

ISSN 1026-3470

Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023

ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

# СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)

Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Номер 6, 2023

---

---

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

Эволюция морских окуней рода *Sebastes* (Perciformes: Sebastidae) Атлантического и Северного Ледовитого океанов: “видообразование путем почкования” в “букете видов” (budding speciation in the species flock)

*А. Ю. Рольский, В. С. Артамонова, А. А. Махров*

597

---

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Физиологические реакции растений огурца на внесение лигносульфоната натрия в дерново-подзолистую почву

*Е. Н. Икконен, М. Г. Юркевич*

609

Структурная и функциональная характеристика корней *Arabidopsis thaliana*, полученных в культуре *in vitro*

*И. В. Булавин, А. И. Сидякин*

616

Сопряженность фотосинтеза и дыхания с содержанием хлорофилловых пигментов в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях воздействия предельных и ароматических углеводов

*Е. Г. Тюлькова, Г. Е. Савченко, Л. Ф. Кабашикова*

626

---

## ЗООЛОГИЯ

Дополнительные элементы в задней части первого и второго верхних моляров у *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Rodentia: Cricetidae)

*М. И. Чепраков*

640

К экологии видов-двойников обыкновенной полевки — *Microtus arvalis* Pall. и *Microtus rossiaemeridionalis* Ognev на северной периферии ареала

*Э. В. Ивантер*

650

Суточная активность желтого суслика *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae): первый опыт инструментального исследования

*Н. А. Васильева, А. А. Лупырёв, Н. С. Васильев*

659

---

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Влияние продолжительности светового дня на врожденную и приобретенную гуморальную иммунореактивность хомячка кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905)

*А. М. Хруцова, Н. Ю. Васильева, О. Н. Шекарова, К. А. Роговин*

669

Противосвертывающие эффекты лейцинсодержащих глипролинов при гиперкоагуляции

*М. Е. Григорьева, Т. Ю. Оберган, Л. А. Ляпина*

682

---

## ЭКОЛОГИЯ

Биодеструкция микроцистина-LR автохтонной микробиотой разнотипных водных объектов Северо-Запада России

*Н. Г. Медведева, Т. Б. Зайцева, И. Л. Кузикова, Е. Н. Чернова*

687

Раковинные амебы природно-исторического парка “Битцевский лес” г. Москвы

*А. А. Бобров*

700

Экология юрков *Fringilla montifringilla* L. На севере Западной Сибири

*В. Н. Рыжановский*

706

---

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Сбрасывание толстого слоя гликокаликса у цистакантов скребня *Acanthocephalus tenuirostris* (Achmerov et Dombrowskaja — Achmerova, 1941)

*Т. В. Давыденко, В. П. Никушин*

716

---

---

---

---

# Contents

---

---

No. 6, 2023

---

---

## Theoretical and Evolutionary Biology

- The Evolution of Redfishes of the Genus *Sebastes* (Perciformes: Sebastidae) of the Atlantic and the Arctic Oceans: Budding Speciation in the Species Flock  
*A. Y. Rolskii, V. S. Artamonova, and A. A. Makhrov* 597
- 

## Plant Physiology

- Physiological Responses of Cucumber Plants to Sodium Lignosulfonate Application to Sandy Loam Soil  
*E. N. Ikkonen and M. G. Yrkevich* 609
- An *in vitro* *Arabidopsis thaliana* Root Structural and Functional Characterization  
*I. V. Bulavin and A. I. Sidyakin* 616
- Connectivity of Photosynthesis and Respiration with Content of Chlorophyll Pigments in Plants of Reed Fescue *Festuca arundinacea* Schreb. Under the Impact of Alkanes and Aromatic Hydrocarbons  
*E. G. Tyulkova, G. E. Savchenko, and L. F. Kabashnikova* 626
- 

## Zoology

- Additional Elements in the Posterior Part of the First and Second Upper Molars in *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Rodentia: Cricetidae)  
*M. I. Cheprakov* 640
- To the Ecology of Species-Double of Common Vole (*Microtus arvalis*, Pall.) at the Northern Limit of the Range  
*E. V. Ivanter* 650
- Circadian Activity in Yellow Ground Squirrels *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae): the Pilot Instrumental Study  
*N. A. Vasilieva, A. A. Lupyrev, and N. S. Vasiliev* 659
- 

## Animal and Human Physiology

- The Effect of Photoperiod Duration on Humoral Innate and Humoral Adaptive Immune Responsiveness in Campbell's Dwarf Hamster  
*A. M. Khrushchova, N. Yu. Vasilieva, O. N. Shekarova, and K. A. Rogovin* 669
- Anticoagulation Effects of Leucine-Containing Glyprolines in Hypercoagulation  
*M. E. Grigorieva, T. Y. Obergan, and L. A. Lyapina* 682
- 

## Ecology

- Microcystin-LR Biodestruction by Autochthonous Microbiota of Different Water Bodies in the North-West of Russia  
*N. G. Medvedeva, T. B. Zaytseva, I. L. Kuzikova, and E. N. Chernova* 687
- Shell Amebas of the Natural and Historical Park "Bitsevsky Forest", Moscow  
*A. A. Bobrov* 700
- Ecology of Brambling *Fringilla montifringilla* L. in the North of Western Siberia  
*V. N. Ryzhanovsky* 706
- 

## Short Communications

- Shedding of a Thick Layer of Glycocalyx in Cystacanth of the Acanthocephalan *Acanthocephalus tenuirostris* (Achmerov et Dombrowskaja – Achmerova, 1941)  
*T. V. Davydenko and V. P. Nikishin* 716
- 
-

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ  
И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 597.585.2-115(268)

ЭВОЛЮЦИЯ МОРСКИХ ОКУНЕЙ РОДА *Sebastes* (Perciformes: Sebastidae)  
АТЛАНТИЧЕСКОГО И СЕВЕРНОГО ЛЕДОВИТОГО ОКЕАНОВ:  
“ВИДООБРАЗОВАНИЕ ПУТЕМ ПОЧКОВАНИЯ”  
В “БУКЕТЕ ВИДОВ” (BUDDING SPECIATION IN THE SPECIES FLOCK)

© 2023 г. А. Ю. Рольский\*, @, В. С. Аргамонова\*\*, А. А. Махров\*\*, \*\*\*

\*Полярный филиал “Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии”  
(ФГБНУ “ПИНРО” им. Н.М. Книповича), ул. Академика Книповича 6, Мурманск, 183038 Россия

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

\*\*\*Санкт-Петербургский государственный университет, Лаборатория макроэкологии и биогеографии  
беспозвоночных, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

@E-mail: rol-lex@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 02.05.2023 г.

По результатам изучения нуклеотидной последовательности Д-петли (*D-loop*) митохондриальной ДНК морских окуней рода *Sebastes*, обитающих в Северной Атлантике и морях Северного Ледовитого океана, выполнена реконструкция эволюционной истории североатлантических *Sebastes*. Показано, что становление современных видов в этой группе проходило в несколько этапов. На первом этапе от общего предка аллопатрически отделился предок малого морского окуня (*S. viviparus*), далее, в процессе эволюции общего предка от него отделился предок американского окуня (*S. fasciatus*), а потом от вида, эволюционировавшего в золотистого окуня (*S. norvegicus*) в результате “видообразования путем почкования” (“budding speciation”) отделился окунь-клювач (*S. mentella*). Ключевыми при дифференциации видов были, судя по всему, палеоклиматические события, разрывавшие ареал предковой формы на время, достаточное для накопления генетических различий между группами рыб. Анализ процессов видообразования североатлантических *Sebastes* заставляет усомниться в универсальности широко распространенных представлений о симпатрическом видообразовании у рыб и является еще одним аргументом против концепции “молекулярных часов”.

**Ключевые слова:** морские окуни *Sebastes*, Северная Атлантика, Северный Ледовитый океан, митохондриальная ДНК, *D-loop*, видообразование, молекулярные часы

**DOI:** 10.31857/S1026347022601023, **EDN:** NYJAOI

Процессы формообразования и видообразования различных живых организмов, попавших в новые условия обитания, являются классической темой исследований биологов-эволюционистов (например, вьюрки Галапагосских островов и обитатели озера Байкал). В настоящее время молекулярно-генетические методы позволяют исследовать процессы дивергенции, охватывающие огромные территории или акватории, и занимающие многие миллионы лет; примером может служить анализ широкомасштабной адаптивной радиации двусторчатых моллюсков семейства Unionidae Палео-Меконга (Bolotov *et al.*, 2017).

Группы эндемичных видов, произошедших от общего предка, который вселился в новое местообитание, получили название “букетов”, или “пучков” видов – species flocks (обзоры: Мина, 1986; Fryer, 1996; Schön, Martens, 2004; Голубцов,

2010; Cristescu *et al.*, 2010). Их яркий пример – североатлантические морские окуни рода *Sebastes* (Johns, Avise, 1998; Hyde, Vetter, 2007).

Род *Sebastes* Cuvier, 1829 насчитывает более 100 видов, большая часть которых обитает в Тихом океане (Kendall, 2000; Снытко, 2001; Барсуков, 2003). Весьма интересные биологические и экологические особенности этих рыб, такие как позднее созревание, внутреннее оплодотворение и живорождение, большая продолжительность жизни, характерная для многих видов *Sebastes*, а также сложная внутривидовая структура, являются причиной повышенного внимания исследователей к этой группе рыб. Кроме того, эти рыбы являются важным объектом промысла (Барсуков, 1981; Parker *et al.*, 2000; Love *et al.*, 2002; Valentin, 2006; Рольский, 2022).

В Северной части Атлантического океана и морях Северного Ледовитого океана обитают только четыре вида морских окуней — это североатлантические *Sebastes*: окунь-клювач (*S. mentella* Travin, 1951), золотистый окунь (*S. norvegicus* Ascanius, 1772), американский окунь (*S. fasciatus* Storer, 1854) и малый морской окунь (*S. viviparus* Krøyer, 1845). Внешнее морфологическое сходство североатлантических *Sebastes*, особенности фауны их паразитов и низкая генетическая дифференциация свидетельствуют об относительно недавней эволюционной истории и филогенетической молодости этих видов (Барсуков, 1981; Sundt, Johansen, 1998; Johansen, 2003; Bunke *et al.*, 2013; McCusker *et al.*, 2013; Бакай, 2013, 2022).

