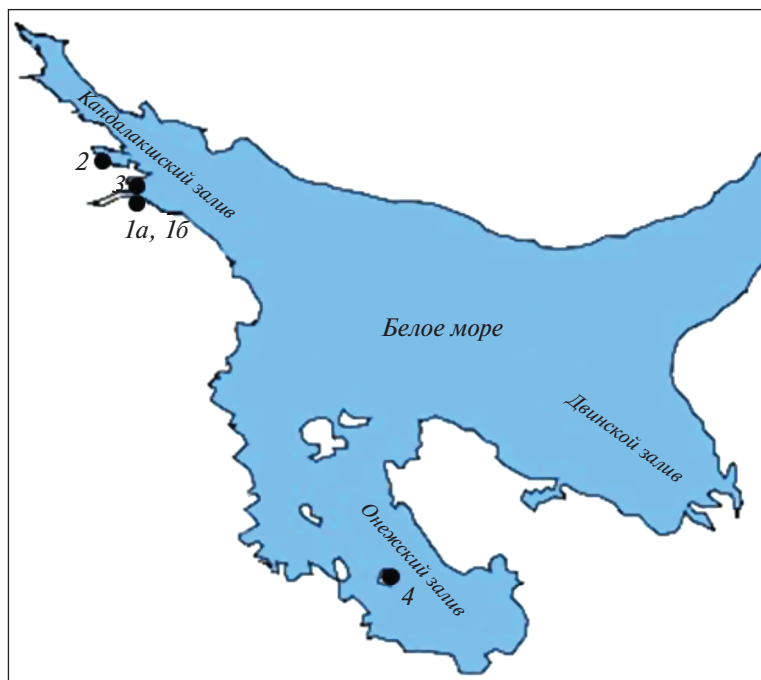


Рис. 1. Места сбора выборок: 1а – лагуна Колюшковая (66°18.787' N; 33°38.790' E); 1б – пролив Сухая Салма (66°18.608' N; 33°39.114' E); 2 – губа Кислая (66°31.954' N; 33°6.338' E); 3 – губа Сельдяная (66°20.255' N; 33°37.401' E); 4 – о. Кондостров (64°13.305' N; 36°37.390' E).

для генетического анализа, фиксировали 96%-ным этанолом в соотношении не менее 1 : 5 и доставляли в лабораторию. Фиксированную молодь затем фотографировали на фоне размерной шкалы, последующие измерения их длины выполняли по фотографиям с точностью до 0.5 мм.

ДНК из фиксированных тканей выделяли с помощью набора “К-сорб” (“Синтол”) согласно рекомендациями производителя. Для определения генетического пола было выполнено тестирование двух локусов: Ga1, длина последовательности которого различается в X- и Y-хромосомах, и Ga2, который имеется только в Y-хромосоме (Griffiths *et al.*, 2000).

При сравнении длины рыб в разных выборках использован *t*-тест Стьюдента. При объединении выборок разноразмерных рыб проводили их стандартизацию, т.е. делили длину каждой особи на среднюю длину рыб в выборке. Для статистической оценки отличий распределения полов в выборке от теоретического соотношения 1 : 1 использовали тест Хи-квадрат. Статистическая обработка данных была выполнена с использованием программ Statistica 7 и Past 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Половозрелые особи. Генотипирование половозрелых особей, собранных в лагуне Колюшковая, показало, что генетический пол всегда совпадал с

фенотипическим; особей, для которых было бы обнаружено переопределение пола в онтогенезе, выявлено не было. При этом для всех 100 особей результаты определения пола на основании данных для локусов Ga1 and Ga2 совпадали. Примеры тестирования данных локусов у фенотипических самцов и самок приведены на рис. 2.

Эмбрионы. Соотношение полов у эмбрионов трехиглой колюшки ни в одной из исследованных нами естественных кладок икры достоверно не отличалось от 1 : 1 (табл. 1), хотя в одной из кладок (№ 1) заметно преобладали самцы.

В потомстве всех четырех самок, икра которых была оплодотворена искусственно, были выявлены как самки, так и самцы, т.е. гиногенетические самки среди производителей отсутствовали. Анализ в данном случае проводили до обнаружения в потомстве, по крайней мере, одного эмбриона каждого пола. Всего было проанализировано 23 эмбриона, среди которых оказалось 11 самок и 12 самцов ($p = 0.83$).

Таким образом, на стадии эмбриогенеза у потомков производителей трехиглой колюшки лагуны Колюшковая доли самцов и самок не имели статистически достоверных отличий от равновесного соотношения полов 1 : 1.

Соотношение полов у молоди. Результаты тестирования пола молоди, собранной в четырех различных локальностях в 2014 г., представлены на рис. 3. Средняя длина рыб в выборках варьиро-

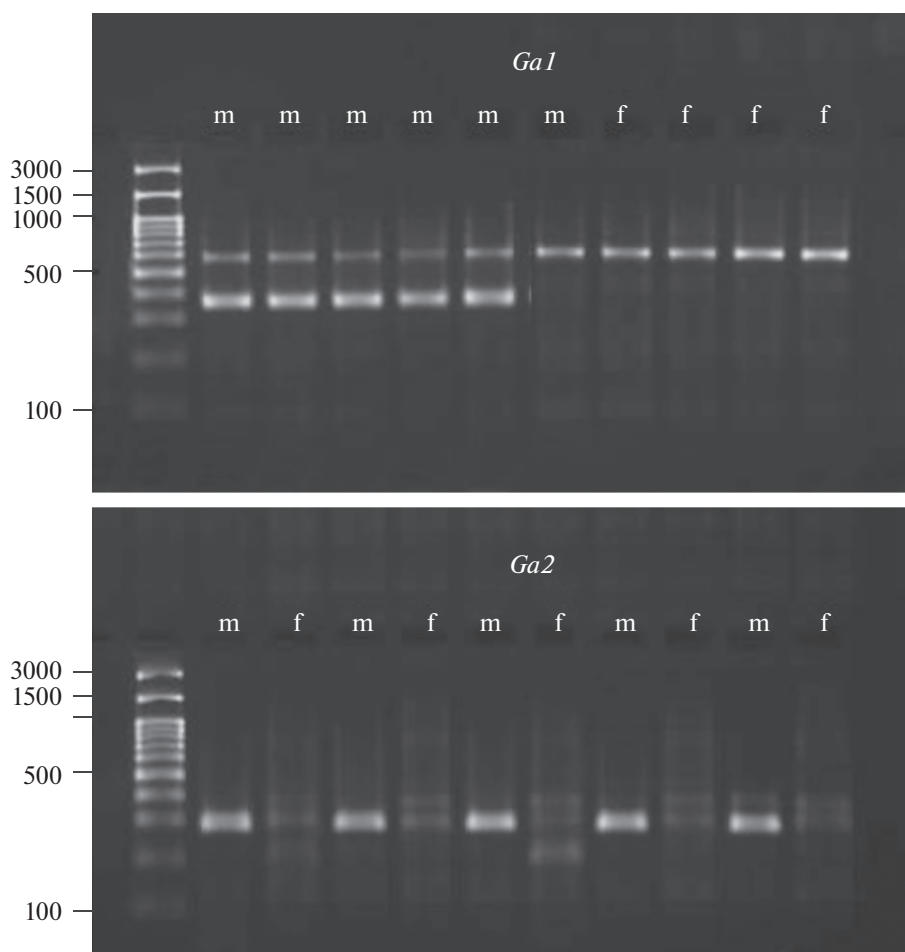


Рис. 2. Пример тестирования генетического пола производителей трехиглой колюшки (ПЦР с праймерами для полоспецифичных локусов). Ga1, Ga2 – тестируемые полоспецифичные локусы; m – фенотипические самцы, f – фенотипические самки. Слева указаны длины некоторых фрагментов маркера (п.н.), имеющего шаг 100 п.н. в диапазоне от 100 до 1000 п.н. и дополнительные фрагменты 1500 и 3000 п.н.

вала от 18.3 ± 0.25 мм до 23.9 ± 0.28 мм (табл. 2). Хорошо видно, что соотношение полов в разных выборках заметно различается. При этом в двух выборках (из лагуны Колюшковая и района Кондострова) доля самок достоверно превышала долю самцов (в обоих случаях $p < 0.05$). Для совокупности всех четырех изученных выборок преобладание самок среди сеголеток также было достоверным ($p = 0.0073$).

В то же время необходимо отметить, что выборки, собранные в 2014 г., различались между

собой как временем, так и местами сбора материала (рис. 3), что не давало возможности оценить, как менялось соотношение полов во времени.

С целью выявления динамики изменения соотношения полов у молоди, в 2015 г. в лагуне Колюшковая были собраны дополнительные выборки, которые различались только временем сбора материала. Результаты тестирования пола молоди из этой локальности приведены на рис. 4.

Данные по соотношению полов в выборках молоди трехиглой колюшки, собранной в июне,

Таблица 1. Соотношение полов развивающихся эмбрионов из природных гнезд трехиглой колюшки, собранных в лагуне Колюшковая

№ гнезда	Количество самок	Количество самцов	Отклонение от 1 : 1 (тест Хи-квадрат, p -значение)
1	29	44	0.21
2	32	28	0.71
3	31	29	0.86

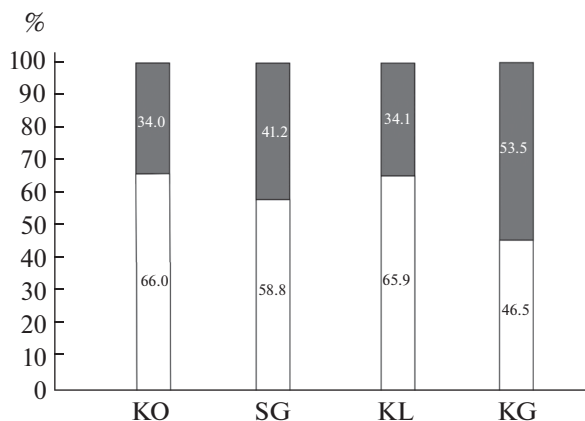


Рис. 3. Доли самцов (серый цвет) и самок (белый цвет) в выборках трехиглой колюшки Белого моря, собранных в августе–сентябре 2014 г. на разных нерестилищах. KO – Кондостров (5 августа), SG – губа Сельдяная (20 августа), KL – лагуна Колюшковая (20 августа), KG – губа Кислая (16 сентября).

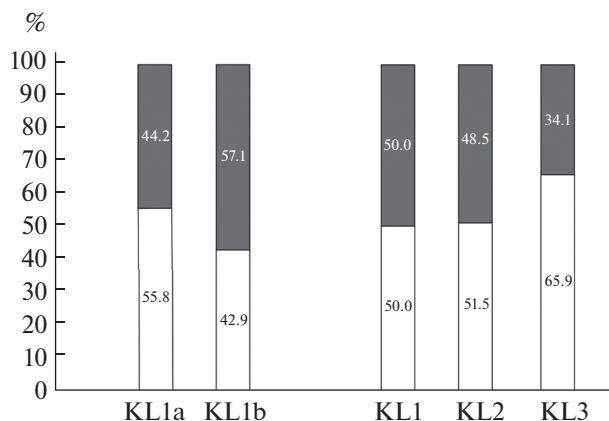


Рис. 4. Доли самцов (серый цвет) и самок (белый цвет) в выборках сеголеток трехиглой колюшки разного возраста, собранных в лагуне Колюшковая. KL1 – 27.06.2015 (KL1a – личинки с нерассосавшимся желточным мешком, KL1b – личинки с рассосавшимся желточным мешком), KL2 – 15.07.2015, KL3 – 20.08.2014.

июле и августе из лагуны Колюшковая, показывают, что в июне и июле соотношение полов у молоди не отклоняется от 1 : 1, а к концу августа в районе нерестилища наблюдается достоверное преобладание самок ($p = 0.042$).

В то же время мы определили, что выборка неполовозрелых годовиков трехиглой колюшки включала 35 самок и 30 самцов, т.е. в процентном выражении соотношение полов составляло 53.8:46.2. Это соотношение не отличалось достоверно от 1 : 1, как не отличалось достоверно от 1 : 1 и соотношение полов у половозрелых годовиков (табл. 2).

Для интерпретации полученных результатов особенно важна выборка, собранная 27 июня 2015 г., представленная личинками с желточным мешком, и личинками, у которых желточный мешок к моменту отлова уже успел рассосаться: среди первых преобладали самки, а среди вторых – самцы (рис. 4). Хотя различие между этими двумя группами не было достоверным ($p > 0.05$), это позволило нам сделать осторожное предположение, что самцы трехиглой колюшки развиваются быстрее самок, и мы проверили это предположение, сравнив средние линейные размеры самцов и самок в выборках молоди возраста 0+.

Размеры молоди разного пола. Данные о длинах молоди возраста 0+ разного пола приведены в табл. 2. При анализе этого материала становится ясным, что тенденция к более быстрому росту самцов проявляется только в выборках молоди, собранных в июне и июле.

Во всех таких группах самцы, в среднем, оказывались крупнее самок, хотя ограниченные объемы выборок и использованный нами способ измерения длины фиксированных сеголеток по фо-

тограммам с точностью до 0.5 мм не позволили показать, что для каждой конкретной выборки эти различия статистически значимы. При объединении выборок сеголеток, собранных в лагуне Колюшковая в июне и июле, после их стандартизации по средней длине эти различия также оказались статистически недостоверны (m -тест, $p = 0.168$).

В выборках сеголеток старших возрастов, собранных в августе–сентябре 2014 г. в разных локальностях (Кондостров, лагуна Колюшковая, губа Кислая) средние размеры самцов и самок практически не различались для всех изученных выборок, а также для их совокупности, в то время как соотношение полов, как было отмечено выше, достоверно сдвигалось в пользу самок. Исключением является выборка из губы Сельдяная, где самцы были крупнее самок ($p = 0.058$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проверка гипотез, объясняющих преобладание самок на нерестилищах. Полученные данные позволили отвергнуть две из трех гипотез, которые были выдвинуты, чтобы объяснить двукратное преобладание самок среди половозрелых производителей трехиглой колюшки на нерестилищах.

Во-первых, мы предполагали, что на формирование фенотипического пола у трехиглой колюшки могут оказывать влияние внешние условия, что должно приводить к несоответствию генетического пола фенотипическому, как это иногда наблюдается у рыб других видов (Devlin, Nagahama, 2002).

Несмотря на то, что у многих видов рыб половые хромосомы не выражены цитологически (Брыков, 2014), у трехиглой колюшки они были

Таблица 2. Основные характеристики изученных выборок молоди трехиглой колюшки

Место сбора	Дата сбора	Стадия	Число самок	Число самцов	Доля самок	Отклонение от 1:1 (тест Хи-квадрат, <i>p</i> -значение)	Средняя длина самок	Средняя длина самцов	<i>t</i> -test сравнение размеров
Колюшковая лагуна	27.06.2015	Предличинки	29	23	55.8	0.41	5.66 ± 0.135	5.93 ± 0.176	0.112
Колюшковая лагуна	27.06.2015	Личинки	26	32	44.8	0.43	7.51 ± 0.097	7.6 ± 0.176	0.248
Колюшковая лагуна	15.07.2015	Ранние сеголетки	17	16	51.5	0.86	11.9 ± 0.841 (<i>n</i> = 9)	12.57 ± 0.176 (<i>n</i> = 9)	0.319
Колюшковая лагуна	20.08.2014	Поздние сеголетки	27	14	65.9	0.029	18.35 ± 0.304	18.18 ± 0.176	0.745
Кондостров	05.08.2014	Поздние сеголетки	31	16	66.0	0.042	18.61 ± 0.382	18.4 ± 0.176	0.755
Сельдяная губа	20.08.2014	Поздние сеголетки	47	33	58.8	0.12	19.07 ± 0.304	19.91 ± 0.176	0.058
Кислая губа	20.09.2014	Поздние сеголетки	20	23	46.5	0.65	24.03 ± 0.401 (<i>n</i> = 18)	23.71 ± 0.176 (<i>n</i> = 17)	0.578
Колюшковая лагуна	15.06.2015	Годовики (неполовозрелые)	35	30	53.8	0.53	—	—	—
Колюшковая лагуна	15–25.06.2018	Годовики (половозрелые)	21	13	61.8	0.17	—	—	—
Сельдяная губа	15–25.06.2018	Годовики (половозрелые)	44	42	51.2	0.83	—	—	—
Против Сухая Салма	15–25.06.2018	Годовики (половозрелые)	12	17	41.4	0.35	—	—	—

выявлены (Yoshida *et al.*, 2014), и некоторые последовательности ДНК, локализованные в Y-хромосоме, хорошо известны (Griffiths *et al.*, 2000; Peichel *et al.*, 2004; Toli *et al.*, 2016; Bakker *et al.*, 2017).

Тестирование, базирующееся на идентификации полоспецифических последовательностей, проведенное нами на материале 100 производителей трехиглой колюшки показало, что пол рыб, определенный по внешним признакам, всегда совпадал с генетическим полом. Это согласуется с данными, представленными в ряде других работ (Griffiths *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2003; Hahlbeck *et al.*, 2004; Bakker *et al.*, 2017; Velando *et al.*, 2017). Не было обнаружено переопределения пола у этого вида и в эксперименте, в котором из группы рыб удаляли созревающих самцов (Bakker, 2016).

Совокупность всех этих данных показывает, что переопределения пола под действием факторов среды у трехиглой колюшки в норме не происходит. Исключение — эксперименты по воздействию на нее химических веществ на ранних стадиях онтогенеза. Так, изменение пола рыб и появление интерсексов было зарегистрировано после воздействия на трехиглую колюшку стероидных гормонов (steroid hormones) (Hahlbeck *et al.*, 2004). Кроме того, был отмечен факт изменения пола у трех особей колюшки в эксперименте по воздействию на рыб перхлората натрия на ранних стадиях развития (Furin *et al.*, 2015). В другом опыте по влиянию этого соединения были выявлены три гермафродита, оказавшиеся генетическими самками (Bernhardt *et al.*, 2006).

Таким образом, *гипотеза 1*, объясняющая преобладание самок в популяции возможностью переопределения пола у трехиглой колюшки в естественных местообитаниях, не подтверждается.

Во-вторых, мы проверили гипотезу, которая недавно обсуждалась в работе (Dean *et al.*, 2019), о присутствии в популяции гиногенетических самок. Несмотря на то, что в эксперименте у трехиглой колюшки удавалось получить искусственный гиногенез (Samonte-Padilla *et al.*, 2011), во всех изученных нами кладках икры, как естественных, так и искусственных, были обнаружены самцы. Учитывая, что естественные кладки могут содержать икру от нескольких самок (до 6–7, Зюганов, 1991), среди которых могут оказаться гиногенетики (исходя из соотношения полов производителей в изученной популяции, такой должна была оказаться каждая вторая-третья самка), мы предполагали, что это должно привести, по крайней мере, к преобладанию самок среди эмбрионов. Однако такого преобладания ни в одном из трех природных гнезд обнаружено не было.

Наши данные согласуются с результатами, полученными другими авторами, которые показали, что самцы присутствовали в потомстве соответ-

ственно всех девяти (Hahlbeck *et al.*, 2004) и двух (Peichel *et al.*, 2004) пар производителей трехиглой колюшки.

Все это позволяет исключить гиногенез как причину преобладания самок среди производителей трехиглой колюшки, т.е. отвергнуть *гипотезу 2*.

Согласно *гипотезе 3*, преобладание самок среди производителей, отловленных на нерестилищах, может объясняться либо различием в пространственном распределении самцов и самок, либо отбором против самцов, который, в свою очередь, также может объясняться различием в поведении особой разного пола. В случае наличия отбора мы планировали выявить, начинается ли этот процесс на первом году жизни трехиглой колюшки, или же он происходит позже, когда рыбы становятся половозрелыми.

Выполненные исследования показали, что на ранних стадиях онтогенеза у колюшки соотношение полов остается близким к 1 : 1, по крайней мере, в течение первых полутора–двух месяцев жизни. В августе молодь, достигшая 20–25 мм в длину, начинает постепенно мигрировать с нерестилищ (Bakhvalova *et al.*, 2016), и в этот же период на нерестилищах регистрируется достоверное преобладание самок.

Данное явление можно объяснить, предположив, что самцы трехиглой колюшки растут быстрее самок, и их миграция начинается раньше, а также допустив, что триггером для миграции является достижение определенной длины тела. Однако статистически подтвердить эту гипотезу нам пока не удалось, возможно, в силу ограниченности объема выборки. Стоит отметить, что после начала миграции части молоди с нерестилищ, никаких различий в размерах самцов и самок, еще остающихся в лагуне Колюшковая, мы также не регистрировали, как и различий в размерах молоди из других местообитаний, собранной в августе–сентябре (исключение — выборка из губы Сельдяная).

Косвенно гипотезу о более ранней миграции крупных самцов с нерестилищ может подтвердить примерно равное соотношение полов в выборке неполовозрелых годовиков, собранных в июне 2015 г., и выборках половозрелых годовиков, собранных в июне 2018 г. при облове нерестилищ. Ранее этот факт был отмечен при исследовании фенотипического пола годовиков колюшки Белого моря (Golovin *et al.*, 2019).

В то же время следует отметить, что изучение соотношения полов у молоди каждой конкретной популяции в возрасте одного года представляет собой отдельную, достаточно сложную задачу. Это обусловлено тем, что у беломорской колюшки, в том числе, и в подробной изученной нами популяции лагуны Колюшковая, только часть самцов и самок становятся половозрелыми в возрасте одного года. Другие рыбы того же возраста остаются

неполовозрелыми, причем не все они подходят к берегу и могут быть отловлены в районе нерестилищ (Ivanova *et al.*, 2016). С учетом сказанного, полностью исключать преобладание самок среди годовиков трехиглой колюшки данной популяции было бы все-таки преждевременно.

Таким образом, наши исследования показывают, что у трехиглой колюшки лагуны Колюшковая наблюдается выраженная тенденция более быстрого развития и роста самцов по сравнению с самками того же возраста, что, по-видимому, приводит к более ранней миграции самцов в открытое море; окончательные выводы можно будет сделать только после дополнительных, более масштабных исследований этого вопроса на свежем материале и при повышении точности измерений, по крайней мере, до 0.1 мм. В данном исследовании нам не удалось обнаружить факты, которые свидетельствовали бы об отборе против самцов на первом году жизни особей, до наступления половозрелости, однако исключить то, что это явление все-таки имеет место, начиная с момента ухода молоди с нерестилищ, нельзя.

Полученные нами данные говорят о том, что объяснение двукратного преобладания самок на нерестилище трехиглой колюшки в лагуне Колюшковая следует искать в рамках гипотезы 3: вероятно, оно обусловлено различиями в поведении самцов и самок, что, в свою очередь, может приводить к отбору против самцов.

Такой вывод согласуется с данными, имеющимися в литературе. Так, в исследованиях, проведенных на сеголетках, выращенных искусственно, значимых различий в размерах или массе тела самцов и самок на первом году жизни выявлено не было (Bell *et al.*, 2011; Ramler *et al.*, 2014; Velando *et al.*, 2017), однако, в одной из работ отмечено, что, размер самцов в возрасте 300 дней был значительно больше при выращивании молоди в присутствии хищника, в то время как на размеры самок присутствие хищника значимого влияния не оказывало (Bell *et al.*, 2011). Уже в возрасте 100 дней отмечены различия в морфологических признаках у самцов и самок трехиглой колюшки — в частности, самцы имеют более длинные спинной, хвостовой и анальный плавники (Ramler *et al.*, 2014), что согласуется с гипотезой о разной скорости развития представителей разных полов, с возможностью проявления различий в их поведении уже на ранних этапах онтогенеза.

Возможные причины преимущественной элиминации самцов. Преимущественная элиминация самцов — практически единственное возможное объяснение преобладания самок среди производителей трехиглой колюшки. Доказательством этого, кроме приведенных выше данных, служит большая доля самок среди колюшек возраста 3 года, по сравнению с колюшками возраста 2 года, выяв-

ленная как в двух популяциях Балтики, обитающих у побережья Эстонии (Saat, Turovski, 2003), так и в Белом море (Yershov, Sukhotin, 2015).

С высокой степенью вероятности именно преимущественной гибелью самцов объясняется и преобладание самок среди рыб, выживших в экспериментах по изучению влияния на трехиглую колюшку выращивания при различной температуре и солености (Lindsey, 1962). Упомянутый автор допускал в качестве объяснения этих результатов и фенотипическое переопределение пола, но это явление, как мы показали выше, у трехиглой колюшки не наблюдается.

Анализ литературы позволяет выделить четыре возможных причины преимущественной гибели самцов.

1. У самок и самцов трехиглой колюшки в некоторых популяциях преобладают разные виды паразитов, в частности, у самцов чаще встречается цестода *Cyathocephalus truncatus*, трематода *Bunodera* (Reimchen, Nosil, 2001) и микроспоридия *Glugea anomala* (Arnold *et al.*, 2003), а смертность рыб, зараженных разными паразитами, может быть различна сама по себе, даже если не принимать во внимание, что различный состав паразитофауны может свидетельствовать о длительном пребывании представителей разных полов в разных биотопах, где они подвержены элиминации в разной степени, или о разном иммунном статусе самцов и самок. Однако первые два паразита в Белом море отсутствуют, а последний у беломорской трехиглой колюшки встречается редко (Шульман, Шульман-Альбова, 1953; Rybkina *et al.*, 2016), поэтому избирательная гибель самцов из-за большей степени заражения указанными паразитами для изученной нами популяции маловероятна.

2. В условиях эксперимента показано, что самцы в возрасте пяти месяцев были значительно смелее (*bolder*) и светлее (*paler*), чем самки (Velando *et al.*, 2017). Неудивительно, что самцы-сеголетки чаще поедаются хищниками, чем самки, по крайней мере, в экспериментальных условиях (Bell *et al.*, 2011). При этом важно отметить, что если в июле в желудках хищных рыб Белого моря молодь колюшки не обнаруживается, то в начале августа она составляет значительную часть рациона трески (*Gadus morhua*) и наваги (*Eleginus nawaga*); у последнего вида она становится основным кормовым объектом (Bakhvalova *et al.*, 2016).

Интенсивное выедание хищниками может быть актуально и для половозрелых самцов. Учитывая особенности их поведения (они защищают гнезда с развивающейся икрой и личинками), вполне вероятно и их преимущественное уничтожение хищниками. До недавнего времени это объяснение не находило подтверждения: соотношение полов трехиглой колюшки в желудках радужной форели *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792) из Lake

Wapato (State Washington, USA) было таким же, как и в выборках рыб, отловленных непосредственно в этом озере (Hagen, Gilbertson, 1973). Более того, в небольших водоемах, расположенных в эстуарии реки Святого Лаврентия (Канада), в нерестовый период выживаемости самцов и самок колюшки оказались почти одинаковыми – 82% у самцов и 83% у самок, а в аналогичных водоемах, защищенных от птиц, выжили все самцы и 90% самок (Whoriskey, FitzGerald, 1985).

Однако в экспериментальных группах трехиглой колюшки, из которых рыб удаляли случайным образом, доля самок увеличивалась: среди отловленных рыб преобладали самцы (Bakker, 2016). В специальном эксперименте по отлову проявилась сходная, но не значимая тенденция, однако, в этой работе (King *et al.*, 2013) отмечено, что поведение самцов и самок трехиглой колюшки различно – взрослые самцы, в целом, смелее самок.

Кроме того, в литературе отмечено, что в период нереста самцы окрашены значительно ярче, чем самки, они защищают гнездо с икрой, и их реакции, нацеленные на самосохранение (*anti-predator behavior*), ослаблены (Huntingford *et al.*, 1994). К тому же и результаты полевых исследований и эксперименты показали, что хищники в большей степени поедают ярко окрашенных самцов трехиглой колюшки, чем самцов и самок с неяркой окраской (Johnson, Candolin, 2017).

Недавнее исследование, проведенное в Белом море в период нереста трехиглой колюшки, показало, что доля взрослых самцов в желудках хищных рыб значительно выше, чем доля самцов в море. Однако влияние хищников на численность колюшки в этот период, скорее всего, невелико, и поэтому доля самцов среди производителей не меняется в течение нерестового периода (Golovin *et al.*, 2019).

3. Как показывают наблюдения, к концу нереста индекс наполнения желудков у взрослых самцов колюшки значительно ниже, чем у взрослых самок на всех трех изученных нерестилищах Белого моря, исследованных в работе (Демчук и др., 2018). Это может приводить к повышенной посленерестовой смертности самцов в результате истощения. Хотя в целом доля погибших особей колюшки на нерестилищах в Белом море довольно низкая – менее 1%, локальная смертность самцов превышает таковую для самок; эта тенденция может продолжаться и в период времени после отхода рыб в открытое море, где ее оценивать технически гораздо сложнее (Golovin *et al.*, 2019).

4. Возможно, существует еще одна причина отбора против самцов, хотя данное предположение, высказанное совсем недавно, требует последующего детального изучения. В работе (Bissegger *et al.*, 2020) было показано, что у трехиглой колюшки наблюдается различие в частотах аллелей многих

генов между выборками самок и самцов из одной популяции (модальное различие (*median magnitude*) этих частот составляет 0.053). Для объяснения этого факта было высказано предположение, что в Y-хромосому этого вида регулярно переносятся гены из аутосом, и в Y-хромосоме эти гены быстро мутируют (Bissegger *et al.*, 2020). Если это предположение верно, то в дальнейшем может оказаться, что многие из этих мутаций приводят к тому, что продукты мутантных генов плохо совместимы с продуктами тех генов, которые задействованы вместе с ними в некоем физиологически важном процессе, а потому жизнеспособность самцов может оказаться пониженной.

Отметим, что гипотеза о более быстрой эволюции Y-хромосомы при мужской гетерогаметности была ранее высказана В.А. Геодакяном (1996), который исходил из представления о том, что самцы являются полом, отвечающим за эволюционные инновации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженное нами преобладание самок над самцами в некоторых выборках поздних сеголеток трехиглой колюшки ранее не описано в литературе. Однако этот факт согласуется с отмеченным ранее четким различием между самками и самцами этого вида по морфологическим признакам, проявляющимся уже в возрасте 100 дней, задолго до полового созревания. Аналогичных примеров в литературе по другим видам рыб нам найти не удалось.

Следует отметить, что интенсивный отбор против самцов, которым, как мы показали, только и может объясняться двукратное преобладание самок среди производителей трехиглой колюшки – явление, которое может быть адаптивно-важным для популяции в целом, причем возможность такого отбора в каждом поколении, судя по всему, обусловлена генетически.

В результате, за счет элиминации большого количества самцов, отбор способен очень быстро менять частоты аллелей различных генов в популяции, что обеспечивает быструю адаптацию этой популяции к меняющимся условиям среды на генетическом уровне. Судя по всему, такой механизм адаптации популяций должен быть очень эффективен для короткоцикловых организмов, к которым относятся и трехиглая колюшка. При этом, в случае изменения условий среды, отбор в следующем поколении может пойти в обратном направлении.

Преимущественный отбор против самцов, как и отбор в пользу гетерозигот, известный у ряда организмов, может быть назван “сизифовым циклом”, однако оба эти явления не бесполезны. Хотя при отборе в пользу гетерозигот в следую-

шем поколении в популяции снова восстанавливается исходное соотношение гомозигот и гетерозигот, тем не менее, такой цикл обеспечивает близкие частоты аллелей целого ряда генов, важных для адаптации к меняющимся условиям среды. Преимущественный отбор против самцов, при том, что в следующем поколении доли самцов и самок снова выравниваются, может обеспечить быстрое изменение частот аллелей различных генов без снижения воспроизводительной способности популяции.

Важно подчеркнуть, что высокая наследуемость количественных признаков и вызванная этим высокая эффективность отбора по этим признакам – характерные особенности трехиглой колюшки; для большинства видов рыб они не описаны.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-14-00092).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брыков В.А. Механизмы определения пола у рыб: эволюционные и практические аспекты // Биология моря. 2014. Т. 40. № 6. С. 417–426.
- Геодакян В.А. Половые хромосомы: для чего они? (новая концепция) // Докл. АН. 1996. Т. 346. № 4. С. 565–569.
- Демчук А.С., Иванов М.В., Иванова Т.С., Полякова Н.В., Головин П.В., Лайус Д.Л. Питание беломорской трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) на нерестилищах // Тр. Карел. науч. центра РАН. 2018. № 4. С. 42–58.
- Зюганов В.В. Семейство колюшковых (Gasterosteidae) мировой фауны. Л.: Наука, 1991. 261 с.
- Лайус Д.Л., Головин П.В., Зеленская А.Е., Демчук А.С., Доргам А.С., Иванов М.В., Иванова Т.С., Мурзина С.А., Полякова Н.В., Рыбкина Е.В., Юрцева А.О. Трехиглая колюшка Белого моря: популяционные характеристики и роль в экосистеме // Сиб. эколог. журн. 2020. № 2. С. 167–183.
- Мухомедияров Ф.Б. Трехиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus* L.) Кандалакшского залива Белого моря // Вопр. ихтиол. 1966. Т. 6. Вып. 3. С. 454–467.
- Пичугин М.Ю., Сидоров Л.В., Гриценко О.Ф. Биологические и морфологические особенности трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* Курильских островов // Вопр. ихтиол. 2003. Т. 43. № 2. С. 169–177.
- Шульман С.С., Шульман-Альбова Р.Е. Паразиты рыб Белого моря. М.–Л. Изд-во АН СССР, 1953. 200 с.
- Aneer G. Biometrical characteristics of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from Northern Baltic proper // Zoologica Scripta. 1973. V. 2. P. 157–162.
- Arnold K.E., Adam A., Orr K.J., Griffiths R., Barber I. Sex-specific survival and parasitism in three-spined sticklebacks: seasonal patterns revealed by molecular analysis // J. Fish Biology. 2003. V. 63. P. 1046–1050.
- Bakhvalova A.E., Ivanova T.S., Ivanov M.V., Demchuk A.S., Movchan E.A., Lajus D.L. Long-term changes in the role of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in the White Sea: predatory fish consumption reflects fluctuating stickleback abundance during the last century // Evol. Ecol. Res. 2016. V. 17. P. 317–334.
- Bakker T.C.M. No evidence of sex reversal by means of experimentally altered sex ratios in threespine stickleback // Evol. Ecol. Res. 2016. V. 17. P. 291–300.
- Bakker T.C.M., Giger T., Frommen J.G., Largiadèr C.R. Rapid molecular sexing of three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* L., based on large Y-chromosomal insertions // J. Appl. Genetics. 2017. V. 58. P. 401–407.
- Bell A.M., Dingermanse N.J., Hankison S.J., Langenhof M.B.W., Rollins K. Early exposure to nonlethal predation risk by size-selective predators increases somatic growth and decreases size at adulthood in threespine sticklebacks // J. Evol. Biol. 2011. V. 24. P. 943–953.
- Bell M.A., Aguirre W.E. Contemporary evolution, allelic cycling, and adaptive radiation of the threespine stickleback // Evol. Ecol. Res. 2013. V. 15. P. 377–411.
- Bernhardt R.R., von Hippel F.A., Cresko W.A. Perchlorate induces hermaphroditism in threespine sticklebacks // Environ. Toxicol. Chem. 2006. V. 25. P. 2087–2096.
- Bissegger M., Laurentino T.G., Roesti M., Berner D. Widespread intersex differentiation across the stickleback genome – the signature of sexually antagonistic selection? // Mol. Ecol. 2020. V. 29. P. 262–271.
- Dean L.L., Robertson S., Mahmud M., MacColl A.D.C. Internal embryonic development in a non-copulatory, egg-laying teleost, the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* // Sci. Reports. 2019. V. 9. P. 2395.
- Devlin R.H., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences // Aquaculture. 2002. V. 208. P. 191–364.
- Furin C.G., von Hippel F.A., Postlethwait J.H., Buck C.L., Cresko W.A., O'Hara T.M. Developmental timing of sodium perchlorate exposure alters angiogenesis, thyroid follicle proliferation and sexual maturation in stickleback // Gen. Compar. Endocrin. 2015. V. 219. P. 24–35.
- Gibson G. The synthesis and evolution of a supermodel // Science. 2005. V. 307. P. 1890–1891.
- Golovin P.V., Bakhvalova A.E., Ivanov M.V., Ivanova T.S., Smirnova K.A., Lajus D.L. Sex-biased mortality of marine threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) during their spawning period in the White Sea // Evol. Ecol. Res. 2019. V. 20. P. 279–295.
- Griffiths R., Orr K.J., Adam A., Barber I. DNA sex identification in the three-spined stickleback // J. Fish Biology. 2000. V. 57. P. 1331–1334.
- Hahlbeck E., Griffiths R., Bengtsson B.-E. The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption. I. Sexual differentiation // Aquatic Toxic. 2004. V. 70. P. 287–310.
- Hagen D.W., Gilbertson L.G. Selective predation and intensity of selection acting upon the lateral plates of

- threespine stickleback // *Heredity*. 1973. V. 30. P. 273–287.
- Hendry A.P., Peichel C.L., Matthews B., Boughman J.W., Nosil P. Stickleback research: the now and the next // *Evol. Ecol. Res.* 2013. V. 15. P. 111–141.
- Heule C., Salzburger W., Böhne A. Genetics of sexual development: an evolutionary playground for fish // *Genetics*. 2014. V. 196. P. 579–591
- Huntingford F.A., Wright P.J., Tierney J.F. Adaptive variation in antipredator behavior in threespined stickleback // *The evolutionary biology of threespine stickleback* / Eds Bell M.A., Foster S.A. Oxford: Oxford University Press, 1994. P. 277–296.
- Ivanova T.S., Ivanov M.V., Golovin P.V., Polyakova N.V., Lajus D.L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality, and abundance // *Evol. Ecol. Res.* 2016. V. 17. P. 301–315.
- Johnson S., Candolin U. Predation cost of a sexual signal in the threespine stickleback // *Behav. Ecol.* 2017. V. 28. P. 1160–1165.
- King A.J., Fürtbauer I., Mamuneas D., James C., Manica A. Sex-differences and temporal consistency in stickleback fish boldness // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. P. 81116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081116>
- Kynard B.E. Breeding behavior of a lacustrine population of threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) // *Behaviour*. 1978. V. 67. P. 178–207.
- Lajus D., Ivanova T., Rybkina E., Lajus J., Ivanov M. Multidecadal fluctuations of threespine stickleback in the White Sea and their correlation with temperature // *ICES J. Marine Sci.* 2020. doi.org/<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa192>
- Lindsey C.C. Experimental study of meristic variation in a population of threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* // *Can. J. Zool.* 1962. V. 40. P. 271–312.
- Niksirat H., Hatef A., Abdoli A. Life cycle and feeding habits of the threespined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758): an alien species in the southeast Caspian sea // *Intern. Aquatic Res.* 2010. V. 2. P. 97–104.
- Östlund-Nilsson S., Mayer I., Huntingford F.A. *Biology of the three-spine stickleback* / Boca Raton: CRC Press, 2007. 392 p.
- Paepke H.-J. *Die Stichlinge: Gasterosteidae*. Magdeburg: Westarp-Wiss, 1996. 176 p.
- Patimar R., Najafabadi M.H., Souraki M.G. Life history features of the nonindigenous three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758) in the Gomis-han wetland (southeast Caspian Sea, Iran) // *Turk. J. Zool.* 2010. V. 34. P. 461–470.
- Peichel C.L., Ross J.A., Matson C.K., Dickson M., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Mori S., Schluter D., Kingsley D.M. The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 1416–1424.
- Ramler D., Mitteroecker P., Shama L.N.S., Wegner K.M., Ahnelt H. Nonlinear effects of temperature on body form and developmental canalization in the threespine stickleback // *J. Evol. Biol.* 2014. V. 27. 497–507.
- Reimchen T.E., Nosil P. Ecological causes of sex-biased parasitism in threespine stickleback // *Biol. J. Linn. Soc.* 2001. V. 73. P. 51–63.
- Rollins J.L., Chiang P., Waite J.N., von Hippel F.A., Bell M.A. Jacks and jills: alternative life-history phenotypes and skewed sex ratio in anadromous threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) // *Evol. Ecol. Res.* 2017. V. 18. P. 363–382.
- Rybkina E.V., Demchuk A.S., Lajus D.L., Ivanova T.S., Ivanov M.V., Galaktionov K.V. Dynamics of parasite community during early ontogenesis of marine threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* // *Evol. Ecol. Res.* 2016. V. 17. P. 335–354.
- Saat T., Turovski A. Three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. // *Fishes of Estonia*. Eds Ojaveer E., Pihu E., Saat T. Tallinn: Estonian Academy Publishers, 2003. P. 274–280.
- Samonte-Padilla I.E., Eizaquirre C., Scharsack J.P., Lenz T.L., Milinski M. Induction of diploid gynogenesis in an evolutionary model organism, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) // *BMC Develop. Biol.* 2011. P. 11–55.
- Toli E.-A., Calboli F., Shikano T., Merilä J. A universal and reliable assay for molecular sex identification of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) // *Mol. Ecol. Res.* 2016. V. 16. P. 1389–1400.
- Velando A., Costa M.M., Kim S.-Y. Sex-specific phenotypes and metabolism-related gene expression in juvenile sticklebacks // *Behav. Ecol.* 2017. V. 28. P. 1553–1563.
- Whoriskey F.G., FitzGerald G.L. The effects of bird predation on an estuarine stickleback (pisces: Gasterosteidae) community // *Can. J. Zool.* 1985. V. 63. P. 301–307.
- Wootton R.J., Fletcher D.A., Smith C., Whoriskey F.G. A review of reproductive rates in sticklebacks in relation to parental expenditure and operational sex ratios // *Behaviour*. 1995. V. 132. P. 915–933.
- Wootton R.J., Smith C. *Reproductive biology of teleost fishes*. Chichester: John Wiley sons, Ltd., 2015. 472 p.
- Yershov P., Sukhotin A. Age and growth of marine three-spined stickleback in the White sea 50 years after a population collapse // *Polar Biology*. 2015. V. 38. P. 1813–1823.
- Yoshida K., Makino T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Hasebe M., Kawata M., Kume M., Mori S., Peichel C.L., Toyoda A., Fujiyama A., Kitano J. Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species // *PLoS Genet.* 2014. V. 10: e1004223.
- Yurtseva A., Noreikiene K., Lajus D., Li Z., Alapassi T., Ivanova T., Ivanov M., Golovin P., Vesala S., Merilä J. Aging three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*: comparison of estimates from three structures // *J. Fish Biology*. 2019. V. 95. P. 802–811.

Female-Biased Sex Ratio in Some Young of the Year and Spawner Samples of Threespine Stickleback *Gasterosteus aculeatus* is Due Not to Genetic, but Environmental Factors

**V. S. Artamonova¹, N. V. Bardukov¹, P. V. Golovin², T. S. Ivanova², M. V. Ivanov²,
D. L. Lajus², and A. A. Makhrov^{1, 2, #}**

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the RAS, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia*

²*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199934 Russia*

[#]*e-mail: makhrov12@mail.ru*

In this study we analyzed a sex ratio of threespine stickleback on different stages of ontogenesis using genetic markers (sex-specific loci of Ga1 and Ga2). The progeny of all individually tested females included both males and females, and no significant departures from 1 : 1 sex ratio was also found in embryos from the natural nests. Juveniles did not show sex bias up to one and a half or two months of age, but in older juveniles, females prevailed (this fact has been reported for the first time). Females prevailed among spawners, which mostly deals with predominant elimination of males during spawning and post-spawning periods, the likely causes of this predominance are discussed.

УДК 576.895.133:595.133

СТРУКТУРА И ФОРМИРОВАНИЕ КАПСУЛЫ ВОКРУГ СКРЕБНЯ *Corynosoma strumosum* В ЕСТЕСТВЕННОМ ПАРАТЕНИЧЕСКОМ ХОЗЯИНЕ – РЫБЕ *Hadropareia middendorffii*. 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ИНКАПСУЛЯЦИИ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ)

© 2021 г. Е. М. Скоробрехова*, В. П. Никишин*, @

*Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Портовая ул., 18, Магадан, 685000 Россия

@E-mail: nikishin@ibpn.ru

Поступила в редакцию 02.05.2019 г.

После доработки 09.03.2021 г.

Принята к публикации 09.03.2021 г.

Впервые экспериментально исследован процесс инкапсуляции скребней в паратеническом хозяине. Показано, что образование лейкоцитарной капсулы вокруг скребня *Corynosoma strumosum* (Rudolphi, 1802) (Lühe, 1904) в толстошке Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* (Schmidt, 1904) происходит в три этапа. В первые дни после проникновения скребня в полость тела хозяина наблюдается миграция к паразиту лейкоцитов, включая макрофаги. Через две недели в состав капсулы включаются немногочисленные фибробласты и коллагеновые волокна, количество которых в дальнейшем возрастает. Через 50 дней после начала инкапсуляции в составе капсулы вместе с лейкоцитами обнаруживается значительное количество фибробластов/фиброцитов и пучков коллагеновых волокон, и по своему клеточному составу она не отличается от описанной из толстошек, инвазированных естественным образом. В ответ на клеточную реакцию хозяина паразит формирует на своей поверхности типичный толстый слой гликокаликса.

Ключевые слова: скребень, паратенический хозяин, формирование капсулы, гликокаликс

DOI: 10.31857/S1026347021050140

В первом сообщении мы представили результаты исследования гистологической и ультратонкой организации капсул, окружающих скребня *Corynosoma strumosum* в толстошке Миддендорфа, инвазированного естественным образом. Было показано, что эти капсулы относятся к лейкоцитарному типу, для которого характерно наличие значительного или даже преобладающего количества лейкоцитов. В ответ коринозома формирует на своей поверхности толстый слой гликокаликса, образование которого мы рассматриваем как защиту от клеточной реакции хозяина. Обе эти особенности, по нашему мнению, являются признаками одной из двух известных на сегодняшний день стратегий взаимоотношений скребней с паратеническими хозяевами (Никишин, Скоробрехова, 2018).

Возможность заражения скребнями паратенических хозяев в условиях эксперимента была неоднократно продемонстрирована в исследовании В.П. Шарпило (1965, 1971), однако процесс инкапсуляции скребней в подобных случаях оставался не изученным. С целью изучения процесса формирования капсулы вокруг скребня *Corynosoma strumosum* в естественных паратенических хозяевах

было проведено экспериментальное заражение толстошек Миддендорфа. С морскими рыбами подобные эксперименты проведены впервые. В настоящем сообщении приводятся предварительные результаты этого исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор для экспериментов толстошек Миддендорфа был обусловлен двумя причинами. Во-первых, во время отливов эти рыбы часто остаются под камнями и в литоральных ваннах, что позволило в аквариуме создать условия, приближенные к естественным. Во-вторых, в бухте Нагаево был обнаружен участок литорали, в котором обитающие там толстошки имели низкую зараженность: в течение 2011–2013 гг. в разные периоды с июня по сентябрь было вскрыто 146 рыб этого вида, отловленных на этом участке, и экстенсивность их естественной инвазии составила менее 5%, при интенсивности от одного до трех экземпляров.

Подопытных рыб отлавливали во время отливов под камнями или в литоральных ваннах. Часть рыб вскрывали сразу (контрольная группа), остальных использовали в эксперименте (опыт-

Таблица 1. Результаты экспериментального заражения толстошека Миддендорфа скребнем *Corynosoma strumosum*

№ рыбы	Длина (см) и пол рыбы	Количество скормленных скребней (экз)	Время с момента введения инвазии (сут)	Локализация и количество обнаруженных скребней				
				просвет кишечника	брыжейка кишечника	брюшная стенка	печень	гонады/ селезенка
1	8.2♀	10	3		1	1		
2	9.2♀	Всего 22	3			1	1	
3	9.4		3	2	1	1		1/
4	9.1♀		3	Не обнаружены				
5	9.0♂		3	Не обнаружены				
6	9.6♀		3	Не обнаружены				
7	11.8♀		3	Не обнаружены				
8	9.2♂		3	Не обнаружены				
9	9.6♀		3		1	1		
10	10.0♂		3	Не обнаружены				
11	10.7♂		3	Не обнаружены				
12	9.2♀		3		3		1	
13	18.2♀		Каждой рыбе от 5 до 11	14		6		
14	12.3♀	14			5			
15	18.0♀	30			11			
16	13.3♀	30			6			
17	9.9♂	50			3			
18	9.0	50			1			
19	6.9	50			1			/1
20	10.6♀	50			1			
21	10.0	50			1	2		
22	9.0	50			3		1	
23	6.3	50				3		

ная группа). Эксперименты проведены в лабораторных условиях в июне и сентябре–ноябре 2012 г.

Опытную группу рыб содержали в аквариуме с морской водой (объем 80 л). На дно аквариума поместили крупногалечный грунт, взятый из естественного биотопа подопытных животных. В качестве укрытий были сооружены нагромождения из крупных камней и установлены полые керамические изделия. Вода в аквариуме постоянно обогащалась кислородом посредством аэрирующего фильтра. С целью максимальной имитации естественных условий аквариум был установлен неотапливаемом помещении. Перед экспериментами пойманных рыб выдерживали в покое в течение недели. Через два–три дня после поимки рыбы начинали принимать корм. Кормили рыб один раз в день мороженым кормом.

Первый эксперимент был проведен в июне 2012 г. с целью исследования начальных этапов процесса инкапсуляции скребней, поэтому все подопытные рыбы были вскрыты через трое суток после заражения. Опытную группу рыб составили 12 толстошеков длиной от 8.2 до 11.8 см (табл. 1). Одновременно с опытной группой рыб была исследована контрольная группа из 14 рыб; результаты вскрытия показали отсутствие естественной инвазии скребнями. Температура воздуха в помещении с аквариумом колебалась от +12 до +18°C. Заражение подопытных рыб проводили пероральным способом инкапсулированными скребнями с кусочками прилежащих тканей, извлеченными из других естественных паратенических хозяев (бельдюг и толстошеков), выловленных на

участке с высокой зараженностью рыб этим скребнем. Всего было скормлено 32 скребня.

Второй эксперимент был проведен в сентябре—ноябре того же года с целью изучения более поздних этапов процесса инкапсуляции скребней. Опытная группа рыб насчитывала 11 особей длиной от 6.3 до 18.2 см. Контрольная группа состояла из 26 рыб; по результатам вскрытия все они оказались незараженными. Условия содержания подопытных рыб и способ их заражения были аналогичными описанным выше. В помещении, где располагался аквариум, температура воздуха от начала эксперимента до его завершения снизилась от +12 до -3°C. Поскольку рыбы предпочитали держаться в определенных участках аквариума, было проведено индивидуальное заражение каждой из них. Трем рыбам было скормлено по 11 скребней, четырем — по 5 скребней, остальным четырем — от 5 до 11 скребней каждой (табл. 1). В последнем случае для заражения использовали как обычные, так и более крупные капсулы, которые содержали более одного скребня (мы находили капсулы, включающие от двух до шести коринозом). Вскрытие проводили через 14 (две рыбы), 30 (две рыбы) и 50 (семь рыб) суток после заражения.

Подготовку препаратов, свето-микроскопические и электронно-микроскопические исследования осуществляли по методикам, изложенным в первом сообщении. Всего свето-микроскопически было исследовано 58 скребней, электронно-микроскопически — 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты экспериментов по заражению коринозомами толстошека Миддендорфа представлены в табл. 1.

Срок заражения 3 суток. Зараженными оказались пять из 12 вскрытых рыб. Все скребни, проникшие в полость тела хозяина, имели признаки начавшейся инкапсуляции. Формирующаяся капсула или была представлена прерывистым клеточным слоем (рис. 1а, 1б), или небольшими скоплениями клеток (рис. 1в), или же почти полностью окружала паразита (рис. 1г).

Особенности строения тегумента скребня. Свето-микроскопически на поверхности тегумента всех трехдневных скребней обнаруживали однородный светло-окрашенный слой гликокаликса. Электронная микроскопия показала, что гликокаликс образован фибриллярным и гранулярным материалом невысокой электронной плотности и имеет толщину 1.5—2.1 мкм (рис. 2а—2г). Наружняя граница его неровная, в него часто внедряются псевдоподии клеток хозяина, однако, не достигающие поверхности тегумента (рис. 2а). Узкая внутренняя часть гликокаликса отличается

более плотной организацией образующего его материала и имеет повышенную электронную плотность. В некоторых участках в основании гликокаликса наблюдались скопления мелких везикул, диаметром 18—23 нм, окруженных оболочкой, напоминающей мембрану (рис. 2в). В толще гликокаликса часто обнаруживались образования в виде трубочек, диаметром 21—26 нм, ориентированные более или менее перпендикулярно поверхности паразита; стенка этих трубочек была сходна со стенкой везикул, однако точный ее характер не определялся (рис. 2г). В некоторых участках гликокаликс был отделен от тегумента, но при этом сохранял свою непрерывность (рис. 2б). В этих случаях в пространствах, образующихся между ним и поверхностью тегумента, нередко наблюдались фрагменты клеток хозяина.

Тегумент трехсуточных скребней по своему строению в целом сходен с таковым у инкапсулированных скребней из естественных паразитических хозяев (см. сообщение 1) (рис. 3а—3в). На полутонких срезах в его составе отчетливо различаются поперечно-полосатый, войлочно-волокнистый и радиально-волокнистый слои. У шести скребней определялся везикулярный слой, элементы которого были расширены до 0.5 мкм и содержали неясный хлопьевидный материал или везикулярные образования, сходные с везикулами, отмеченными в гликокаликсе (рис. 2в). В этих случаях, как показала электронная микроскопия, устья каналов поперечно-полосатого слоя, связывающих эти везикулы с внешней средой, также были расширены до 30—60 нм, что может свидетельствовать о повышенной секреторной активности тегумента (рис. 2г).

Структура капсулы. На брыжейке кишечника найдено шесть скребней; все они имели инвагинированные хоботки. Вокруг двух из них капсула полностью отсутствовала, и лишь единичные скопления клеток хозяина наблюдались у поверхности гельминтов. Вокруг остальных скребней капсула имела прерывистый характер и неравномерную толщину (рис. 1а, 1б). В участках, в которых скребни контактировали с брыжейкой, толщина капсулы достигала наибольших значений, по мере удаления от них ее толщина снижалась, она становилась прерывистой и перемежалась участками, свободными от клеток. Клетки в капсуле располагались рыхло с заметными межклеточными пространствами. Во внутренней части капсулы они характеризовались многочисленными псевдоподиями, направленными в сторону паразита и часто погруженными в верхнюю часть слоя гликокаликса на его поверхности (рис. 2а).

Четыре скребня эвагинированными хоботками были прикреплены к стенке брюшной полости. При этом три из них были лишены капсулы, и на их поверхности имелись лишь небольшие

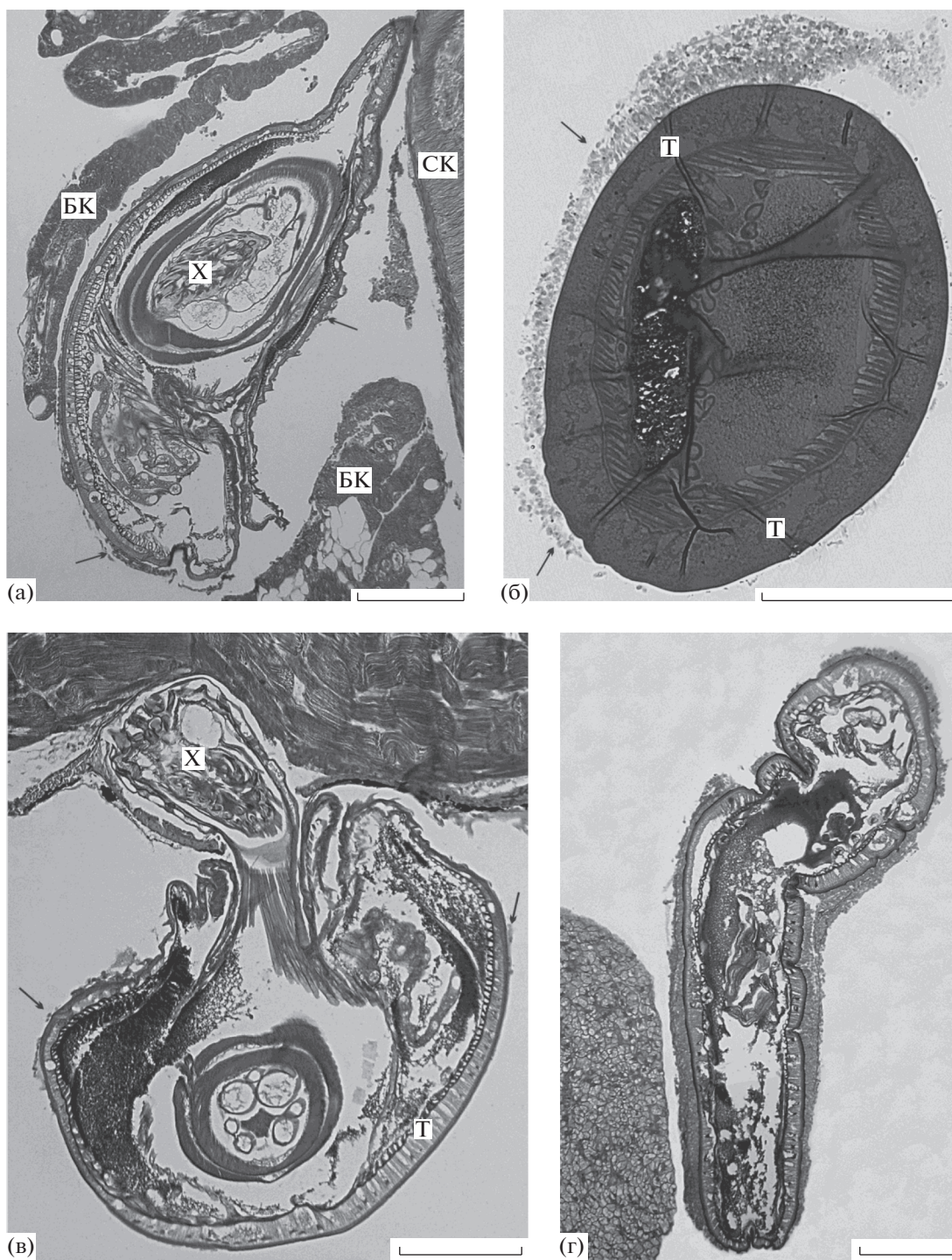


Рис. 1. Общий вид скребня *Corynosoma strumosum* на брыжейке кишечника (а, б), брюшной стенке (в) и печени (г) толстошечка Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* через трое суток после заражения. (а, б) – Продольный (а) и поперечный (б) срезы скребня, частично окруженного тонкой формирующейся капсулой (стрелки); (в) – эвагинированный хоботок скребня проник до мышц брюшной стенки, капсула не сформирована, видны лишь отдельные скопления клеток хозяина (стрелки); (г) – скребень почти полностью окружен капсулой, наиболее толстой в участке, прилегающем к печени, и в складке гельминта. БК – брыжейка кишечника, СК – стенка кишечника, Т – тегумент скребня, Х – хоботок скребня. Масштаб: 200 мкм.

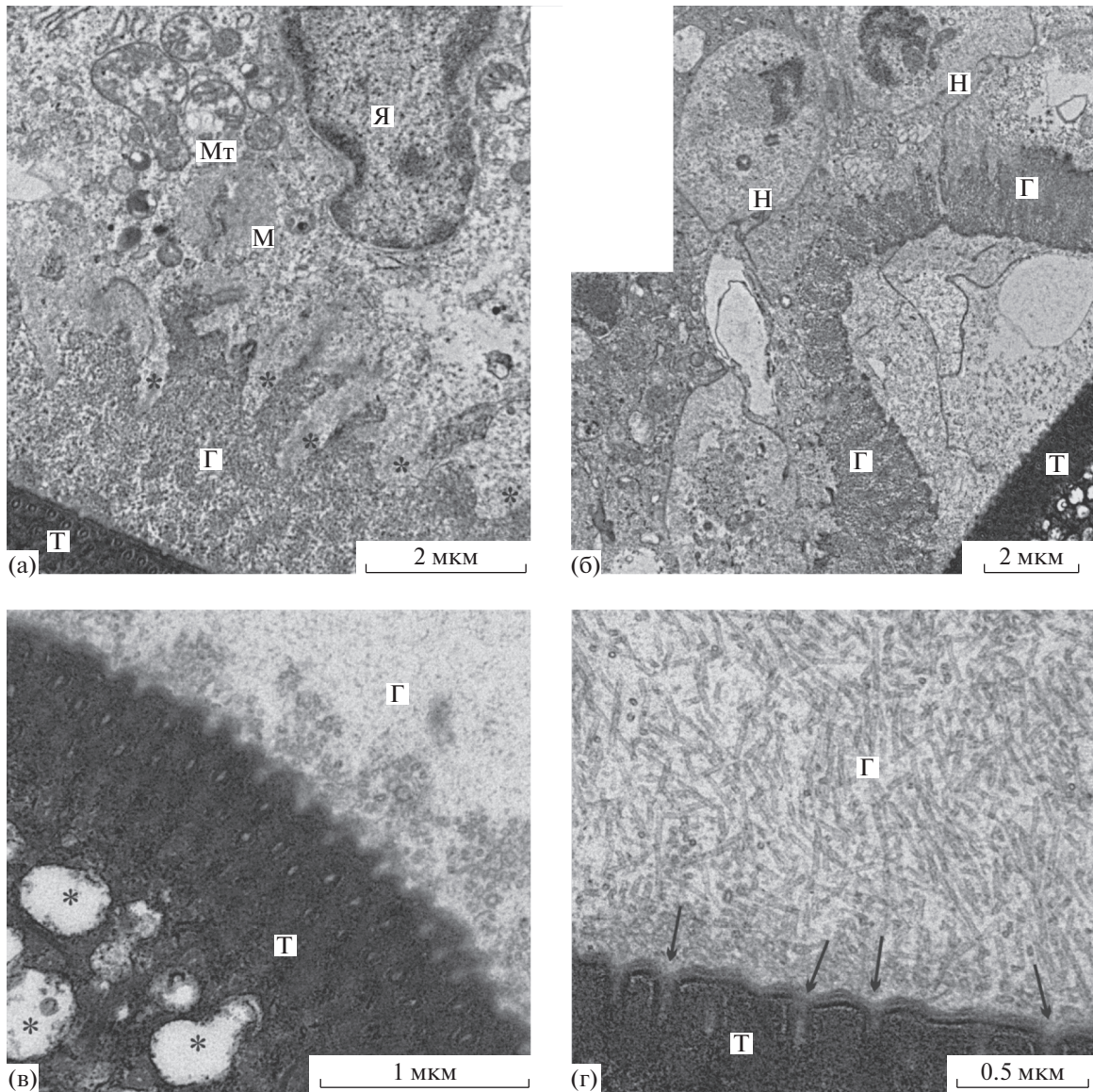


Рис. 2. Ультраструктура поверхности тегумента и гликокаликса скребня *Corynosoma strumosum* на брыжейке кишечника толстоцека Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* через трое суток после заражения. (а) – Отростки макрофага хозяина (*) погружены в слой гликокаликса; просветленная цитоплазма и набухшие митохондрии свидетельствуют о деградации макрофага; (б) – отслоение слоя гликокаликса от тегумента скребня; (в) – скопления мелких везикул во внутренней части гликокаликса; погруженные части “каналов” (*) тегумента, образующие его везикулярный слой, расширены; (г) – внутренняя часть гликокаликса включает многочисленные трубчовидные образования. Устья “каналов” (стрелки) тегумента расширены. Г – гликокаликс, М – макрофаг, Мт – митохондрии, Н – нейтрофилы, Т – тегумент скребня, Я – ядро макрофага.

скопления клеток (рис. 1в). Вблизи заднего отдела одного из этих скребней наблюдался крупный клеточный инфильтрат, состоящий из нескольких десятков (на одном срезе) эритроцитов. Признаки инкапсуляции этого скребня наблюдались только в участке его контакта с инфильтратом, над остальной поверхностью паразита клетки хозяина отсутствовали. У четвертого скребня капсула была прерывистой, но отдельные участки его поверхности не были покрыты клетками хозяина.

Капсула состояла из двух–трех слоев клеток, и ее толщина варьировала от 20 до 60 мкм (рис. 3б). Некоторые из наиболее внутренних клеток образовывали пальцевидные отростки, направленные к поверхности скребня.

На поверхности печени рыб найдено два скребня. Оба гельминта содержали инвагинированный хоботок, и большая часть их тела была окружена капсулой (рис. 1г, 3в); в других участках она полностью отсутствовала. Толщина капсулы

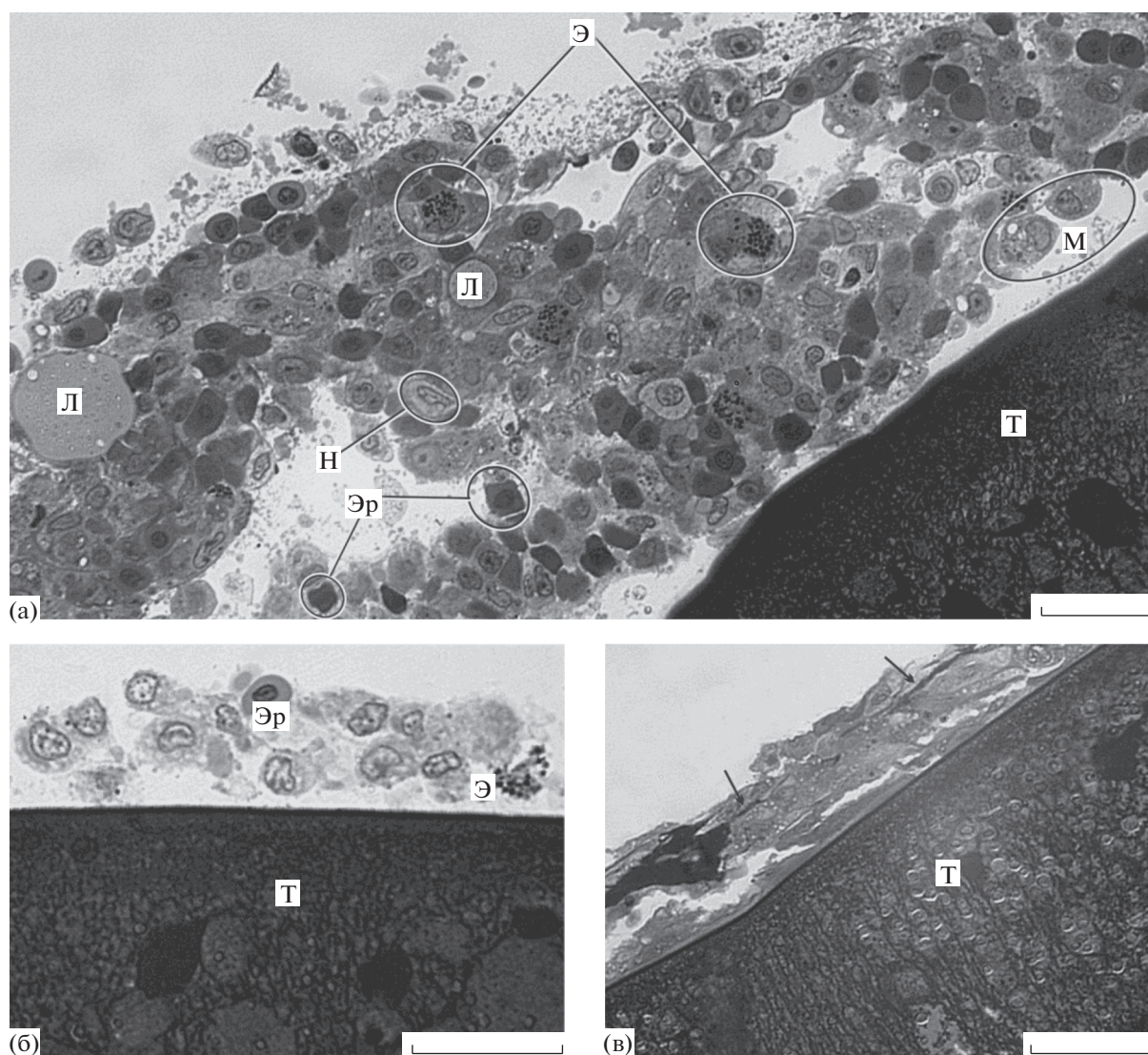


Рис. 3. Микроструктура тегумента и капсулы скребня *Corynosoma strumosum* на гонадах (а), брюшной стенке (б) и печени (в) толстошека Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* через трое суток после заражения. (а) – В составе капсулы определяются эозинофилы, макрофаги, эритроциты, нейтрофил и крупные липидные капли; (б) – формирующаяся капсула представлена двумя-тремя слоями клеток хозяина; (в) – в составе капсулы в межклеточных пространствах виден плотный гомогенный материал неясного происхождения (стрелки). Л – липидные капли, М – макрофаги, Н – нейтрофил, Т – тегумент скребня, Э – эозинофилы, Эр – эритроциты. Масштаб: 20 мкм.

варьировала от 16 до 35 мкм, причем наибольших значений она достигала в местах контакта скребней с печенью, а также в изгибах тела гельминтов.

На гонадах найден один частично инкапсулированный скребень с втянутым хоботком. Капсулой, толщиной от 35 до 129 мкм, была покрыта передняя часть скребня, тогда как его задний конец был свободен, и лишь в некоторых местах на его поверхности наблюдались единичные скопления клеток. В капсуле клетки располагались рыхло, с широкими межклеточными пространствами (рис. 3а).

В составе всех обнаруженных капсул выявлено несколько типов клеток, среди которых преобладают макрофаги, нейтрофилы и эритроциты, менее многочисленными были эозинофилы и лимфоциты. Многие клетки характеризуются признаками деструкции, наиболее ярко проявляющимися в просветлении периферической цитоплазмы и набухании митохондрий (рис. 2а). По своим характеристикам клетки в целом не отличаются от описанных в капсулах из рыб, инвазированных естественным образом. Фибробласты в составе трехсуточных капсул не обнаружены.

Диаметр макрофагов варьирует от 8 до 14 мкм (рис. 2а, 3а). Ядра их светлые, округлой или бобо-

видной формы, расположены эксцентрично. Цитоплазма включает короткие каналцы гранулярной эндоплазматической сети, мелкие темные фагосомы, светлые вакуоли и липидные капли.

Нейтрофилы – округлые клетки, диаметром 6–9 мкм, характеризуются эксцентрично расположенным ядром (рис. 3а); преобладают клетки с округлыми и палочковидными ядрами, реже ядра состоят из 2–3 сегментов. Ядра характеризуются грубыми скоплениями гетерохроматина вдоль оболочек, а в цитоплазме видны мелкие специфические гранулы округлой, реже вытянутой, формы. Периферическая часть гранул включает плотное гомогенное содержимое, а их центральная часть представляется “пустой”.

Эозинофилы чаще имеют вытянутую форму, ширина их составляет 6–7 мкм, длина – 12–15 мкм (рис. 3а, 3б); их ядра расположены эксцентрично. В отличие от нейтрофилов для эозинофилов характерны более крупные специфические гранулы с темным однородным содержимым.

Лимфоциты отличаются от других клеток большими размерами (~5 мкм) и плотным ядром, занимающим большую часть их тела.

В межклеточных пространствах наблюдался плотный гомогенный материал; на полутонких срезах он окрашивался в темно-синий цвет (рис. 3в), на гистологических срезах, окрашенных по методу Маллори – в интенсивно красный цвет. Электронно-микроскопически этот материал состоит из хаотично ориентированных тонких фибрилл, не имеющих поперечной исчерченности. Кроме того, в капсулах большинства исследованных скребней в межклеточных пространствах присутствовали крупные липидные капли, диаметром 4–5 мкм, в отдельных случаях – до 20 мкм (рис. 3а).

Срок заражения 14 суток. Спустя 14 сут после начала эксперимента вскрыто две рыбы. В первой из них (№ 13) найдено 6 скребней, во второй (№ 14) – 5. Все паразиты располагались на брыжейке кишечника хозяев; в просвете кишечника скребни не обнаружены. У первой рыбы два паразита были практически полностью лишены капсулы, а вблизи их поверхности наблюдались редкие группы клеток, остальные гельминты были покрыты тонкой прерывистой капсулой. У второй рыбы один скребень также был свободен от капсулы, три скребня были окружены тонкой прерывистой капсулой. Последний скребень был заключен в почти сплошную многослойную капсулу, прерывающуюся лишь в отдельных коротких участках (рис. 4а–4в).

Особенности строения тегумента. На светомикроскопических и электронно-микроскопических препаратах у трех скребней отмечены расширенные элементы везикулярного слоя тегумента, аналогичные описанным у некоторых скребней в возрасте трех суток (рис. 4а); устья каналов, свя-

зывающих эти везикулы с внешней средой, также были расширены до 40–60 нм (рис. 4г, 4д). У других скребней везикулярный слой имел “нормальную” внешность (рис. 4б, 4в). На поверхности тегумента во всех случаях был хорошо виден рыхлый слой гликокаликса, образованный войлокоподобным материалом (рис. 4г, 4д). Участками в этом материале наблюдались трубочки, по морфологии сходные с отмеченными в гликокаликсе трехсуточных коринозом, но в значительно меньшем количестве (рис. 4д).