На сегодняшний день существует несколько принципиально различных точек зрения на проблему видообразования в данной группе рыб. Одни исследователи считают, что видообразование морских окуней в Северной Атлантике и Северном Ледовитом океане было симпатрическим (Барсуков, 1981), другие допускают возможность аллопатрического видообразования (Литвиненко, 1985; Bunke *et al.*, 2013). Вместе с тем, скудость палеонтологических свидетельств затрудняет воссоздание достоверной картины видообразования североатлантических видов морских окуней рода *Sebastes*. Существуют лишь рабочие гипотезы, которые в общих чертах описывают места и временные рамки образования североатлантических видов.

В настоящее время установлено, что особенности внешнеморфологических и анатомических признаков североатлантических *Sebastes* указывают на их родство с группой наиболее северных и глубоководных морских окуней Тихого океана: *S. phyllipsi*, *S. aurora*, *S. borealis*, *S. matsubarae*, *S. iracundus* и др. (Литвиненко, 1985). Ранее, на основании изучения морфологических и экологических особенностей В. Темплеман (Templeman, 1959) сближал североатлантические виды рода *Sebastes* с тихоокеанским видом *S. (Sebastodes) alutus*. Эта последняя точка зрения подтверждается недавними результатами исследований формы отолигов морских окуней (Stransky, MacLellan, 2005) и результатами кладистического анализа, выполненного на основании изучения последовательностей некоторых митохондриальных генов, таких как *cyt b*, *ND-3*, *12S*, *16S* и др. (Rocha-Olivares *et al.*, 1999; Hyde, Vetter, 2007; Bunke *et al.*, 2013).

С другой стороны, итоги сравнительного анализа фауны паразитов *Sebastes* Атлантического и Тихого океанов хотя и поддержали гипотезу о тихоокеанском происхождении североатлантических *Sebastes*, но заставили предполагать, что вероятным предком североатлантических *Sebastes* мог быть *S. iracundus*, входящий в группу тихоокеанских видов (Бакай, 2013, 2022). На родство североатлантических видов *Sebastes* с этим видом

тихоокеанских морских окуней также указывал и Н.И. Литвиненко (1985).

На сегодняшний день у исследователей нет и единого мнения в вопросе о направлении эволюции у североатлантических *Sebastes*. Так, С. Роке с соавторами (Roques *et al.*, 2001) по результатам изучения восьми микросателлитных локусов высказывают предположение о происхождении *S. mentella*, *S. viviparus* и *S. fasciatus* от *S. norvegicus*. Изучение полной последовательности митохондриального гена *ND-3* приводит авторов другой работы (Bunke *et al.*, 2013) к выводу о том, что все остальные виды могли произойти от *S. mentella* (ранее аналогичная гипотеза высказана В. Темплеманом (Templeman, 1959)).

Кроме того, в литературе идет интенсивная дискуссия о таксономическом статусе и происхождении ряда внутривидовых форм североатлантических *Sebastes*, которая очень актуальна в связи с тем, что рациональная организация рыболовства требует, в первую очередь, четкого разделения видов морских окуней (Cadrin *et al.*, 2010; Makhrov *et al.*, 2011; Artamonova *et al.*, 2013; Shum *et al.*, 2015, 2017; Saha *et al.*, 2017; Rolskii *et al.*, 2020a, b; Shum, Pampoulie, 2020).

Указанные выше проблемы стали основой для формирования цели настоящего исследования, которая заключалась в реконструкции основных этапов дифференциации видов североатлантических морских окуней рода *Sebastes*. Для достижения этой цели были изучены нуклеотидные последовательности Д-петли (контрольный регион, *D-loop*) митохондриальной ДНК (мтДНК) в выборках североатлантических *Sebastes* и некоторых морских окуней Тихого океана. Данная последовательность оказалась информативной для решения поставленной задачи в отличие от последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы I (*COI*), которую обычно используют при идентификации видовой принадлежности особей, но которая идентична у трех видов североатлантических *Sebastes* (видоспецифические замены имеются только у *S. viviparus*) (Hyde, Vetter, 2007; McCusker *et al.*, 2013).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для работы послужили последовательности Д-петли мтДНК североатлантических морских окуней рода *Sebastes*, проанализированные нами ранее (Artamonova *et al.*, 2013). В международной базе данных GenBank (NCBI) эти последовательности представлены под номерами: *S. mentella* JQ846241–JQ846253; *S. norvegicus* JQ846254–JQ846259; *S. fasciatus* JQ846260, JQ846261; *S. viviparus* JQ846262–JQ846264. Для анализа были использованы последовательности только тех особей, видовой принадлежность которых, определен-

ная с помощью морфологического и генетического анализов, не вызывала сомнений. Идентификацию видов по морфологическим признакам проводили в соответствии с методическими рекомендациями по определению видов морских окуней северной части Атлантического океана и прилегающих морей (Барсуков и др., 1984; Artamonova *et al.*, 2013). Для дополнительного подтверждения видовой принадлежности рыб у всех особей анализировали нуклеотидные последовательности второго интрона ядерного гена, кодирующего белок *S7* (*RP2 S7*, 597 п. н.), по которым североатлантические *Sebastes* очень хорошо различаются (Rehbein, 2013). Например, по сравнению с *S. norvegicus*, последовательности *RP2 S7.S. mentella* имеют не только нуклеотидные замены, но также четыре вставки (длиной от 2 до 5 п. н.) и три делеции (длиной от 1 до 37 п. н.) (Rolskii *et al.*, 2020b).

Помимо собственных данных, в филогенетический анализ также были включены последовательности Д-петли тихоокеанских *Sebastes*, наиболее близко стоящих к североатлантическим *Sebastes* по результатам изучения некоторых митохондриальных и ядерных последовательностей: *S. (Sebastes) alutus* – DQ678519, *S. baramenue* – DQ678594, *S. ciliatus* – DQ678618, *S. crameri* – DQ678540, *S. polyspinis* – DQ678615, *S. reedi* – DQ678518, *S. variabilis* – DQ678613. В качестве внешней группы (outgroup) была использована последовательность филогенетически отдаленного вида *Sebastolobus alascanus* (DQ678603) (Hyde, Vetter, 2007).

Для выравнивания и анализа последовательностей контрольного региона использовали специализированный редактор BioEdit v. 7.0.5 (Hall, 1999). Генетические дистанции (*p*-дистанции) между индивидуальными последовательностями ДНК рассчитывали, исходя из количества нуклеотидных замен на позицию при попарных сравнениях. Поиск эволюционной модели нуклеотидных замен для локуса *D-loop* и восстановление филогенетического дерева с использованием методов максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI), проводили в программной оболочке PhyloSuite v.1.2.2 (Zhang *et al.*, 2020). Выбор наиболее подходящей модели нуклеотидных замен произведен на основании минимального значения Байесовского информационного критерия (BIC) (Schwarz, 1978), согласно которому наиболее оптимальной является НКУ + G1 модель (Hasegawa *et al.*, 1985). В разделе “Результаты и обсуждение” приведены только BI деревья, поскольку между данными, полученными методами ML и BI наблюдалась хорошая согласованность.

Тестирование гипотезы “молекулярных часов” проводили с помощью ML-метода, реализованного в программе MEGA v.11.0.13 (Tamura *et al.*, 2021). Суть метода заключается в статистической оценке ( $\chi^2$ -тест) логарифмических значений

правдоподобия для двух топологий деревьев – с “часами” и без “часов”. По результатам оценки нулевая гипотеза о равномерной скорости эволюции либо принимается, либо отвергается.

Расчет и построение медианной сети гаплотипов проводили на основе метода “median joining”, сочетающего в себе алгоритм Краскала для построения минимального остовного дерева и метода максимальной парсиномии (MP) Фарриса (Bandelt *et al.*, 1999), которые реализованы в программе Network 10.2.0.0 (www.fluxus-engineering.com).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Филогенетические взаимоотношения тихоокеанских и североатлантических окуней рода Sebastes*

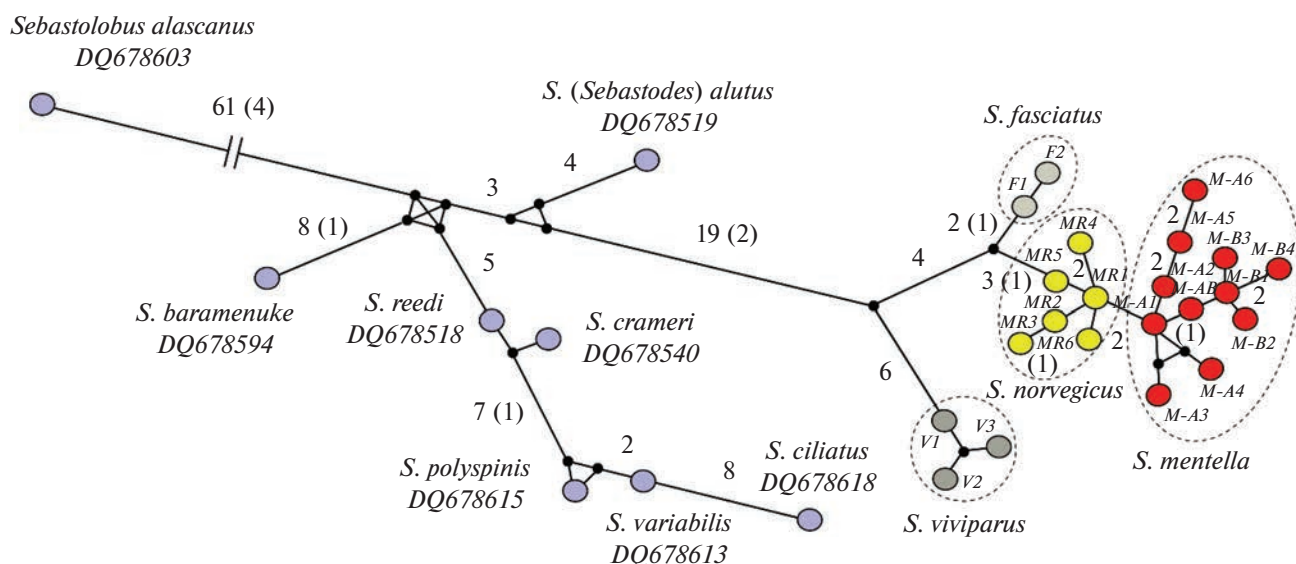
Результаты определения видовой принадлежности морских окуней по морфологическим признакам и по последовательности *RP2 S7* во всех случаях совпадали. Гибридные особи североатлантических *Sebastes*, последовательности которых ранее были депонированы нами в базу данных GenBank под номерами JQ846252 и JQ846253, были исключены из филогенетического анализа.