Структура капсулы. Основу капсул у исследованных скребней составляли макрофаги и нейтрофильные лейкоциты, в меньшем количестве присутствовали эозинофилы, лимфоциты, и эритроциты (рис. 4а). Кроме того, были отмечены немногочисленные фибробласты, отличающиеся крупными размерами, округлой или удлинённой формой, относительно высоким ядерно-плазменным отношением и светлым ядром с отчетливым ядрышком. Межклеточный материал капсулы был представлен двумя модификациями волокон. Волокна первой модификации образуют довольно крупные скопления, окрашивающиеся по методу Маллори в ярко-красный цвет (рис. 4в). Материал второй модификации, в отличие от первой, представлен сетью коллагеновых волокон, о чем свидетельствует их окраска по методу Маллори в синий цвет (рис. 4б).

Срок заражения 30 суток. На тридцатые сутки эксперимента вскрыто 2 рыбы: у первой (№ 15) найдено 11 скребней, у второй (№ 16) – 6. Все обнаруженные скребни располагались на брыжейке кишечника и были окружены сплошной многослойной капсулой, толщиной от 32 до 160 мкм. Как и на предыдущих сроках эксперимента наблюдалось увеличение толщины капсулы в участках, в которых скребни были наиболее близко расположены к брыжейке (рис. 5а).

Особенности строения тегумента. Свето-микроскопически тегумент исследованных скребней по своему строению не отличался от такового у скребней из рыб, инвазированных естественным образом (рис. 5б). Слой гликокаликса на поверхности тегумента отчетливо наблюдался в случаях, когда между скребнем и капсулой имелся просвет (рис. 5б).

Электронно-микроскопически были изучены два скребня. У обоих элементы везикулярного слоя были расширены (рис. 5в). Гликокаликс скребней достигал в толщину 1.5–2.0 мкм и был образован тонкофибрилярным материалом (рис. 5в) с включением в отдельных участках микротрубочек (рис. 5г). В этих участках устья “каналов” поперечно-полосатого слоя представляются расширенными, в остальных участках имеют “нормальную” внешность.

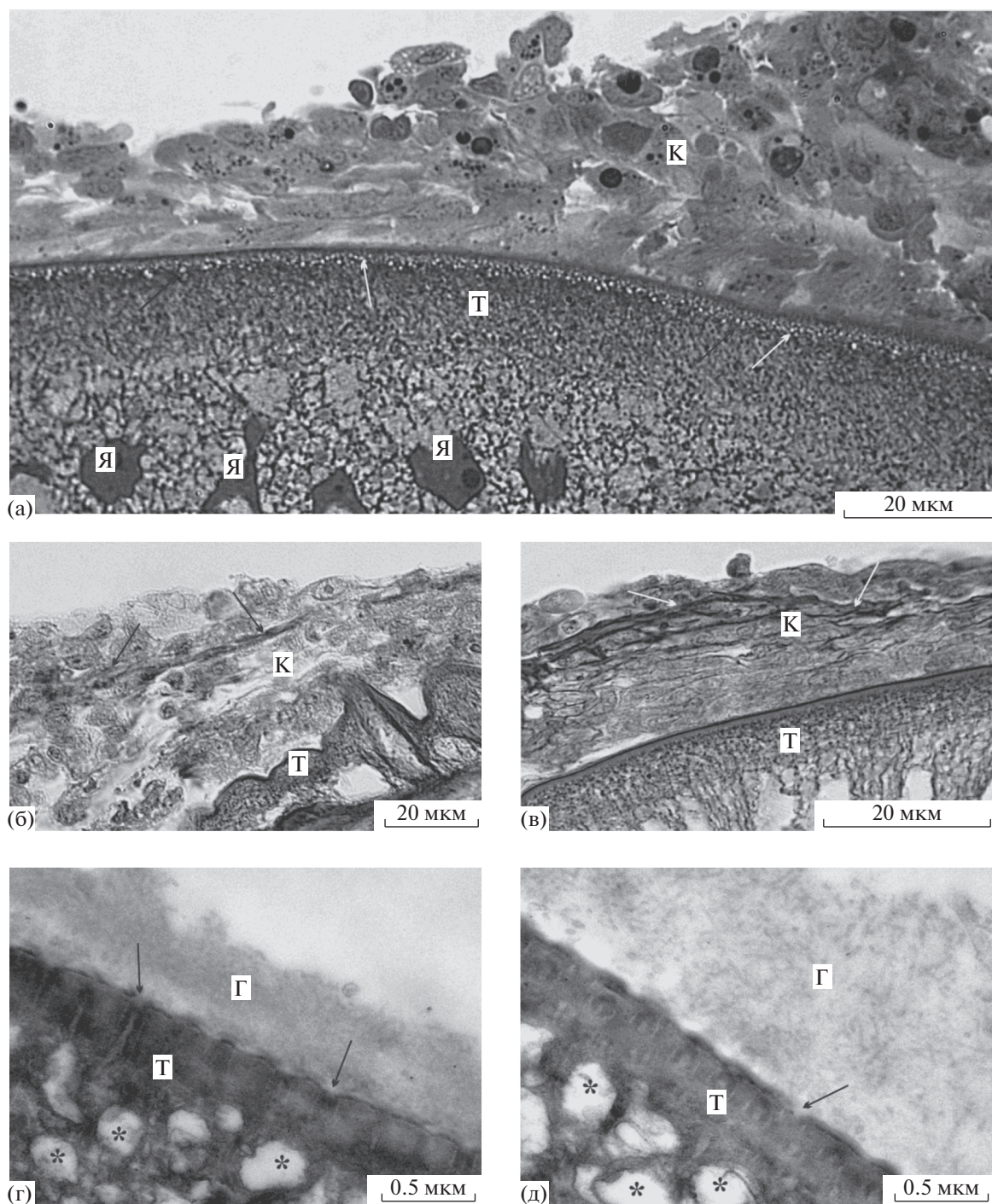


Рис. 4. Скребень *Corynosoma strumosum* на брыжейке кишечника толстошечка Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* через 14 суток после заражения. (а) – Тегумент скребня с расширенными элементами везикулярного слоя (стрелки); окружающая капсула многослойная и образована лейкоцитами и макрофагами; (б) – коллагеновые волокна в составе капсулы (стрелки), окрашивающиеся по Маллори в синий цвет; (в) – межклеточный материал в составе капсулы (стрелки), окрашивающийся по Маллори в красный цвет; (г, д) – тегумент скребня с расширенными элементами везикулярного слоя (*) и устьями “каналов” (стрелки) поперечно-полосатого слоя; слой гликокаликса на поверхности тегумента, образован аморфным материалом (г) и включает микротрубочки (д). Г – гликокаликс, К – капсула, Т – тегумент скребня, Я – ядра тегумента.

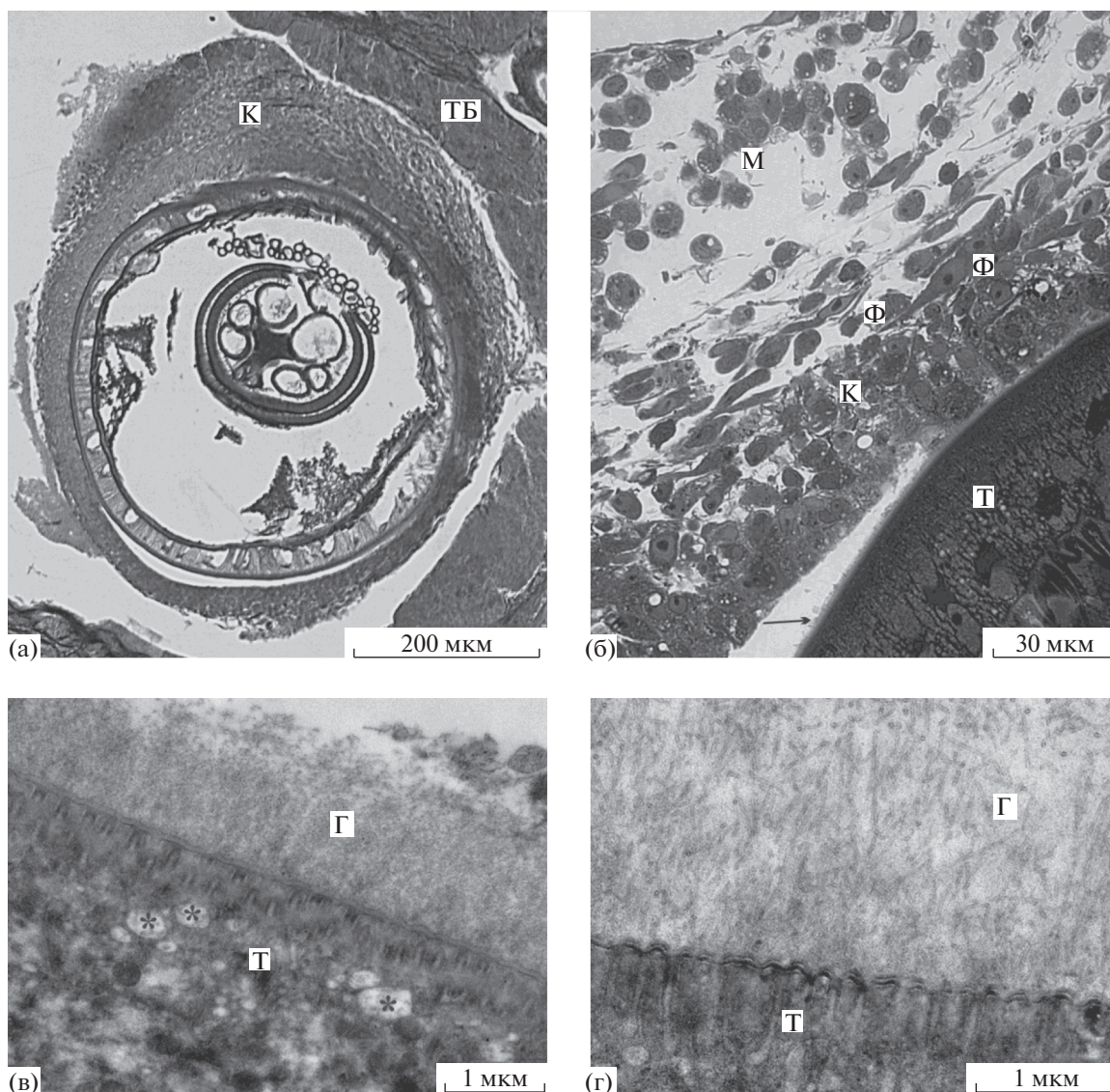


Рис. 5. Скребень *Corynosoma strumosum* на брыжейке кишечника толстошека Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* через тридцать суток после заражения. (а) – Общий вид скребня в капсуле, наиболее толстой в участке, обращенном к ткани брыжейки; (б) – фрагмент капсулы, образованной не только лейкоцитами и макрофагами, но и фибробластами; на поверхности тегумента заметен слой гликокаликса (стрелка); (в) – гликокаликс, образованный тонко волокнистым материалом; элементы везикулярного слоя тегумента расширены (*); (г) – трубочки в составе гликокаликса. Г – гликокаликс, К – капсула, М – макрофаги, Т – тегумент скребня, ТБ – ткань брыжейки, Ф – фибробласты.

Структура капсулы. В составе капсул обнаружены многочисленные макрофаги, нейтрофилы и фибробласты, в значительно меньшем количестве наблюдались эозинофилы, лимфоциты и эритроциты. Плотность расположения клеток в капсуле меняется от плотной в ее внутренней части до рыхлой в среднем и поверхностном слоях (рис. 5б). Строение клеточных элементов сходно с описанным на предыдущих сроках эксперимента. Фибробласты – крупные ($17.7\text{--}24.0 \times 3.3\text{--}6.6$ мкм) вытянутые клетки с овальным ядром, включающим 1–2 ядрышка. Межклеточный материал в этих капсулах представлен только коллагеновыми во-

локнами, организованными в виде более толстых, чем у 14-дневных капсул пучков, хорошо выявляемых на гистологических препаратах. Их количество заметно увеличивается в участках, в которых капсула прилегает к брыжейке хозяина.

Срок заражения 50 суток. Спустя 50 сут после заражения вскрыто 7 толстошеков. У двух из них найдено по 1 скребню, у трех – по 3, у одного – 2 и еще у одного – 4. Большинство скребней располагалось на брыжейке кишечника, по одному скребню обнаружено на печени (№ 22) и селезенке (№ 19) и пять скребней – на брюшной стенке. В

одном случае (№ 21) в одной капсуле располагались два скребня, в другом (№ 23) — три.

Особенности строения тегумента. Микроскопически и электронно-микроскопически изучены два скребня. Заметных различий в строении тегумента этих скребней по сравнению с червями из естественно инвазированных толстощек не обнаружено. Однако в строении гликокаликса наблюдались различия. У червя из рыбы № 17 гликокаликс имел толщину не менее 2 мкм и был образован нежными переплетающимися филаментами с включением скоплений мелких пузырьков, диаметром до 50 нм (рис. 6г). В основании слоя гликокаликса на расстоянии не более 0.1 мкм от поверхности тегумента наблюдалась сплошная полоска умеренно плотного материала (рис. 6г). Форма полоски была правильно волнистой, вероятно, повторяющей очертание поверхности тегумента. Ее максимальная толщина составляла 0.3 мкм. Другой исследованный скребель, извлеченный из рыбы № 22, не был покрыт толстым слоем гликокаликса, и клетки капсулы контактировали непосредственно с поверхностью его тегумента (рис. 6в).

Структура капсулы. Все исследованные скребни имели инвагинированный хоботок и были окружены сплошной толстой капсулой, клеточный состав которой был в целом сходен с таковым 30-дневных капсул и визуально отличался несколько большим количеством коллагеновых волокон (рис. 6а–6в). Толщина капсулы на разных органах была примерно одинаковой и составляла 87–116 мкм. Клетки в капсулах располагаются либо плотно, либо между ними видны небольшие межклеточные пространства (рис. 6б). Как и 30-дневные капсулы, 50-дневные образованы преимущественно макрофагами, лейкоцитами и фибробластами (рис. 6в); межклеточное вещество представлено только коллагеновыми волокнами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было показано, что тегумент скребня *Corynosoma strumosum* в естественных паратенических хозяевах многих видов покрыт толстым слоем гликокаликса (Никишин, Скоробрехова, 2007; Skorobrechova, Nikishin, 2011; Скоробрехова, Никишин, 2013). Коринозома из толстощека, изученные в первом сообщении, не являются исключением и также характеризуются наличием такого же слоя гликокаликса. Результаты, полученные в описанном здесь эксперименте, свидетельствуют, что этот гликокаликс формируется уже в течение первых трех суток инвазии. Если же принять во внимание время, необходимое для проникновения скребня из кишечника в полость тела паратенического хозяина, то период формирования этого гликокаликса на поверхности паразита должен быть еще меньшим.

Факт реформирования гликокаликса в обсуждаемом эксперименте представляется наиболее вероятным. Известно, что в его состав входят, преимущественно, кислые и нейтральные мукополисахариды, а также гликопротеиды (Bennett, 1963; Ito, 1969, 1974). Поэтому при попадании коринозома в паратенического хозяина гликокаликс, покрывающий скребня в предыдущем хозяине, должен разрушаться под воздействием пищеварительных ферментов. Следовательно, в нашем эксперименте толстый слой гликокаликса на поверхности коринозома, по всей вероятности, формируется заново, а не сохраняется от предыдущей стадии развития. В пользу этого предположения свидетельствуют также факты отсутствия гликокаликса у коринозом в процессе их миграции сквозь стенку кишечника паратенического хозяина (Skorobrechova *et al.*, 2012), а также частичной его утраты при последовательном моделировании сред желудка и двенадцатиперстной кишки в случаях с цистицеркоидами цестод (наши неопубликованные данные). Более детальное обсуждение факта новообразования гликокаликса выполнено нами ранее (Никишин, 2018).

Механизм формирования гликокаликса ранее был изучен с применением метода радиоавтографии на примере эпителия кишечника крысы (Bennett, 1970; Bennett, Leblond, 1970). В частности, этими авторами показано, что после инъекции животному углеводов, меченных тритием, они через какое-то время скапливаются в комплексе Гольджи, из которого в виде везикул поступают к апикальной клеточной мембране, и затем наблюдаются среди микроворсинок в слое гликокаликса. Сходный процесс перемещения везикул по цитоплазматическим мостикам из цитонов тегумента в его дистальную часть и затем на поверхность паразита мы наблюдали в стенке цисты цистицеркоидов некоторых цестод (Краснощеков, Никишин, 1979). Похожие мелкие везикулы обнаруживались в настоящем исследовании на третьи сутки эксперимента в слое гликокаликса на поверхности коринозом, а также в терминальных расширениях “каналов” поперечно-полосатого слоя тегумента. Эти факты, а также характер расположения этих везикул в виде относительно небольших скоплений свидетельствуют об их вероятном образовании в тегументе скребня и выделении на его поверхность через “каналы” поперечно-полосатого слоя. Косвенным подтверждением этих предположений является заметное расширение устьев “каналов” поверхностного слоя тегумента. По аналогии с вышеприведенным предположением (Bennett, 1970; Bennett, Leblond, 1970) можно предполагать, что эти везикулы, как в случае со скребнями, так и в случае с цистицеркоидами, могут быть связаны с формированием слоя гликокаликса на поверхности коринозом.

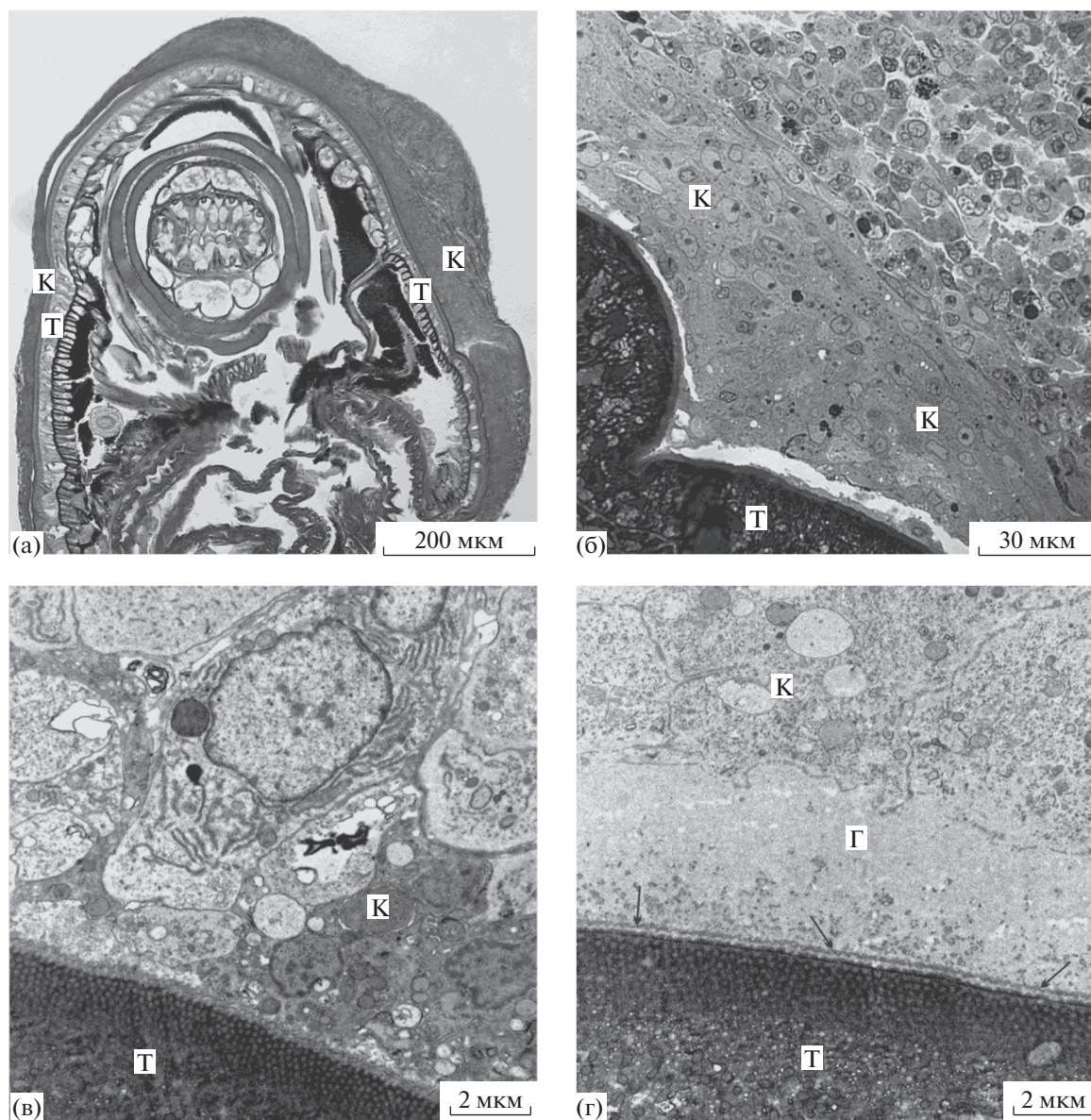


Рис. 6. Скребень *Corynosoma strumosum* на брыжейке кишечника толстошеса Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* через 50 суток после заражения. (а) – Общий вид скребня в капсуле; (б) – фрагмент капсулы, в составе которой преобладают лейкоциты; (в) – скребень, на поверхности которого отсутствует типичный слой гликокаликса, и клетки капсулы контактируют с поверхностью тегумента; (г) – на поверхности скребня имеется типичный толстый слой гликокаликса, включающий также скопления пузырьков; в основании гликокаликса имеется полоска электронно-плотного материала (стрелки). Г – гликокаликс, К – капсула, Т – тегумент скребня.

Необычным является факт обнаружения в гликокаликсе этих же скребней обширных скоплений трубочек. Для его интерпретации в настоящее время данных явно недостаточно. Можно отметить, однако, что, во-первых, по своему диаметру эти трубочки почти не отличаются от типичных микротрубочек, имеющих в цитоплазме многих клеток (см. Ченцов, 2005), а во-вторых, диаметры микротрубочек и выше упомянутых везикул почти идентичны, что позволяет предполагать их генетическое сходство. Мы предполагаем, что эти

трубочки, как и везикулы, выделяются из “каналов” поперечно-полосатого слоя тегумента и каким-то образом связаны с формированием толстого слоя гликокаликса.

Еще более затруднительна интерпретация трех других особенностей в организации гликокаликса у исследованных скребней. Во-первых, упомянутые скопления трубочек обнаруживались не только в самом начале эксперимента (у трехсуточных скребней), но и на всех других исследованных стадиях. Если принять во внимание предполагаемое

участие трубочек в формировании толстого слоя гликокаликса на поверхности тегумента (а оно весьма вероятно), то обсуждаемая особенность предполагает продолжение процесса формирования гликокаликса на протяжении всего периода эксперимента.

Второй трудно интерпретируемой особенностью гликокаликса является его частичное отделение от поверхности тегумента у некоторых трех- и четырнадцатидесяти-суточных скребней; при этом его слой сохранял свою непрерывность. Этот процесс можно было бы рассматривать как выражение некоей патологии, тем более, что у одного из исследованных пятидесяти-суточных скребней толстый слой гликокаликса на поверхности тегумента полностью отсутствовал. Однако, поскольку одной из наиболее вероятных предполагаемых функций гликокаликса является защитная (см. обзоры Никишин, 2016, 2018), более приемлемым, на наш взгляд, является предположение о периодической смене (частичной или полной) гликокаликса на начальном этапе инвазии паратенического хозяина. Это предположение хорошо согласуется с возможным участием вышеупомянутых везикул и трубочек в образовании этого гликокаликса, которые наблюдались у скребней на всех сроках эксперимента. Кроме того, таким способом паразит может избавляться от негативного материала, накопленного в гликокаликсе в результате противодействия иммунному ответу хозяина на инвазию.

Наконец, третьей особенностью гликокаликса, отмечаемой впервые, является волнистая полоска материала повышенной электронной плотности, обнаруженная в его основании в близости от поверхности тегумента у пятидесяти-суточных червей. По внешнему виду она несколько напоминает внутренний слой цисты, одноразово секретлируемый поздними акантеллами из “каналов” поперечно-полосатого слоя тегумента (Nikishin, 1992), или же может представлять собой отделившийся внутренний слой гликокаликса, который обычно прилежит к тегументу вплотную (Никишин, 2016, 2018) и который хорошо виден на рис. За в первом сообщении. Для проверки этих версий необходимы дальнейшие исследования.

Полученные результаты свидетельствуют, что процесс инкапсуляции скребня *Corynosoma strumosum* в толстошке Миддендорфа начинается с интенсивной миграции к паразиту лейкоцитов и макрофагов. Этот результат сходен с большинством ранее полученных данных об инкапсуляции гельминтов во вторых промежуточных хозяевах. Так, основу молодых капсул, окружающих плероцеркоидов цестод *Ligula intestinalis* в мальках плотвы, инвазированных естественным путем, составляли клетки воспалительного ряда (Hoole, Arme, 1982, 1983a). При имплантации, в том числе и перекрестной, плероцеркоидов этого вида в плотву

или пескарей также не отмечались фибробласты и пучки коллагеновых волокон (Hoole, Arme, 1983b). В экспериментально зараженных золотых карасях метацеркарии трематод *Ribeiroia marini* на ранней стадии инкапсуляции окружались макрофагами, гранулоцитами и лимфоцитами, а фибробласты включались в состав капсулы лишь на третьи сутки эксперимента (Huizinga, Nadakavukaren, 1997).

В то же время, инкапсуляция метацеркарий *Posthodiplostomum cuticola*, паразитирующих в воле, начинается с отложения одного-двух слоев фибробластов (Березанцев, Добровольский, 1968), при этом наличие в составе капсул лейкоцитов не отмечено. Это различие можно объяснить тем, что капсула, окружающая этих трематод, возможно является фибробластической, процесс образования которой может отличаться от такового лейкоцитарной капсулы. В нашем исследовании немногочисленные фибробласты впервые наблюдались в составе капсулы только на четырнадцатый день эксперимента, и затем их количество возрастало. Увеличивалось и количество коллагеновых фибрилл, причем большая их часть наблюдалась в дистальной половине капсулы, что соответствует схеме расположения коллагена в капсулах из толстошек, зараженных естественным образом.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить следующую схему инкапсуляции коринозома в толстошке Миддендорфа. В течение первых трех дней заражения скребень проникает сквозь стенку кишечника хозяина, локализуется на каком-либо его органе и покрывается слоем гликокаликса. В это же время из окружающих скребня тканей хозяина мигрируют макрофаги и лейкоциты, контактирующие со слоем гликокаликса на поверхности червя. В дальнейшем часть из них, очевидно, гибнет в результате этого взаимодействия, и их остатки образуют внутренний слой, обнаруживаемый у более “возрастных” капсул. По истечении двух недель после заражения в формирующуюся капсулу мигрируют фибробласты, но продолжается также и миграция лейкоцитов. К 50-му дню эксперимента миграция в капсулу лейкоцитов и фибробластов продолжается, но клетки в толще капсулы располагаются плотнее, а оставшиеся межклеточные пространства заполняются коллагеновыми фибриллами, синтезированными фибробластами.

Заметных различий в характере образования капсул, локализующихся на разных органах хозяина, не выявлено. В то же время, участки скребней, ближе других расположенные к прилегающей ткани хозяина, покрываются его клетками быстрее, чем отдаленные, и капсула в этих участках, как правило, имеет большую толщину.

* * *

Экспериментальное изучение процесса инкапсуляции скребней в морских рыбах — естественных паратенических хозяевах скребня *Corynosoma strumosum* — проведено впервые. Обнаружено, что уже на третьи сутки на поверхности скребня формируется типичный толстый слой гликокаликса. С этим процессом, по всей вероятности, связаны мелкие везикулы и микротрубочки, обнаруживаемые в составе гликокаликса и, вероятно, секретлируемые через расширенные устья “каналов” поперечно-полосатого слоя тегумента. Явление отслоения участков гликокаликса от поверхности тегумента, возможно, является следствием его взаимодействия с макрофагами хозяина.

В процессе инкапсуляции паразита можно выделить три этапа. На первом к скребню мигрируют макрофаги и лейкоциты, часть из которых гибнет, по-видимому, в результате взаимодействия с гликокаликсом червя. Через две недели к мигрирующим макрофагам и лейкоцитам добавляются фибробласты и появляются первые пучки коллагеновых волокон. Через пятьдесят дней инвазии количество коллагеновых волокон в составе капсулы значительно увеличивается, организация клеточных элементов в ней становится более плотной, и по своему строению она приближается к капсулам из толстощек, инвазированных естественным образом.

Работа выполнена в рамках государственного задания “Таксономическое, морфологическое и экологическое разнообразие гельминтов позвоночных животных Северной Азии” (ААА-А17-117012710031-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Березанцев Ю.А., Добровольский А.А. Процессы инкапсуляции метацеркариев трематод *Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832) (Dubois, 1936) в рыбах // Тр. Астраханского заповедника: сборник гельминтологических работ. 1968. № 11. С. 7–12.
- Краснощекоев Г.П., Никишин В.П. Ультраструктура стенки цисты метацистод *Aploparaksis polystictae* (Schiller, 1955) и *A. furcigera* (Cestoda, Cyclophyllidae) // Паразитология. 1979. Т. 13. № 3. С. 250–256.
- Никишин В.П. Морфофункциональное разнообразие гликокаликса у ленточных червей // Успехи соврем. биол. 2016. Т. 136. № 5. С. 506–526.
- Никишин В.П. Модификации гликокаликса скребней // Известия РАН. Сер. биол. 2018. № 1. С. 42–54. <https://doi.org/10.7868/S000233291801006X>
- Никишин В.П., Скоробрехова Е.М. Инкапсуляция скребней *Corynosoma* sp. в резервуарных хозяевах двух видов // Докл. Академии наук. 2007. Т. 417. № 4. С. 566–569. <https://doi.org/10.1134/S0012496607060154>
- Никишин В.П., Скоробрехова Е.М. Две стратегии взаимоотношений скребней с паратеническими хозяевами // Зоологический журн. 2018. Т. 97. № 9. С. 1100–1109. <https://doi.org/10.1134/S0044513418090106>
- Скоробрехова Е.М., Никишин В.П. Зависимость строения капсулы, окружающей скребня *Corynosoma strumosum*, от видовой принадлежности естественного паратенического хозяина // Известия РАН. Сер. биол. 2013. № 6. С. 696–712. <https://doi.org/10.7868/S0002332913050160>
- Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М.: “Академкнига”, 2005. 495 с.
- Шарпило В.П. О способности акантелл рода *Centro-rhynchus* (Acanthocephala, Gigantorhynchidae) к прохождению через резервуарных хозяев // Мат. научной конф. Всесоюз. общества гельминтологов. М.: Б. и. 1965. Ч. 4. С. 312–317.
- Шарпило В.П. Использование резервуарных хозяев для аккумуляции и хранения инвазионных личинок гельминтов // Паразитология. 1971. Т. 5. № 1. С. 88–91.
- Bennett H.S. Morphological aspects of extracellular polysaccharides // J. Histochem. Cytochem. 1963. V. 11. № 1. P. 14–23. <https://doi.org/10.1177/11.1.14>
- Bennett G. Migration of glycoprotein from Golgi apparatus to cell coat in the columnar cells of the duodenal epithelium // J. Cell Biol. 1970. V. 45. № 3. P. 668–673. <https://doi.org/10.1083/jcb.45.3.668>
- Bennett G., Leblond C.P. Formation of the cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine, as visualized by radioautography with L-fucose-³H // J. Cell Biol. 1970. V. 46. № 2. P. 409–416. <https://doi.org/10.1083/jcb.46.2.409>
- Hoole D., Arme, C. Ultrastructural studies on the cellular response of roach, *Rutilus rutilus* L., to the plerocercoid larva of the pseudophyllidean cestode, *Ligula intestinalis* // J. Fish Diseases. 1982. V. 5. № 2. P. 131–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1982.tb00466.x>
- Hoole D., Arme C. *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidae): an ultrastructural study of the cellular response of roach fry *Rutilus rutilus* // Intern. J. Parasitol. 1983a. V. 13. № 4. P. 359–365. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(83\)80041-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(83)80041-1)
- Hoole D., Arme C. Ultrastructural studies on the cellular response of fish hosts following experimental infection with the plerocercoid of *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidae) // Parasitology. 1983b. V. 87. № 1. P. 139–149. <https://doi.org/10.1017/S0031182000052483>
- Huizinga H.W., Nadakavukaren M.J. Cellular response of goldfish, *Carassius auratus* (L.), to metacercariae of *Ribeiroia marini* (Faust and Hoffman, 1934) // J. Fish Diseases. 1997. V. 20. № 6. P. 401–408. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00311.x>
- Ito S. Structure and function of the glycocalyx // Federation Proc. 1969. V. 28. P. 12–25.

- Ito S.* Form and function of the glycocalyx on free cell surfaces // *Philosoph. Transact. Royal Society. B. Biol. Sci.* 1974. V. 268. № 891. P. 55–66.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1974.0015>
- Nikishin V.P.* Formation of the capsule around *Filicollis anatis* (Acanthocephala) in its intermediate host // *J. Parasitology.* 1992. V. 78. № 1. P. 127–137.
- Skorobrechova E., Nikishin V.* Structure of capsule surrounding acanthocephalans *Corynosoma strumosum* in paratenic hosts of three species // *Paras. Res.* 2011. V. 108. № 2. P. 467–475.
<https://doi.org/10.1007/s00436-010-2088-3>
- Skorobrechova E., Nikishin V., Lisitsyna O.* Structure of the capsule around acanthocephalan *Corynosoma strumosum* from uncommon paratenic hosts – lizards of two species // *Parasitology Res.* 2012. V. 110. № 1. P. 459–467.
<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2512-3>

Structure and Formation of a Capsule Around the Acanthocephalan *Corynosoma strumosum* in a Natural Paratenic Host – Fish *Hadropareia middendorffii*. 2. Experimental Study of the Encapsulation Process (Preliminary Results)

E. M. Skorobrechova¹ and V. P. Nikishin^{1, #}

¹*Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, Portovaya str. 18, Magadan, 685000 Russia*

[#]*e-mail: nikishin@ibpn.ru*

For the first time, the process of encapsulation of acanthocephalans in a paratenic host has been experimentally investigated. It was shown that the formation of a leukocytic capsule around the acanthocephalan of *Corynosoma strumosum* in the Middendorff's eelpout *Hadropareia middendorffii* occurs in three stages. In the first days after the penetration of the acanthocephalan into the body cavity of the host, migration to the parasite of leukocytes, including macrophages, is observed. Two weeks later, a few fibroblasts and collagen fibers are included in the capsule, the number of which further increases. Fifty days after the start of encapsulation, a significant number of fibroblasts/fibrocytes and bundles of collagen fibers are found in the composition of the capsule, together with leukocytes, and in its cellular composition it does not differ from that described from Middendorff's eelpout infected naturally. In response to the host's cellular response, the parasite forms a typical thick glycocalyx layer on its surface.

Keywords: acanthocephalan, paratenic host, capsule formation, glycocalyx

УДК 597.553.2.591.5

ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ТИПОВ РЕОРЕАКЦИИ У РЫБ ПРИ ГОЛОДАНИИ

© 2021 г. Д. С. Павлов*, В. В. Костин*[@], В. Ю. Паршина*, Е. Д. Павлов*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

[@]E-mail: povedenie@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2020 г.

После доработки 09.12.2020 г.

Принята к публикации 09.12.2020 г.

Проведен анализ изменения мотивационной компоненты реореакции (соотношения типов реореакции) при голодании у ряда видов рыб. Показано, что характер изменения мотивационной компоненты реореакции у рыб в ответ на голодание во многом определяется наличием у них перед голоданием мотивации к миграции. У всех исследованных рыб семейств Cyprinidae и Salmonidae с изначально резидентным поведением наблюдается однотипный ответ на голодание: на 2-е–5-е сутки у них увеличивается предпочтение к движению по течению, а на 7-е–12-е сутки увеличивается предпочтение к движению против течения, и соотношение типов реореакции приближается к исходному. У молоди черноморской кумжи (*Salmo trutta labrax*) с мотивацией к покатной миграции наблюдается иной ответ на голодание — начиная с двух суток монотонно увеличивается движение особей по течению.

DOI: 10.31857/S1026347021040119

Реореакция (отношение рыб к течению) — это врождённая реакция, связанная с жизнью рыб в подвижной среде. Она проявляется в выборе рыбами участка водоема с оптимальными (для актуального поведения) скоростями течения и вектора собственного движения в нем. Реореакция является одним из основных механизмов поведения рыб в текучих водоемах, в том числе, их распределения, миграций и кочевков (Павлов 1979; Павлов и др., 2007).

Проявление реореакции определяют три компоненты: ориентационная (восприятие стимула), мотивационная (выбор типа реореакции), локомоторная (реализация реореакции выбранного типа) (Павлов, 1979; Pavlov *et al.*, 2010; Павлов и др., 2020б). К показателям мотивационной компоненты относятся: реопреферендум рыб (выбор канала с течением или без него), избираемые скорости течения в реоградиенте (Павлов, 1979), соотношение типов реореакции (Maclean, Gee, 1971; Pavlov *et al.*, 2010; Павлов и др., 2020 б). Рассмотрены три типа реореакции: положительный (ПТР) — движение против течения; отрицательный (ОТР) — движение по течению; компенсаторный (КТР) — сохранение своего положения относительно неподвижных ориентиров. Эти типы отношения рыб к течению отметили и другие авторы (Johnston *et al.*, 2017).

Изменения реореакции под воздействием различных факторов среды имеют разные причины. Известно, что мотивационная компонента реоре-

акции в период миграции молоди с нерестилищ к местам нагула быстро (минуты, часы) и кардинально изменяется в зависимости от освещенности (Павлов и др., 2007; Павлов и др., 2019) и химического состава воды (Звездин, 2016). В этих случаях особи постоянно находятся в миграционном состоянии, а изменение реореакции определяется сменой их актуального поведения, например, контранатантной миграции на денатантную у молоди нерки *Oncorhynchus nerka* при отсутствии “запаха озера” или смене в сумерки резидентного поведения на миграционное у молоди многих видов при покатной миграции в реке. Кроме того, реореакция молоди изменяется при длительном воздействии неблагоприятных факторов различной природы. В этом случае у рыб, которые изначально были без мотивации к миграции, изменение реореакции определяется формированием миграционного состояния (Павлов и др., 2010; Пономарева, 2014).

В естественных условиях трофический фактор является наиболее частой причиной кочевков и миграций рыб (Olsson *et al.*, 2006; Павлов и др., 2007; Flecker *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 2019). При голодании рыб происходит быстрое (дни, недели) формирование миграционного поведения, что изменяет их реореакцию (Павлов и др., 2010). При этом у рыб модифицируются все три компоненты реореакции. В ряде специальных исследований были изучены изменения ориентационной (Gaffron, 1934; Harden Jones, 1963; Павлов, 1979) и

локомоторной (Этинген, 1964; MacLeod, 1967; Laurence, 1972; Сабуренков, 1973; Павлов, 1979 и др.) компонент реореакции рыб под влиянием голода. Специальных исследований изменения количественных параметров мотивационной компоненты реореакции рыб в литературе нами не найдено. Некоторые сведения о ее изменении получены при исследовании физиологических и поведенческих механизмов миграционного поведения рыб (Павлов, 1979; Павлов и др., 2007; 2010; 2016 и др.).

Цель данной работы — экспериментальная оценка динамики соотношения типов реореакции при голодании рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили в лаборатории ИПЭЭ РАН в 2018 г. Использовали особей 4-х видов рыб: верховка (*Leucaspius delineatus*), средняя длина тела 31.7 ± 0.25 (28–36) мм; данио рерио (*Danio rerio*) 26.5 ± 0.27 (24–33) мм; серебряный карась (*Carassius auratus*) 94.6 ± 1.14 (78–116) мм; микижа (радужная форель, *Parasalmo mykiss* (= *Oncorhynchus mykiss*)) 105.6 ± 0.97 (88–120) мм. Латинские названия видов приводятся по (Аннотированный каталог..., 1998). Верховку отловили мальковой волокушей в речках, а карася — в прудах Ярославской обл. Радужная форель была взята на подмосковном рыбопроизводном заводе. Данио рерио (беспородные) взяты из аквариальной ИПЭЭ РАН.

До начала экспериментов рыб кормили один раз в сутки, давая избыточное количество корма. Данио рерио и верховке давали корм для аквариумных рыб Prodac Tropical Fish Flakes, а радужной форели и серебряному карасю — искусственный корм BioMar. После начала экспериментов кормление рыб полностью прекращали, последний раз рыб кормили в 0-е сутки за час до начала тестирования. Рыб содержали в аэрируемых аквариумах при плотности посадки: 1 экз/7 л воды (данио рерио и верховка) и 1 экз/10 л воды (карась и радужная форель). Температуру поддерживали с помощью терморегулятора на уровне 18°C (карась, радужная форель, верховка) и 22°C (данио рерио). Освещенность в лаборатории с 10 до 19 ч составляла 450–500 лк; в остальное время суток искусственное освещение выключали.

Для определения соотношения типов реореакции использовали прямоточные гидродинамические установки типа “Рыбоход”, позволяющие определять три типа реореакции — ПТР, КТР и ОТР (Pavlov *et al.*, 2010). Такая установка представляла собой лоток, разделенный поперечными перегородками на 9 отсеков, средний отсек (№ 5) был стартовым. В зависимости от размера рыб использовали два варианта установки: для серебряного карася и радужной форели длина “Рыбохо-

да” составляла 200 см, ширина — 60 см; для данио рерио и верховки — 110 и 20 см соответственно.

Опыты проводили на группах из 6 рыб. В начале эксперимента рыб помещали в стартовый отсек (№ 5), предварительно изолированный съемными сетками. После 20 мин акклимации снимали сетки стартового отсека, и начинался опыт. Через 30 мин подсчитывали число рыб в отсеках установки.

Для сравнимости с предыдущими публикациями опыты проводили на 0-е, 2-е, 5-е, 7-е, 10-е и 12-е сутки после последнего кормления.

На рыбах каждого вида было проведено по 60 опытов и использовано по 60 экз.

По экспериментальным данным рассчитывали частоты проявления каждого типа реореакции:

$$\begin{aligned} \text{ПТР} &= \sum n_i / N; \quad \text{КТР} = n_5 / N; \\ \text{ОТР} &= \sum n_j / N, \end{aligned}$$

где: N — число исследованных рыб, экз., n_i — число рыб в 1–4 отсеках рыбохода, экз., n_5 — число рыб в 5 отсеке (стартовом), экз., n_j — число рыб в 6–9 отсеках, экз., i, j — номер отсека в диапазоне 1–4 и 6–9 соответственно.

Кроме соотношения типов реореакции рассчитывали и индекс контрагентности (I_k), который отражает соотношение динамических типов реореакции (ПТР и ОТР). Индекс контрагентности оценивает перемещение рыб относительно стартового отсека, приведенное к шкале $-1 \dots +1$. Расчет этого показателя проводили по формуле:

$$I_k = \sum (n_i(N_{\text{эс}} - i)) / N(N_{\text{эс}} - 1),$$

где: n_i — число рыб в отсеке № i , № s — номер стартового отсека, i — номер отсека, N — число всех рыб в эксперименте.

Кроме того, для анализа и обобщения результатов в работе использованы исходные данные по контрольным особям, полученные нами в исследованиях физиолого-биохимических механизмов миграций кумжи (*Salmo trutta*), черноморской кумжи (*Salmo trutta labrax*) и радужной форели (Павлов и др., 2010, 2018, 2020a; Павлов Е. и др., 2016). Эти особи не были подвергнуты экспериментальному воздействию (гормональными препаратами или лишением доступа к убежищам) ни до начала, ни в течение голодания.

Для статистического анализа использовали непараметрический дисперсионный анализ (H -критерий Краскела–Уоллиса) с использованием результатов каждого опыта и критерий Стьюдента для долей (Лакин, 1973), введенный по суммарным данным для каждого вида. Как и любые соотношения, соотношения типов реореакции достоверно различаются, когда достоверно различаются частоты проявлений хотя бы одного из типов реореакции.

Таблица 1. Частота проявления типов реореакции в “Рыбоходе” при голодании у 4-х видов рыб

Вид рыб	Сутки голодания	ПТР	КТР	ОТР
<i>D. rerio</i>	0	40.0	3.3	56.7
	2	16.7	3.3	80.0
	5	31.7	1.7	66.7
	7	35.0	8.3	56.7
	10	31.7	0.0	68.3
	12	45.0	3.3	51.7
<i>P. mykiss</i> (= <i>O. mykiss</i>)	0	45.0	15.0	40.0
	2	28.7	10.0	61.3
	5	23.3	13.3	63.3
	7	40.0	21.7	38.3
	10	38.3	6.7	55.0
	12	46.7	1.7	51.7
<i>L. delineatus</i>	0	48.3	3.3	48.3
	2	33.3	3.3	63.3
	5	23.3	1.7	75.0
	7	33.3	3.3	63.3
	10	48.3	0.0	51.7
	12	40.0	0.0	60.0
<i>C. auratus</i>	0	43.3	16.7	40.0
	2	45.0	5.0	50.0
	5	36.7	5.0	58.3
	7	66.7	3.3	30.0
	10	51.7	10.0	38.3
	12	46.7	0.0	53.3

Примечание. Выделены частоты ОТР, которые достоверно ($p \leq 0.021$) отличаются от соответствующей частоты ПТР по критерию Стьюдента для долей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Непараметрический дисперсионный анализ (H -критерий Краскела–Уоллиса) показал, что голодание достоверно ($p < 0.05$) влияет на частоту проявления динамических типов реореакции (ПТР, ОТР), но не КТР ($p = 0.46$). Не выявлено достоверного совместного влияния двух факторов (вида рыб и длительности их голодания) на рассматриваемые показатели. То есть при голодании характер изменения соотношения типов реореакции сходен у рыб исследованных видов.

У неголодавших рыб (0-е сутки, табл. 1) преобладают динамические типы реореакции (83.3–96.7%), при этом частоты их проявления (ПТР и ОТР) примерно равны ($p > 0.70$, критерий Стьюдента для долей). Такое соотношение типов реореакции наблюдается у рыб с резидентным поведением, использующих динамический способ сохранения местоположения (Пономарева и др., 2017). Этому соответствует и близкое к нулю зна-

чение индекса контранатантности. В естественных условиях такое соотношение типов реореакции наблюдалось у немигрирующих рыб (Павлов и др., 2010, 2020б; Pavlov *et al.*, 2010). Следовательно, у подопытных рыб до начала голодания не было миграционного состояния – в экспериментальной установке они проявляли резидентное поведение с динамическим способом сохранения местоположения.

На вторые–пятые сутки голодания у всех исследованных рыб частота ОТР стала больше, чем ПТР (табл. 1). Такое соотношение типов реореакции в естественных условиях указывает на перемещение (миграцию или откочевку) рыб по течению (Pavlov *et al.*, 2010; Павлов и др., 2010, 2020б; Звездин, 2016). Затем у рыб повышалась мотивация к движению против течения. В результате на 7-е–12-е сутки голодания у исследованных рыб соотношение типов реореакции приближалось к

Таблица 2. Средние по суткам голодания индексы контранатантности у исследованных рыб

Вид рыб	Длительность голодания, сут.					
	0	2	5	7	10	12
<i>L. delineatus</i>	−0.01	−0.28	−0.47	−0.20	0.00	−0.06
<i>D. rerio</i>	−0.14	−0.59	−0.23	−0.15	−0.05	0.00
<i>P. mykiss</i> (= <i>O. mykiss</i>)	0.00	−0.38	−0.21	−0.11	−0.22	0.01
<i>C. auratus</i>	0.10	−0.14	0.03	0.19	0.08	−0.03
<i>P. mykiss</i> (= <i>O. mykiss</i>) (Павлов и др., 2020а)	−0.14	−0.57	−0.30	−0.23	−0.25	0.05
<i>P. mykiss</i> (= <i>O. mykiss</i>) (Павлов Е. и др., 2016)	0.13	−0.21	−0.20	−0.03	−0.15	0.00
<i>S. trutta labrax</i> (Павлов и др., 2010)	−0.08	−0.18	−0.22	−0.09	−0.01	–
<i>S. trutta</i> (Павлов и др., 2018)	−0.43	−0.62	−0.68	−0.58	−0.42	–

Примечание. Прочерк – нет данных.

своему начальному значению, и разница в частотах ПТР и ОТР вновь стала недостоверной (табл. 1).

Индекс контранатантности (I_k) дает наиболее наглядную оценку динамики изменения поведения рыб, связанного с миграциями. В табл. 2 представлены как результаты данной работы, так и ранее полученные на особях радужной форели, кумжи и ее подвида – черноморской кумжи (Павлов и др., 2010, 2018, 2020а; Павлов Е. и др., 2016). Для всех рыб характерно в начале голодания увеличение мотивации к движению по течению, а затем – против течения. К концу эксперимента I_k приближается к исходным значениям.

Дисперсионный анализ показал, что I_k , как и соотношение типов реореакции зависит: а) от длительности голодания ($p = 0.002$), что указывает на изменение средней (по видам) величины I_k в течение опыта; б) от вида рыб ($p = 0.006$), т.е. средняя (за все сутки голодания) величина I_k различна у разных видов (рис. 1а). Совместное влияние двух факторов (вид рыб и длительность голодания) оказалось недостоверным ($p = 0.26$), что свидетельствует о сходной динамике изменения I_k у различных видов рыб при голодании (рис. 1б).

У исследованных рыб в разных масштабах наблюдается сходная динамика I_k . От начала голодания ко 2–5 суткам величина I_k уменьшается, что указывает на преимущественное движение рыб по течению. После достижения минимума I_k , от 2–5 сут к 7–12 сут голодания рыбы начинают больше двигаться против течения, и величина I_k приближается к исходной. В этот период зафиксированы минимальные значения частоты КТР (табл. 1), что свидетельствует о большей подвижности рыб на 7–12 сутки голодания.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате анализа полученных материалов у рыб с исходным резидентным поведением (без

мотивации к миграции) выявлены два этапа поведенческого ответа на голодание. На первом этапе (2–5 сут голодания) у рыб усиливается мотивация к движению по течению, что в естественных условиях обеспечивает их пократную миграцию или откочевку по течению. То есть на первом этапе ответом рыб на голодание является поиск пищи с минимальными затратами энергии. Известно, что недостаток пищи мотивирует молодь рыб к пократным миграциям (Павлов, 1979; Olsson *et al.*, 2006; Павлов Е. и др., 2007; Flecker *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 2019). На втором этапе (7–12 сут голодания) начинает усиливаться мотивация к движению против течения. И это приводит к примерно одинаковому движению рыб по и против течения, при этом у них увеличивается подвижность. То есть на втором этапе ответ рыб на голодание заключается в поиске корма в обоих направлениях относительно течения.

Сроки и характер изменения мотивационной компоненты реореакции при отсутствии корма соответствуют срокам и характеру изменений других компонент реореакции. Например, время начала оптомоторной реакции у молоди ельца (*Leuciscus leuciscus*), не кормленной 48 ч, увеличивалось в 32 раза, а оценка силы реакции значительно снижалась. Аналогичные результаты были получены и на других видах рыб (Павлов, 1979). При голодании также изменяется и локомоторная компонента реореакции рыб. В экспериментах первоначальной реакцией на снижение рациона было повышение активности рыб – особи чаще двигались в потоке и реже отдыхали в специальных затишных зонах (Этинген, 1964; Sogard, Olla, 1996). Также на молоди рыб различных видов было показано, что их крейсерские скорости плавания уменьшаются на 1–6 сут голодания (MacLeod, 1967; Павлов, 1979; Laurence, 1972; Faria *et al.*, 2011). У осетровых (Acipenseridae) голодание приводило к снижению числа рыб, активно сопротивлявшихся течению, например, у

молоди севрюги (*Acipenser stellatus*) через один день – до 49%, через 4 дня – до 15–25%, а через 6 дней – до 2% рыб (Павлов, 1979). Бросковые (Сабуренков, 1973) и критические (Faria *et al.*, 2011) скорости течения для молоди рыб не изменяются при голодании до 30 и 3 сут соответственно.

Уменьшение крейсерских скоростей рыб некоторые авторы связывают со снижением выносливости при голодании (Faria *et al.*, 2011), однако это объяснение, по нашему мнению, не всегда обосновано. Для личинок плотвы *Rutilus rutilus* было показано, что на показатели плавательной способности рыб существенное влияние оказывает наличие или отсутствие у них мотивации к покатной миграции. При дневной освещенности, когда в реке нет миграции плотвы, плавательная способность мигрантов была выше, чем у резидентов. А при ночной освещенности, когда в реке идет покатная миграция, плавательная способность мигрантов стала ниже, чем у резидентов (Павлов и др., 2007). На сеголетках плотвы было показано, что у рыб с мотивацией к покатной миграции снижается критическая скорость течения (Костин и др., 2016). Поэтому мы считаем, что снижение экспериментальных показателей плавательной способности рыб при начале голодания может быть вызвано появлением мотивации к движению по течению, а не только изменением их физиологических возможностей. Это согласуется с данными литературы, например, у молоди минтая *Theragra chalcogramma* переход от активного поискового поведения к снижению двигательной активности происходил на 30–54 сутки голодания (Sogard, Olla, 1996).

Ранее нами были получены материалы по влиянию голодания на соотношение типов реореакции у рыб с мотивацией к покатной миграции. На черноморской кумже были проведены исследования по изучению условий формирования жизненных (миграционных) стратегий (Павлов и др., 2010; Пономарева, 2014). Для этого вида генетически детерминирован скат в море части особей из популяции (Jonsson, Jonsson, 2011). При воздействии неблагоприятных условий содержания различной природы у черноморской кумжи начинала формироваться повышенная мотивация к покатной миграции. В этих исследованиях было показано, что у таких рыб наблюдали иной ответ на голодание – начиная со вторых суток монотонно увеличивалась мотивация рыб к движению по течению. Видимо, ответ особей на голодание во многом определяется их мотивацией к миграции, сформировавшейся перед началом голодания.

Таким образом, выявленные изменения мотивационной компоненты реореакции показали, что рыбы без мотивации к миграции сначала будут покидать участок обитания с минимальными затратами энергии – скатываться по течению. С

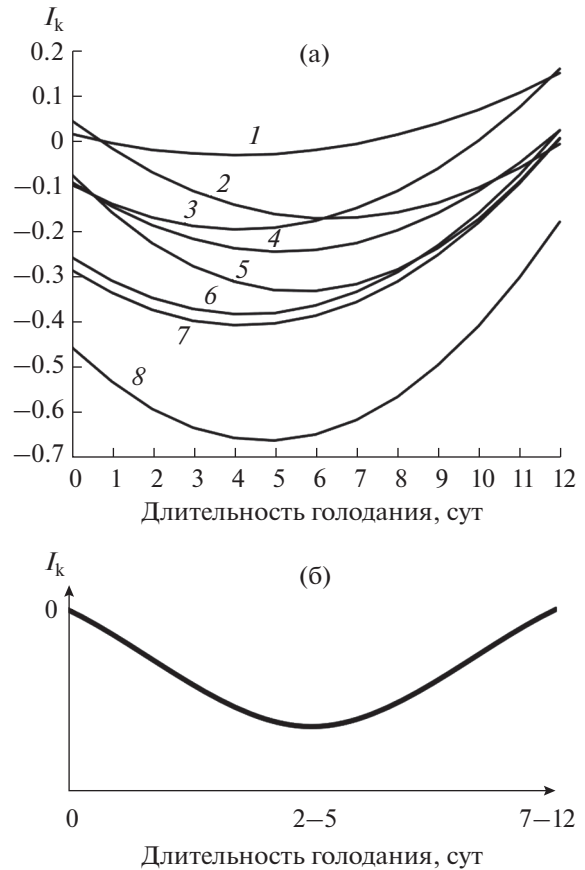


Рис. 1. Изменение индекса контранатантности (I_k) при голодании карповых и лососевых рыб с резидентным поведением до начала голодания. (а) – регрессионные кривые по видам: 1 – *C. auratus*, 2 – *P. mykiss* (= *O. mykiss*) (Павлов Е. и др., 2016), 3 – *S. trutta labrax* (Павлов и др., 2010), 4 – *P. mykiss* (= *O. mykiss*), 5 – *L. delineatus*, 6 – *P. mykiss* (= *O. mykiss*) (Павлов и др., 2020а), 7 – *D. rerio*, 8 – *S. trutta* (Павлов и др., 2018); (б) – общая схема динамики I_k .

увеличением длительности голодания рыбы начнут активный поиск корма, двигаясь как по, так и против течения. У особей с мотивацией к покатной миграции поведение существенно отличается – они будут постоянно скатываться вниз по течению.

Авторы благодарят Д.А. Прозорова за участие в проведении опытов, А.О. Касумяна (МГУ) за ценные замечания по тексту рукописи.

Сбор материала выполнен в 2018 г. при поддержке Программы Президиума РАН № 41 “Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России”, его обработка, анализ и подготовка статьи при финансовой поддержке РФФ (грант 19-14-00015).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России / Под ред. Решетникова Ю.С. М.: Наука, 1998. 218 с.
- Звездин А.О. Реореакция ранней молоди нерки *Oncorhynchus nerka* (Walb.) в период расселения с нерестилищ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 2016. 28 с.
- Костин В.В., Звездин А.О., Павлов Д.С., Голованов В.К., Маврин А.С., Мартемьянов В.И., Капшай Д.С. Сравнение поведенческих и физиолого-биохимических показателей у сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.) из реки Ильдь и Ильдинского залива Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод. 2016. № 3. С. 79–88. <https://doi.org/10.7868/S0320965216030128>
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
- Павлов Д.С. 1979. Биологические основы управления поведением рыб в потоке воды. М.: Наука, 1979. 319 с.
- Павлов Д.С., Лупандин А.И., Костин В.В. Механизмы покатной миграции молоди речных рыб. М.: Наука, 2007. 213 с.
- Павлов Д.С., Костин В.В., Пономарева В.Ю. Поведенческая дифференциация сеголетков черноморской кумжи *Salmo trutta labrax*: реореакция в год, предшествующий смолтификации // Вопр. ихтиологии. 2010. Т. 50. № 2. С. 251–261.
- Павлов Д.С., Павлов Е.Д., Костин В.В., Ганжа Е.В. Реореакция молоди радужной форели при воздействии сурфагона // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 2. С. 110–116. <https://doi.org/10.7868/S0475145016020075>
- Павлов Д.С., Павлов Е.Д., Ганжа Е.В., Зарипов П.И., Костин В.В., Ручьев М.А. Влияние сурфагона на реореакцию молоди кумжи *Salmo trutta* // Вопр. ихтиологии. 2018. Т. 58. № 6. С. 740–744. <https://doi.org/10.1134/S004287521806019X>
- Павлов Д.С., Костин В.В., Звездин А.О., Прозоров Д.А., Подольяко С.А. Реореакция молоди некоторых карповых рыб (*Cyprinidae*) в период осенней контранатантной миграции // Вопр. ихтиологии. 2019. Т. 59. № 6. С. 716–723. <https://doi.org/10.1134/S0042875219060122>
- Павлов Д.С., Павлов Е.Д., Ганжа Е.В., Костин В.В. Изменение реореакции и содержания тиреоидных гормонов в крови молоди радужной форели *Oncorhynchus mykiss* при голодании // Вопр. ихтиологии. 2020а. Т. 60. № 2. С. 229–234. <https://doi.org/10.31857/S0042875220020186>
- Павлов Д.С., Паршина В.Ю., Костин В.В., Прозоров Д.А. Сравнение экспериментальных методов оценки мотивационной компоненты реореакции рыб (соотношения типов реореакции) // Вопросы ихтиологии. 2020б. Т. 60. № 4. С. 643–652. <https://doi.org/10.1134/S0032945220040153>
- Павлов Е.Д., Ганжа Е.В., Пономарева В.Ю., Костин В.В., Павлов Д.С., Во Тху Ха. Влияние метилтестостерона на физиологическое состояние и реореакцию радужной форели *Parasalmo mykiss* (= *Oncorhynchus mykiss*) при неблагоприятных условиях содержания // Вопросы ихтиологии. 2016. Т. 56. № 6. С. 740–752.
- Пономарева В.Ю. Поведенческие механизмы внутрипопуляционной дифференциации молоди некоторых лососевых рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 2014. 28 с.
- Пономарева В.Ю., Павлов Д.С., Костин В.В. Разработка и апробирование методики исследования соотношения типов реореакции рыб в кольцевом гидродинамическом лотке // Биология внутренних вод. 2017. № 1. С. 100–108. <https://doi.org/10.7868/S0320965217010156>
- Сабуренков Е.Н. Скорость и длительность плавания рыб как элементы их поведения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИЭМЭЖ, 1973. 23 с.
- Этинген Р.М. О реакции рыб на течение в зависимости от степени накормленности // Вопросы ихтиологии. 1964. Т. 4. № 4. С. 624–631.
- Faria A., Chicharo M.A., Gonçalves E.J. Effects of starvation on swimming performance and body condition of pre-settlement *Sparus aurata* larvae // Aquat. Biol. 2011. V. 12. P. 281–289. <https://doi.org/10.3354/ab00345>
- Ferguson A., Reed T.E., Cross T.F. et al. Anadromy, potamodromy and residency in brown trout *Salmo trutta*: the role of genes and the environment // J. Fish Biol. 2019. P. 1. <https://doi.org/10.1111/jfb.14005>
- Flecker A.S., McIntyre P.B., Moore J.W., Anderson J.T., Taylor B.W., Hall R.O. Migratory fishes as material and process subsidies in riverine ecosystems // Am. Fish. Soc. Symp. 2010. V. 73. P. 559–592.
- Gaffron M. Untersuchungen über das Bewegungssehen bei Libellenlarven, Fliegen und Fischen // Z. f. vergl. Physiologie. 1934. V.20. P. 299–337. <https://doi.org/10.1007/BF00361440>
- Jonsson B., Jonsson N. Ecology of atlantic salmon and brown trout: habitat as a template for life histories // Fish Fisheries Ser. 2011. V. 33.
- Johnston M.E., Kelly J.T., Lindvall M.E. et al. Experimental evaluation of the use of vision and barbels as references for rheotaxis in green sturgeon // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2017. V. 496. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.04.002>
- Harden Jones F.R. The reaction of fish to moving backgrounds // J. Exp. Biol. 1963. V. 40. № 3. P. 437–446.
- Laurence G.C. Comparative swimming abilities of fed and starved larval largemouth bass (*Micropterus salmoides*) // J. Fish Biol. 1972. V. 4. № 1. P. 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1972.tb05654.x>
- Maclean J.A., Gee J.H. Effect of temperature on movements of pre-spawning brook sticklebacks, *Culaea inconstans*, in the Roseau River, Manitoba // J. Fish. Res. Board Can. 1971. V. 28. P. 919. <https://doi.org/DOI:10.1139/f71-133>
- MacLeod J.C. A new apparatus for measuring maximum swimming speeds of small fish // J. Fish. Res. Board

- Can. 1967. V. 24. № 6. P. 1241–1252.
<https://doi.org/10.1139/f67-106>
- Olsson I.C., Greenberg L.A., Bergman E., Wysujack K.* Environmentally induced migration: The importance of food // *Ecology Letters*. 2006. V. 9. P. 645–651.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00909.x>
- Pavlov D.S., Kostin V.V., Zvezdin A.O., Ponomareva V.Yu.* On methods of determination of the rheoreaction type in fish // *J. Ichthyology*. 2010. V. 50. № 11. P. 977.
<https://doi.org/10.1134/s0032945210110020>
- Sogard S.M., Olla B.L.* Food deprivation affects vertical distribution and activity of a marine fish in a thermal gradient: potential energy-conserving mechanisms // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1996. 133. P. 43–55.
<https://doi.org/10.3354/meps133043>

Modification of the Ratio of Rheoreaction Types in Fish During Starvation

D. S. Pavlov¹, V. V. Kostin^{1, #}, V. U. Parshina¹, and E. D. Pavlov¹

¹*Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

[#]*e-mail: povedenie@yandex.ru*

The analysis of changes in the motivational component of rheoreaction (the ratio of types of rheoreaction) during starvation in some of fish species was carried out. It is established that the primary presence of fish motivation to migrate (before starvation) is the major pattern of the future changes in motivational component of rheoreaction by response to starvation. All studied fish (Cyprinidae and Salmonidae) with initially behavior as resident individuals, had the same type of response to starvation. Their preference for movement with the water flow increases on the 2nd–5th days of starvation, then the preference for movement against flow and the ratio of types of rheoreaction approaches the initial one on the 7th–12th days. In juveniles of the Black Sea salmon (*Salmo trutta labrax*) with motivation of downstream migration, a different response to starvation is observed – the movement of individuals downstream monotonously increased from 2 days after starvation.

УДК 598.288.7:591.582.2

ВОЗРАСТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РЕКЛАМНОЙ ПЕСНИ МУХОЛОВКИ-ПЕСТРУШКИ (*FICEDULA HYPOLEUCA*) В УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННОЙ И ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ

© 2021 г. А. Е. Бастрикова*, @, С. И. Гашков*, Н. С. Москвитина*

*Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия

@E-mail: bastrikova_a_e@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2020 г.

После доработки 23.06.2020 г.

Принята к публикации 04.10.2020 г.

Проанализирована возрастная изменчивость частотных и структурно-временных параметров рекламной песни самцов *Ficedula hypoleuca* в естественных местообитаниях и городской среде. В естественных условиях у самцов с третьего года жизни сокращается диапазон частот песни, понижается ее максимальная частота, уменьшается количество фигур и сокращается длина песни. Аналогичные возрастные изменения песни у птиц в городе отмечаются раньше – со второго года жизни. У городских птиц происходит повышение минимальной частоты песни, адаптирующей ее к условиям шумового загрязнения и усиливающейся с возрастом.

Ключевые слова: *Ficedula hypoleuca*, песня, возрастающая изменчивость, шумовое загрязнение, адаптация

DOI: 10.31857/S1026347021050048

Для птиц из подотряда певчих воробьиных (Oscines) пение имеет большое биологическое значение, являясь одним из ведущих способов внутри- и межвидовой коммуникации. Оно обеспечивает ряд важных функций, таких как информирование о занятости и удержание территории (Smith 1976, 1979; Krebs, 1977; McDonald, 1989; Nowicki *et al.*, 1998), привлечение половых партнеров (Eriksson, Wallin, 1986; Mountjoy, Lemon, 1991; Johnson, Searcy, 1996), этологической изоляции близких видов (Irwin, 2000), поддержание структуры поселения (Catchpole, Slater, 2008).

Известно, что самки певчих птиц при выборе партнера, наряду с прочими характеристиками самца, оценивают также и его песню (Eriksson, Wallin, 1986). Исходя из этого, можно полагать, что рекламная песня может нести информацию о самой поющей особи, в частности, отражать его иммунный статус (Møller *et al.*, 2000; Беме и др., 2014), возраст (Garamszegi *et al.*, 2005), как одну из характеристик репродуктивного потенциала самца.

Возрастная изменчивость пения представляет большой интерес, поскольку возраст несет информацию об опыте и жизнеспособности особей, что во многом определяет “качество” самца, т.е. его потенциальный репродуктивный успех. Взрослые самцы, реализовавшие свою жизнеспособность, имеют опыт и могут вносить больший вклад в выкармливание и воспитание потомства (Desrochers, 1992).

Возрастному изменению могут быть подвержены различные параметры песни. На скворце *Sturnus vulgaris*, (Eens *et al.*, 1992), западном соловье *Luscinia megarhynchos* (Kiefer *et al.*, 2009), мухоловке-белошейке *Ficedula albicollis* (Garamszegi *et al.*, 2007) и ряде других видов была показана тенденция увеличения размера репертуара с возрастом. У самцов деревенских ласточек вероятными маркерами возраста могут выступать количество фигур в рекламной песне, ее продолжительность и некоторые частотные характеристики (Galeotti *et al.*, 2001; Garamszegi *et al.*, 2005).

Вопрос о ходе изменения параметров песни птиц с возрастом остается мало изученным. Во многом это обусловлено методическими трудностями, сопряженными со сложностями сбора материала такого рода и точного определения возраста особей. Большинство исследователей в своих работах используют косвенные методики определения возраста, основанные на морфологических признаках. При таком подходе (Ojanen, 1987; Высоцкий, 1989) возможно выделение лишь двух возрастных групп – *subadultus* (годовалые) и *adultus* (взрослые). Для некоторых видов данные методики не абсолютны, и имеют существенные погрешности в определении возраста (Lundberg, Alatalo, 1992; Артемьев, 2008). По нашим наблюдениям, использование с этой целью такого признака, как форма центральных рулевых перьев (Высоцкий, 1989), дает ошибку около 25%.

Это осложняет оценку различий даже между группами взрослых и молодых птиц, а возрастные изменения внутри группы *adultus* вообще остаются не учтенными (Adret-Hausberger, *et al.*, 1990).

Нельзя не учитывать, что для видов, обитающих в измененных человеком условиях, появляются дополнительные факторы, способные оказывать заметное влияние на возрастную изменчивость пения. Особое значение в этом отношении может иметь антропогенное шумовое загрязнение, затрудняющее акустическую коммуникацию птиц, мешающее передаче и восприятию сигнала. На большом числе видов показано, что у птиц, обитающих в таких условиях, отмечен сдвиг частот и максимальной амплитуды песни в более высокочастотную область (Slabbekoorn, Peet, 2003; Luther, Baptista, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Nemeth *et al.*, 2013; Иваницкий и др., 2014), что может быть объяснено избеганием перекрывания видовых сигналов с антропогенными шумами диапазона 1–3000 Гц (Slabbekoorn, Peet, 2003; Roca *et al.*, 2016). Другим механизмом, повышающим эффективность передачи сигнала в зашумленных условиях, может служить исполнение более длинных и медленных песен, что отмечается, например, у *Copsychus saularis* (Hill *et al.*, 2018).

В числе видов, отнесенных к модельным, мухоловка-пеструшка (*Ficedula hypoleuca*) отличается рядом “удобных” для исследователей свойств. Она легко привлекается в искусственные гнездовья, заселяя различные местообитания (Артемьев, 2008). Птицы толерантны к антропогенным факторам, в силу чего возможны манипуляции исследователей с птенцами без негативных последствий для выводка. Это обеспечивает возможность массового кольцевания и достаточно полного контроля популяции, в том числе ее возрастной структуры. Для самцов этого вида характерна также высокая верность месту гнездования (Соколов 1991; Гашков 2003; Куранов, 2017).

Томская популяция мухоловки-пеструшки, населяющая восточную периферию ареала, всесторонне изучается в течение многих лет. Данный вид был впервые зарегистрирован на гнездовании в окрестностях г. Томска в 1907 г. (Иогансен, 1914; Иогансен, 1916). С 1985 г. ведется мониторинг популяции, позволивший выявить особенности полиморфизма, филопатрии, миграции, полигинии (Гашков 2003; Куранов 2007, 2017; Grinkov *et al.*, 2018). В отношении филопатрии показано, в частности, что для данной популяции мухоловки-пеструшки характерен высокий процент возврата птенцов на место рождения – 6.6–8.4% (Grinkov, Gashkov 2003; Гашков 2003; Куранов, 2017). Акустическая коммуникация этого вида на данной территории остается наименее изученной (Бастрикова, Гашков, 2016, 2019).

Цель настоящей работы – изучение возрастной изменчивости частотных и структурно-временных характеристик рекламной песни мухоловки-пеструшки в природных и городских условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материалов, положенных в основу настоящего исследования осуществляли в период с первой по третью декаду мая 2014–2017 гг. на территории двух парков г. Томска – “Университетская роща” (площадью 34 га) и “Лагерный сад” (17 га) и на естественном участке обитания вида (20 га) в окрестностях с. Коларово Томского р-на Томской области (56°20′ с.ш. 84°56′ в.д.). Оба городских участка подвержены антропогенному шумовому воздействию. Основной вклад в шумовую нагрузку вносит автотранспорт. Так, к “Университетской роще” с восточной стороны примыкает крупная четырехполосная дорога с интенсивностью трафика 1300–2000 транспортных средств в час. “Лагерный сад” с северной стороны граничит с шестиполосным участком автотрассы регионального значения “Р 400”. Интенсивность трафика на участке составляет 2300–2400 транспортных средств в час. По данным на 2019 г. эквивалентный уровень шума вблизи обоих парков составляет 70–74 Дб (Коваль, 2019). Помимо автотранспорта, для городских участков характерны также непредсказуемые источники шума, связанные с присутствием человека (музыка, громкие голоса и т.п.). На контрольном участке антропогенная шумовая нагрузка минимальна и не постоянна. Единственным источником антропогенного шумового воздействия является примыкающая к участку с юго-восточной стороны автодорога областного значения “Коларовский тракт”. Движение на данном участке дороги малоинтенсивное – 55–67 транспортных средств в час (наши данные).