По результатам изучения нуклеотидной последовательности Д-петли морских окуней подсемейства Sebastinae (сем. Sebastidae) выполнена реконструкция филогении североатлантических морских окуней рода *Sebastes*. Полученная сеть гаплотипов для морских окуней представлена на рис. 1, филогенетическое дерево сходства этих видов – на рис. 2.

На медианной сети гаплотипов хорошо видно, что последовательности, относящиеся к разным видам морских окуней Северной Атлантики, образуют относительно компактные группы, которые не перекрываются между собой несмотря на то, что степень дифференциации между самими группами крайне низка, и различия между наиболее близкими гаплотипами *S. norvegicus* (MR1) и *S. mentella* (MA1) составляют всего две нуклеотидных замены (*p*-дистанция 0.0054) (рис. 1).

На рис. 1 видно, что ближайшим тихоокеанским родственником североатлантических *Sebastes* является *S. (Sebastes) alutus*, что подтверждает результаты предыдущих исследований (Templeman, 1959; Rocha-Olivares *et al.*, 1999; Hyde, Vetter, 2007; Bunke *et al.*, 2013).

Результаты тестирования “молекулярных часов” (ML-тест) позволили отклонить нулевую гипотезу о равномерной скорости эволюции последовательностей Д-петли у представителей североатлантической и тихоокеанской групп *Sebastes*. Оценки логарифмических значений правдоподобия для двух топологий деревьев с “часами” ( $\ln L = -1266.654$ ) и без “часов” ( $\ln L = -1242.667$ ) имели значимые различия ( $P = 1.479E-002$ ).



**Рис. 1.** Медианная сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК, включающая данные для тихоокеанских и североатлантических *Sebastes*. Цифрами обозначено число нуклеотидных замен между вариантами, если число не указано, то расстояние между вариантами равно одной нуклеотидной замене. В скобках указано число вставок/делений. VI, FI, MR1... – гаплотипы североатлантических *Sebastes*. Черные круги – гипотетические предковые последовательности (медианные векторы).

Ранее ускорение молекулярной эволюции показано при сравнении сестринских групп морских беспозвоночных, обитающих в Атлантическом и Тихом океанах (Loeza-Quintana *et al.*, 2019), и отмечено у чернопятнистой колюшки *Gasterosteus wheatlandi*, попавшей из Тихого океана в Атлантический через Арктику (Artamonova *et al.*, 2022). Это свидетельствует о закономерном ускорении эволюции у видов гидробионтов, пересекающих Арктику, и ставит под сомнение гипотезу “молекулярных часов”.

Определить время вселения морских окуней из Тихого океана в Атлантический на основании данных об ископаемых остатках этих рыб довольно затруднительно. В отложениях Среднего Олигоцена Бельгии обнаружен отолит рыбы, описанной как *Sebastes weileri* (Gaemers, 1972), но в недавней сводке ее считают синонимом *Rhombocitharus rhenanus* (Schwarzjans, 2010). В Олигоценных отложениях Германии обнаружены личинки рыб, предположительно относящиеся к роду *Sebastes* (Micklich, 1998), но точно определить систематическую принадлежность этих рыб невозможно.

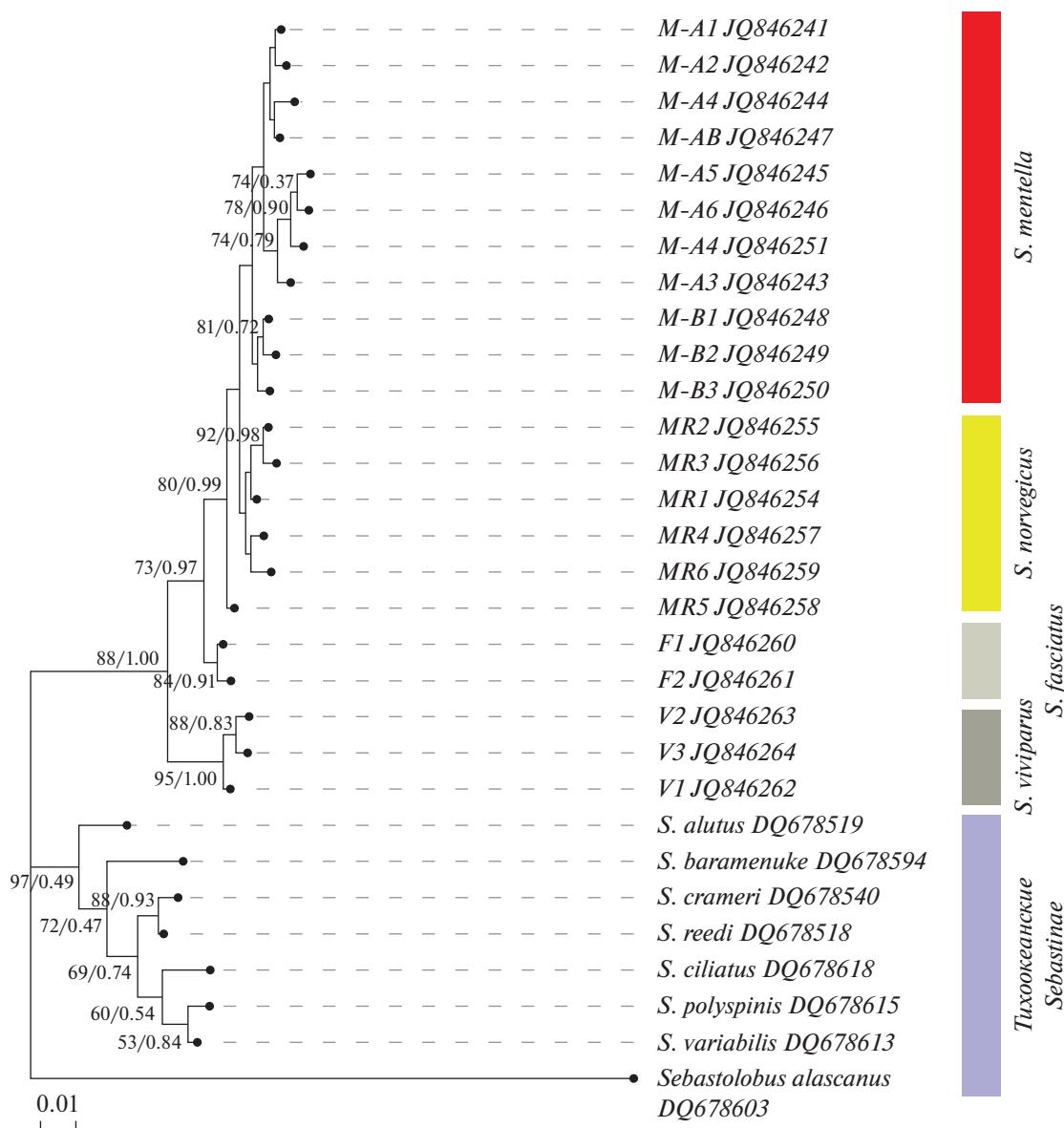
В.В. Барсуков (1981) предполагал, что морские окуни вселились в Атлантику в конце Третичного периода, то есть в Плиоцене. В современных работах обычно принимают, что разделение атлантических и тихоокеанских *Sebastes* произошло 3 млн лет назад (Hyde, Vetter, 2007). Это примерно совпадает с данными по другим видам, и не случайно период около 3.5 млн лет назад был назван периодом “Большого Транс-Арктического биотиче-

ского обмена” (the Great Trans-Arctic Biotic Interchange) (Briggs, 2003; Laakkonen *et al.*, 2021).

Монофилия североатлантических *Sebastes* позволяет рассматривать их как хороший пример эволюционного “букета видов” (“species flocks”) (Johns, Avise, 1998; Hyde, Vetter, 2007). Однако прежде чем анализировать взаимоотношения видов в пределах этой группы, надо рассмотреть и разрешить противоречия, имеющиеся у исследователей относительно принадлежности носителей некоторых гаплотипов Д-петли к тем или иным видам *Sebastes*.

#### Видовая принадлежность гаплотипов группы MR

В литературе уже несколько лет идет дискуссия о видовой принадлежности носителей группы гаплотипов, обозначенных на рис. 1, 2 как MR (гаплогруппа *S. norvegicus*). Первые исследователи пришли к обоснованному морфологическим анализом выводу, что эта группа гаплотипов, широко представленная на ареале североатлантических *Sebastes*, характеризует вид *S. norvegicus* (Hyde, Vetter, 2007; Artamonova *et al.*, 2013). Этот вывод полностью подтверждается нами в настоящей работе, где видовую принадлежность особей тестировали как морфологическими методами, так и при помощи анализа последовательности диагностического ядерного маркера (все носители гаплотипа MR имели последовательность RP2 S7, характерную для *S. norvegicus*). Однако в серии работ (Shum *et al.*, 2015, 2017; Shum, Pampoulie, 2020) носителей этой группы гаплотипов авторы



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево (метод Байеса) для последовательности контрольного региона мтДНК морских окуней. В узлах приведены значения бутстреп-поддержки (1000 реплик для каждого анализа, показаны значения  $\geq 50$ ) и через косую черту – значения апостериорной вероятности.

относят к виду *S. mentella*, и при этом считают, что для вида *S. norvegicus* характерен другой гаплотип, обнаруженный ими у представителей рода *Sebastes* только в море Ирмингера и который близок к гаплотипу *S. fasciatus*.

Следует отметить, что изученные в настоящей работе особи с гаплотипами группы MR были отловлены в Баренцевом море, в районе о. Медвежий – как раз там, где были собраны выборки, на основании изучения которых *S. norvegicus* (*S. marinus*) и *S. mentella* впервые были описаны как отдельные виды (Травин, 1951). Отметим также, что в работах (Shum *et al.*, 2015, 2017) отсутствует информация о том, с помощью каких мор-

фологических признаков авторы определяли видовую принадлежность рыб, а также не приведена информация о том, выполнялось ли тестирование особей по диагностическому ядерному маркеру.