Для привлечения птиц на гнездование все участки снабжены дощатыми искусственными гнездовьями (ИГ) типа “малый синичник” (200 ИГ в “Университетской роще”; около 100 ИГ – в “Лагерном саду”; 200 ИГ – на контрольном участке). Плотность гнездования мухоловки-пеструшки в исследуемые годы в среднем составила: в “Университетской роще” – 1.3 пары/га, “Лагерном саду” – 2.5 пары/га, 8 пар/га – на естественном участке.

Звукозапись производили в сухую, безветренную погоду с 7:00 до 14:00. Записывали пение “холостных”, еще не образовавших пару, самцов. Для записи звука использовали диктофон Olympus LS-12 (“Olympus Corp.”, Япония) с помощью выносного параболического микрофона PRO-5 PIP (“Telinga Microphones”, Швеция).

По окончании записи самцов отлавливали ловушками типа “клапан”, “боек” либо паутинны-

Таблица 1. Распределение самцов *Ficedula hypoleuca* по возрастным группам

Место записи	Количество особей в каждой возрастной группе		
	I (1 год)	II (2 года)	III (3–7 лет)
Город	15	6	7
Естественный участок	8	7	5
Итого	23	13	12

ми сетями для получения данных о возрасте птиц. В исследование включены только те самцы, которые с уверенностью могли быть отнесены к определенной возрастной группе. Самые точные сведения о возрасте мы получали, если на исследуемых участках самцы были окольцованы птенцами стандартными номерными кольцами. Это позволяло оценивать их возраст при повторных отловах в последующие годы. Всего проанализированы записи пения 48 самцов, распределенных по трем возрастным группам – годовалые, двухлетние и самцы в возрасте от трех лет и старше (табл. 1).

В последней группе из 12 отловленных присутствовало 6 самцов с точно определенным возрастом (на естественном участке: 2 особи – 3 лет, 1 – 5 лет, 1 – 7 лет; в городе: 1 – 3 лет; 1 – 4 лет). Еще 6 птиц включены в третью группу без точно известного года рождения, но в возрасте 3+ (1 особь на естественном участке, 2 особи – в городе) и 4+ (3 особи в городе).

Анализ и визуализацию записей производили с использованием редактора Cool Edit Pro версия 2.1 (“Adobe”, США). Рекламное пение самцов *F. hypoleuca* состоит из отдельных единичных пе-

сен, разделенных паузами продолжительностью не менее 1 с. Каждая рекламная песня, в свою очередь, состоит из песенных фигур, представляющих из себя один непрерывный звук или несколько звуков с паузами менее 0.02 с (Espmark, Lampe, 1993; рис. 1).

Для каждого самца проанализировали последовательность из 25 рекламных песен. Для каждой песни считывали следующие параметры:

- 1) максимальная частота песни, Гц;
- 2) минимальная частота песни, Гц;
- 3) диапазон частот рекламной песни, Гц (разница между максимальной и минимальной частотами песни);
- 4) продолжительность песни, мс;
- 5) количество фигур в песне.

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica версия 10.0 (“Stat soft”, США). Для каждого параметра в разных возрастных группах рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего (SE). Оценку различий между разными возрастными группами по частотным и структурно-временным показателям

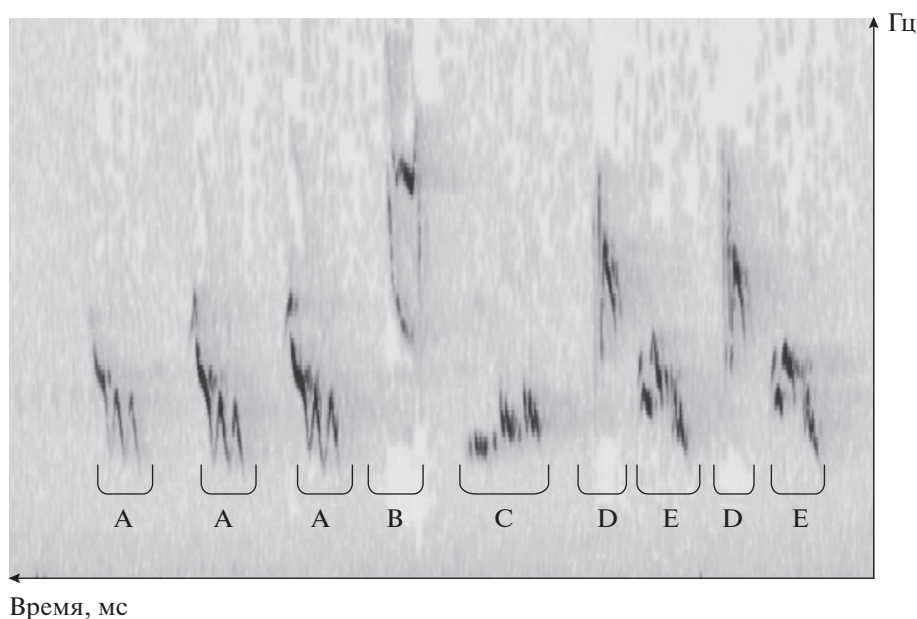
**Рис. 1.** Сонаграмма записи рекламной песни самца *Ficedula hypoleuca*. Отдельные песенные фигуры обозначены буквами.

Таблица 2. Параметры песни мухоловки-пеструшки в возрастных группах самцов из естественных местообитаний с результатами попарного сравнения групп при помощи *U*-критерия Мана–Уитни. *Z* – пересчет значения *U* на стандартное нормальное распределение. Значимые результаты ($p < 0.05$) отмечены жирным шрифтом

	Среднее значение + SE			Сравнение между возрастными группами. <i>U</i> -критерий Мана–Уитни								
	I 1 год	II 2 года	III 3–7 лет	I–II			II–III			I–III		
				<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
Диапазон частот песни, Гц	5996.73 ± 58.68	5869.62 ± 63.76	5267.35 ± 107.42	16049.50	1.38	0.17	7902.00	-4.10	≤0.01	8195.00	5.22	≤0.01
Максимальная частота, Гц	8248.39 ± 52.33	8160.58 ± 57.79	7570.51 ± 95.78	16327.50	1.12	0.26	7575.50	-4.54	≤0.01	7983.50	5.48	≤0.01
Минимальная частота, Гц	2251.66 ± 15.92	2290.96 ± 13.40	2303.16 ± 25.81	16390.00	-1.06	0.29	10684.00	-0.34	0.73	11787.0 0	-0.87	0.39
Длина песни, мс	2306.08 ± 52.02	2214.07 ± 57.73	1855.45 ± 66.18	15766.00	1.66	0.10	7895.00	-4.11	≤0.01	8216.00	5.20	≤0.01
Количество фигур в песне	10.94 ± 0.24	10.52 ± 0.30	8.87 ± 0.27	15736.50	1.68	0.09	8298.00	-3.56	≤0.01	8040.50	5.41	≤0.01

телям песни производили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (*H*). Нами было принято решение отказаться от использования поправки Бонферрони для множественных сравнений, поскольку эта поправка является строгой и ее применение нецелесообразно для целей экологических и эколого-поведенческих исследований (Perneger, 1998; Moran, 2003; Nakagawa, 2004). При малом числе групп сравнения сильно увеличивается вероятность возникновения ошибок второго рода. При попарных сравнениях возрастных групп использовали *U*-критерий Манна–Уитни (*U*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение пения с возрастом в естественных местообитаниях. В условиях естественных местообитаний у самцов *F. hypoleuca* с возрастом происходят значимые изменения всех рассматриваемых параметров рекламной песни, за исключением минимальной частоты песни ($H_{(2, N=500)} = 1.386082$; $p > 0.05$; табл. 2; рис. 2а). Так, с возрастом у самцов наблюдалось сужение диапазона частот рекламной песни ($H_{(2, N=500)} = 29.273$; $p < 0.0001$; рис. 3а, обусловленное снижением максимальной частоты песни ($H_{(2, N=500)} = 32.853$; $p < 0.0001$; рис. 4а). Изменялась и структура рекламной песни – число песенных фигур уменьшалось ($H_{(2, N=500)} = 29.021$; $p < 0.0001$; рис. 5а), а ее длина сокращалась ($H_{(2, N=500)} = 29.714$; $p < 0.0001$; рис. 6а).

Следует отметить, что все фиксируемые изменения пения протекали при переходе из II возрастной группы в III (табл. 2). Таким образом, в условиях естественных местообитаний рекламная песня годовалых самцов была схожа с песней двухлетних, а все наблюдаемые возрастные изменения происходили в более зрелом возрасте.

Аналогичная тенденция возрастной изменчивости песни показана в работе М.Н. Ивановой (1998) на Куршской косе: у самцов с известным точным возрастом показана значимая отрицательная корреляция количества фигур в песне с возрастом и слабая отрицательная корреляция – с длиной песни ($p = 0.07$). Таким образом, сокращение с возрастом числа фигур в песне и, как следствие, сокращение ее длины, можно рассматривать, как общую видовую характеристику, формирующуюся при переходе из II в III возрастную группу.

Изменение пения с возрастом в городской среде. В условиях города у самцов мухоловки-пеструшки происходит повышение минимальной частоты песни с возрастом ($H_{(2, N=700)} = 43.19575$; $p < 0.0001$; рис. 2б). Изменение данного параметра носит линейный характер – рост минимальной частоты пения отмечается как при переходе из I возрастной группы во вторую, так и из II в III (табл. 3). Следует подчеркнуть, что в естественных местообитаниях данный параметр возрастным изменениям не подвержен. Его изменение в урбанизированных местообитаниях носит не случайный характер и может быть следствием адаптации пения к антропогенному шумовому загрязнению, реализованному через снижение перекрывания видового сигнала низкочастотными городскими шумами. Ранее мы показали, что для городских группировок мухоловки-пеструшки в сравнении с естественными местообитаниями в целом характерна увеличенная минимальная частота песни (Бастрикова, Гашков, 2019).

Другие рассматриваемые параметры песни самцов *F. hypoleuca* в этих условиях изменяются схожим с естественными местообитаниями образом, однако в городе эти изменения начинаются у самцов раньше – со второго года жизни (табл. 3). С этого момента происходит сужение диапазона

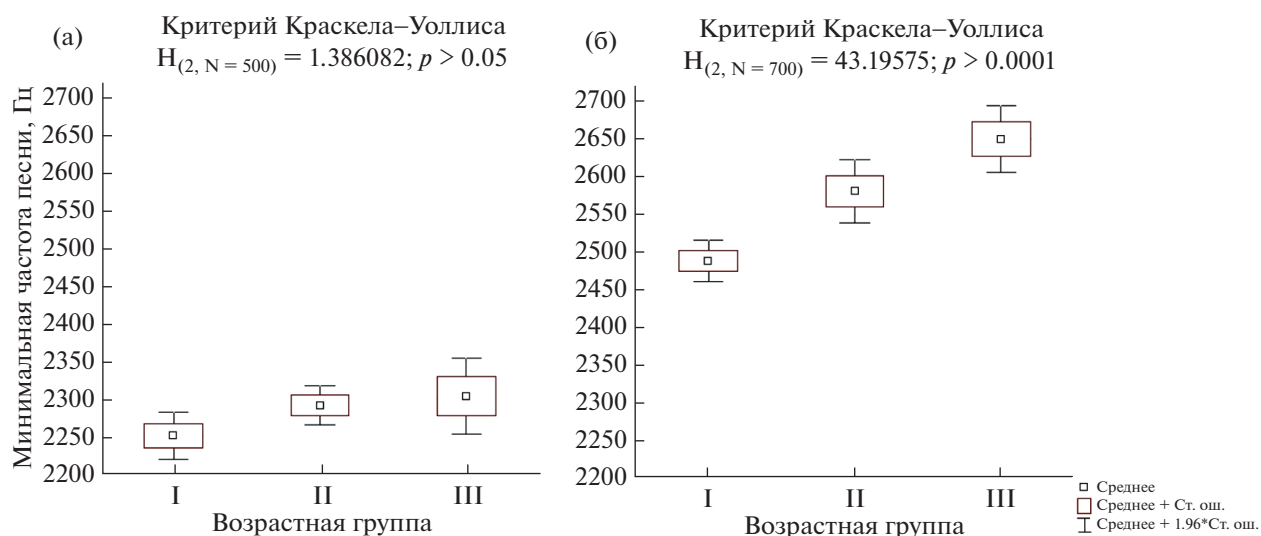


Рис. 2. Минимальная частота песни *Ficedula hypoleuca* разных возрастов: (а) – обитающих в городской среде; (б) – в естественных условиях.

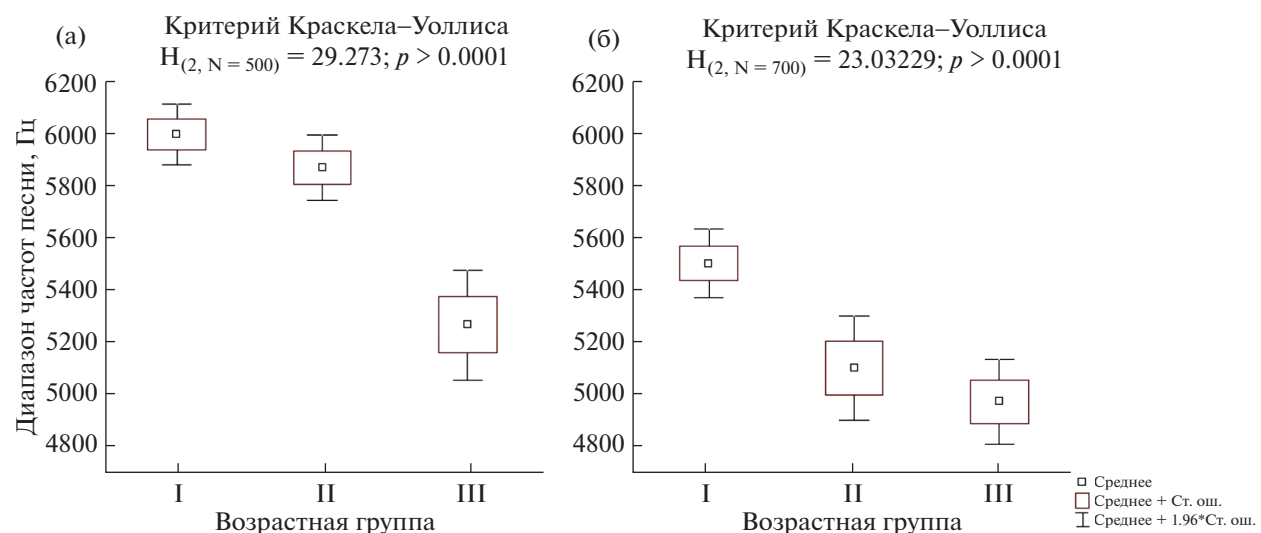


Рис. 3. Ширина диапазона частот рекламной песни *Ficedula hypoleuca* разных возрастов: (а) – обитающих в городской среде; (б) – обитающих в естественных условиях.

частот рекламной песни ($H_{(2, N = 700)} = 23.03229; p < 0.0001$; рис. 3б) и понижение максимальной частоты песни ($H_{(2, N = 700)} = 14.27028; p = 0.0008$; рис. 4б). Сокращается количество фигур в рекламной песне ($H_{(2, N = 700)} = 37.64414; p < 0.0001$; рис. 5б) и уменьшается ее длина ($H_{(2, N = 700)} = 31.42611; p < 0.0001$; рис. 6б).

Исключение составляет максимальная частота песни: значимые различия по данному параметру наблюдаются только между I и III возрастными группами (табл. 3). Вместе с тем некоторое снижение среднего значения этого признака отмечается уже при переходе ко II возрастной группе.

Большая вариабельность значений данного признака внутри этой группы наводит на мысль, что приспособление к городской среде в этом возрасте происходит только у части птиц, что ведет к возрастанию дисперсии (рис. 4б). Раннее начало возрастных изменений параметров песни в городе, таким образом, является отличительной особенностью городских группировок мухоловки-пеструшки.

Способность изменять песню в ответ на воздействие шумового загрязнения говорит о высокой пластичности данного вида и может являться одной из потенций, обеспечивающих его высокую толе-

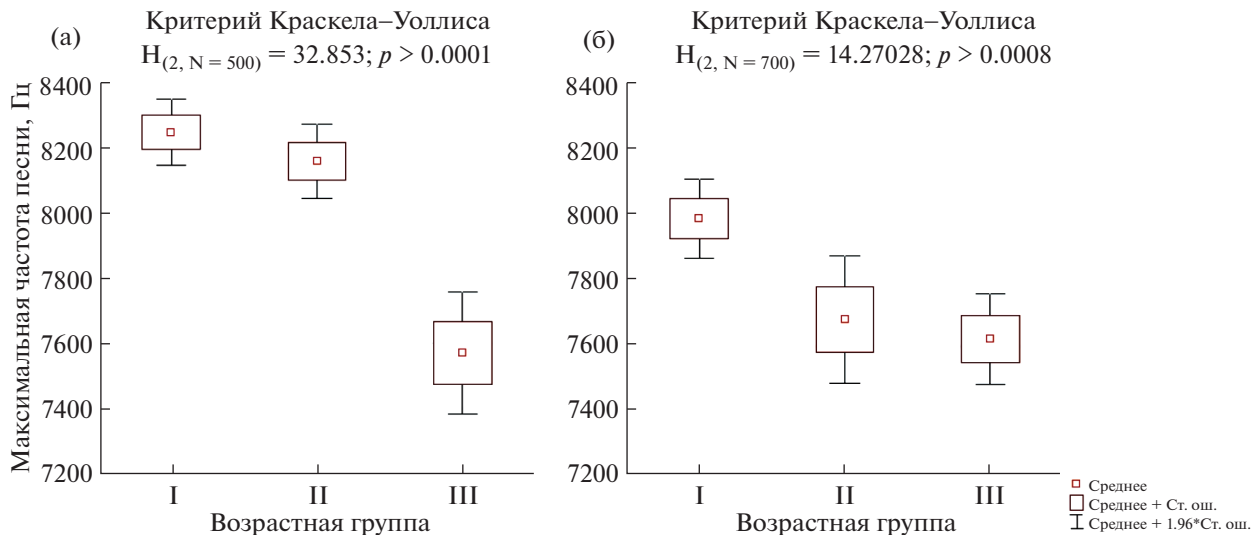


Рис. 4. Максимальная частота песни самцов *Ficedula hypoleuca* разных возрастов: (а) – обитающих в городской среде; (б) – в естественных условиях.

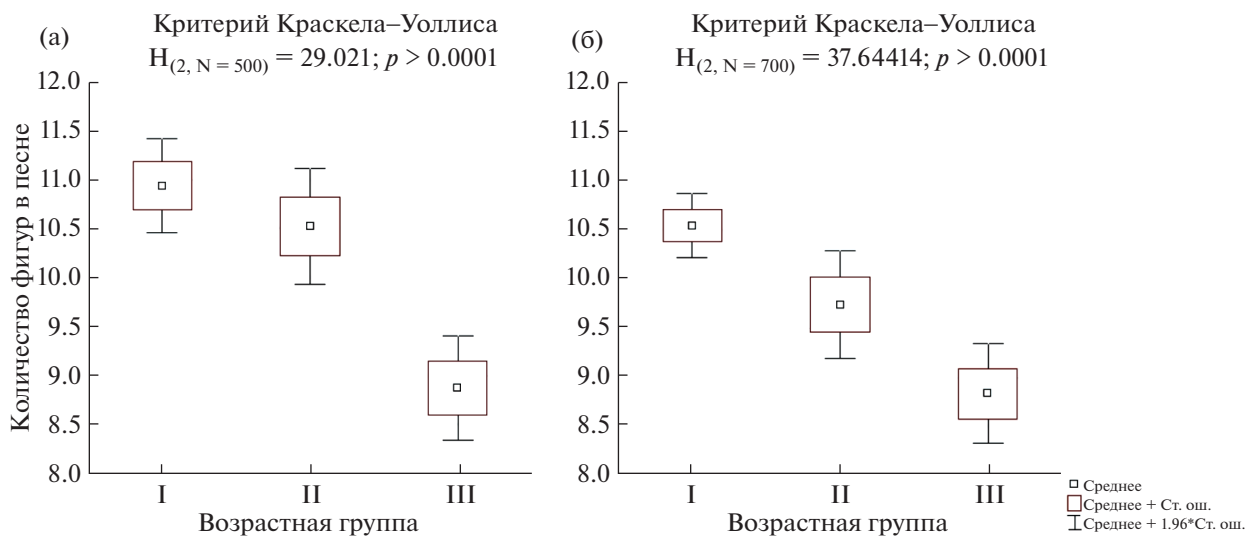


Рис. 5. Количество фигур в рекламной песне самцов *Ficedula hypoleuca* разных возрастов: (а) – обитающих в городской среде; (б) – в естественных условиях.

рантность к городским условиям. Наличие иной стратегии преобразования песни с возрастом в городских группировках мухоловки-пеструшки в конечном итоге может привести к формированию новых песенных диалектов, обеспечивающих наиболее эффективную коммуникацию в условиях антропогенного шума. Так, в многолетних исследованиях на белоголовой зонотрихии (*Zonotrichia leucophrys*) показано, что рост шумового загрязнения на исследуемом участке за 30 лет привел к замене диалекта, содержащего низкочастотные песни, диалектом с высокой минимальной частотой песен (Luther, Baptista, 2010). В итоге это привело к

тому, что при предъявлении самцам записи песен, сделанных около 40 лет назад и в настоящее время, они давали более слабую поведенческую реакцию на архивные песни. Самцы медленнее реагировали на воспроизведение таких записей, отвечали меньшим числом песен, реже подлетали к динамику (Luther, Derryberry, 2012). Индуцированная адаптацией к антропогенному шумовому загрязнению культурная эволюция коммуникативных сигналов со временем может способствовать поведенческой сегрегации популяций. По мнению А.С. Опаева (2010), изучавшего комплекс четырех видов камышовок, акустические призна-

Таблица 3. Параметры песни мухоловки-пеструшки в возрастных группах самцов из городских местообитаний с результатами попарного сравнения групп при помощи *U*-критерия Мана–Уитни. *Z* – пересчет значения *U* на стандартное нормальное распределение. Значимые результаты ($p < 0.05$) отмечены жирным шрифтом

	Среднее значение + SE			Сравнение между возрастными группами. <i>U</i> -критерий Мана–Уитни								
	I 1 год	II 2 года	III 3–7 лет	I–II			II–III			I–III		
				<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
Диапазон частот песни, Гц	5502.93 ± ± 66.91	5101.71 ± ± 102.34	4972.63 ± ± 6.25	24555.00	2.27	0.02	11779.50	–1.59	0.11	24504.00	4.79	≤0.01
Максимальная частота, Гц	7991.91 ± ± 61.91	7682.74 ± ± 98.99	7622.66 ± ± 5.33	26100.50	1.29	0.20	11568.50	–1.84	0.07	26187.00	3.82	≤0.01
Минимальная частота, Гц	2488.98 ± ± 13.96	2581.03 ± ± 21.17	2650.03 ± ± 1.70	22509.50	–3.58	≤0.01	11049.50	2.46	0.01	21941.00	–6.26	≤0.01
Длина песни, мс	2146.40 ± ± 32.54	1942.16 ± ± 62.64	1854.72 ± ± 3.92	22444.00	3.62	≤0.01	12345.50	–0.92	0.36	23793.50	5.20	≤0.01
Количество фигур в песне	10.55 ± ± 0.17	9.74 ± ± 0.28	8.83 ± ± 0.02	23725.00	2.80	<0.01	10866.50	–2.67	0.01	22434.00	5.98	≤0.01

ки отличаются опережающими темпами эволюции по сравнению с морфологическими признаками и особенностями экологии и гнездовой биологии.

Таким образом, антропогенное шумовое загрязнение выступает важным параметром, влияющим на популяции птиц. Зашумление среды может способствовать постепенной поведенческой изоляции популяций, даже если какие-либо физические барьеры при этом отсутствуют (Berger-Tal, Saltz, 2019). Можно полагать, что эти изоляционные механизмы усиливаются по мере фрагментации среды. В случае с мухоловкой-пеструшкой, отличающейся толерантностью к городской среде и быстрой сменой поколений, эти факторы мо-

гут приводить к быстрому формированию внутривидовых группировок.

* * *

На основе анализа рекламных песен самцов мухоловки-пеструшки с точно определенным возрастом показано, что возрастные изменения песни протекают по-разному в естественных и городских местообитаниях. В первом случае перестройка песни начинается с третьего года жизни, когда происходит сужение диапазона частот рекламной песни вследствие снижения максимальной частоты песни. Уменьшается количество фигур в песне, за счет чего сокращается ее длина. Характер изменения этих же параметров

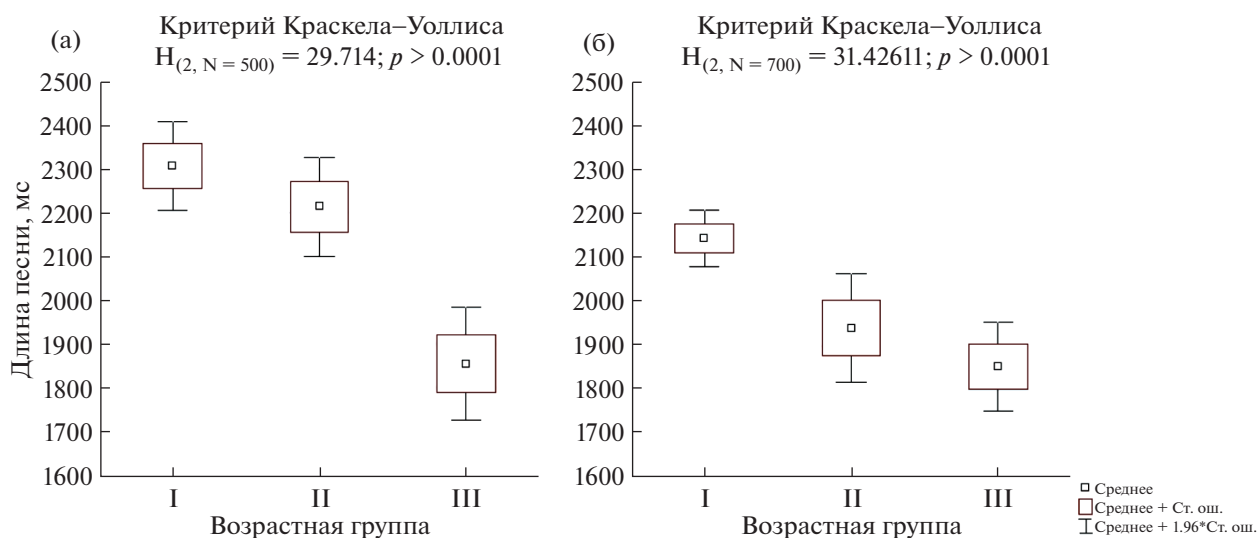


Рис. 6. Длина рекламной песни самцов *Ficedula hypoleuca* разных возрастов: (а) – обитающих в городской среде; (б) – в естественных условиях.

песни аналогичен и в городской среде, но перестройка начинается здесь раньше — со второго года жизни. Существенным отличием, кроме того, является повышение в условиях города минимальной частоты песни, усиливающееся с возрастом. В естественной среде этот параметр не подвержен возрастным изменениям.

Таким образом, мухоловка-пеструшка способна быстро перестраивать параметры песни в соответствии с условиями среды, адаптируя ее к условиям антропогенного шумового загрязнения. Ранние изменения песни в городе говорят о высокой этологической пластичности данного вида, что наряду с пространственной дифференциацией населения вида, может способствовать эволюционному преобразованию популяций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90080.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемов А.В. Популяционная экология мухоловки-пеструшки в северной зоне ареала. М.: Наука, 2008. 272 с.
- Бастрикова А.Е., Гашков С.И. Различия рекламной песни самцов мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca* Pall.) разных возрастов // Принципы экологии. 2016. Т. 5. № 3(19). С. 25.
- Бастрикова А.Е., Гашков С.И. Частотно-временные характеристики песни мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) в условиях антропогенного шумового загрязнения // Экология и эволюция: новые горизонты: мат-лы Международного симпозиума, посвященного 100-летию академика С. С. Шварца, Екатеринбург, 1–5 апреля 2019 г. Екатеринбург: Гуманитарный ун-т, 2019. С. 12–14.
- Беме И.Р., Горецкая М.Я., Москаленко В.Н. Иммунизация нереплицирующимся антигеном приводит к изменению характеристик песни и уровня кортикостерона у воробьиных птиц // Докл. Акад. Наук. 2014. Т. 454. № 1. С. 111–114.
- Высоцкий В.Г. Определение возраста мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) в период размножения // Труды АН ЗИН СССР: “Фауна и экологии птиц Евразии”, 1989. Т. 197. С. 49–52.
- Гашков С.И. Связь с территорией рождения и размножения мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca* Pall.) на восточной периферии ареала // Вест. Томского гос. ун-та. Прил. № 8. 2003. С. 35–40.
- Иваницкий В.В., Антипов В.А., Марова И.М. Восточный соловей (*luscinia luscinia*) в Москве и Подмоскowie: городской шум влияет на частотные параметры песни // Зоологический журн. 2014. Т. 93. № 9. С. 1123–1130.
- Иванова М.Н. Взаимозависимость типа окраски, возраста и акустических характеристик песни у самцов мухоловки-пеструшки // Орнитология. 1998. Т. 28. № 1–2. С. 126–135.
- Иоганзен В.Г. Наблюдения над гнездованием мухоловки-пеструшки (*Muscicapa atricapilla* Linn.) близ Томска // Орнитологический вестник. 1914. № 4. С. 293–295.
- Иоганзен Г.Э. Томская мухоловка-пеструшка // Орнитологический вестник. 1916. № 2. С. 101.
- Коваль З.В. Оценка шумового загрязнения Кировского района г. Томска: магистерская дис. по направлению подготовки: 05.04.06 — Экология и природопользование. Томск: НИ ТГУ, 2019. 85 с.
- Куранов Б.Д. Гнездовая биология урбанизированной популяции мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) // Вест. Томского гос. ун-та. 2007. № 297. С. 192–200.
- Куранов Б.Д. Сохраняемость мухоловки-пеструшки *Ficedula hypoleuca* у восточной границы распространения // Рус. орнитол. журн. 2017. Т. 26. В. 1425. С. 1291–1300.
- Онаев А.С. Основные направления дивергенции криптических видов птиц: на примере комплекса “дроздовидная камышевка”: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 2010. 24 с.
- Соколов Л.В. Филопатрия и дисперсия птиц // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1991. Т. 230. С. 1–232.
- Adret-Hausberger M., Güttinger H.R., Merkel F.W. Individual life history and song repertoire changes in a colony of starlings (*Sturnus vulgaris*) // Ethology. 1990. V. 84. № 4. P. 265–280.
- Berger-Tal O., Saltz D. Invisible barriers: anthropogenic impacts on inter- and intra-specific interactions as drivers of landscape-independent fragmentation // Philosoph. Trans. Royal Society B. 2019. V. 374. № 1781. С. 20180049.
- Catchpole C.K., Slater P.J.B. Bird song: biological themes and variations. N.Y.: Cambridge University Press, 2008. 335 p.
- Desrochers A. Age and foraging success in European blackbirds — variations between and within individuals // Animal Behaviour. 1992. V. 43. P. 885–894.
- Eens M., Pinxten R., Verheyen R. No overlap in song repertoire size between yearling and older starlings, *Sturnus vulgaris*. // Ibis. 1992. V. 134. P. 72–76.
- Eriksson D., Wallin L. Male bird song attracts females — a field experiment // Behav. Ecol. Sociobiol. 1986. V. 19. № 4. P. 297–299.
- Espmark Y.O., Lampe H.M. Variations in the song of the pied flycatcher within and between breeding seasons // Bioacoustic. 1993. V. 5. P. 33–65.
- Galeotti P., Saino N., Perani E., Sacchi R., Møller A.R. Age-related song variation in male barn swallows // Ital. J. Zoology. 2001. V. 68. P. 305–310.
- Garamszegi L.Z., Heylen D., Møller A.P., Eens M., De Lope F. Age-dependent health status and song characteristics in the barn swallow // Behav. Ecology. 2005. V. 16. P. 580–591.
- Garamszegi L.Z., Török J., Hegyi G., Szöllösi E., Rosivall B., Eens M. Age-dependent expression of song in the collared flycatcher, *Ficedula albicollis* // Ethology. 2007. V. 113. № 3. P. 246–256.
- Grinkov V.G., Gashkov S.I. Living on the edge: new data about the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) breeding in Western Siberia, Russia // Vogelwarte. 2003. V. 42. P. 3–27.

- Grinkov V.G., Bauer A., Gashkov S.I., Sternberg H., Wink M. Diversity of social-genetic relationships in the socially monogamous pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) breeding in Western Siberia // PeerJ. 2018. V. 6. P. e6059–e6059.
- Hill S.D., Aryal A., Pawley M.D., Ji W. So much for the city: Urban–rural song variation in a widespread Asiatic songbird // Integrative zoology. 2018. V. 13. № 2. P. 194–205.
- Irwin D. Song variation in avian ring species // Evolution. 2000. V. 54. P. 998–1010.
- Johnson L.S., Searcy W.A. Female attraction to male song in house wrens (*Troglodytes aedon*) // Behaviour. 1996. V. 133. P. 357–366.
- Kiefer S., Sommer C., Scharff C., Kipper S., Mundry R. Tuning towards tomorrow? Common nightingales *Luscinia megarhynchos* change and increase their song repertoires from the first to the second breeding season // J. Avian Biol. 2009. V. 40. P. 231–236.
- Krebs J.R. The significance of song repertoires: the Beau Geste hypothesis // Anim. Behav. 1977. V. 25. P. 475–478.
- Lundberg A., Alatalo R.V. The pied flycatcher. L: Poyser, 1992. 267 p.
- Luther D.A., Baptista L. Does urban noise influence the cultural evolution of bird songs? // Proc. Royal Soc. London. B. 2010. V. 277. P. 469–473.
- Luther D.A., Derryberry E.P. Birdsongs keep pace with city life: changes in song over time in an urban songbird affects communication // Anim. Behav. 2012. V. 83. № 4. P. 1059–1066.
- McDonald M.V. Function of song in Scott's seaside sparrow, *Ammodramus maritimus peninsulæ* // Anim. Behav. 1989. V. 38. P. 468–485.
- Mendes S., Colino-Rabanal V.J., Peris S.J. Diferencias en el canto de la ratona común (*Troglodytes musculus*) en ambientes con distintos niveles de influencia humana // El hornero. 2011. V. 26. № 2. P. 85–93.
- Møller A.P., Henry P.Y., Erritzøe J. The evolution of song repertoires and immune defence in birds // Proc. Royal Soc. London. B. 2000. V. 267. № 1439. P. 165–169.
- Moran M.D. Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies // Oikos. 2003. V. 100. P. 403–405.
- Mountjoy D.J., Lemon R.E. Song as an attractant for male and female European starlings, and the influence of song complexity on their response // Behav. Ecol. Sociobiol. 1991. V. 28. P. 97–100.
- Nakagawa S. A farewell to Bonferroni: the problems of low statistical power and publication bias // Behav. Ecol. 2004. V. 15. P. 1044–1045.
- Nemeth E. et al. Bird song and anthropogenic noise: vocal constraints may explain why birds sing higher-frequency songs in cities // Proc. Royal Soc. London. B. 2013. V. 280. № 1754. P. 1–7.
- Nowicki S., Searcy W.A., Hughes M. The territory defense function of song in song sparrows: a test with the speaker occupation design // Behaviour. 1998. V. 135. P. 615–628.
- Ojanen M. A method for age determination of Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca* in spring // Acta Reg. Soc. Scien. Litter. Gothoburg. Zool. 1987. V. 14. P. 95–101.
- Perneger T.V. What's wrong with Bonferroni adjustments // Brit. Med. J. 1998. V. 316. P. 1236–1238.
- Roca I.T., Desrochers L., Giacomazzo M., Bertolo A., Bolduc P., Deschesnes R., Martin C.A., Rainville V., Rheault G., Proulx R. Shifting song frequencies in response to anthropogenic noise: a meta-analysis on birds and anurans // Behav. Ecol. 2016. V. 27. № 5. P. 1269–1274.
- Slabbekoorn H., Peet M. Birds sing at a higher pitch in urban noise – great tits hit the high notes to ensure that their mating calls are heard above the city's din // Nature. 2003. V. 424. P. 267–268.
- Smith D.G. An experimental analysis of the function of red-winged blackbird song // Behaviour. 1976. V. 56. P. 136–156.
- Smith D.G. Male singing ability and territory integrity in red-winged blackbirds *Agelaius phoeniceus* // Behaviour. 1979. V. 68. P. 193–206.