Для доказательства принадлежности гаплотипов группы MR к виду *S. mentella*, а не к *S. norvegicus*, авторы приводят следующий аргумент: “шесть предполагаемых гаплотипов *S. norvegicus*, выявленных у 15 особей, отловленных у о. Медвежий и в районе Копытова на северо-востоке Норвежского моря, постоянно кластеризуются с гаплотипами мелководного и глубоководного *S. mentella*” (“six of the putative *S. norvegicus* haplotypes representing 15



individuals (collected at Bear Island Trough & Kopytov area, northeast of the Norwegian Sea) all consistently cluster within the shallow- and deep-type *S. mentella*)” (Shum *et al.*, 2017, p. 13).

Действительно, согласно результатам настоящего исследования, виды *S. norvegicus* и *S. mentella* на дендрограмме входят в состав единого большого кластера (рис. 2). Однако ранее (Funk, Omland, 2003) было показано, что парафилетические таксоны довольно распространенное явление: “было установлено, что среди изученных 2319 видов доля парафилетических или полифилетических видов составила 23%, тем самым демонстрируя, что этот феномен статистически значим, характерен для многих таксонов, а само явление более распространено, чем предполагалось ранее” (“This survey detected species-level paraphyly or polyphyly in 23% of 2319 assayed species, demonstrating this phenomenon to be statistically supported, taxonomically widespread, and far more common than generally recognized”) (Funk, Omland, 2003, p. 397). Образование нового вида с сохранением предкового вида в литературе получило особое название — “видообразование путем почкования” (budding speciation) (Foote, 1996).

Таким образом, нет никаких весомых оснований сомневаться, что гаплотипы группы MR относятся к виду *S. norvegicus*, как это было установлено ранее на основании результатов морфологического и молекулярно-генетического анализов.

К сожалению, трудности, связанные с корректной видовой идентификацией североатлантических *Sebastes*, уже приводят к появлению ошибочных сведений по морским окуням в международной базе генетических данных GenBank. Так, в недавней работе Кемпбелла с соавторами (Campbell *et al.*, 2022) выполнена сборка митохондриального генома *S. norvegicus* из SRA — архива (Sequence Read Archive), депонированного в GenBank авторами другой работы (Malmström *et al.*, 2016), которые ранее секвенировали и собрали полный ядерный геном *S. norvegicus*. Однако при анализе видоспецифичных последовательностей мтДНК (*D-loop*) и ядерной ДНК (*RP2 S7*) из этих геномов (данные не приводятся), нами было установлено, что изученный образец на самом деле принадлежит к другому виду морских окуней — *S. viviparus*. Анализ вышеуказанных работ показал, что в них также отсутствует информация о том с помощью каких морфологических и генетических признаков авторы определяли видовую принадлежность образца, предназначенного для полногеномного секвенирования (Malmström *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2022).

*Последовательность дивергенции видов североатлантических морских окуней и видообразование путем почкования в случае S. mentella*

На медианной сети гаплотипов (рис. 1) хорошо видно, что первым видом, который отделяется от общего предка североатлантических видов морских окуней, является *S. viviparus*. Это позволяет уточнить некоторые особенности видообразования североатлантических *Sebastes*.

Поскольку с некоторого момента замены в последовательности контрольного региона морских окуней стали накапливаться независимо в двух разных ветвях, одна из которых содержала предка современного *S. viviparus*, а другая — предка трех других видов *Sebastes*, наиболее вероятно, что в результате определенных палеоклиматических событий (регрессия океана, чередование межледниковых фаз) предковая форма современных североатлантических *Sebastes* разделилась на две группы, которые долгое время были репродуктивно изолированы. Одна из них, как уже было сказано, эволюционировала в итоге до современного *S. viviparus*, а вторая стала родоначальником трех остальных североатлантических видов морских окуней — *S. fasciatus*, *S. norvegicus* и *S. mentella*. Таким образом, на первом этапе процесс видообразования у морских окуней был, судя по всему, аллопатрическим.

Данная реконструкция во многом согласуется с точкой зрения Н.И. Литвиненко (1985), который предполагал, что разрыв ареала предковой формы североатлантических *Sebastes* привел к аллопатрическому возникновению двух линий морских окуней, одна из которых дала начало только одному виду (*S. fasciatus*), а вторая — трем, причем отделение предковой формы современного *S. viviparus* было аллопатрическим, а обособление *S. norvegicus* и *S. mentella* происходило по мере освоения все больших океанических глубин.

В то же время, согласно данным, представленным в настоящей работе, первым от общего предка североатлантических морских окуней отделился не *S. fasciatus*, а *S. viviparus*. Ранее это предполагал В.В. Барсуков (1981), который, однако, считал, что разделение предковой формы на две, одна из которых дала начало современному *S. viviparus*, а другая — трем остальным видам, было симпатрическим. Согласно этому автору, репродуктивная изоляция между зарождающимися видами возникла благодаря различиям в глубине обитания — предки *S. norvegicus* освоили средние глубины, предок *S. mentella* — наиболее глубокие слои.

Однако глубина обитания североатлантических *Sebastes*, видимо, в большой степени зависит от условий, в частности, от температуры (Барсуков, 1981; Литвиненко, 1985; Núñez-Riboni *et al.*, 2013; Planque *et al.*, 2013). Так, в Гренландии иско-

паемые рыбы, предположительно относимые к *S. norvegicus*, обнаружены в слоях, образовавшихся в Голоцене, скорее всего, на глубинах менее 50 м (Bennike, 1997). Этот вид регулярно добывали рыбаки как в южной, так и в северной Норвегии еще в Мезолите (Pickard, Bonsall, 2004). В очень холодном Белом море *S. norvegicus* до сих пор встречается на относительно небольших глубинах. Так, авторами настоящей работы в Белом море были пойманы две особи этого вида на глубине 40 м (Rolskii *et al.*, 2020a). Отсюда следует, что изменения среды должны были вести к нарушению репродуктивной изоляции зарождающихся видов.

С учетом сказанного выше, картину эволюции североатлантических *Sebastes* можно реконструировать следующим образом. Появление *Sebastes* в Атлантическом океане — результат единичного вселения из Тихого океана, поскольку и на medianной сети гаплотипов (рис. 1), и на филогенетическом древе (рис. 2) североатлантические виды образуют единый кластер. Тихоокеанский предок этой группы был относительно мелководным и холодолюбивым (поскольку пересек Северный Ледовитый океан). Пройдя по арктическому шельфу Евразии, он достиг севера Европы, где возник вид *S. viviparus*. Предок остальных трех видов двинулся на запад, и разделился на предка *S. fasciatus*, населявшего западный шельф Атлантического океана, и предка *S. norvegicus*, первоначально населявшего островные склоны Северной Атлантики. Разделению ареалов видов в значительной степени способствовали неоднократные оледенения, как это показано для других атлантических видов рыб (Kettle *et al.*, 2011).

Согласно полученным в настоящей работе данным, наиболее молодой вид североатлантических *Sebastes*, окунь-клювач, произошел непосредственно от вида *S. norvegicus*, в результате “видообразования путем почкования” (budding speciation), а не от общего с ним предка, как предполагает традиционная модель видообразования. Можно предположить, что в период одного из оледенений предок *S. mentella* освоил пелагиаль Атлантики, лежащую южнее зоны оледенения. Это объясняет, почему теплоустойчивость мышц *S. mentella* выше, чем *S. norvegicus* (Паюсова, Нефедов, 1968; Altukhov *et al.*, 1968). Современную миграцию *S. mentella* вплоть до северо-западного побережья Испании, где отмечены единичные поимки этого вида (Fernández-Zapico *et al.*, 2012), можно трактовать как возврат в район его прошлого местообитания.

Интенсивная межвидовая гибридизация между североатлантическими видами *Sebastes* (Roques *et al.*, 2001; Valentin, 2006; Pampoulie, Daniélsdóttir, 2008; Artamonova *et al.*, 2013; Bunke *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2016, 2017; Rolskii *et al.*, 2020b) служит дополнительным и достаточно весомым аргумен-

том в пользу того, что видообразование у этих рыб было аллопатрическим. Ведь в условиях симпатрии при отсутствии развитых механизмов репродуктивной изоляции видообразование было бы просто невозможно. Эту точку зрения подтверждает недавнее исследование *S. mentella* и *S. fasciatus*, основанное на массовом анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Его авторы приходят к выводу, что образование этих видов происходило аллопатрично, и только потом произошел вторичный контакт двух видов (Benestan *et al.*, 2021).

Важно отметить также, что большинство рыб, преодолевших путь из Тихого океана до побережья северной Европы и Северной Атлантики, не претерпели дивергенции в новом ареале, хотя в некоторых случаях вид-вселенец давал начало одному новому виду (обзоры: Махров, Лайус, 2018; Laakkonen *et al.*, 2021). Судя по всему, образование пучков видов североатлантическими морскими окунями связано с их биологическими особенностями. Для морских окуней характерно живорождение, поэтому их личинки разносятся течениями не так далеко, как личинки других рыб.

Это согласуется с данными по вселившимся из Тихого океана в Атлантический моллюскам — у них претерпели дивергенцию в Атлантике только виды с прямым развитием, без стадии планктонной личинки (Vermeij, 1991). На наш взгляд, отсутствие видовой дифференциации у легко расселяющихся рыб и моллюсков тихоокеанского происхождения свидетельствует о том, что для видообразования необходима географическая изоляция, а симпатрическое видообразование затруднено или даже невозможно.

Таким образом, имеющиеся у нас данные свидетельствуют в пользу аллопатрического, а не симпатрического видообразования у североатлантических *Sebastes*.

#### Проблема симпатрического видообразования

В конце 20 века—начале 21 века идея симпатрического видообразования получила широкое признание, и “букеты видов” многие исследователи считали его ярким примером (обзоры: Медников, 1963; Савваитова, 1985; Schluter, 1996; Bolnick, Fitzpatrick, 2007; Bernardi, 2013; Seehausen, Wagner, 2014). Однако с развитием молекулярно-генетических методов оказалось, что во многих случаях либо образование видов, ныне обитающих симпатрично было все-таки аллопатрическим (как в рассмотренном нами случае североатлантических морских окуней), либо сомнителен видовой статус симпатрических форм.