Age-Related Variability of the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) Song in Natural and Urban Environments

A. E. Bastrikova^{1, #}, S. I. Gashkov¹, and N. S. Moskvitina¹

¹National Research Tomsk State University, Lenin Ave. 36, Tomsk, 634050 Russia

[#]e-mail: bastrikova_a_e@mail.ru

The age-related variability of the frequency and structural-temporal parameters of *Ficedula hypoleuca* males song in natural habitats and urban environment were analyzed. In the natural habitats, the range of male song frequencies, the peak frequency, the number of figures as well as the length of the song decreased from the third year of life. Similar age-related changes in the urban birds song were noted earlier, from the second year of life. Urban birds showed higher peak song frequency as a result of its adaptation to noise pollution, which increased with age.

Keywords: *Ficedula hypoleuca*, song, age-related change, noise pollution, adaptation

УДК 556.114

ОПЫТ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕСО-ТОРФЯНЫХ ПОЖАРОВ НА ГИДРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭУТРОФНЫХ БОЛОТ

© 2021 г. Т. Т. Ефремова*,[@], А. В. Пименов*, С. П. Ефремов*, А. Ф. Аврова*, Д. Ю. Ефимов*

*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – Обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН,
Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 Россия

[@]E-mail: efr2@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 19.05.2020 г.

Принята к публикации 27.05.2020 г.

Впервые на примере ключевого объекта заторфованных речных долин Кузнецкого Алатау, занятых ельниками, показано, что вследствие лесо-торфяных пожаров болотные воды четко дифференцируются по содержанию главных ионов и объективно формируют три группы: 1 – воды исходного типа водно-минерального питания (пресные, мягкие), 2 – воды массива, пройденного пожаром средней силы (пресные, жесткие), 3 – сильным пожаром (слабосолонцеватые, очень жесткие). Наибольшей дискриминирующей мощностью (95%) в определении болотных вод обладают ионы магния и гидрокарбонаты. Болотные воды постпирогенного торфяного массива не утрачивают одноприродное с водами исходного типа соотношение главных ионов и сохраняют гидрокарбонатный кальциево-магниевый состав.

DOI: 10.31857/S1026347021050073

Торфяные пожары являются мощным экзогенным фактором влияния на состояние болотных экосистем. Болота и заболоченные леса, включенные в третью группу природной пожарной опасности, подвержены циклическому воздействию пожаров (Фуряев, 1970). Установлены следующие виды почвенно-торфяных пожаров: подземные, открытые и/или комбинированные (Курбатский, 1962; Волокитина, 1985). Для почвенных и подземных пожаров наиболее характерно беспламенное горение. Для понимания закономерностей послепожарной сукцессии болотных экосистем необходимо принимать во внимание последствия многообразных взаимодействий целого ряда факторов, которые влияют на условия среды, определяя векторы микроэволюционных процессов (Санников, 1981; Wieder *et al.*, 2009). В той или иной мере влияние пожаров изучено на отдельные факторы гидроморфных местообитаний: состояние древостоя в болотных лесах (Пьявченко, 1978; Ефремова, Ефремов, 1994; Ефремова, Ефремов, 1996), на функционирование фитоценозов (Копотева, Купцова, 2016), свойства и плодородие пирогенно-торфяных почв (Зайдельман и др., 2003; Банников и др., 2004), на трансформацию органического вещества торфа (Ефремова, Ефремов, 2006; Turetsky *et al.*, 2015; Глухова, Сирин, 2018), на микро топографию торфяников (Benscoter *et al.*, 2015).

Вместе с тем практически не изученной остается роль пирогенного фактора в преобразовании химического состава болотных вод. Известно, что любые перемены в среде обитания на болотах наиболее тесно связаны с изменением их водно-минерального питания, определяющего биогеохимическую эволюцию гидроморфных экосистем, циклы почвообразования, естественный отбор экобиотипов растений и адаптацию древесных пиропитов.

Цель настоящей работы – объективно оценить неоднородность химического состава поверхностных вод болотных ельников эутрофного ряда развития в связи с лесоторфяными пожарами, используя методы многомерного статистического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали лесоболотные экосистемы восточного макросклона Кузнецкого Алатау (Республика Хакасия). В структуре лесов этой территории широко распространены болотные ельники по долинам рек, во влажных распадках и падах, по подножьям и пологим склонам гор на участках выклинивания ключевых вод. Из общего числа 18 типизированных лесных болот в качестве ключевого объекта выбрали торфяной массив в долине реки Тунгжувль (приток р. Белый Июс) на абсолютной высоте 622 м. Торфяник площадью 1,8 тыс. га характеризуется малой мощностью (70–80 см) и сложен

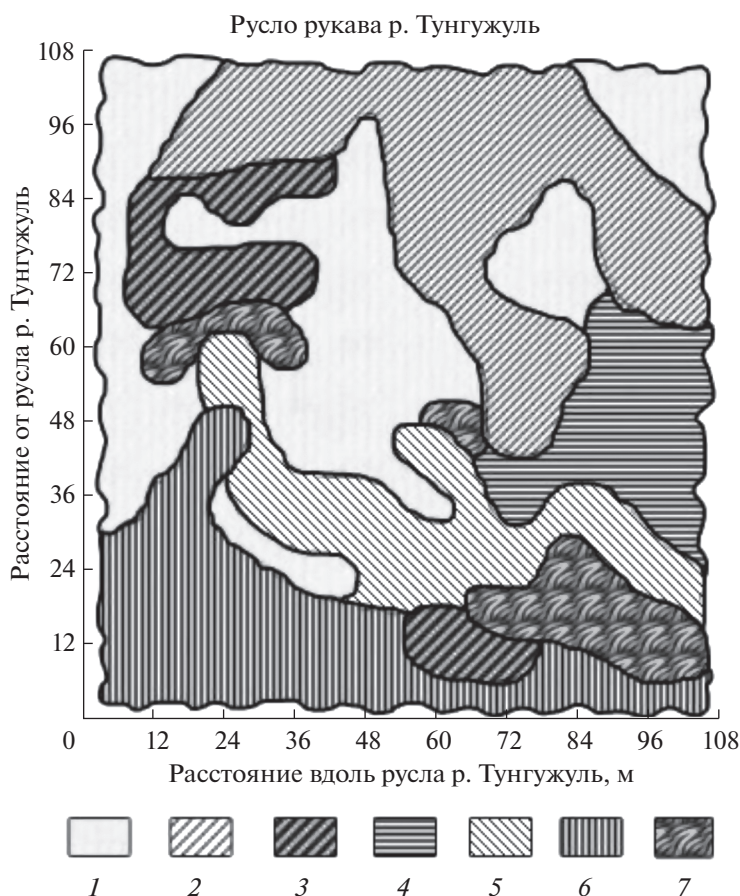


Рис. 1. Структура напочвенного растительного покрова в ельнике зеленомошно-гипновом. Условные обозначения: 1 – *Tomenthypnum nitens* (Hedw.) Loeske, 2 – *Tomenthypnum nitens* (Hedw.) Loeske + *Aulacomnium turgidum* (Wahlenb.) + *Aulacomnium palustre* (Hedw.) Schwaegr., 3 – *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. Sch. et Ymb., 4 – *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. Sch. et Ymb. + *Aulacomnium turgidum* (Wahlenb.) + *Aulacomnium palustre* (Hedw.) Schwaegr., 5 – *Aulacomnium turgidum* (Wahlenb.) + *Aulacomnium palustre* (Hedw.) Schwaegr., 6 – *Drepanocladus uncinatus* (Hedw.), 7 – *Helodium Blandowii* (Web. et Mohr) Warnst.

почвами эутрофного типа – ТЕ-ТТ (Hypereutric Histic Histosol) (Классификация ..., 2004; Мировая реферативная ..., 2017). Большую часть года он проморожен до минерального дна. Сезонная глубина залегания мерзлоты активно влияет на уровни стояния грунтовых вод: в начале июня 11–20 см, в конце августа 45–50 см.

Заболоченная долина занята разновозрастным (72–410 лет) зеленомошно-гипновым ельником (*Picea obovata* Z.) Va класса бонитета. Степень проективного покрытия мхами составляет 95%. Структура растительного покрова представлена на рис. 1. Стволы и ветви еловых деревьев густо обросли “космами” кустистых лишайников – *Evernia divaricata* (L.) Ach., *Evernia esorediosa* (Müll. Arg.) DR., *Usnea cavernosa* Tuck., *Usnea dasypoga* (Ach.) Nyl., *Usnea longissima* Ach.

Торфяной массив сухой весной 1999 г. пройден крупным пожаром (площадь более 200 га) вблизи д. Усть-Тунгужуль. Возгорание вызвано

развитием низового пожара на высокотравном лугу подножья горы Ала–Таг. На болоте огонь перешел в верховой пожар благодаря наличию в ельнике активных проводников горения – эпифитных лишайников. По ним пламя активно охватывало кроны деревьев, смолистую хвою, вызывая обгорание стволов и ветвей, что приводило к развитию почвенно-подземного пожара. Практически полное выпадение из состава древостоя ели, которая относится к числу наиболее огнестойких темнохвойных видов (Санников, 1981), дает основание предполагать, что пожар по скорости распространения оказался устойчивым, по интенсивности горения – средним и сильным.

Ко времени обследования в сентябре 2018 г. (т.е. спустя 20 лет) растительность пожарища представлена березняком (*Betula pubescens* Ehrh.) кустарниковым осоково-зеленомошным, относящимся к группе кратковременно-производных постпирогенных травяных лесов. Возраст древо-

Таблица 1. Геоботаническая характеристика пиролого-экологического профиля

Индексация объектов	Растительные сообщества
П1 1, 2	Березовый кустарниково (<i>Salix rhamnifolia</i> + <i>Ribes nigrum</i> + <i>Dasiphora fruticosa</i>) – дернистоосоково (<i>Carex cespitosa</i>) – зеленомошный (<i>Aulacomnium palustre</i>) лес
П2 3, 4	Березовый кустарниково (<i>D. fruticosa</i> + <i>S. rhamnifolia</i>) – дернистоосоково (<i>C. cespitosa</i>) – зеленомошный (<i>A. palustre</i>) лес
П3 5, 6	Березовый кустарниково (<i>D. fruticosa</i>) – дернистоосоковый (<i>C. cespitosa</i>) лес
П4 7, 8	Березовый кустарниково (<i>D. fruticosa</i> + <i>Salix pentandra</i>) – хвощово (<i>Equisetum pratense</i>) – дернистоосоково (<i>C. cespitosa</i>) – зеленомошный (<i>Hylocomium splendens</i>) лес
П5 9, 10	Березовый кустарниково (<i>D. fruticosa</i> + <i>S. rhamnifolia</i>) – дернистоосоково (<i>C. cespitosa</i>) – зеленомошный (<i>A. palustre</i>) лес

Примечание. П1–П5 – номера пробных площадей, 1–10 – номера участков.

стоя – 17–20 лет. Флористический состав на 87% представлен сосудистыми растениями. Почвы – пироторфяные эутрофного типа (TEpиг-ТТ). Вдоль русла р. Тунгужуль на расстоянии 25–35 м от берегового вала разбили эколого-пирологический профиль (полигон) протяженностью 250–300 м. В его пределах организовали пять примерно равноудаленных пробных площадей (10 × 10 м) и на каждой сообразно доминирующим растительным группировкам выделено по 2 участка. Характеристика растительных сообществ каждой пробной площади приведена в табл. 1. По видовому богатству участки слабо различаются между собой, что характеризует согласованность процессов восстановительной динамики.

На химический анализ отобрана 31 проба поверхностных болотных вод. Выкапывали торфяной монолит размером 35 × 35 × 40 см и образовавшееся углубление (шурф) заполнялось водой, как правило, на утро следующего дня. Наиболее высоко (5–7 см) грунтовые воды стояли на пробных площадях П3 и П4, которые примыкают к заторфованной ложбине, наиболее низко на пр. пл П5 – 55 см, которая ближе других расположена к руслу р. Тунгужуль, на остальных – примерно на уровне 20 см. На каждом участке эколого-пирологического профиля заложено по 3–6 шурфа, на площади болотного ельника, не затронутого пожаром – 7. Не позднее 2–3 дней пробы вод поступали в аналитическую лабораторию. Определяли сумму концентраций главных ионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^-), величину pH, а также содержание органического углерода. Выбор данных показателей обусловлен тем, что они характеризуют основополагающие особенности химического состава болотных вод. Аналитическую работу выполняли по руководству (Алекин и др., 1973). Болотные воды классифицировали согласно (Алекин, 1970; Перельман, Касимов, 1999).

Многомерный статистический анализ выполнен в программе STATISTICA 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным табл. 2, болотные воды эутрофного долинного торфяного массива р. Тунгужуль относятся к классу нейтральных и слабощелочных, что соответствует нейтральным и слабощелочным ландшафтно-геохимическим условиям почвенных вод юга Центральной Сибири (Мирошников и др., 2003). По степени минерализации и составу ионов воды характеризуются как пресные и слабосолоноватые гидрокарбонатные кальциево-магниевые, бедные растворенным органическим веществом. Большинство химических показателей болотных вод отличаются значительным варьированием ($\text{Cv} > 34\%$) и формируют неоднородную совокупность, оценка по (Скворцова и др., 2015). Прежде чем приступить к формальной классификации вод в сходные по химическому составу группы, была выполнена ориентировочная оценка интенсивности пожара в пределах топо-экологического профиля.

Косвенные показатели силы огневого воздействия характеризовали по качеству торфяного субстрата и состоянию сухостоя.

Пироторф массива Тунгужуль после пожара средней силы представляет собой сильно-разложившиеся растительные остатки темно-бурого цвета с единичными вкраплениями углей, монолитного, плотного сложения $0.205\text{--}0.344 \text{ г/см}^3$ (0.292 г/см^3) с зачатками агрегированности и слабо выраженной пластичностью. Пироторф сильного пожара – темно-бурый, однородный, высокой пластичности органический субстрат повышенной уплотненности $0.347\text{--}0.374 \text{ г/см}^3$ (0.360 г/см^3) с обильными включениями древесных углей, серовато-сизых скоплений золы и хорошо оформ-

Таблица 2. Химический состав поверхностных болотных вод исходного типа водно-минерального питания за-торфованной долины р. Тунгузूल и участков залежи, пройденных пожаром

№ участка	$\Sigma_{ин}$, мг/л	рН	С, мг/л	Катионы, мг/л					Анионы, мг/л		
				NH_4^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}
Болотные воды исходного типа водно-минерального питания: географические координаты – 54°16'30.42" N, 89°38'53.93" E											
01	273.5	7.9	3.5	–	35.6	12.8	1	17.6	187.9	13.7	4.9
02	298.7	7.5	3.1	–	39.6	13.8	1.2	16.4	200.1	14.0	13.6
03	310.2	7.5	2.9	1.76	40.1	13.1	1.3	20.5	210.5	13.9	6.7
04	369.1	7.4	4.7	–	54.2	21.5	1.6	8.5	242.8	8.1	32.5
05	422.5	7.4	4.7	–	56.2	28.1	1.3	10.1	279.4	8.6	38.9
06	374.5	7.2	5.5	–	65.0	15.8	1.6	6.0	239.1	9.5	37.5
07	452.0	7.4	8.6	–	72.8	22.8	4.6	10.5	277.6	12.3	51.5
Болотные воды участков торфяного массива, пройденных пожаром											
Пробная площадь П1 – 54°14'30.60" N, 89°36'03.10" E											
1	631.9	7.4	9.6	1.48	107.0	29.8	1.0	14.1	453.8	8.8	15.9
	624.7	7.3	9.2	1.53	106.0	29.7	1.0	13.3	450.0	8.0	15.2
	635.5	7.5	9.8	1.45	101.5	29.8	1.1	15.2	460.0	10.0	16.5
2	621.4	7.5	5.9	1.06	112.0	26.9	0.3	10.3	436.2	13.6	21.0
	609.1	7.4	5.4	1.01	110.0	26.8	0.3	9.4	428.0	13.1	20.6
	633.9	7.6	6.2	1.10	115.0	27.0	0.4	11.0	444.0	14.0	21.4
Пробная площадь П2 – 54°14'29.00" N, 89°36'03.00" E											
3	922.3	7.6	10.8	1.25	108.0	64.8	0.2	32.1	672.7	12.3	30.9
	912.1	7.5	10.4	1.20	107.2	65.3	0.2	31.1	665.0	12.1	30.0
	930.4	7.7	11.1	1.31	108.8	64.3	0.2	33.5	678.0	12.5	31.7
4	1068.1	7.6	11.1	1.80	96.0	90.2	0.3	43.0	777.8	11.7	47.3
	1066.8	7.5	11.0	1.74	95.0	90.2	0.3	42.2	782.0	12.3	43.2
	1068.4	7.7	11.3	1.82	97.0	90.4	0.3	44.5	773.0	10.1	51.4
Пробная площадь П3 – 54°14'27.20" N, 89°36'02.80" E											
5	740.7	7.7	15.3	1.78	96.0	54.7	0.7	11.0	528.3	17.9	30.2
	758.1	7.6	14.1	1.72	94.0	58.6	0.7	13.3	535.6	18.4	35.8
	738.4	7.8	16.3	1.84	97.0	51.8	0.7	15.2	520.9	17.5	33.4
Пробная площадь П4 – 54°14'26.20" N, 89°36'02.20" E											
6	1120.8	7.5	13.0	1.52	126.0	82.1	0.4	31.3	757.0	10.1	112.4
	1120.5	7.4	14.1	1.47	125.0	81.7	0.4	30.5	761.3	9.9	110.3
	1121.5	7.6	11.9	1.56	127.0	82.6	0.4	32.7	752.7	10.2	114.4
7	897.6	7.8	11.1	1.65	120.0	65.3	0.3	24.0	574.0	12.3	100.0
	890.9	7.7	11.9	1.60	121.6	64.3	0.3	23.8	568.0	12.1	99.2
	903.4	7.9	10.4	1.69	118.4	66.2	0.3	25.0	579.0	12.3	100.4
Пробная площадь П5 – 54°14'24.70" N, 89°35'59.40" E											
8	711.8	7.5	12.3	2.13	106.4	46.6	0.6	12.3	479.5	14.0	50.3
	712.7	7.4	12.6	2.05	107.2	46.1	0.6	11.6	482.5	13.8	48.9
	709.8	7.6	11.9	2.18	104.6	47.0	0.6	13.1	476.4	14.2	51.7
Статистическая оценка гидрохимических показателей торфяной залежи в целом											
\bar{x}	730.7	7.6	9.7	1.6	95.8	48.7	0.8	20.4	505.6	12.3	45.7
$S \bar{x}$	53.5	0.03	0.8	0.1	5.4	5.2	0.2	2.3	38.4	0.5	6.7
<i>min</i>	273.5	7.2	2.9	1.01	35.6	12.8	0.2	6	187.9	8	4.9
<i>max</i>	1121.5	7.9	16.3	2.2	127.0	90.4	4.6	44.5	782.0	18.4	114.4
Cv	36	2	38	20	28	52	107	55	37	22	72

Примечание. \bar{x} – среднее, $S \bar{x}$ – ошибка среднего, *min* – минимум, *max* – максимум, Cv – коэффициент вариации, %, прочерк – не определялось.

Таблица 3. Оценка межгрупповой дисперсии кластеров поверхностных болотных вод методом дискриминантного анализа

Кластер	Квадраты расстояний Махаланобиса, <i>p</i> -уровень значимости			Матрица классификации			
	I	II	III	% попадания	I	II	III
I	–	216.5	651.3	100	7	0	0
II	<0.001	–	125.2	100	0	15	0
III	<0.001	<0.001	–	100	0	0	9
				итоги классификации:			
				100	7	15	9

Примечание. Квадраты расстояний Махаланобиса – над чертой, *p*-уровни значимости различий – под чертой.

ленных зернисто-ореховатых агрегатов. Выявленные признаки пирогенной трансформации лесной торфяной почвы согласуются с итогами лабораторных опытов: торф при термической деструкции дает большую усадку, превращается в мелкие порошки, а в интервале температур 150–600°C проходит стадию размягчения, образуя вязкую массу (Раковский и др., 1959). Показано, что свойство пластичности пироторфа в природных условиях сопряжено с повышенной концентрацией битумов – продуктов спирто-бензольной экстракции (Efremova, Efremov, 1996). Увеличение плотности сложения и резкое уменьшение порозности осушенных торфяных, а также лесных почв после пожара отмечается другими авторами (Зайдельман и др., 2003; Giovannini *et al.*, 1986). Торфяной субстрат, не пройденный пожаром – рыхлый, губчатого сложения, низкой плотности 0.024–0.068 г/см³ (среднее 0.049 г/см³) слагается в основном светло-бурыми, слабо мацерированными остатками мхов с небольшим включением древесных фрагментов и раковин пресноводных моллюсков.

По состоянию сухостоя и валежа методом древовидной кластеризации (на основании определенной меры сходства или расстояния между объектами) организовалось два кластера, которые определили наиболее возможно значимое объединение площадей выгоревшего ельника (рис. 2а). Сгруппированные участки 1, 2, 5, 8 (в составе пробных площадей П1, П3 и П5), отличаются суммарным количеством погибших деревьев 38.3 шт/100 м² и примерно равным соотношением сухостоя и упавших стволов без ярко выраженных признаков обгорания, что, вероятнее всего, соответствует почвенно-торфяному пожару средней силы. Кластер, группирующий участки 3, 4, 6, 7 (пр. пл П2, П4) характеризуется сокращением количества сухостоя в 3 раза и увеличением на 40% поваленных стволов. При этом валежник практически полностью обуглен, что указывает на устойчивый сильный пожар.

Формализованная классификация болотных вод по химическому составу. В качестве предварительного (разведочного) этапа исследования структуры данных использовали метод древовидной кластеризации. Группировку вод выполнили по совокупности показателей – содержанию главных ионов (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, HCO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻), а также аммония и водорастворимого органического углерода. На дендрограмме четко обособились три кластера (рис. 2б). Кластер I объединяет пробы вод на участках, не пройденных пожаром. Кластер II и III группируют воды в пределах зоны воздействия пожара различной интенсивности – среднего и сильного соответственно. Как видим, итоги гидрохимической классификации фактически соответствуют объединению постпирогенных участков леса (пробных площадей) по интенсивности огневого воздействия на древостои.

Объективность выделения кластеров (точность классификации) подтвердили с помощью методов дискриминантного анализа. Согласно оценке квадратов расстояния Махаланобиса, сгруппированные кластеры с высоким уровнем значимости различаются между собой: пробы вод характеризуются 100% попаданием в соответствующий кластер (табл. 3). Наиболее удалены друг от друга воды исходного типа водно-минерального питания и торфяного массива, пройденного сильным пожаром. Персональный вклад ингредиентов в дискриминацию (разделение) кластеров оценивали статистиками лямбда Уилкса и *F*-значение. Согласно табл. 4, наибольшими дискриминантными возможностями вод обладает ион гидрокарбоната, за ним следуют магний, сульфат-ион, хлор. Наименьшей способностью разделять кластеры вод обладает катион натрия. Содержание углерода является незначимым показателем, а кальций, калий и аммоний исключаются из модели.

Минимизировать число переменных, т.е. определить количество скрытых (латентных) независимых факторов, позволяет канонический анализ пу-

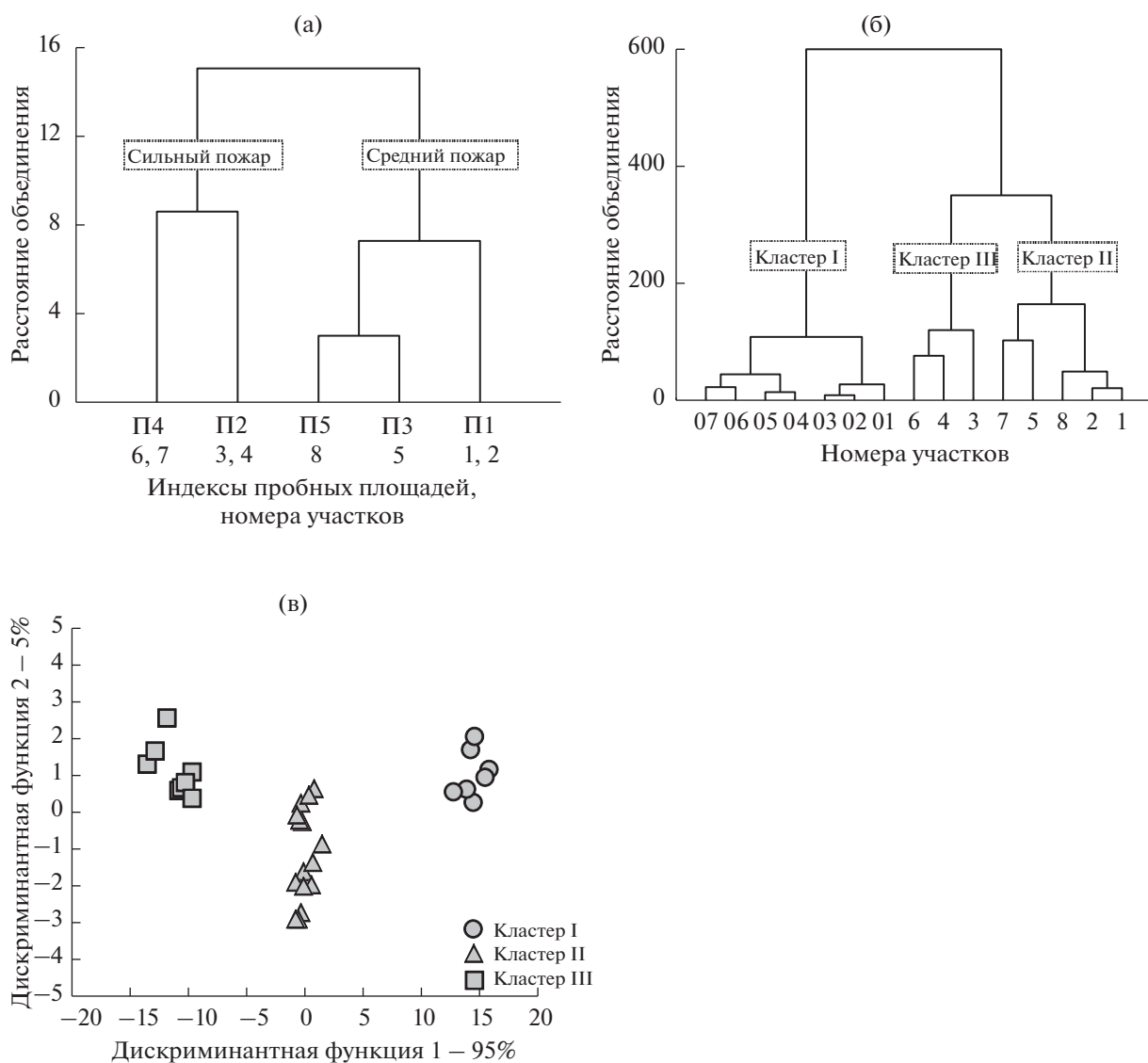


Рис. 2. Древоидная диаграмма объединения участков торфяного массива долины р. Тунгузюль по состоянию сухостоя и валежа (а), по химическому составу болотных вод (б), канонические значения дискриминантных функций кластеров болотных вод (в). Кластер I – болотные воды исходного типа водно-минерального питания, кластеры II и III – болотные воды массивов, пройденных средним и сильным пожаром соответственно.

тем вычисления дискриминантных функций (корней). Количество оцениваемых функций рассчитывается как число выделенных кластеров минус единица. Каждая функция характеризуется определенной способностью различать кластеры. Согласно табл. 5, первый корень обладает высокой дискриминирующей мощностью. Стандартизованные коэффициенты позволяют определить для каждой переменной наибольший совокупный вклад, или “вес”, в значение дискриминантной функции (корня). Согласно критерию Кайзера, к рассмотрению числа переменных принимались те стандартизованные коэффициенты, абсолютные значения которых больше 1: нагрузки канонических факторов можно интерпретировать так

же, как в факторном анализе (Ким и др., 1989). Как следует из табл. 6, дискриминантная функция (корень) 1, ответственная за 95% объясненной дисперсии, взвешивается в основном содержанием ионов HCO_3^- , Mg^{2+} и SO_4^- . Вклад в канонический корень 2, на долю которого приходится 5% дискриминирующих возможностей, вносят катионы натрия. Персональный вклад канонической переменной в значение каждой дискриминантной функции оценивается структурными коэффициентами, которые показывают, насколько тесно связаны отдельная переменная и конкретная дискриминантная функция. Когда абсолютная величина такого коэффициента велика, вся ин-

Таблица 4. Вклад показателей химического состава в дискриминацию поверхностных болотных вод

Переменные модели	Лямбда Уилкса	Частная лямбда	F-критерий	p-уровень
Оценка качества модели: лямбда Уилкса – 0.0046, F-критерий – 65.87, p-уровень < 0.001				
HCO ₃ ⁻	0.105	0.037	295.9	<0.001
Mg ²⁺	0.008	0.501	11.4	<0.001
SO ₄ ²⁻	0.007	0.571	8.6	0.002
Na ⁺	0.005	0.749	3.9	0.036
Cl ⁻	0.006	0.629	6.8	0.005
C	0.005	0.851	2.0	0.157

Таблица 5. Собственные значения дискриминантных функций (корней) и их статистическая значимость

Дискриминантная функция (корень)	Собственное значение	Каноническая корреляция, R	λ-статистика Уилкса	Статистика хи-квадрат, χ ²	p-уровень
Корень 1	88.8	0.99	0.005	139.8	<0.001
Корень 2	3.2	0.78	0.407	25.1	<0.001

формация о дискриминантной функции заключена в этой переменной, если же коэффициент близок к нулю – их зависимость мала (Ким и др., 1989). Как следует из табл. 6, наиболее тесно с функцией 1 связаны анионы гидрокарбонатов, с корнем 2 – катионы натрия.

Диаграмма рассеяния нестандартизованных канонических коэффициентов для каждой отдельной пробы вод в координатах двух выделенных дискриминантных функций показывает три четко обособленные группы, что дополнительно подтверждает объективность организации болотных вод по химическому составу (рис. 2в).

Химический состав и систематика кластеров болотных вод. Болотные воды торфяной залежи естественного хода развития относятся по степени минерализации к семейству пресных, бедных растворенным органическим веществом гумусовой природы, оценка по (Ефремова и др., 2018) по соотношению ионов – к виду гидрокарбонатных кальциево-магниевых, подвиду II – HCO₃⁻ < Ca²⁺ + Mg²⁺ < HCO₃⁻ + SO₄²⁻, по величине жесткости – к мягким (табл. 7).

Кластер болотных вод торфяной залежи, пройденной пожаром средней силы, характери-

Таблица 6. Коэффициенты дискриминантных функций (корней) и доля объясненной дисперсии

Переменные	Стандартизованные коэффициенты		Коэффициенты факторной структуры	
	корень 1	корень 2	корень 1	корень 2
HCO ₃ ⁻	-3.59	-0.15	-0.41	0.25
Mg ²⁺	2.58	-0.86	-0.15	0.10
SO ₄ ²⁻	1.21	0.32	-0.04	0.21
Na ⁺	0.29	1.71	-0.10	0.43
Cl ⁻	-0.73	-0.90	0.00	-0.36
Собственные значения корня	88.8	3.2		
Накопленная доля объясненной дисперсии	0.95	1.00		
Доля объясненной дисперсии, %	95	5		

Таблица 7. Химический состав кластеров поверхностных болотных вод эвтрофного торфяного массива долины р. Тунгужуль естественного ряда развития и участков залежи, пройденных пожаром

$\Sigma_{и}$, мг/л	рН	С, мг/л	Катионы, мг/л					Анионы, мг/л			Общая жесткость, $Ca^{2+} + Mg^{2+}$, мг-экв/л
			NH_4^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K ⁺	Na ⁺	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}	
Кластер I – пресные, мягкие болотные воды исходного типа водно-минерального питания											
<u>357</u>	<u>7.5</u>	<u>4.7</u>	1.8	<u>51.9</u>	<u>18.3</u>	<u>1.8</u>	<u>12.8</u>	<u>233.9</u>	<u>11.4</u>	<u>26.5</u>	<u>4.12</u>
25.0	0.08	0.7		5.3	2.2	0.5	2.0	13.7	1.0	6.8	0.4
Кластер II – пресные, жесткие болотные воды массива, пройденного пожаром средней силы											
<u>721</u>	<u>7.6</u>	<u>10.8</u>	<u>1.6</u>	<u>107.8</u>	<u>44.7</u>	<u>0.6</u>	<u>14.8</u>	<u>494.4</u>	<u>13.3</u>	<u>44.0</u>	<u>9.1</u>
26.7	0.04	0.8	0.1	2.2	3.9	0.1	1.3	13.5	0.8	8.1	0.4
Кластер III – слабосоленоватые, очень жесткие болотные воды массива, пройденного сильным пожаром											
<u>1037</u>	<u>7.6</u>	<u>11.63</u>	<u>1.5</u>	<u>110.0</u>	<u>79.0</u>	<u>0.3</u>	<u>35.7</u>	<u>735.5</u>	<u>11.2</u>	<u>63.5</u>	<u>12.1</u>
29.8	0.03	0.4	0.1	4.4	3.8	0.03	1.9	16.2	0.4	12.5	0.3

Примечание. $\Sigma_{и}$ – сумма ионов (степень минерализации), числитель – среднее, знаменатель – ошибка среднего (\pm).

Таблица 8. Кратность превышения и темпы прироста гидрохимических показателей эвтрофного болота, пройденного пожаром различной интенсивности относительно исходного типа водно-минерального питания

$\Sigma_{и}$	С	Катионы				Анионы		
		Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na ⁺	K ⁺	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}
Пожар средней силы								
<u>2.02</u>	<u>2.29</u>	<u>2.08</u>	<u>2.45</u>	<u>1.16</u>	<u>0.32</u>	<u>2.11</u>	<u>1.16</u>	<u>1.66</u>
102	132	107.7	144.3	15.6	-66.6	111.4	16.7	66.0
Сильный пожар								
<u>2.90</u>	<u>2.47</u>	<u>2.12</u>	<u>4.33</u>	<u>2.79</u>	<u>0.16</u>	<u>3.14</u>	<u>0.98</u>	<u>2.40</u>
190.5	146.8	111.9	331.7	178.9	-83.3	214.4	-1.8	139.6

Примечание. Числитель – кратность превышения, знаменатель – темпы прироста, %.

зается значительным увеличением суммы ионов за счет более чем двукратного роста HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , а также водорастворимого углерода (табл. 8). Несколько в меньшей кратности (1.2–1.7) возрастает содержание ионов Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} . Тем не менее, воды сохраняют исходную классификационную принадлежность по основным таксономическим уровням, но переходят в категорию жестких. За 20-летний послепожарный период в водах снизилось лишь количество калия, который, без сомнения, благодаря высокой растворимости, легко вымывался из толщи торфяника, а также активно поглощался корнями древесной и травянистой растительности.

Под влиянием сильного пожара в болотных водах резко возрастают темпы прироста ионов HCO_3^- и Mg^{2+} (214–332%), немногим меньше Na^+ и SO_4^{2-} (179–140%). Воды переходят в другую категорию качества и классифицируются как слабосо-

леноватые, очень жесткие, хотя по-прежнему обеднены растворенным органическим веществом, сохраняют гидрокарбонатный кальциево-магниевый состав с соотношением ионов, присутствующим подвиду II. Воздействие сильного пожара относительно пожара средней силы на поведение катионов кальция, калия, аммония, а также водорастворимого углерода сказывается мало.

Спустя 20 лет после пожара сгруппированные кластеры болотных вод эвтрофного торфяного массива долины р. Тунгужуль вне зависимости от интенсивности огня сохраняют принадлежность к классу нейтральных и слабощелочных. Аналогичная ситуация отмечается в погребенных пирогенно-преобразованных слоях торфяной залежи, в которых кислотно-основные условия среды не отличаются от современных почв (Ефремова, Ефремов, 1994; Глебов, Александрова, 1973). Причина, на наш взгляд, кроется в существенном обогащении пирогенных горизонтов торфа гумусовыми кислотами главным образом первой фракции, которая

по сравнению с другими фракциями торфяных гуминовых кислот содержит в составе молекулы большее количество карбоксильных групп (Ефремова, Ефремов, 2006). Преимущественное формирование данной фракции, вероятнее всего, обусловлено реакциями омыления, которые преобладают в процессе мокрого обугливания торфа и сопровождаются гидролитическим расщеплением сложных эфиров с образованием гидроксильных и карбоксильных групп (Раковский и др., 1959).

Итак, методами многомерного анализа объективно доказано, что наибольшей дискриминирующей мощностью (95%) в определении болотных вод обладают ионы магния и гидрокарбонатов. Такое явление объяснимо. Установлено, что торфяные пожары сопровождаются химическим недожогом и выбросом в атмосферу большого количества дыма, двуокиси серы, углекислого газа и других продуктов горения (Добрых, Захарычева, 2009). При растворении CO_2 в воде образуется, как известно, угольная кислота (H_2CO_3), которая при величине рН 6–10 диссоциирует на гидрокарбонаты (HCO_3^-) или карбонаты (CO_3^{2-}) при уровне рН 10–12. Слабощелочная реакция болотных вод обсуждаемой торфяной залежи (рН 7.6) способствует активному образованию гидрокарбонатов. В воде, насыщенной углекислым газом, сильно увеличивается растворимость гидрокарбонатов кальция и особенно магния (Шварцев, 1999), которые в составе зольных элементов, наряду с калием, фосфором, натрием и другими элементами, высвобождаются из субстрата огневого воздействия (Мелехов, Душа-Гудым, 1979; Абаимов и др., 2001; Tuittila *et al.*, 2007). Магний активно поступает в водную среду, отделяясь от хлорофилла под действием термической деструкции растительных остатков и угольной кислоты. Меньший вес ионов Na^+ и SO_4^{2-} в дискриминации болотных вод массива Тунгужуль обусловлен, скорее всего, их активным выщелачиванием с площади пожара в следствие высокой растворимости.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на примере ключевого объекта за торфованных речных долин Кузнецкого Алатау, занятых ельниками, объективно доказана трансформация химического состава поверхностных вод эвтрофных болот вследствие лесо-торфяных пожаров.

2. Почвенно-грунтовые воды болотного ельника по содержанию главных ионов объективно сгруппировались в три кластера: исходного типа водно-минерального питания (кластер I), после пожара средней силы (кластер II) и пройденные сильным пожаром (кластер III). Наибольшей дискриминирующей мощностью (95%) в опреде-

лении болотных вод обладают ионы магния и гидрокарбонаты.

3. Воды исходного типа водно-минерального питания относятся к классу нейтральных и слабощелочных, семейству пресных гидрокарбонатных кальциево-магниевых, бедных растворенным органическим веществом, по величине жесткости — к мягким. Под воздействием пожара средней силы болотные воды, сохраняя статус пресных, переходят в категорию жестких. Сильный пожар способствует значительному увеличению общей минерализации ($\Sigma_{\text{и}} > 1000$ мг/л) и воды трансформируются в слабосоленоватые, очень жесткие. Независимо от силы пожара воды болотного ельника эвтрофного ряда развития сохраняют слабощелочную реакцию среды и остаются обедненными водорастворимым органическим веществом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абаимов А.П., Прокушкин С.Г., Зырянова О.А., Каназава Ю., Такахаши К. Экологическая и лесообразующая роль пожаров в криолитозоне Сибири // Лесоведение. 2001. № 5. С. 50–59.
- Алекин О.А. Основы гидрохимии. Л.: Гидрометеоздат, 1970. 444 с.
- Алекин О.А., Семенов А.Д., Скворцов Б.А. Руководство по химическому анализу вод суши. Л.: Гидрометеоздат, 1973. 269 с.
- Банников М.В., Поздняков А.И., Шевченко Е.М., Умарова А.Б., Бутылкина М.А. Изменение свойств пирогенно-торфяных почв под влиянием факторов почвообразования // Вест. Моск. Унив. Сер. 17. Почвоведение. 2004. № 1. С. 37–43.
- Волокитина А.В. Пожарное созревание заболоченных лесов юга Западной Сибири / Лесные пожары и их последствие. Красноярск: ИЛиД, 1985. С. 64–73.
- Глебов Ф.З., Александрова С.Р. Фитоценологическая характеристика, гидротермический режим и почвенная микрофлора некоторых типов болотных Томского стационара в связи с микрорельефом / Комплексная оценка болот и заболоченных лесов в связи с их мелиорацией. Новосибирск: Наука, 1973. С. 23–44.
- Глухова Т.В., Сирин А.А. Потери почвенного углерода при пожаре на осушенном лесном верховом болоте // Почвоведение. 2018. № 5. С. 580–588.
- Добрых В.А., Захарычева Т.А. Дым лесных пожаров и здоровье. Хабаровск: Изд-во ГОУ ВПО Дальневост. Государ. Мед. Универ. 2009. 201 с.
- Ефремова Т.Т., Ефремов С.П. Торфяные пожары как экологический фактор развития лесоболотных экосистем // Экология, 1994. № 5. С. 27–34.
- Ефремова Т.Т., Ефремов С.П. Пирогенная трансформация органического вещества почв лесных болот // Почвоведение. 2006. № 12. С. 1441–1450.
- Ефремова Т.Т., Ефремов С.П., Аврова А.Ф. Формализованная группировка притоков Оби таежной зоны по химическому составу вод // Географический вестник = Geographical bulletin. 2018. № 2. С. 88–103.

- Зайдельман Ф.Р., Морозова Д.И., Шваров А.П. Изменение свойств пирогенных образований и растительности на сгоревших осушенных почвах полесий // Почвоведение. 2003. № 11. С. 1300–1309.
- Ким Дж.-О., Мьюллер Ч.У., Клекка У.Р., Олдендерфер М.С., Блэшфилд Р.К. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. М.: Финансы и статистика, 1989. 215 с.
- Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
- Копотева Т.А., Купцова В.А. Влияние пожаров на функционирование фитоценозов торфяных болот Среднеамурской низменности // Экология. 2016. № 1. С. 14–21.
- Курбатский Н.П. Техника и тактика тушения лесных пожаров. М.: Гослесбумиздат, 1962. 154 с.
- Мелехов И.С., Душа-Гудым С.И. Лесная пирология. М., 1979. 80 с.
- Мировая реферативная база почвенных ресурсов 2014. Международная система почвенной классификации для диагностики почв и создания легенд почвенных карт. Исправленная и дополненная версия 2015. ФАО и МГУ, 2017. 203 с.
- Мирошников А.Е., Стрижма Т.П., Смолянинова Л.Г., Анцифорова О.В., Кочнева Н.А., Кузнецов В.В., Максимова С.В. Оценка территориального экологического равновесия Центральной Сибири. Красноярск, КНИИГиМС. 2003. 192 с.
- Перельман А.И., Касимов Н.С. Геохимия ландшафта. М.: Астрей, 1999. 768 с.
- Пьявченко Н.И. Биогеоэценологические закономерности генезиса болот и динамика растительного покрова / Генезис и динамика болот. М.: МГУ, 1978. С. 13–18.
- Раковский В.Е., Каганович Ф.Л., Новичкова Е.А. Химия пирогенных процессов. Минск: АН БССР, 1959. 208 с.
- Санников С.Н. Лесные пожары как фактор преобразования структуры, возобновления и эволюции биогеоценозов // Экология. 1981. № 6. С. 23–33.
- Скворцова Е.Б., Рожков В.А., Щепотьев В.Н., Дмитренко В.Н., Тюгай З.Н., Хохлов С.Ф. Варьирование микроморфологических показателей строения пор в суглинистых почвах южной тайги и лесостепи европейской территории России // Почвоведение. 2015. № 9. С. 1061–1073.
- Фуряев В.В. Влияние уровней грунтовых вод на пожарное созревание заболоченных и болотных лесов Кеть-Чулымского междуречья / Вопросы лесной пирологии. Красноярск, 1970. С. 186–220.
- Шварцев С.Л. Гидрогеохимия зоны гипергенеза. М.: Недра. 1999. 366 с.
- Benscoter B.W., Greenacre D., Turetsky M.R. Wildfire as a key determinant of peatland microtopography // Canad. J. Forest Res. 2015. V. 45. № 8. P. 1132–1136.
- Giovannini G., Lucchesi S., Giacheffi M. Soil aggregation and cementation as affected by heating / Trans. 13. Congr. Int. Soc. Soil. Sci. Hamburg, 13–20 Aug., 1986. V. 2. P. 58–59.
- Efremova T.T., Efremov S.P. Ecological Effects of Peat Fire on Forested Bog Ecosystems / Fire in Ecosystems of Boreal Eurasia. Dordrecht / Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1996. Printed in the Netherlands. P. 350–357.
- Tuittila E.-S., Väliiranta M., Laine J., Korhola A. Quantifying patterns and controls of mire vegetation succession in a southern boreal bog using a combination of partial ordinations // J. Veget. Sci. 2007. V. 18. P. 891–902.
- Turetsky Merritt R., Benscoter Brian, Page Susan, Rein Guillermo, R. van der Werf Guido and Watts Adam. Global vulnerability of peatlands to fire and carbon loss // Nature Geoscience. 2015. V. 8. P. 11–14.
- Wieder R.K., Scott K.D., Kamminga K.K., Vile M.A., Vitt D.H., Bone T., Xu B., Benscoter B.W., Bhatti J.S. Post-fire carbon balance in boreal bogs of Alberta, Canada // Glob. Change Biol. 2009. V. 15. P. 63–81.

Experience in Assessing the Impact of Forest-Peat Fires on the Hydrochemical Properties of the Swamps

T. T. Efremova^{1, #}, A. V. Pimenov¹, S. P. Efremov¹, A. F. Avrova¹, and D. Yu. Efimov¹

¹Sukachev Institute of Forest SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia

[#]e-mail: efr2@ksc.krasn.ru

For the first time, using the example of a key object of the peat river valleys of the Kuznetsk Alatau occupied by spruce forests, it is shown, that due to forest-peat fires, swamp waters are clearly differentiated by the content of main ions. Swamp waters objectively form three groups: 1 – waters of the original type of mineral nutrition (fresh, soft), 2 – waters of peatland, covered by a medium fire (fresh, hard), 3 – waters of peatland, covered by a high fire (slightly saline, very hard). Magnesium ions and bicarbonates have the highest discriminating power (95%) in the determination of swamp waters. The swamp waters of the post-pyrogenic peatland do not lose similar to waters of the original type the ratio of the main ions and retain the hydro-carbonate calcium-magnesium composition.

УДК 631.463:574.24

ВЫЯВЛЕНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННОГО АКТИНОМИЦЕТА *Streptomyces* sp. 89

© 2021 г. Ю. М. Поляк*, @, В. И. Сухаревич*

*Санкт-Петербургский НИЦ экологической безопасности РАН – обособленное структурное подразделение ФГБУН Санкт-Петербургский ФИЦ РАН, Корпусная ул., 18, Санкт-Петербург, 197110 Россия

@E-mail: yuliapolyak@mail.ru

Поступила в редакцию 25.01.2018 г.

После доработки 30.10.2018 г.

Принята к публикации 17.03.2021 г.

Из чернозема типичного выделена культура актиномицета *Streptomyces* sp. 89, обладающая антагонистическими свойствами по отношению к фитопатогенным микроорганизмам. Из биомассы актиномицета выделены и идентифицированы антибиотические вещества, обладающие физиологической активностью по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям. Показано, что соотношение компонентов антибиотического комплекса актиномицета определяется в значительной степени окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП) среды. Показано, что ОВП и другие факторы среды оказывают заметное влияние на образование полиена, но в меньшей степени – на синтез неполиеновых компонентов. Показана возможность целенаправленного регулирования компонентного состава антибиотика и, как следствие, спектра его биологического действия.

Ключевые слова: фитопатогенные микроорганизмы, чернозем типичный, биологические активные соединения, антибиотики, окислительно-восстановительный потенциал

DOI: 10.31857/S1026347021050127

Интерес к антагонистическим свойствам почвенных микроорганизмов, как фактору защиты растений от фитопатогенов, существенно возрос в последние десятилетия в связи с повышенным использованием для этих целей химикатов, негативно влияющих на окружающую среду (Whipps, 2001). Поэтому микробиологический контроль фитопатогенов рассматривается, как альтернатива химическим соединениям, применяемым в сельском хозяйстве, или как дополнительный способ сокращения их количества (Comprant *et al.*, 2005; Ulloa-Ogaz *et al.*, 2015).

Основная часть исследований, посвященных данной проблеме, выполнена с бактериями и грибами, многие из которых могут весьма эффективно осуществлять биологический контроль над фитопатогенами (Whipps, 2001; Raaijmakers *et al.*, 2009; Beneduzi *et al.*, 2012). Показано, что бактерии, ассоциированные с растениями, стимулируют их рост и подавляют развитие фитопатогенных микроорганизмов, выделяя различные вещества, обладающие антимикробной активностью – антибиотики, сидерофоры, бактериоцины, гидролитические ферменты и др. (Comprant *et al.*, 2005; Максимов и др. 2011; Леонтьевская, Добровольская, 2014).

Среди указанных метаболитов наиболее эффективными являются антибиотики, проявляющие

высокую антимикробную активность и специфичность действия, а наиболее перспективную группу продуцентов антибиотиков составляют актиномицеты, относящиеся к роду *Streptomyces* (Beneduzi *et al.*, 2012; Поляк, Сухаревич, 2017). Высокая биоцидная активность продуктов метаболизма стрептомицетов против бактерий и грибов позволяет использовать их для производства медицинских и ветеринарных препаратов, однако, в качестве агентов биологического контроля за фитопатогенами микроорганизмы данной группы, в настоящее время исследованы недостаточно (Berg *et al.*, 2001; El-Tarabily, Sivasithamparam, 2006).

Тем не менее, известно, что антагонистические свойства стрептомицетов играют важную роль в снижении численности нежелательных популяций и регулировании взаимоотношений в почвенном микробоценозе (Звягинцев, Зенова, 2001; Звенигородский и др., 2004). Проявление и уровень антагонистической активности почвенных микроорганизмов – бактерий, грибов, актиномицетов, зависит не только от химического состава и путей биосинтеза веществ аллелопатической природы, но и от факторов среды, оказывающих влияние на биологический контроль (Duffy, Défago, 1999; Поляк, Сухаревич, 2019).

К числу факторов, от которых зависят антагонистические свойства микроорганизмов, относятся наличие минеральных и органических элементов питания, тип источника органического вещества, pH, свойства почвы, ризосферы и др. (Johansson *et al.*, 2004; Prashar, Kapoor, 2014; Schlatter *et al.*, 2015; Polyak, Sukharevich, 2019). Важным, но малоизученным в проблеме биологического контроля, остается такой физико-химический фактор как окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) (Шигаева и др. 2020).

Многими исследователями показано, что этот параметр среды оказывает значительное влияние на генезис и плодородие почв, превращение органических веществ, соединений азота, фосфора, серы, железа, марганца и других элементов, на процессы роста и физиолого-биохимическую активность различных групп микроорганизмов (Сухаревич и др., 1994; Wlodarczyk *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003).

Существует связь почвенной микробиоты и ОВП: величина потенциала влияет на развитие микроорганизмов и биологическую активность почв (Wlodarczyk *et al.*, 2002), а микроорганизмы, в свою очередь, создают условия для изменения ОВП (повышения или понижения). В почве с ОВП, равном или менее 150 мВ, интенсивнее происходят восстановительные процессы, присутствуют сероводород, метан и другие углеводороды. Преобладание окислительных процессов характеризуется присутствием свободного кислорода или других сильных окислителей, а величина ОВП почвы составляет от 150 до 700 мВ. С помощью величины ОВП среды можно определить уровень ее аэрации, степень окисленности или восстановленности (Nishiyama, Hisabori, 2009; Szafranek-Nakonieczna, Stepniewska, 2015).

Учитывая значительную роль данного фактора в жизнедеятельности микроорганизмов, очевидно, что в различных окислительно-восстановительных условиях будут происходить изменения в образовании микробами-антагонистами биологически активных веществ, а, следовательно, изменится и их способность осуществлять биоконтроль над фитопатогенами. В первую очередь, это относится к актиномицетам, образующим комплексные антибиотики, отдельные компоненты которых обладают различным спектром биологического действия (Звягинцев, Зенова, 2001).

Настоящая работа посвящена выделению и идентификации культуры актиномицета, обладающего антагонистическими свойствами по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, изучению состава и антимикробных свойств образующих биологически активных веществ, определению характера и степени воздействия на биосинтез антибиотических компонентов такого

важного фактора почвенной среды, как окислительно-восстановительный потенциал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и идентификация актиномицета. В работе использовали культуру актиномицета, выделенную из верхнего 0–20 см горизонта чернозема типичного (*Chernozem typical*) Полтавской области (Украина), характеризующегося следующими физико-химическими свойствами: $C_{орг}$ – 7.3%, pH 6.9, обменные катионы (ммоль/100 г): Ca^{2+} – 28.4, Mg^{2+} – 6.3, $K_{обм}$ 16.2 мг/100 г, $P_2O_{5\text{плодв}}$ 9.6 мг/100 г, содержание физической глины – 55.3%, ила – 28.1%.

Для выделения актиномицета использовали традиционный метод посева на крахмало-аммиачный агар (КАА). Идентификацию изолята проводили с использованием диагностических сред и методов, рекомендованных в определителях Берджи (Williams *et al.*, 1989) и Гаузе с соавт. (1983). Морфологию мицелия, спораносцев, поверхность спор изучали с использованием сканирующей электронной микроскопии по методу Блэк (Black, 1974) и просматривали в микроскопе JMS – 35С (Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Изометрическую форму диаминопимелиновой кислоты (ДАП) клеточных стенок изолята определяли по методу Станека и Робертса (Stanek, Roberts, 1974).

Культивирование в жидкой среде. Изолят, обозначенный как *Streptomyces* sp. 89, культивировали в глубинных условиях на среде следующего состава (г/л): соевая мука – 15, глюкоза – 15, глицерин – 5, крахмал – 5, натрий хлористый – 5, кальций углекислый – 1, pH 6.8–7.2. Культивирование проводили в течение 5 сут в колбах объемом 250 мл на качалке (240 об./мин) при 28°C.

Для регуляции окислительно-восстановительного потенциала среды использовали восстановители ($Na_2S_2O_3$, $K_4Fe(CN)_6$, цистеин) в концентрации от 0.05 до 1.0%, окислители ($KMnO_4$, $K_3Fe(CN)_6$) в концентрации от 0.001 до 0.2%, и кислород воздуха. Интенсивность аэрации среды варьировали изменением объема среды в колбах объемом от 30 до 150 мл. Для регуляции процесса биосинтеза антибиотических веществ в среду вносили соли натрия и калия – Na_2CO_3 , $NaCl$, Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , в концентрации от 0.3 до 3%.

Уровень ОВП среды определяли с использованием платинового игольчатого электрода ($d = 0.5$ мм) и хлорсеребряного электрода сравнения ЭВЛ-1М4 на pH метре № 5170 и выражали в мВ. Рост актиномицета в среде контролировали по изменению его сухого веса. Спектры поглощения метанольных экстрактов биомассы и нативных растворов в УФ свете определяли на спектрофотометре

Genesys 10uv scanning (“Thermo Spectronic”, США).

Определение антагонистической активности актиномицета. Активность антибиотических веществ определяли методом диффузии в агар (Поляк и др., 1979) среды Чапека с крахмалом для грибов, и МПА — для бактерий. При определении спектра биологического действия в качестве тест-культур использовали чистые культуры фитопатогенных и токсигенных грибов *Alternaria solani* Sorauer, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Aspergillus terreus* Thom, *Botrytis cinerea* f. lini, *Penicillium cyclopium* Westling, *Penicillium ochrochloron* Biourge, *Penicillium granulatum* Bainier, *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, дрожжеподобных грибов *Candida utilis* (Henneberg) Lodder и Kreger, *Candida albicans* Berkhout, бактерий *Bacillus mesentericus* Trevisan, *Bacillus subtilis* Cohn, *Corynebacterium sepedonicum* Spieckermann & Kothhoff, *Pseudomonas syringae* van Hall, *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Xanthomonas campestris* Dowson, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Зоны ингибирования роста грибов измеряли после инкубации при температуре 28°C в течение 5 сут, бактерий — 2 сут.

Определение биологически активных веществ, образуемых актиномицетом. Антибиотики, образующиеся *Streptomyces* sp. 89, выделяли из биомассы и подвергали химической очистке от биологически неактивных веществ.

Для выделения неполиеновых антибиотиков *Streptomyces* sp. 89 культивировали в среде следующего состава (г/л): соевая мука — 15, глюкоза — 15, глицерин — 5, крахмал — 5, натрий хлористый — 5, кальций углекислый — 1, $K_4Fe(CN)_6$ — 0.5 в течение 5 сут. Из полученной микробной биомассы антибиотик экстрагировали гексаном. Экстракты высушивали свежeproкаленным $MgSO_4$, упаривали в вакууме, после чего полученное бесцветное масло перекристаллизовывали гексаном. После экстракции гексаном мицелий *Streptomyces* sp. 89 экстрагировали этилацетатом (трехкратно) и получали другой антибиотический компонент. Экстракты упаривали в вакууме на роторном испарителе и перекристаллизовали смесь этилацетата с ацетоном (в соотношении 1 : 1).

Для выделения из биомассы антибиотического вещества, имеющего максимум поглощения в УФ свете при 265 нм, после экстракции гексаном и этилацетатом, проводили экстракцию метанолом. Метанольный экстракт упаривали в вакууме на роторном испарителе. Полученный сироп коричневого цвета снова растворяли в метаноле и пропускали через колонку с силикагелем (Kieselgur G, 100–200 мин., “Merck”, Германия, колонка $d = 5$ см, высота слоя 10 см). Элюцию проводили сначала смесью $CH_3COOH-CHCl_3$ (6 : 4), затем

смесью бутанол — вода (4 : 1). Объединенные фракции бутанол — вода упаривали досуха на роторном испарителе. Полученный гигроскопичный продукт коричневого цвета пропускали через сефадекс LH-20 (элюция метанолом).

Полиеновый антибиотик выделяли из биомассы продуцента *Streptomyces* sp. 89, который культивировали на среде следующего состава: соевая мука — 15, глюкоза — 15, глицерин — 5, крахмал — 5, натрий хлористый — 5, кальций углекислый — 1, Na_2HPO_4 — 5. Антибиотик экстрагировали метанолом в соотношении 1 : 3, экстракт упаривали на роторном испарителе до водного слоя. Для удаления неполиеновых антибиотиков водный слой несколько раз экстрагировали гексаном и этилацетатом. Из водного остатка гептаен экстрагировали *n*-бутанолом и упаривали бутанольный экстракт досуха.

ЯМР (1H и ^{13}C) спектры выделенных антибиотиков получали на спектрофотометре Bruker AC-200 (Германия), ИК-спектры в таблетках KBr — на приборе Specord IR-75 (Германия), ВЭЖХ проводили на хроматографе Миллихром-2 (Россия), масс-спектры получали на приборном комплексе ХЖ-МХ-3303 (НПО “Научные приборы”, Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета компьютерных программ Statistica 10.0 (StatSoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований проводили идентификацию актиномицета-антагониста, выделенного из окультуренной почвы Полтавской области (Украина). Электронная микроскопия показала, что почвенный изолят образует характерный для актиномицетов воздушный и субстратный мицелий, состоящий из переплетения гиф с диаметром 0.5–2 мкм. Специальные структуры, такие как спорангиум и склероции отсутствуют, но образуются хорошо сформированные спораносцы в виде крючковидных или растянутых спиралей. Поверхность спор покрыта зубцевидными выростами.

Изолят актиномицета хорошо растет на диагностических средах и, в зависимости от состава среды, окраска воздушного мицелия варьирует от светло до темно-зеленой. Растворимый пигмент изолят не образует. Гидролизат мицелия содержит LL-диаминопимелиновую кислоту (ДАП). При изучении физиолого-биохимических признаков отмечено, что культура разжижает желатину, гидролизует крахмал, в разной степени потребляет многие сахара (кроме арабинозы, мальтозы, рибозы и сорбозы) и обладает широким спектром антимикробного действия (табл. 1). На основании морфолого-культуральных и физиологиче-

Таблица 1. Противомикробный спектр действия *Streptomyces* sp. 89

Тест-культура	Диаметр зоны подавления роста, мм
<i>Alternaria solani</i>	23 ± 4
<i>Aspergillus flavus</i>	18 ± 1
<i>Aspergillus niger</i>	21 ± 2
<i>Botrytis cinerea</i>	24 ± 3
<i>Fusarium oxysporum</i>	22 ± 5
<i>Penicillium funiculosum</i>	15 ± 2
<i>Penicillium cyclopium</i>	25 ± 3
<i>Trichoderma viride</i>	30 ± 5
<i>Candida albicans</i>	26 ± 3
<i>Candida utilis</i>	25 ± 4
<i>Bacillus mesentericus</i>	5 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i>	4 ± 2
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	3 ± 1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0
<i>Pseudomonas syringae</i>	2 ± 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 ± 2
<i>Xanthomonas campestris</i>	2 ± 1

ских признаков с учетом наличия в клетках ДАП, изолят отнесен к роду стрептомицетов и обозначен, как *Streptomyces* sp. 89.

Стрептомицет обладает широким спектром антимикробного действия, его наибольшая активность проявляется по отношению к микромицетам, а наименьшая — к бактериям (табл. 1). Высокая фунгицидная активность *Streptomyces* sp. 89 (диаметр зоны ингибирования роста микромицетов 20 мм и более) была выявлена по отношению к возбудителю альтернариоза *A. solani*, мягкой гнили *A. niger* и *P. cyclopium*, серой гнили — *B. cinerea*, фузариоза *F. oxysporum*, “зеленой плесени”,

поражающей высшие грибы, *T. viride*, дрожжеподобным грибам рода *Candida*.

По отношению к грамположительным бактериям — возбудителям бактериоза растений *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *C. sepedonicum* и стафилококковой инфекции *S. aureus*, антагонистические свойства *Streptomyces* sp. 89 были менее выражены (диаметр зоны ингибирования роста 3–8 мм). Слабее всего антагонизм стрептомицета проявлялся по отношению к грамотрицательным бактериям — облигатному фитопатогену *Ps. syringae*, факультативному фитопатогену *Ps. fluorescens*, возбудителю сосудистого бактериоза растений *X. campestris* (диаметр зоны ингибирования роста 2 мм или ингибирование отсутствует).

Широкий спектр антимикробного действия изученного стрептомицета позволяет предположить, что культура образует не одно, а несколько соединений с антагонистическими свойствами. Биологический контроль фитопатогенов в почве достаточно часто представляет собой результат совместного действия различных биологически активных соединений (Raaijmakers *et al.*, 2009).

На основании УФ-спектров биомассы и нативного раствора, полученных при глубинном культивировании актиномицета была проведена первичная оценка аллелопатических веществ, синтезируемых *Streptomyces* sp. 89. Показано, что культура образует не менее двух антибиотических соединений, одно из которых имеет спектр поглощения характерный для гептаеновых антибиотиков с максимумами при 362, 380 и 405 нм (рис. 1). Второй компонент имеет максимум поглощения в УФ свете при 265 нм и не относится к числу полиенов. Оба упомянутых антибиотика содержатся, главным образом, в биомассе стрептомицета.

Дальнейшие исследования показали, что антибиотический комплекс *Streptomyces* sp. 89 содержит четыре антибиотических вещества, в т.ч.

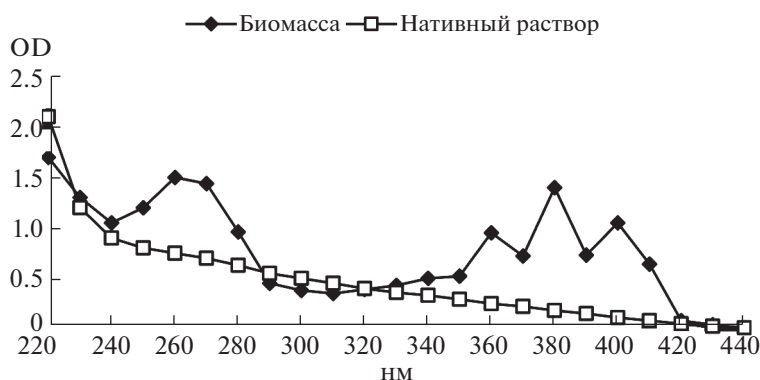
**Рис. 1.** Спектры поглощения метанольного экстракта биомассы и нативного раствора *Streptomyces* sp. 89 в УФ свете.

Таблица 2. Биосинтез антибиотиков *Streptomyces* sp. 89 при снижении ОВП среды восстановителями

Восстановитель (В)	Концентрация В, %	ОВП, мВ	Пики УФ спектра (% к контролю)		Прирост биомассы (% к контролю)	Пик 265 нм/380 нм
			неполиеновый комплекс (265 нм)	гептаен (380 нм)		
Контроль*	—	207	100 ± 6.1	100 ± 5.3	100 ± 7.9	1.3 ± 0.1
K ₄ Fe(CN) ₆	0.05	31	98.6 ± 4.7	26.1 ± 3.2	123.2 ± 11.8	4.9 ± 0.7
	0.15	21	100.3 ± 5.8	15.2 ± 0.7	109.1 ± 7.3	8.5 ± 0.9
Цистеин	0.05	98	119.5 ± 9.0	94.4 ± 7.3	95.8 ± 6.3	1.6 ± 0.1
	0.15	17	33.4 ± 2.1	4.1 ± 1.1	100.2 ± 5.4	10.6 ± 1.2
Na ₂ S ₂ O ₃	0.5	53	43.0 ± 2.9	40.8 ± 3.6	100.0 ± 6.1	3.7 ± 0.2
	1.0	31	32.1 ± 3.1	23.1 ± 1.7	102.1 ± 4.5	5.4 ± 0.7

Примечание. * В качестве контрольных приняты результаты, полученные на среде без восстановителей; объем среды в колбах 50 мл.

один гептаеновый и три неполиеновых антибиотика.

Первый из выделенных неполиеновых антибиотиков проявлял активность в отношении грамположительных бактерий, и, в меньшей степени, некоторых грамотрицательных бактерий и грибов. Выделенный антибиотик по своим свойствам идентичен полиэфирному антибиотику нигерицину и не имеет поглощения в ультрафиолете. Его ИК-спектр имеет следующие полосы поглощения: 1705 (СООН) и 1660 (С=О) см⁻¹. Антибиотик оптически деятелен: $\alpha J_D^{20} = +33.4$ (Cl, СНСО₃), +5.6 (Cl, MeOH).

Физико-химические характеристики второго неполиенового антибиотика (проявляет активность в отношении грамположительных бактерий), хорошо согласуются с таковыми антибиотика элайофилина (Gerlitz *et al.*, 1992). УФ спектр метанольных растворов антибиотика характеризуется максимумом поглощения при 253 нм. Удельное вращение $\alpha J_D^{18} = -43$ (С 0.5, СНCl₃). ЯМР-спектр выделенного препарата и его хроматографическая подвижность в системе хлороформ-метанол (9 : 1) соответствуют аналогичным характеристикам элайофилина, что подтверждает сделанные выводы.

Третье антибиотическое вещество неполиеновой природы с максимумом поглощения в УФ свете при 265 нм проявляло биологическую активность в отношении грамположительных бактерий и слабее — в отношении грибов. УФ-спектр метанольных растворов этого антибиотика имеет два максимума поглощения при длинах волн 238 и 260–262 нм, удельное вращение $J_D = +43$ (Cl, MeOH). По выявленным характеристикам антибиотик был отнесен в группу макроциклических лактонов типа азаломицина F.

Четвертое выделенное из мицелия *Streptomyces* sp. 89 антибиотическое вещество имело максимумы поглощения в УФ свете при длинах волн: 362, 380 и 405 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%}$ соответственно 460, 840 и 980). Такой спектр характерен для неароматических гептаенов типа амфотерицина В. Антибиотик проявлял активность в отношении фитопатогенных грибов и был неактивен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Антигрибная активность гептаена значительно превышала антигрибную активность неполиеновых антибиотиков.

Таким образом, выделенный из почвы актиномицет *Streptomyces* sp. 89 является продуцентом четырех биологически активных соединений:

- 1) полиенового антибиотика из группы неароматических гептаенов типа амфотерицина В — высокоактивного антагониста грибов;
- 2) макролидного антибиотика элайофилина — антагониста грамположительных бактерий;
- 3) антибиотика из группы макроциклических лактонов типа азаломицина F — антагониста грамположительных бактерий и грибов;
- 4) полиэфирного антибиотика нигерицина — антагониста грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов.

Способность почвенных антагонистов к биосинтезу нескольких антибиотиков с различным спектром биологического действия известна и для других групп микроорганизмов (Raaijmakers *et al.*, 2002). Например, бактерии *Bacillus cereus* и *Ps. fluorescens* образуют комплексы антибиотиков, которые могут, как совпадать, так и различаться по уровню активности против фитопатогенных микроорганизмов (Handelsman, Stabb, 1996; Bender *et al.*, 1999). Образование комплекса антибиотиков с различным спектром действия повы-

Таблица 3. Биосинтез антибиотиков *Streptomyces* sp. 89 при повышении ОВП среды окислителями

Окислитель (О)	Концентрация О, %	ОВП среды, мВ	Величина пиков УФ спектра (% к контролю)		Прирост биомассы (% к контролю)	Соотношение пиков при 265 и 380 нм
			неполиеновый комплекс (265 нм)	гептаен (380 нм)		
Контроль*	—	204	100 ± 6.0	100 ± 4.6	100 ± 4.6	1.2 ± 0.3
K ₃ Fe(CN) ₆	0.05	375	70.1 ± 3.8	50.4 ± 3.6	102.6 ± 7.3	3.3 ± 0.5
	0.20	407	60.4 ± 5.5	21.4 ± 4.3	109.1 ± 7.1	7.9 ± 0.8
KMnO ₄	0.001	310	70.6 ± 3.7	76.5 ± 6.6	121.4 ± 8.2	2.3 ± 0.2
	0.002	380	73.2 ± 4.8	47.2 ± 3.9	111.9 ± 5.6	3.4 ± 0.6

Примечание. * В качестве контрольных приняты результаты, полученные на среде без окислителей; объем среды в колбах 50 мл.

Таблица 4. Влияние аэрации на рост и образование антибиотиков *Streptomyces* sp. 89

Объем среды в колбе, мл	ОВП среды, мВ	Прирост биомассы, г/л	Величина пиков УФ спектра (% к контролю*)		Соотношение пиков при 265 и 380 нм
			неполиеновый комплекс (265 нм)	гептаен (380 нм)	
30	239	14.4±0.9	116.1 ± 5.8	110.9 ± 7.2	1.5 ± 0.1
50	205	14.7±0.6	100.0 ± 4.9	100.0 ± 6.0	1.2 ± 0.1
100	144	13.0±0.8	70.1 ± 8.4	53.2 ± 3.7	1.7 ± 0.2
150	102	12.6±0.9	37.3 ± 5.1	15.5 ± 3.4	2.4 ± 0.2

Примечание. * В качестве контрольных приняты результаты, полученные в варианте с объемом среды в колбах 50 мл.

шает конкурентоспособность почвенных микроорганизмов и усиливает их роль в антагонистических взаимоотношениях с фитопатогенами (Pal, McSpadden, 2006).

Сложный компонентный состав антибиотического комплекса предполагает возможность изменения спектра антимикробного действия актиномицета при изменении условий среды почвы. От условий среды во многом зависит как синтез, так и значимость каждого из компонентов антибиотического комплекса микробов-антагонистов (Thomashow, Weller, 1996). В настоящей работе изучали действие важнейшего фактора почвенной среды — окислительно-восстановительного потенциала, на антагонистические свойства *Streptomyces* sp. 89.

Известно, что результаты, полученные при культивировании микробов-антагонистов на жидких средах, позволяют достаточно точно оценить влияние факторов окружающей среды на синтез антибиотических веществ (Duffy, Défago, 1999). В то же время (по сравнению с почвой) использование жидкой среды значительно упрощает выделение и определение антибиотиков. Учитывая опыт предыдущих исследователей, регуляцию ОВП проводили в глубинных условиях

внесением в питательную среду восстановителей и окислителей.

Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что при снижении ОВП достоверные различия в приросте биомассы актиномицета не выявлены, однако ОВП значительно влияет на синтез антибиотиков *Streptomyces* sp. 89 ($p < 0.05$).

В восстановленных условиях наблюдается значительное подавление синтеза гептаена и, в меньшей степени, комплекса неполиеновых антибиотиков. Соотношение оптических плотностей метанольных экстрактов биомассы при 265 и 380 нм (пики неполиенового антибиотического комплекса и гептаена соответственно) варьирует в зависимости от значения ОВП от 1.3 в контроле (207 мВ) до 10.6 в восстановленных условиях (табл. 2).

Аналогичные результаты получены при культивировании *Streptomyces* sp. 89 в условиях повышенного ОВП среды (табл. 3). Он негативно действует на синтез антибиотиков, а для гептаена, как и в восстановленных условиях, ингибирующий эффект более выражен. Так, при увеличении ОВП среды до 407 мВ (внесение K₃Fe(CN)₆) пик УФ спектра неполиеновых антибиотиков составляет 60.4% от контроля, а гептаена — лишь 21.4%.