Ярким примером аллопатрического формирования видов, ныне обитающих симпатрично, служат, в частности, арктические гольцы рода *Salvelinus*.

Молекулярные методы демонстрируют происхождение многих симпатричных форм этих рыб в результате контакта изначально аллопатрических филогенетических линий (Osinov *et al.*, 2015, 2022; Есин, Маркевич, 2017; Oleinik *et al.*, 2019 и др.).

Становится ясно, что симпатрично образующиеся формы, как правило, не достигают постзиготической репродуктивной изоляции, а презиготическая изоляция, основанная на расхождении по месту или времени нереста, легко нарушается при изменении условий среды, что ведет к интенсивной гибридизации. Это показано, в частности, для благородных лососей *Salmo* (Махров и др., 2011).

Во многих случаях оказалось, что и фенотипические признаки, различающие симпатрические формы, в значительной степени зависят от среды обитания, то есть налицо фенотипическая пластичность. Это показано, например, для карликового алтайского османа, *Oreoleuciscus humilis* (Дгебуадзе, 2001), арктических гольцов рода *Salvelinus* (Adams *et al.*, 2003) и сигов *Coregonus* (Боровикова и др., 2020). Естественно, видовой статус форм, различия между которыми возникли в результате фенотипической пластичности, весьма сомнителен.

Североатлантические морские окуни рода *Sebastes* — интересный пример ситуации, почти “промежуточной” между аллопатрическим и симпатрическим формообразованием. Изоляция зарождающихся видов *Sebastes* была недостаточной для полного развития постзиготической репродуктивной изоляции, поэтому для этой группы характерен значительный уровень межвидовой гибридизации. Этот пример хорошо показывает необходимость географической изоляции для “полноценного” видообразования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение последовательности контрольного региона мтДНК позволило не только пролить свет на особенности происхождения североатлантических *Sebastes* и степень их родства с морскими окунями Тихого океана, но также дает возможность реконструировать порядок дифференциации современных видов морских окуней Северной Атлантики и Северного Ледовитого океана. Эволюция североатлантических *Sebastes*, судя по всему, проходила в несколько этапов. На первом этапе от общего предка аллопатрически отделился предок *S. viviparus*, далее произошло разделение предковых форм *S. fasciatus* и *S. norvegicus*, а потом непосредственно от *S. norvegicus* возник *S. mentella*. Ключевыми при дифференциации видов были палеоклиматические события, разрывавшие ареал предковой формы на время, достаточное для

накопления генетических различий между группами рыб.

Таким образом, “букет видов” североатлантических морских окуней демонстрирует: 1) аллопатрическое видообразование группы симпатрично обитающих видов; 2) пример видообразования путем почкования. Это заставляет усомниться в универсальности широко распространенных представлений о симпатрическом видообразовании и является еще одним аргументом, заставляющим усомниться в универсальности теории “молекулярных часов”.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-14-00066-П, <https://rscf.ru/project/19-14-00066/>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакай Ю.И. К вопросу о происхождении североатлантических *Sebastes* (Scorpaenidae) на основе анализа их паразитофауны // Биология моря. 2013. Т. 39. № 3. С. 227–229.
- Бакай Ю.И. Структура сообществ паразитов и особенности популяционной биологии морских окуней рода *Sebastes* Атлантического и Северного Ледовитого // Мурманск: ПИНРО им. Н.М. Книповича, 2022. 258 с.
- Барсуков В.В. Морские окуни (Sebastinae) Мирового океана — их морфология, экология, распространение, расселение и эволюция: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: 1981. 50 с.
- Барсуков В.В., Литвиненко Н.И., Серебряков В.П. Методические указания по определению видов морских окуней северной части Атлантического океана и прилегающих морей // АтлантНИРО. Калининград, 1984. 28 с.
- Барсуков В.В. Аннотированный и иллюстрированный каталог морских окуней Мирового океана. СПб: ЗИН РАН. 2003. Т. 95. 320 с.
- Боровикова Е.А., Кодухова Ю.В., Семенова А.В. Фенотипическая пластичность и аллометрия краниологических признаков проходной и озерной форм обыкновенного сига *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758) как указание на неправомерность выделения вида *Coregonus pidschian* // Сибирский экологический журнал. 2020. № 6. С. 741–752. <https://doi.org/10.15372/SEJ20200606>
- Голубцов А.С. “Пучки видов” рыб в реках и озерах: симпатрическая дивергенция в фаунистически обедненных рыбных сообществах как особый модус эволюции // Актуальные проблемы современной ихтиологии (к 100-летию Г.В. Никольского). М.: Т-во научных изданий КМК. 2010. С. 96–123.
- Дгебуадзе Ю.Ю. Экологические закономерности изменчивости роста рыб. М.: Наука, 2001. 276 с.
- Есин Е.В., Маркевич Г.Н. Гольцы рода *Salvelinus* азиатской части Северной Пацифики: происхождение,

- эволюция и современное разнообразие. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2017. 188 с.
- Литвиненко Н.И. Морские окуни (род *Sebastes*) Северной Атлантики — их морфология, экология, распространение, расселение и эволюция: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: 1985. 22 с.
- Махров А.А., Артамонова В.С., Сумароков В.С., Пашков А.Н., Решетников С.И., Ганченко М.В., Кулян С.А. Изменчивость сроков нереста у черноморской кумжи *Salmo trutta labrax* Pallas в искусственных и естественных условиях // Изв. РАН. 2011. Серия биол. № 2. С. 178–186.
- Махров А.А., Лайус Д.Л. Последледниковое вселение рыб и миноги из Тихого океана в моря севера Европы // Сибирский экологический журн. 2018. № 3. С. 265–279.  
<https://doi.org/10.15372/SEJ20180301>
- Медников Б.М. Экологические формы рыб и проблема симпатрического видообразования // Зоол. журн. 1963. Т. 42. Вып. 1. С. 70–77.
- Мина М.В. Микроэволюция рыб. Эволюционные аспекты фенетического разнообразия. М.: Наука, 1986. 207 с.
- Паюсова А.Н., Нефедов Г.Н. Анализ теплоустойчивости изолированной мышечной ткани морских окуней рода *Sebastes* из Баренцева моря // Цитология. 1968. Т. 10. № 1. С. 133–137.
- Рольский А.Ю. Окунь-клювач *Sebastes mentella* моря Ирмингера — современные представления о структуре, состоянии запаса и мерах регулирования промысла // Вопросы рыболовства. 2022. № 3. С. 56–69.  
<https://doi.org/10.36038/0234-2774-2022-23-3-56-69>
- Савваитова К.А. К проблеме симпатрического формо- и видообразования у рыб // Биологические науки. 1985. № 11. С. 18–31.
- Снытко В.А. Морские окуни северной части Тихого океана // Владивосток: ТИНРО-центр. 2001. 468 с.
- Травин В.И. Новый вид морского окуня в Баренцевом море (*Sebastes mentella* Travin sp. nov.) // Доклады АН СССР. 1951. Т. 77. № 4. С. 741–744.
- Adams C.E., Woltering C., Alexander G. Epigenetic regulation of trophic morphology through feeding behavior in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* // Biol. J. Linn. Soc. 2003. V. 78. P. 43–49.  
<https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00126.x>
- Altukhov Ju.P., Nefyodov G.N., Payusova A.N. Thermostability of isolated muscle in determining the taxonomic relationship of the marinus- and mentella- types of the redfish (*Sebastes*) // Research Bulletin ICNAF. 1968. № 5. P. 130–136.
- Artemonova V.S., Makhrov A.A., Karabanov D.P., Rolskiy A.Yu., Bakay Yu.I., Popov V.I. Hybridization of beaked redfish (*Sebastes mentella*) with small redfish (*S. viviparus*) and diversification of redfish (Actinopterygii: Scorpaeniformes) in the Irminger Sea // Journal of Natural History. 2013. V. 47. № 25. P. 1791–1801.  
<https://doi.org/10.1080/00222933.2012.752539>
- Artemonova V.S., Bardukov N.V., Aksenova O.V., Ivanova T.S., Ivanov M.V., Kirillova E.A., Koulishev A.V., Lajus D.L., Malyutina A.M., Pashkov A.N., Reshetnikov S.I., Makhrov A.A. Round-the-World Voyage of the Threespine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Phylogeographic Data Covering the Entire Species Range // Water. 2022. V. 14. 2484.  
<https://doi.org/10.3390/w14162484>
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Benestan L.M., Rougemont Q., Senay C., Normandeau E., Parent E., Rideout R., Bernatchez L., Lambert Y., Audet C., Parent G.J. Population genomics and history of speciation reveal fishery management gaps in two related redfish species (*Sebastes mentella* and *Sebastes fasciatus*) // Evolutionary Applications. 2021. V. 14. P. 588–606.  
<https://doi.org/10.1111/eva.13143>
- Bennike O. Quaternary vertebrates from Greenland: a review // Quaternary Science Reviews. 1997. V. 16. P. 899–909.  
[https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(97\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(97)00002-4)
- Bernardi G. Speciation in fishes // Molecular Ecology. 2013. V. 22. P. 5487–5502.  
<https://doi.org/10.1111/mec.12494>
- Bolnick D.I., Fitzpatrick B.M. Sympatric speciation: Models and empirical evidence // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2007. V. 38. P. 459–487.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095804>
- Bolotov I.N., Kondakov A.V., Vikhrev I.V., Aksenova O.V., Bepalaya Yu.V., Gofarov M.Yu., Kolosova Yu.S., Konopleva E.S., Spitsyn V.M., Tanmuangpak K., Tumpeesuan S. Ancient River Inference Explains Exceptional Oriental Freshwater Mussel Radiations // Scientific Reports. 2017. V. 7: 2135.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02312-z>
- Briggs J.C. Marine centres of origin as evolutionary engines // Journal of Biogeography. 2003. V. 30. P. 1–18.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00810.x>
- Bunke C., Hanel R., Trautner J.H. Phylogenetic relationships among North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) as revealed by mitochondrial DNA sequence analyses // J. of Applied Ichthyology. 2013. V. 29. № 1. P. 82–92.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.02048.x>
- Cadrin S.X., Bernreuther M., Daniélsdóttir A.K., Hjörleifsson E., Johansen T., Kerr L., Kristinsson K., Mariani S., Nedreaas K., Pampoulie C., Planque B., Reinert J., Saborido-Rey F., Sigurðsson T., Stransky C. Population structure of beaked redfish, *Sebastes mentella*: evidence of divergence associated with different habitats // ICES Journal of Marine Sciences. 2010. V. 67. № 8. P. 1617–1630.  
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsq046>
- Campbell J.R., Searle P.C., Kokkonen A.L., Shiozawa D.K., Belk M.C., Evans R.P. Complete mitochondrial genomes of two rockfish: *Sebastes maliger* and *Sebastes norvegicus* (Scorpaenidae, Scorpaeniformes) // Mitochondrial DNA Part B. 2022. V. 7. № 9. P. 1614–1616.  
<https://doi.org/10.1080/23802359.2022.2116951>
- Cristescu M.E., Adamowicz S.J., Vaillant J.J., Haffner D.G. Ancient lakes revisited: from the ecology to the genetics of speciation // Molecular Ecology. 2010. V. 19.

- P. 4837–4851.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04832.x>
- Fernández-Zapico O., Arronte J.C., Ruiz-Pico S.* Occurrence of *Sebastes mentella* (Scorpaeniformes: Sebastidae) off the Galician coast (NW Spain) (North-eastern Atlantic) // *Cybium*. 2012. V. 3. № 4. P. 591–592.  
<https://doi.org/10.26028/cybium/2012-364-016>
- Foote M.* On the probability of ancestors in the fossil record // *Paleobiology* 1996. 22. № 2. P. 141–151.
- Fryer G.* Endemism, speciation and adaptive radiation in great lakes // *Environmental Biology of Fishes*. 1996. V. 45. P. 109–131.  
<https://doi.org/10.1007/BF00005225>
- Funk D.J., Omland K.E.* Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2003. P. 397–423.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Gaemers P.A.M.* Otoliths from the type locality of the Sands of Berg (Middle Oligocene) at Berg, Belgium // *Meded. Werkgr. Tert. Kwart. Geol.* 1972. V. 9. P. 73–85.
- Hall V.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41. 1999. P. 95–98.  
[https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14998u1.29](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29)
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T.* Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1985. V. 22. № 2. P. 160–74.  
<https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Hyde J.R., Vetter R.D.* The origin, evolution, and diversification of rockfishes of the genus *Sebastes* (Cuvier) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007. V. 44. P. 780–811.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.026> Epub 2007 Jan 12
- Johansen T.* Genetic study of genus *Sebastes* (redfish) in the North Atlantic with emphasis on the stock complex in the Irminger Sea. Thesis for the partial fulfilment of the Dr. Scient. Degree // *Bergen: University of Bergen*. 2003. 44 p.
- Johns G.C., Avise J.C.* Tests for ancient species flocks based on molecular phylogenetic appraisals of *Sebastes* rockfishes and other marine fishes // *Evolution*. V. 52. № 4. 1998. P. 1135–1146.  
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01840.x>
- Kendall A.W. Jr.* An historical review of *Sebastes* taxonomy and systematics // *Marine Fisheries Review*. V. 62. 2000. P. 1–23.
- Kettle A.J., Morales-Muciz A., Roselly-Izquierdo E., Heinrich D., Vøllestad L.A.* Refugia of marine fish in the northeast Atlantic during the last glacial maximum: concordant assessment from archaeozoology and palaeotemperature reconstructions // *Clim. Past*. 2011. V. 7. P. 181–201.  
<https://doi.org/10.5194/cp-7-181-2011>
- Laakkonen H.M., Hardman M., Strelkov P., Vainola R.* Cycles of trans-Arctic dispersal and vicariance, and diversification of the amphi-boreal marine fauna // *J. Evol. Biol.* 2021. V. 34. P. 73–96.  
<https://doi.org/10.5061/dryad.zw3r22868>
- Loeza-Quintana T., Carr C.M., Khan T., Bhatt Y.A., Lyon S.P., Hebert P.D.N., Adamowicz S.J.* Recalibrating the molecular clock for Arctic marine invertebrates based on DNA barcodes // *Genome*. 2019. V. 62. P. 200–216.  
<https://doi.org/10.1139/gen-2018-0107>
- Love M.S., Yoklavich M.M., Thorsteinson L.K.* The Rockfishes of the Northeast Pacific // *University of California Press*. 2002. 405 p.
- Makhrov A.A., Artamonova V.S., Popov V.I., Rolskiy A.Yu., Bakay Yu.I.* Comment on: Cadrin *et al.* (2010) “Population structure of beaked redfish, *Sebastes mentella*: evidence of divergence associated with different habitats. *ICES Journal of Marine Science*, 67: 1617–1630” // *ICES Journal of Marine Science*. 2011. V. 68. 10. P. 2013–2015.  
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsr132>
- Malmström M., Matschiner M., Tørresen O.K., Star B., Snipen L.G., Hansen T.F., Baalsrud H.T., Nederbragt A.J., Hanel R., Salzburger W., Stenseth N.C., Jakobsen K.S., Jentoft S.* Evolution of the immune system influences speciation rates in teleost fishes // *Nature Genetics*. 2016. V. 48. № 10. P. 1204–1210.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3645> Epub 2016 Aug 22
- McCusker M.R., Denti D., van Guelpen L., Kenchington E., Bentsen P.* Barcoding Atlantic Canada’s commonly encountered marine fishes // *Molecular Ecology Resources*. 2013. V. 13. P. 177–188.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12043> Epub 2012 Dec 17
- Micklich N.* New information on the fishfauna of the Frauenweiler fossil site // *Italian Journal of Zoology*. 1998. V. 65. S1. P. 169–184.  
<https://doi.org/10.1080/11250009809386809>
- Núñez-Riboni I., Kristinsson K., Bernreuther M., van Aken H.M., Stransky C., Cisewski B., Rolskiy A.* Impact of interannual changes of large scale circulation and hydrography on the spatial distribution of beaked redfish (*Sebastes mentella*) in the Irminger Sea // *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2013. V. 82. P. 80–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.dsr.2013.08.003>
- Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Kukhlevsky A.D., Bondar E.I.* On the origin of endemic stone charr in the Kamchatka River basin // *Hydrobiologia*. 2019. V. 840. P. 21–33.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-018-3867-6>
- Osinov A.G., Senchukova A.L., Mugue N.S., Pavlov S.D., Chereshevnev I.A.* Speciation and genetic divergence of three species of charr from ancient Lake El’gygytyn (Chukotka) and their phylogenetic relationships with other representatives of the genus *Salvelinus* // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2015. V. 116. P. 63–85.  
<https://doi.org/10.1111/bij.12559>
- Osinov A.G., Volkov A.A., Pavlov D.A.* Secondary contact, hybridization, and diversification in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* (L.) species complex) from lakes of the Norilo-Pyasinskaya water system, Taimyr: how many forms exist there? // *Hydrobiologia*. 2022. V. 849. P. 2521–2547.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-022-04869-x>
- Pampoulie P., Daniëlsdóttir A.K.* Resolving species identification problems in the genus *Sebastes* using nuclear genetic

- markers // *Fish. Res.* 2008. V. 93. № 1–2. P. 54–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2008.02.007>
- Parker S., Berkeley S.A., Golden J., Gunderson D., Heifetz J., Hixon M., Larson R., Leaman B., Love M., Musick J., O'Connell V., Ralston S. Management of Pacific Rockfish // *Fisheries*. 2000. V. 25. P. 22–30.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8446\(2000\)025<0022:MOPR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(2000)025<0022:MOPR>2.0.CO;2)
- Pickard C., Bonsall C. Deep-Sea Fishing in the European Mesolithic: Fact or Fantasy? // *European Journal of Archaeology*. 2004. V. 7. P. 273–290.  
<https://doi.org/10.1177/1461957104056504>
- Planque B., Kristinsson K., Astakhov A., Bernreuther M., Bethke E., Drevetnyak K., Nedreaas K., Reinert J., Rolskiy A., Sigurðsson T., Stransky C. Monitoring beaked redfish (*Sebastes mentella*) in the North Atlantic, current challenges and future prospects // *Aquat. Living Resour.* 2013. V. 26. № 4. P. 293–306.  
<https://doi.org/10.1051/alr/2013062>
- Rehbein H. Differentiation of fish species by PCR-based DNA analysis of nuclear genes // *European Food Res. and Technology*. 2013. V. 236. № 6. P. 979–990.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-1961-6>
- Rocha-Olivares A., Kimbrell C.A., Eitner B.J., Vetter R.D. Evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene sequence in the species-rich genus *Sebastes* (Teleostei: Scorpaenidae) and its utility in testing the monophyly of the subgenus *Sebastomus* // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1999. V. 11. P. 426–440.  
<https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0584>
- Roques S., Sévigny J.-M., Bernatchez L. Evidence for broad-scale introgressive hybridization between two redfish (genus *Sebastes*) in the North-west Atlantic: a rare marine example // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. P. 149–165.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01195.x>
- Rolskii A.Y., Artamonova V.S., Makhrov A.A. Molecular identification of golden redfish (*Sebastes norvegicus*) in the White Sea // *Polar Biology*. 2020a. V. 43. P. 385–389.  
<https://doi.org/10.1007/s00300-020-02629-y>
- Rolskii A.Y., Artamonova V.S., Makhrov A.A. Hybridization of the redfish species *Sebastes norvegicus* and *Sebastes mentella* occurs in the Irminger Sea but not in the White Sea // *Polar Biology*. 2020b. V. 43. P. 1667–1668.  
<https://doi.org/10.1007/s00300-020-02719-x>
- Saha A., Johansen T., Hedeholm R., Jon-Ivar W., Hauser L., Benjamin P., Cadrin S., Boje J., Nielsen E. Geographic extent of introgression in *Sebastes mentella* and its effect on genetic population structure // *Evolutionary Applications*. 2016. V. 10. P. 1–14.  
<https://doi.org/10.1111/eva.12429>
- Saha A., Hauser L., Hedeholm R., Planque B., Fevolden S.-E., Boje J., Johansen T. Cryptic *Sebastes norvegicus* species in Greenland waters revealed by microsatellites // *ICES Journal of Marine Science*. 2017. V. 74. P. 2148–2158.  
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsx039>
- Schluter D. Ecological speciation in postglacial fishes // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B. Biological science*. 1996. V. 351. P. 807–814.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0075>
- Schön I., Martens K. Adaptive, pre-adaptive and non-adaptive components of radiations in ancient lakes: a review // *Organisms Diversity and Evolution*. 2004. V. 4. P. 137–156.  
<https://doi.org/10.1016/j.ode.2004.03.001>
- Schwarz G. Estimating the dimension of a model // *The Annals of Statistics* 1978. V. 6. № 2. P. 461–464.
- Schwarzans W. The Otoliths from the Miocene of the North Sea Basin // Leiden: Backhuys Publishers. 2010.  
<https://doi.org/10.13140/2.1.1877.0563>
- Seehausen O., Wagner C.E. Speciation in freshwater fishes // *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 2014. V. 45. P. 621–651.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091818>
- Shum P., Pampoulie C., Kristinsson K., Mariani S. Three-dimensional postglacial expansion and diversification of an exploited oceanic fish // *Molecular Ecology*. 2015. V. 24. P. 3652–3667.  
<https://doi.org/10.1111/mec.13262> Epub 2015 Jun 14
- Shum P., Moore L., Pampoulie C., Di Muri C., Vandamme S., Mariani S. Harnessing mtDNA variation to resolve ambiguity in 'Redfish' sold in Europe // *PeerJ*. 2017. 5:e3746.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.3746>
- Shum P., Pampoulie C. Molecular identification of redfish (genus *Sebastes*) in the White Sea indicates patterns of introgressive hybridization // *Polar Biol.* 2020. V. 43. P. 1663–1665.  
<https://doi.org/10.1007/s00300-020-02718-y>
- Stransky C., MacLellan S.E. Species separation and zoogeography of redfish and rockfish (genus *Sebastes*) by otolith shape analysis // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2005. V. 62. P. 2265–2276.  
<https://doi.org/10.1139/f05-143>
- Sundt R.P., Johansen T. Low levels of interspecific DNA sequence variation of the mitochondrial 16S rRNA in North Atlantic redfish *Sebastes* (Pisces, Scorpaenidae) // *Sarsia*. 1998. V. 83. P. 449–452.  
<https://doi.org/10.1080/00364827.1998.10413704>
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 // *Molecular Biology and Evolution*. 2021. V. 38. P. 3022–3027.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Templeman W. Redfish distribution in the North Atlantic // *Bull. Fish. Res. Board of Canada*. 1959. V. 120. P. 120–173.
- Valentin A.E. Structure des populations de *Sébaste* de L'atlantique du nord-ouest dans un contexte de Gestion des stocks et d'évolution // Thèse De Doctorat. L'université Du Québec À Rimouski. 2006. 212 p.
- Vermeij G.J. Anatomy of an invasion: the Trans-Arctic interchange // *Paleobiology*. 1991. V. 17. № 3. P. 281–307.
- Zhang D., Gao F., Jakovlić I., Zou H., Zhang J., Li W.X., Wang G.T. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies // *Molecular Ecology Resources*. 2020. V. 20. № 1. P. 348–355.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13096>