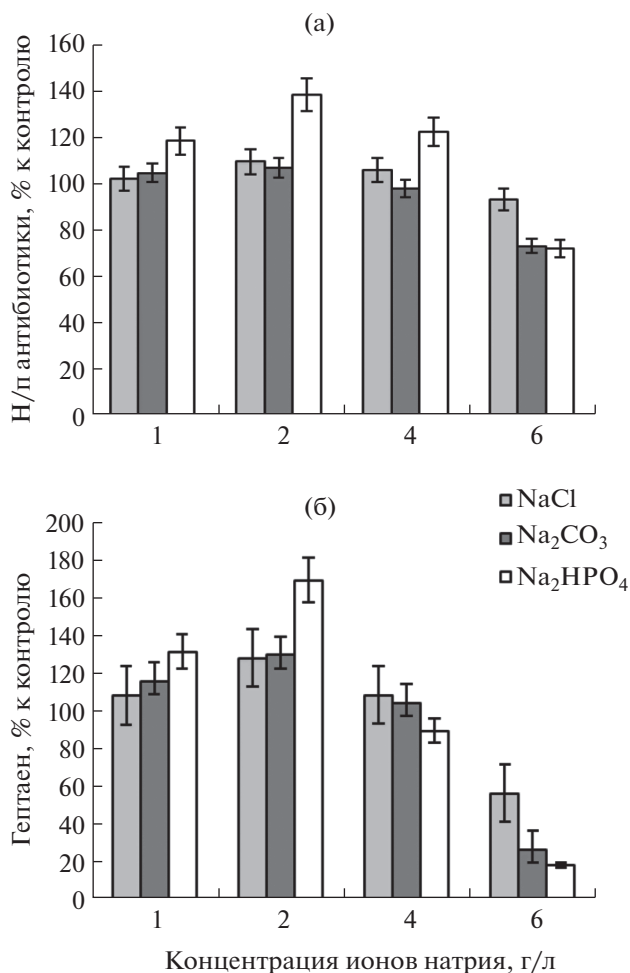


Рис. 2. Влияние солей натрия на образование комплекса неполиеновых антибиотиков (а) и гептаена (б) культурой *Streptomyces* sp. 89.

Основным окислителем в почве является молекулярный кислород почвенного раствора и воздуха, а также продукты жизнедеятельности почвенных организмов, содержание которых тесно связано с аэрацией почвы. Учитывая, что между аэрацией и ОВП почвы существует прямая зависимость, были проведены эксперименты в средах, в которых ОВП регулировали кислородом воздуха.

При снижении интенсивности аэрации среды, изменения биосинтеза антибиотиков были аналогичны изменениям, происходящим под влиянием химических веществ (табл. 4). Так, при снижении ОВП среды на 61 мВ отношение неполиеновые антибиотики : гептаен возрастает в 1.5 раза, а на 103 мВ – в 2 раза. В этих условиях наблюдается незначительное (на 13–14%) снижение прироста биомассы, что, по-видимому, связано с недостатком кислорода для роста, поскольку исследуемый стрептомицет относится к строгим аэробам.

Таким образом, гептаен, определяющий высокую фунгицидную активность изученного стреп-

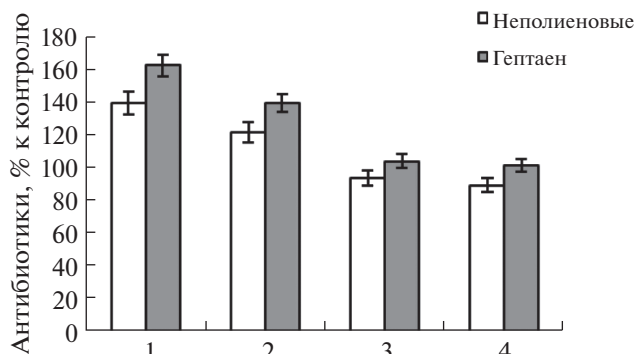


Рис. 3. Влияние фосфорнокислых солей натрия и калия на синтез антибиотиков *Streptomyces* sp. 89: 1 – Na₂HPO₄ (6 мг %), 2 – K₂HPO₄ (6 мг %), 3 – Na₂HPO₄ (12 мг %), 4 – K₂HPO₄ (12 мг %).

томицета, наиболее чувствителен к ОВП среды. При изменении ОВП происходило ингибирование синтеза гептаена и образование преимущественно неполиеновых антибиотиков. Полученные результаты согласуются с данными многих авторов о значительной роли ОВП в регуляции микробного метаболизма, синтеза вторичных метаболитов, влиянии на их состав и свойства (Shi *et al.*, 2003; Поляк и др., 2013; Поляк и др., 2014; Tokarz, Urban, 2015).

На биосинтез антибиотических веществ могут оказывать регуляторное действие обменные катионы почвы, например натрий (Ng *et al.*, 2014). Ионы натрия влияют на проницаемость клеточных мембран и транспорт веществ в микробную клетку. В настоящей работе исследовали действие солей натрия на образование противогрибкового и противобактериального компонентов антибиотического комплекса *Streptomyces* sp. 89.

Соли Na₂CO₃, NaCl, Na₂HPO₄ вносили в среду по отдельности, при этом концентрация ионов Na была одинаковой. В ряду концентраций от 1.0 до 6.0 г Na/л, наибольший стимулирующий эффект выявлен при 2.0 г Na⁺/л (рис. 2). В варианте 6.0 г Na⁺/л происходило ингибирование синтеза неполиеновых антибиотиков (рис. 2а) и гептаена (рис. 2б). В отношении гептаена проявлялся как стимулирующий (до 167% от контроля), так и ингибирующий эффект (до 18%).

Наиболее высокий стимулирующий эффект был достигнут в варианте с фосфорсодержащей солью натрия, при этом доля антигрибного компонента превышала таковую антибактериального. Аналогичную зависимость наблюдали и при использовании гидрофосфата калия (рис. 3).

Внесение неорганического фосфора (1–2 г/л) в виде натриевой и калийной солей, способствовало повышенному синтезу антибиотиков культурой *Streptomyces* sp. 89. Стимулирующий эффект достигал 138 и 169% от контроля для неполиеновых антибиотиков и гептаена, соответственно.

Следовательно, фосфор может влиять на биосинтез антибиотиков даже в большей степени, чем натрий. Полученные результаты согласуются с данными других авторов о существовании связи между синтезом антибиотиков микробами-антагонистами и содержанием фосфатов в почве (Raaijmakers *et al.*, 2002). На рост *Streptomyces* sp. 89 фосфор в наших экспериментах оказывал стимулирующее действие (110–117%).

Таким образом, содержание фосфора и ОВП среды оказывают наибольшее влияние на образование полиенового антибиотика *Streptomyces* sp. 89. Дополнительное внесение в среду источников фосфора (Na_2HPO_4 или K_2HPO_4) приводило к повышенному синтезу гептаена, но не влияло на синтез неполиеновых компонентов.

* * *

При биологическом контроле фитопатогенов в окружающей среде особое внимание уделяют антагонистическим свойствам почвенных микроорганизмов (преимущественно, бактерий и грибов). Многочисленной группе почвенных актиномицетов, прежде всего из рода стрептомицетов, посвящены лишь единичные сообщения.

Проведенные исследования показывают, что актиномицеты, образующие комплексные антибиотики с широким спектром действия, являются перспективными агентами биоконтроля. Установлено, что культура *Streptomyces* sp. 89 (выделена из чернозема типичного) продуцирует четыре антибиотика, три из которых подавляют рост фитопатогенных бактерий, и один (полиеновый гептаен) обладает высокой антифунгальной активностью. Показано, что при изменении условий среды компонентный состав антибиотиков или их соотношение в антибиотическом комплексе может меняться.

Значительное влияние на процесс образования антибиотиков оказывает ОВП. Снижение или повышение ОВП способствует образованию *Streptomyces* sp. 89 антибиотического комплекса, преимущественно с противобактериальной активностью. Есть основание полагать, что направленность и уровень антибиотической активности многих почвенных микроорганизмов будет зависеть от ОВП среды, хотя его влияние во многом еще не изучено.

Авторы выражают глубокую признательность Ю.Д. Шенину (Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург) за идентификацию антибиотических веществ *Streptomyces* sp. 89.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.
Звенигородский В.И., Кузин А.И., Шагов Е. М., Азизбеян Р.Р., Зенова Г.М., Воейкова Т.А. Микробы-

антагонисты (стрептомицеты и бациллы), выделенные из почв разных типов // Почвоведение. 2004. № 7. С. 860–866.

Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 256 с.

Леонтьевская Е.А., Добровольская Т.Г. Эпифитные бактериальные комплексы зерновых культур – таксономический состав и антагонистические свойства // Почвоведение. 2014. № 10. С. 1235–1239.

Максимов И.В., Абизильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 386–396.

Поляк М.С., Васильева Н.Г., Берштейн Е.М., Фрадкова Т.А. Определение биологической активности полиеновых антибиотиков: Методические указания. Л.: Всесоюз. н.-и. технол. ин-т антибиотиков и ферментов мед. назначения, 1979. 38 с.

Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. Аллелопатические взаимоотношения растений и микроорганизмов в почвенных экосистемах // Усп. соврем. биологии. 2019. Т. 2. С. 147–160.

Поляк Ю.М., Шигаева Т.Д., Кудрявцева В.А., Сухаревич В.И. Окислительно-восстановительный потенциал в процессе культивирования цианобактерий *Anabaena variabilis* // Вода: химия и экология. 2013. № 8. С. 66–70.

Поляк Ю.М., Шигаева Т.Д., Кудрявцева В.А., Сухаревич В.И. Влияние аэрации и редокспотенциала на рост, фотосинтез и токсинообразование цианобактерии *Microcystis aeruginosa* 973 // Вода: химия и экология. 2014. № 10. С. 60–68.

Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. Выделение почвенных стрептомицетов – продуцентов комплексных антибиотиков // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. № 1. С. 18–24.

Сухаревич В.И., Семенова И.Р., Денисова Н.П. Влияние аэрации и окислительно-восстановительного потенциала среды на рост и биосинтез протеиназ фибринолитического действия грибом *Coprinus cinereus* // Биотехнология. 1994. № 11–12. С. 16–19.

Шигаева Т.Д., Поляк Ю.М., Кудрявцева В.А. Окислительно-восстановительный потенциал как показатель состояния объектов окружающей среды // Биосфера. 2020. Т. 12. № 3. С. 549.

Bender C.L., Rangaswamy V., Loper J.E. Polyketide production by plant-associated pseudomonads // Annu. Rev. Phytopathol. 1999. V. 37. P. 175–196.

Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet. Mol. Biol. 2012. V. 35. P. 1044–1051.

Berg G., Marten P., Minkwitz A., Bruckner S. Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424 // J. Plant Diseases Protec. 2001. V. 108. P. 1–10.

Black I.T. Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological application. N.Y.: Van Nostrand Reinhold Co, 1974. V. 1. № 1. P. 1–43.

Comptant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 9. P. 4951–4959.

- Duffy B.K., Défago G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 9. P. 2429–2438.
- El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K. Non-streptomycete actinomycete as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters // Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. № 7. P. 1505–1520.
- Gerlitz M., Hammann P., Thiericke R., Rohr J. The biogenetic origin of the carbon skeleton and the oxygen atoms of elaiophyllin, a symmetric macrodiolide antibiotic // J. Org. Chem. 1992. V. 57. № 14. P. 4030–4033.
- Handelsman J., Stabb E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens // Plant Cell 1996. V. 8. P. 1855–1869.
- Johansson J.F., Paul L.R., Finlay R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 48. 2004. P. 1–13.
- Ng Y.K., Hodson M.P., Hewavitharana A.K., Bose U., Shaw P.N., Fuerst J.A. Effects of salinity on antibiotic production in sponge-derived *Salinispora* actinobacteria // J. Appl. Microbiol. 2014. 117. № 1. P. 109–125.
- Nishiyama Y., Hisabori T. Physiological impact of thioredoxin- and glutaredoxin-mediated redox regulation in cyanobacteria // Adv. Bot. Res. 2009. V. 52. P. 187–205.
- Pal K.K., McSpadden Gardener B. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. 2006. 25 p. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Polyak Y.M., Sukcharevich V.I. Allelopathic interactions between plants and microorganisms in soil ecosystems // Biology Bulletin Reviews. 2019. V. 9. № 6. P. 562–574.
- Prashar P., Kapoor N. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2014. V. 13. P. 63–77.
- Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents // Antonie van Leeuwenhoek. 2002. V. 81. P. 537–547.
- Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moënne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms // Plant Soil. 2009. V. 321. P. 341–361.
- Schlatter D.C., Bakker M.G., Bradeen M.J. Plant community richness and microbial interactions structure bacterial communities in soil // Ecology 2015. V. 96. № 1. P. 134–142.
- Shi X., Yang L., Niu X., Xiao L., Kong Z., Qin B., Gao G. Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness // Microbiological Research. 2003. V. 158. № 4. P. 345–352.
- Stanek J.L., Roberts G.D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography // Appl. Microbiol. 1974. V. 28. P. 226–231.
- Szafranek-Nakonieczna A., Stepniowska Z. The influence of the aeration status (ODR, Eh) of peat soils on their ability to produce methane // Wetlands Ecol. and Management 2015. V. 23. № 4. P. 665–676.
- Thomashow L.S., Weller D.M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites / Plant-Microbe Interact. V. 1. 1996. P. 187–235.
- Tokarz E., Urban D. Soil redox potential and its impact on microorganisms and plants of wetlands // J. Ecol. Engineering 2015. V. 16. № 3. P. 20–30.
- Ulloa-Ogaz A.L., Muñoz-Castellanos L.N., Nevárez-Moorillón G.V. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control / In: Méndez-Vilas A. (eds.) The battle against microbial pathogens: Basic science, technological advances and educational programs. Formatex, 2015. P. 305–309.
- Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 487–511.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989. P. 2452–2492.
- Włodarczyk T., Gliński J., Stępniewski W., Stępniewska Z., Brzezińska M., Kurá V. Aeration properties and enzyme activity on the example of Arenic Chernozem (Tišice) // Int. Agrophysics 2001. V. 15. P. 131–138.
- Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M., Kotowska U. N₂O emission and sorption in relation to soil dehydrogenase activity and redox potential // Int. Agrophysics 2002. V. 16. P. 249–252.

Detection and Regulation of Antagonistic Properties of Soil Actinomycete *Streptomyces* sp. 89

Y. M. Polyak^{1, #} and V. I. Sukharevich¹

¹Scientific Research Centre for Ecological Safety of the RAS, Korpusnaya str. 18, Saint-Petersburg, 197110 Russia

[#]e-mail: yuliapolyak@mail.ru

Actinomycete *Streptomyces* sp. 89 with antagonistic activity towards plant pathogens was isolated from chernozem typical. Antibiotic substances with physiological activity against phytopathogenic fungi and bacteria were isolated from the actinomycete biomass and identified. It was shown that the ratio of the components of the actinomycete antibiotic complex is largely determined by the redox potential of the medium. Redox potential and other environmental factors had a noticeable effect on the formation of polyene, but to a lesser extent – on the synthesis of non-polyene components. The possibility of targeted regulation of antibiotic composition and, as a result, the biological action spectrum is evaluated.

Keywords: plant pathogens, chernozem typical, biologically active compounds, antibiotics, redox potential

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.554.3-12:577.125:612.11

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА
РАЗЛИЧНЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ГРУПП КАРПА В РАЗНЫЕ
ПЕРИОДЫ ГОДОВОГО ЦИКЛА

© 2021 г. Д. В. Микряков*,[®], Г. И. Пронина**, Т. А. Суворова*,
А. С. Соколова*, В. Р. Микряков*, А. Б. Петрушин***

*ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, Борок, Ярославская область, 152742 Россия

**Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
ул. Тимирязевская, 49, Москва 127550 Россия

***ВНИИ интегрированного рыбководства – филиал ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр
животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста”, ул. Сергеева, д. 24, пос. Воровского, Богородский ГО,
Московская обл., 142460 Россия

[®]E-mail: daniil@ibiw.ru

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

После доработки 17.11.2020 г.

Принята к публикации 17.11.2020 г.

Проведено сравнительное исследование некоторых параметров неспецифического иммунитета у ангелинской краснухостойчивой породы, чешуйчатой и зеркальной групп карпа в преднерестовый и конце нагульного периодов. Изучен уровень антимикробных свойств С-реактивного белка, неспецифических иммунных комплексов в сыворотке крови и фагоцитарной активности нейтрофилов. Исследование показало межпородные и межсезонные различия некоторых показателей. Сделан вывод, что более высокий уровень бактериостатической активности сыворотки крови у краснухостойчивой породы, по сравнению с другими группами карпа, обеспечивает низкий процент иммунодефицитных особей и устойчивость к возбудителям инфекционных заболеваний.

DOI: 10.31857/S1026347021040107

Годовой цикл рыб состоит из ряда периодов: преднерестового, нереста, посленерестового, нагульного, зимовальной миграции, зимовки, нерестовой миграции, преднерестового нагула (Никольский, 1974). Ранее на примере плотвы *Rutilus rutilus*, леща *Abramis brama*, речного окуня *Perca fluviatilis* и синца *Abramis ballerus* было показано, что устойчивость рыб к бактериальной инфекции в разные периоды года отличается. В нерестовый и посленерестовый периоды (май, июнь) отмечена минимальная устойчивость к возбудителям аэромоноза рыб, а максимальная – в конце нагула (Schaperclaus, 1979; Микряков, 1984).

В нерестовый период в организме рыб происходят значительные изменения, требующие огромных энергетических затрат за счет активации катаболических и снижения анаболических процессов. В обменные процессы включаются структурные фракции липидов (фосфолипидов), уровень содержания холестерина – нарастает, альбумина, гликогена, α -глобулина – падает. В этот период процессы диссимиляции преобладают над ассимиляцией. Одновременно в нерестовый и посленерестовый периоды нарастает доля особей с

низким уровнем иммунореактивности. В нагульный период в организме рыб происходят противоположные процессы, связанные с восстановлением израсходованных во время зимовки и нереста ресурсов пластических и энергетических веществ и с повышением функциональной активности иммунной системы (Шатуновский, 1980; Микряков, 1984; Lloret *et al.*, 2014).

При выращивании в рыбоводных хозяйствах у карпов *Suiprinus carpio* в течение годового цикла также изменяется уровень иммунореактивности (Лысанов, Микряков 1990). Снижение неспецифического иммунитета способствует созданию условий для вспышки эпизоотий инфекционных болезней. Весенний период считается наиболее опасным. Рыбы испытывают стресс в результате отлова, транспортировки и изменения условий содержания в процессе их пересадки из зимовалов в нагульные пруды. Воздействие стресс-факторов приводит к снижению выживаемости, иммунореактивности и неспецифической защиты к возбудителям различных инфекционных и инвазионных заболеваний (Wendelaar Bonga, 1997; Van

Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006; Uren Webster *et al.*, 2018).

Одним из наиболее распространенных заболеваний рыб, наносящих большой экономический ущерб, в РФ считается краснуха. Это полиэтиологическое заболевание рыб, в основном семейства карповых, возбудителями которого являются вирус весенней виремии, аэромонады, псевдомонады (Kirpichnikov *et al.*, 1993; Головина и др., 2003). Для решения задачи по снижению значительного ущерба рыбоводству в России с помощью селекции на иммунную устойчивость выведена ангелинская порода карпа, обладающая устойчивостью к возбудителям краснухи (Илясов, 2002). Исследование показателей неспецифического иммунитета у краснухостойчивых карпов позволит понять механизмы, обеспечивающие невосприимчивость рыб к инфекционным заболеваниям. Ранее авторами были показаны различия некоторых иммунобиохимических показателей между краснухостойчивыми и восприимчивыми к заболеванию породами карпа (Микряков и др., 2019а, 2019б; Суворова и др., 2019). Установлено, что особи краснухостойчивой породы отличаются от карпов других селекционных групп долей содержания различных форм лейкоцитов, интенсивностью лейкопоза, уровнем белка, глюкозы, общих липидов, окислительных процессов и антиоксидантной защиты. Однако этих данных недостаточно для понимания особенностей функционирования различных систем организма, в том числе отвечающих за иммунный ответ и устойчивость к инфекционным заболеваниям, у особой ангелинской породы.

Цель работы – сравнительное исследование показателей неспецифического иммунитета рыб краснухостойчивой породы с карпами, восприимчивыми к возбудителям краснухи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали карпов в возрасте 2+...3+ в мае и сентябре 2018 г. во время пересадки рыб из зимовалов в нагульные пруды, и наоборот. Материал отбирали у особей ангелинской чешуйчатой краснухостойчивой породы, содержащихся на экспериментальной прудовой базе “Сунога” ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН Ярославской обл. Для сравнения использовали восприимчивых к возбудителям краснухи чешуйчатых и зеркальных карпов из рыбоводного хозяйства “Кирия” Чувашской республики.

У рыб проводили отбор крови из хвостовой вены для исследования бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК), доли иммунодефицитных (ИМД) особей, содержания неспецифических иммунных комплексов (ИК), уровня С-реактивного белка (СРБ) и фагоцитарной активности (ФА)

нейтрофилов. Для определения ФА делали мазки, которые фиксировали в 5%-ном растворе сульфосалициловой кислоты в течение 60–90 с, промывали дистиллированной водой, высушивали, затем окрашивали 0.1%-ным раствором бромфенолового синего в боратном буфере в течение 1–2 мин. После чего трижды промывали 0.05 М раствором боратного буфера 1–3 мин. На следующем этапе докрашивали ядра 1%-ным раствором сафранина в течение 30–60 с. Для получения сыворотки кровь рыб собирали в сухую стерильную пробирку. Пробирку с кровью оставляли в штативе на 1 ч при комнатной температуре, а потом выдерживали 1 сут в холодильнике при 4°C для свертывания крови и ретракции сгустка. После этого сыворотку забирали шприцем с тонкой иглой и переносили в пробирку эппендорф. Пробы замораживали в морозильной камере при температуре –18...–20°C и транспортировали в специальных термоконтейнерах. В лаборатории непосредственно перед анализом пробы размораживали при комнатной температуре.

БАСК оценивали нефелометрическим методом согласно модификации Микрякова (1984). В зависимости от уровня БАСК выявляли долю ИМД особей, сыворотка крови которых не угнетала развитие тест-микробов. Уровень СРБ определяли визуально по реакции агглютинации латекс-реагента с сывороткой крови, используя набор реагентов СРБ-Ольвекс. Содержание ИК устанавливали спектрофотометрически при длине волны 450 нм методом селективной преципитации с 4%-ным полиэтиленгликолем мол. массой 6000 как рекомендовано ранее (Гриневич, Алферов, 1981). Спектрофотометрические исследования проводили с помощью фотоэлектрического фотометра КФК-3 “Загорского оптико-механического завода”. ФА определяли по содержанию неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов периферической крови цитохимическим методом с бромфеноловым синим (Шубич, 1974), адаптированным для гидробионтов. Микроскопическое исследование мазков производили под цифровым микроскопом Ortika DM-15 с увеличением ($\times 600$), просматривая по 100 клеток в каждой мазке. По степени фагоцитарной активности исследуемые клетки делили на 4 группы (0–3 балла): 0 – гранулы катионного белка отсутствуют, 1 – единичные гранулы, 2 – гранулы занимают $\sim 1/4$ цитоплазмы, 3 – гранулы занимают более $1/4$ цитоплазмы. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3) / 100,$$

где N_0, N_1, N_2, N_3 – соответственно число нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла;

$$N_0 + N_1 + N_2 + N_3 = 100.$$

Таблица 1. Показатели неспецифического иммунитета карпов

Показатели	Ангелинская порода	Чешуйчатые карпы	Зеркальные карпы
Количество рыб	$\frac{5}{6}$	$\frac{10}{8}$	$\frac{10}{8}$
Масса тела, г	$\frac{284.40 \pm 12.37}{863.00 \pm 34.41}$	$\frac{241.77 \pm 22.41}{2022.37 \pm 69.70}$	$\frac{270.20 \pm 22.94}{2033.75 \pm 71.05}$
Длина тела, см	$\frac{22.74 \pm 0.19}{32.35 \pm 0.51}$	$\frac{22.09 \pm 0.75}{42.66 \pm 0.54}$	$\frac{23.04 \pm 0.61}{40.41 \pm 0.40}$
Бактериостатическая активность сыворотки крови, %	$\frac{23.22 \pm 6.54}{53.93 \pm 5.26^*}$	$\frac{7.10 \pm 6.34^a}{58.77 \pm 15.01^*}$	$\frac{5.16 \pm 2.18^a}{45.40 \pm 14.40^*}$
Иммунодефицитные особи, %	$\frac{20}{0}$	$\frac{70}{25}$	$\frac{60}{25}$
Иммунные комплексы, усл. ед.	$\frac{1.82 \pm 0.70}{1.50 \pm 0.54}$	$\frac{1.25 \pm 0.46}{1.00 \pm 0.27}$	$\frac{0.94 \pm 0.21}{1.21 \pm 0.37}$
С-реактивный белок, мг/л	$\frac{6}{>6}$	$\frac{>6}{6}$	$\frac{>6}{>6}$
Средний цитохимический коэффициент лизосомального катионного белка в нейтрофилах крови, ед.	$\frac{1.78 \pm 0.10}{1.60 \pm 0.06}$	$\frac{1.88 \pm 0.04}{1.84 \pm 0.04}$	$\frac{1.83 \pm 0.03}{1.67 \pm 0.04^*}$

Примечание. Над чертой – весенние показатели, под чертой – осенние показатели; * – значимые различия между весенними и осенними показателями; ^a – значимые различия между ангелинской породой и другими группами (чешуйчатые и зеркальные) карпов, при $p \leq 0.05$.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ Statistica V6.0, с использованием t -теста. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ показал, что особи краснухостойчивой породы и других селекционных групп карпов *Cyprinus carpio* имели межсезонные и межпородные отличия по исследуемым показателям (таблица 1).

Известно, что БАСК – интегральный показатель функционального состояния врожденных факторов гуморального иммунитета: систем комплемента, лизоцима, иммуноглобулинов, противомикробных пептидов, лектинов, преципитинов, β -лизина, пропердина, дефензина и др. (Микряков, 1984; Ройт и др. 2000; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van der Wal, 2006; Койхо и др., 2008; Van der Marel, 2012; Campoverde *et al.*, 2017 и др.). Величина БАСК была в разы выше у карпов, отловленных осенью по сравнению с весной, при этом у краснухостойчивых межсезонные различия были не такие значительные, как у чешуйчатых и зеркальных. Как было указано выше, такие различия связаны с уровнем функционального со-

стояния иммунной системы организма рыб в различные периоды годового цикла. Аналогичное изменение уровня БАСК зафиксировано у разных по экологии видов рыб: налима *Lota lota*, синца *Abramis ballerus*, плотвы *Rutilus rutilus*, леща *Abramis brama* (Микряков, Силкин, 1978; Микряков, 1984).

Сравнение уровня между различными селекционными группами показало, что весенние показатели БАСК у особей краснухостойчивой породы были выше в 3.3 раза, чем у чешуйчатых и в 4.5 раза, чем у зеркальных карпов. С низким уровнем БАСК связан высокий процент ИМД особей среди чешуйчатых и зеркальных карпов. У ангелинской породы процент таких особей был низкий даже в весенний период, что указывает на более высокий уровень функционального состояния неспецифического гуморального иммунитета.

Исследование содержания ИК показало незначительные отличия среди исследуемых групп рыб. Более высокие показатели зафиксированы весной (за исключением зеркальных карпов). Известно, что ИК – комплексы антиген-антитело и связанные с ними компоненты комплемента, образующиеся в результате взаимодействия с низкомолекулярными чужеродными соединениями (гаптенами, растворимыми антигенами и аутоан-

тигенами). Они играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунологического и биохимического гомеостаза. При насыщении организма чужеродными телами, происходит избыточное образование ИК вследствие супрессии клиринговой функции клеток фагоцитарной системы (Логинов и др., 1999; Койхо и др., 2008). Отсутствие значимых межвидовых и межсезонных отличий уровня ИК в сыворотке крови указывает на хорошее содержание карпов и отсутствие инфекционных агентов. Межсезонные изменения, вероятно, связаны с интенсивностью накопления и утилизацией ИК организмом рыб.

Исследование уровня СРБ – белка острой фазы, наиболее чувствительного лабораторного маркера инфекции, воспаления и тканевого повреждения, показало межсезонные отличия у ангелинских и чешуйчатых карпов. Слабоположительный уровень СРБ (6 мг/л) зафиксирован у карпов краснухоустойчивой породы весной и у чешуйчатых карпов – осенью. В остальных пробах отмечен положительный результат (более 6 мг/л). СРБ – один из ключевых компонентов гуморального врожденного иммунитета, обеспечивает связь между врожденной и адаптивной иммунной системами (Назаров, 2010), способный распознавать микробы и способствовать их поглощению фагоцитами (Bottazzi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017). СРБ очень чувствительный элемент крови, быстрее других реагирующий на повреждения тканей. В сыворотке здорового организма СРБ отсутствует, но его уровень быстро и многократно увеличивается при инфекционных и паразитарных заболеваниях. Низкое содержание СРБ в организме краснухоустойчивой породы карпов весной, вероятно, связано с высоким уровнем БАСК.

Фагоциты способны убивать патогены, используя различные механизмы, которые могут быть в широком смысле классифицированы как кислород-зависимые или кислород-независимые. Исследования показали, что у рыб фагоцитарной активностью обладают моноциты/макрофаги и гранулоциты (нейтрофилы и, в некоторых случаях, эозинофилы). Гранулоциты (особенно нейтрофилы) – мобильные, фагоцитарные клетки, которые производят активные формы кислорода, но их бактерицидная активность ниже по сравнению с макрофагами (Hoar *et al.*, 1996). Результаты лизосомально-катионного теста показали, что потенциальная фагоцитарная активность нейтрофилов крови рыб находилась в пределах физиологической нормы для карпа данной возрастной категории. Однако осенью отмечено значимое снижение СЦК катионного белка у зеркальной группы карпа. Такое снижение в осенний период свидетельствует о расходовании высокотоксичного лизосомального катионного белка в процессе неспецифической кле-

точной иммунной защиты (фагоцитоза) у рыб во время нагульного периода. Подобные результаты получены нами ранее (Pronina *et al.*, 2019) и свидетельствуют о хорошем иммунном статусе рыб в этот период года.

Исследование иммунологических показателей у карпов *Cyprinus carpio* краснухоустойчивой породы позволило получить новые данные об уровне неспецифического иммунитета в весенний и осенний периоды годового цикла. Анализ полученных данных показал межсезонные и межпородные различия исследуемых показателей. Наиболее значимые отличия зафиксированы в уровне БАСК и количестве ИМД особей в весенний период. Высокий уровень функционального состояния неспецифического гуморального иммунитета, в частности бактериостатических свойств сыворотки крови, вероятно, обеспечивает невосприимчивость карпов ангелинской породы к возбудителям краснухи. Полученные данные могут быть использованы в качестве маркеров при проведении селекционно-племенной работы по повышению устойчивости рыб к инфекционным заболеваниям.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-016-0019618) и частично в рамках государственного задания (тема АААА-А18-118012690123-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н. Икhtiопатология. Под ред. Н.А. Головиной, О.Н. Бауера. М.: Мир, 2003. 448 с.
- Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
- Илясов Ю.И. Селекция рыб на повышение устойчивости к заболеваниям // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. Вып. 78. С. 125–134.
- Койхо Р., Санишайн Д., Бенджамини Э. Иммунология: учебное пособие. М.: Академия, 2008. 368 с.
- Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. Новосибирск: РАСХН. Сиб. отд. ИЭВС и ДВ, 1999. 144 с.
- Лысанов А.В., Микряков В.Р. Особенности сезонной динамики общего белка и бактериоагглютининов у карпа (*Cyprinus carpio* L.) в условиях тепловодного хозяйства // Биология внутренних вод: Информационный бюллетень. 1990. № 86. С. 49–51.
- Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИЭМиЭЖ АН СССР, 1984. 37 с.
- Микряков В.Р., Силкин Н.Ф. Сезонная динамика антимикробных свойств сыворотки крови у различных по экологии видов рыб // Биология внутренних

- вод: Информационный бюллетень. 1978. № 39. С. 63–68.
- Микряков Д.В., Пронина Г.И., Суворова Т.А., Соколова А.С., Петрушин А.Б., Кузьмичёва С.В. Содержание иммунных комплексов, общих липидов и окислительные процессы в иммунокомпетентных органах краснухостойчивой породы карпа в конце нагульного периода // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2019 а. № 8. С. 49–55.
- Микряков Д.В., Ревякин А.О., Пронина Г.И., Соколова А.С., Микряков В.Р., Петрушин А.Б. Биохимические показатели сыворотки крови краснухостойчивой породы карпа после зимовки // Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. 2019 б. Вып. 87(90). С. 56–61.
- Назаров П.Г. Пентраксины в реакциях врожденного и приобретённого иммунитета, организации матрикса, фертильности // Медицинский академический журн. 2010. Т. 10. № 4. С. 107–124.
- Никольский Г.В. Экология рыб. М. Высшая школа, 1974. 367 с.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.
- Суворова Т.А., Пронина Г.И., Микряков Д.В., Петрушин А.Б. Состав лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов краснухостойчивой породы карпа в конце нагульного периода // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2019. № 3(43). С. 25–29.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 238 с.
- Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. № 10. С. 1321–1322.
- Bottazzi B., Doni A., Garlanda C., Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm // Ann. Rev. Immun. 2010. V. 28. P. 157–183.
- Camposverde C., Milne D.J., Estévez A., Duncan N., Secombes C.J., Andree K.B. Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*) // Fish Shellfish Immun. 2017. V. 69. P. 200–210.
- Hoar W.S., Randall D.J., Iwama G., Nakanishi T. The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment. Fish Physiology (V. 15). San Diego, California. Academic Press, Inc., 1996. 378 p.
- Kirpichnikov V.S., Ilyasov Ju.I., Shart L.A., Vikhman A.A., Ganchenko M.V., Ostashevsky A.L., Simonov V.M., Tikhonov G.F., Tjurin V.V. Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L.) for resistance to dropsy: principal results and prospects // Aquaculture. 1993. V. 111. P. 7–20.
- Lee P.T., Bird S., Zou J. Martin S.A.M. Phylogeny and expression analysis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-P (SAP) like genes reveal two distinct groups in fish. Fish & Shellfish Immunology. 2017. V. 65. P. 42–51.
- Lloret J., Shulman G., Love R.M. Condition and health indicators of exploited marine fishes. Wiley Blackwell, 2014. P. 247.
- Pronina G.I., Petrushin A.B., Shishanova E.I., Rozumnaya L.A. Physiological and immunologic peculiarities of the “Surskiy malokostniy” immune resistant carp cross // Journal of Aquatic science. 2019. V. 10(2): 83–87.
- Schaperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin: Academic-Verlag, 1979. V. 1. 510 p.
- Uren Webster T.M., Rodriguez-Barreto D., Martin S.A.M., van Oosterhout C., Orozco-terWengel P., Cable J., Hamilton A., Garcia de Leaniz C., Consuegra S. Contrasting effects of acute and chronic stress on the transcriptome, epigenome, and immune response of Atlantic salmon // Epigenetics. 2018 V. 13. № 12. P. 1191–1207.
- Van der Marel M.C. Carp mucus and its role in mucosal defense: PhD Thesis, Wageningen University. The Netherlands. 2012. 189 p.
- Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish Diseases and Disorders. 2006. V. 1. P. 678–701.
- Wendelaar Bonga S.E. The stress response in fish // Physiol. Rev. 1997. V. 77. № 3. P. 591–625.

Some Indicators of Nonspecific Immunity of Various Breeding Groups of Carp in Different Periods of the Annual Cycle

D. V. Mikryakov^{1, #}, G. I. Pronina², T. A. Suvorova¹, A. S. Sokolova¹,
V. R. Mikryakov¹, and A. B. Petrushin³

¹Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Yaroslavl region, 152742 Russia

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, st. Timiryazevsky 49, Moscow, 127550 Russia

³All-Russian Research Institute of Irrigation Fisheries, st. Sergeeva 24, pos. Vorovskogo, Borogodsky GO, Moscow region, 142460 Russia

[#]e-mail: daniil@ibiw.ru

A comparative study of some parameters of nonspecific immunity in the Angelina rubella-resistant breed, the scaly and mirror groups of carp in the pre-spawning and late feeding periods was carried out. The level of antimicrobial properties of C-reactive protein, nonspecific immune complexes in blood serum and phagocytic activity of neutrophils were studied. The study showed inter-breed and inter-seasonal differences in some indicators. It is concluded that the higher level of bacteriostatic activity of blood serum in the rubella-resistant breed, compared with other groups of carp, provides a low percentage of immunodeficient individuals and resistance to pathogens of infectious diseases.