## The Evolution of Redfishes of the Genus *Sebastes* (Perciformes: Sebastidae) of the Atlantic and the Arctic Oceans: Budding Speciation in the Species Flock

A. Y. Rolskii<sup>1, #</sup>, V. S. Artamonova<sup>2</sup>, and A. A. Makhrov<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> Polar Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI "PINRO" named after N.M. Knipovich), Akademika Knipovicha, St 6, Murmansk, 183038 Russia

<sup>2</sup> Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Leninskiy Prospect, 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, Laboratory of macroecology and biogeography of invertebrates, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

#e-mail: rol-lex@mail.ru

The evolutionary history of North Atlantic *Sebastes* redfishes was reconstructed as a result of studying the mitochondrial DNA D-loop sequences of *Sebastes* redfishes inhabiting the North Atlantic and the Arctic Oceans. It was shown, that speciation of these redfishes occurred in several stages. During the first stage, the ancestor of Norway redfish (*S. viviparus*) diverged from the common ancestor species in the process of allopatric speciation. Ancestor of Acadian redfish (*S. fasciatus*) diverged from the common ancestor as it evolved. Budding speciation in the species that would later evolve into golden redfish (*S. norvegicus*) resulted in emergence of beaked redfish (*S. mentella*). Paleoclimatic events seem to have played the key role in species divergence as they caused habitat fragmentation allowing the isolated groups to become genetically distinct in the meantime. The conducted analysis of *Sebastes* redfishes speciation brings into question the generality of widely accepted views on fish sympatric speciation. It also serves as an argument against the molecular clock hypothesis.

**Keywords:** *Sebastes* redfishes, the North Atlantic, the Arctic Ocean, mitochondrial DNA, D-loop, speciation, molecular clock

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА НА ВНЕСЕНИЕ ЛИГНОСУЛЬФОНАТА НАТРИЯ В ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТУЮ ПОЧВУ

© 2023 г. Е. Н. Икконен\*, @, М. Г. Юркевич\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

@E-mail: likkonen@gmail.com

Поступила в редакцию 06.06.2022 г.

После доработки 01.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

Вопрос использования лигносульфонатов (ЛС) для повышения плодородия почв в настоящее время является дискуссионным. Исследовали влияние содержания в почве ЛС натрия на накопление биомассы, фотосинтез, дыхание, и их соотношение у растений огурца. Содержание ЛС в пределах 10–25 г/кг не оказывало значимого влияния на исследованные показатели физиологического состояния растений. Однако при высоком содержании ЛС в почве (50–100 г/кг) скорость роста и активность фотосинтетического аппарата понижались, а интенсивность дыхания увеличивалась, определяя повышение доли дыхательных затрат от фотосинтеза. Высокие концентрации ЛС натрия в почве негативно отразились на физиологическом состоянии огурца и на его устойчивости к холоду предположительно из-за натриевого засоления почвы.

*Ключевые слова:* *Cucumis sativus*, фотосинтез, дыхание, флуоресценция хлорофилла

**DOI:** 10.31857/S1026347022600510, **EDN:** VVVXJE

В настоящее время активно исследуются вещества, которые могли бы, пусть частично, но замещать дорогостоящие удобрения. В качестве “улучшителей” почв, среди прочих, изучается возможность использования техногенных отходов. В случае положительного эффекта от использования отходов в агропроизводстве, кроме того, появилась бы возможность их частичной утилизации.

Недавние исследования показали, что лигносульфонаты (ЛС), побочные продукты трансформации лигнина в процессе производства целлюлозы, могут быть использованы для улучшения химических и физических свойств почв (Ta'negonbadi, Noorzad, 2017; Liu *et al.*, 2019). Из-за способности лигносульфонатов образовывать с металлами хелатные комплексы (Хабаров и др., 2019), было высказано мнение о возможности их использования в качестве хелатных удобрений (Carrasco *et al.*, 2012). В состав ЛС входит лигнин, кислоты, полисахариды и моносахара, макро- и микроэлементы (Максимов, Стадницкий, 1988). Значительное содержание в ЛС органических и минеральных веществ, свободных фенольных и карбоксильных групп, обуславливающих высокие ионные свойства материала (Fernando, Roberts, 1976), позволяет рассматривать их как потенциальных улучшителей почвенных свойств (Carrasco

*et al.*, 2012) и, следовательно, условий для роста и развития растений.

В исследованиях возможности использования ЛС в сельскохозяйственных целях основное внимание уделялось оценке его влияния на свойства почв, а в знаниях об отклике растений на внесение ЛС в почву существуют значительные пробелы. В немногочисленных работах сообщалось, что ЛС может стимулировать рост и плодоношение отдельных видов растений, положительно влиять на укоренение побегов (Docquier *et al.*, 2007), а также активизировать в клетках растений синтез некоторых белков и повышать содержание хлорофилла и сахаров (Ertani *et al.*, 2011). Однако были получены и противоположные результаты. Так, в работе Стапаниан и Шеа (Stapanian, Shea, 1986) показано, что накопление биомассы травянистыми видами снижалось при высоком уровне содержания ЛС в почве, а у древесных видов растений скорость накопления биомассы не менялась вне зависимости от концентрации ЛС в почве. Ввиду немногочисленности и неопределенности оценок реакций растений на внесение в почву ЛС вопрос о возможности его использования в сельскохозяйственном производстве остается дискуссионным.

Реакции растений на изменения условий их обитания сложны, поскольку регулируются широ-



ким спектром физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов, действующих на разных уровнях организации. Предполагается, что в силу особенности своего состава и способности образовывать хелатные комплексы, ЛС может инициировать в растениях ряд изменений в физиологических процессах, основными из которых являются рост, фотосинтез и дыхание.

Как упоминалось ранее, отдельные исследования затрагивали вопрос влияния ЛС на ростовые процессы растений, но малоизвестно о его воздействии на процессы фотосинтеза и дыхания, а также на их соотношение. Кроме того, неизвестно, может ли ЛС способствовать повышению устойчивости растений к изменению условий их роста, например, к понижению температуры. В связи с этим задачей данного исследования являлась оценка влияния внесения лигносульфоната натрия в почву на основные физиологические процессы растения на примере огурца и на его устойчивость к понижению температуры.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В модельном опыте использовали дерново-подзолистую суглинистую почву, которую высушивали, просеивали и смешивали с лигносульфонатом натрия в концентрации 0, 10, 25, 50 или 100 г/кг. Почвенный субстрат инкубировали в контролируемых условиях при еженедельном поливе и перемешивании в течение 90 сут. После инкубации субстратов определяли обменную кислотность (рН) в вытяжке раствором 1 М КСl.

Пророщенные семена огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Кураж F1) высаживали в сосуды объемом 0.8 л, заполненные подготовленным субстратом. В каждый сосуд высаживали по 4 семени. Растения выращивали при температуре 25/22°C день/ночь, фотопериоде 16 ч, фотосинтетически активной радиации (ФАР) 300 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), влажности воздуха 60–70% в камерах искусственного климата (ВКШ, Россия). Через 7 сут после посадки семян в каждом сосуде было оставлено по одному растению. Через 14 сут после посадки растения каждого опытного варианта были разделены на 2 части. Первую часть растений продолжали выращивать при первоначальных температурных условиях, а вторую часть растений перевели на 10 сут на рост при 15/12°C день/ночь.

Измерения физиологических параметров растений выполняли, начиная с 24-х сут после их посадки. Скорость CO<sub>2</sub>-газообмена листа измеряли с использованием портативной системы для исследования CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O-газообмена HSM-1000 (Walz, Германия) при температуре листа 25°C для растений, выращиваемых при 25/22°C, и при температуре листа 15°C для растений, выращиваемых при 15/12°C. Измерения проводили при насыщаю-

щем фотосинтез свете, интенсивность которого была определена предварительно и составляла 1200 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР для растений, выращиваемых при 25/22°C, и 800 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР для растений, выращиваемых при 15/12°C. Для растений варианта 25/22°C дополнительно измеряли газообмен при 300, 60, 40 и 20 и 0 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР. Скорость газообмена при 0 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР была принята за дыхание листьев в темноте ( $R_d$ ). Видимый квантовый выход фотосинтеза ( $\alpha$ ) вычисляли по начальному линейному отрезку световой кривой фотосинтеза, построенной по значениям скорости видимого фотосинтеза при 60, 40 и 20 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР. Митохондриальное дыхание листьев на свету ( $R_l$ ) было определено по методу Kok (1948). Скорость истинного фотосинтеза ( $A_2$ ) при ФАР, равной 1200 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), рассчитывали как сумму скорости видимого фотосинтеза ( $A_n$ ) и  $R_l$ . Скорость фотосинтетического транспорта электронов ( $J$ ), оксигеназную ( $v_o$ ) и карбоксилазную ( $v_c$ ) активность Рубиско вычисляли согласно Farquhar и von Caemmere (Farquhar, von Caemmerer, 1982).

Параметры флуоресценции и содержания хлорофилла определяли на тех же листьях, которые использовали для исследования параметров CO<sub>2</sub>-газообмена. Для измерения максимальной фотохимической квантовой эффективности ФСII ( $F_v/F_m$ ) использовали портативный флуориметр MINI-PAM (Walz, Германия). Перед измерением минимальной и максимальной флуоресценции хлорофилла ( $F_o$  и  $F_m$  соответственно) листья адаптировали к темноте в течение 30 мин с помощью зажимов для листьев. Параметры  $F_o$  и  $F_m$  использовали для расчета максимальной фотохимической эффективности ФС II ( $F_v/F_m = [F_m - F_o]/F_m$ ). Содержание хлорофилла (SPAD индекс) определяли с использованием хлорофилл метра SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) (Minolta Camera, Япония) с выполнением не менее 5 измерений на каждом листе.

Интенсивность устойчивого и чувствительно-го к салицилгидроксамовой кислоте (СГК) путей дыхания изучали полярографическим методом, измеряя скорость темнового дыхания листьев по поглощению кислорода с помощью электрода Кларка (Oxygraph System Plus, Hansatech, Великобритания) в буферном растворе 100 мМ HEPES (рН 7.5) с добавлением или без добавления ингибитора альтернативного пути дыхания 30 мМ СГК. До начала измерений растения выдерживали в темноте не менее 15 мин. Из середины части листовых пластинок огурца стальным цилиндром вырезали диски площадью 2.6 см<sup>2</sup>, что составляло в среднем 6.9 мг сухой массы. Отобранные образцы разрезали на полоски шириной не более 2 мм и помещали в измерительную кювету с 2 мл буфер-

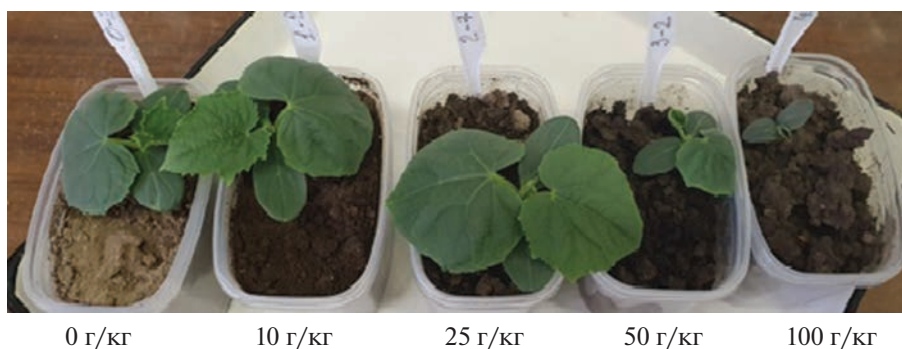
ного раствора, который насыщали кислородом перед каждым измерением. После стабилизации процесса в измерительной ячейке в течение не менее 15 мин скорость снижения содержания кислорода измеряли в течение 5 мин. Интенсивность поглощения кислорода растительным материалом в буферном растворе, не содержащем СГК, была принята за общее дыхание, а в буферном растворе, содержащем СГК — за устойчивое к СГК совместное цитохромное и остаточное дыхание. Различия скорости поглощения кислорода из буфера, не содержащего и содержащего СГК, были приняты за СГК-чувствительное дыхание, косвенно отражающее активность альтернативного пути дыхания. Измерения дыхания проводили при температуре буферного раствора 25°C для растений, выращиваемых при 25/22°C, и при 15°C — для растений, выращиваемых при 15/12°C. Для создания требуемой температуры камеру с измерительной кюветой, содержащей буферный раствор, подсоединяли к жидкостному термостату MLW (VEB MLW PRUFGERATE-WERK, ГДР). Для определения сухой биомассы надземную часть растений возраста 28 сут высушивали при температуре 70°C до постоянного веса. Данные представлены как средние значения из 4-х биологических повторностей и их стандартные ошибки двух независимых экспериментов. Достоверность различий между средними значениями определяли дисперсионным анализом при  $P < 0.05$  (LSD тест) с использованием программного обеспечения Statistica (v. 8.0.550.0, “StatSoft, Inc.”).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

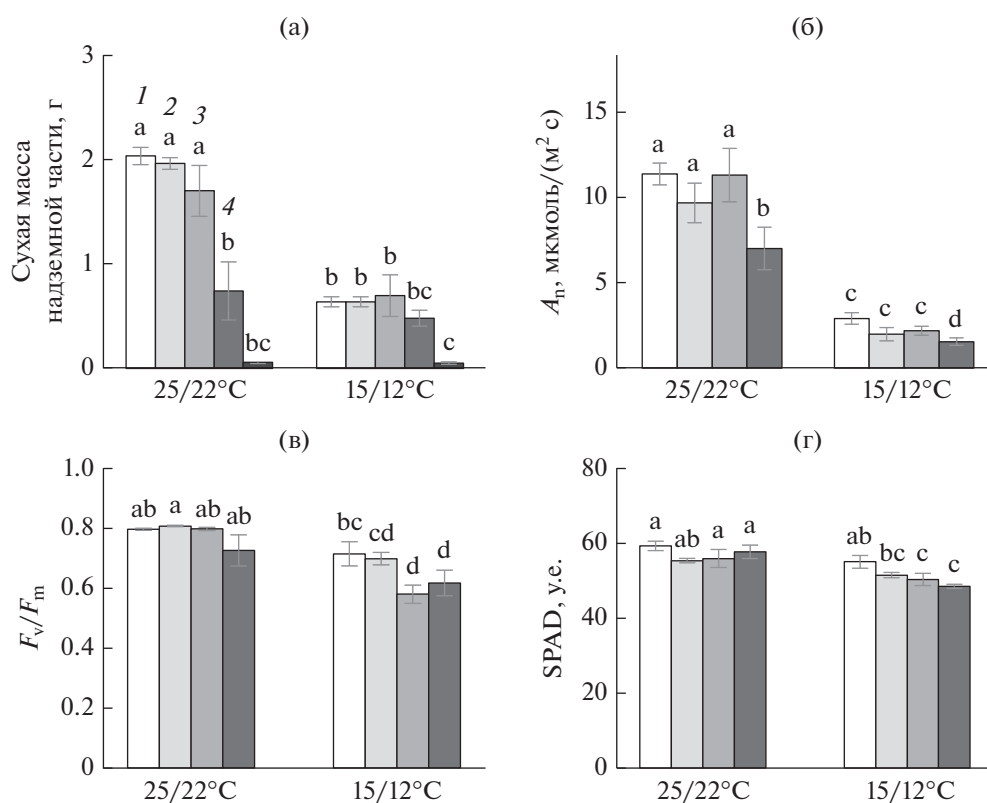
При визуальном наблюдении за развитием растений огурца было заметно, что к окончанию второй недели после посева растения, росшие на субстрате с внесенной дозой ЛС 25 г/кг, опережают другие опытные варианты по размеру растений и площади листьев (рис. 1). Однако в дальнейшем эта тенденция перестала быть явной, и на 28 сут накопление сухой биомассы растениями данного варианта было меньше, чем у растений, росших на субстратах с дозой внесения ЛС 0 и 10 г/кг (рис. 2а), хотя данные различия не были подтверждены статистически. Видимо ЛС в концентрации 25 г/кг оказывал стимулирующее действие на рост растений в начальный период их развития, однако данное воздействие было недолговременным и сменилось снижением продуктивности растений. Высокие концентрации ЛС в почве (50 и 100 г/кг) ингибировали ростовые процессы у огурца (рис. 1, 2а), при этом растения варианта 100 г/кг не были способны накопить даже минимальное количество биомассы, необходимое для выполнения измерений ряда физиологических параметров, представленных в табл. 1 и на рис. 2, 3. Снижение скоростей накопления растениями

сухого вещества и видимого фотосинтеза ( $A_n$ ) под влиянием ЛС было более выраженным при оптимальной (25/22°C), чем пониженной (15/12°C) температуре роста (рис. 2а, 2б). Независимо от уровня содержания в почве ЛС понижение температуры роста негативно влияло на скорость роста растений и интенсивность фотосинтеза. Нарушения под влиянием холода процесса фотосинтеза, выявленные по изменению величины  $F_v/F_m$ , и синтеза хлорофилла усугублялись наличием в почве ЛС (рис. 2в, 2г). Так, совместное действие низкой температуры и высоких концентраций ЛС снижали величину  $F_v/F_m$  и SPAD на 24 и 20%, соответственно. Однако при оптимальной температуре роста влияние ЛС было незначительным не только на  $F_v/F_m$  и содержание в листьях хлорофилла, но также на такие физиологические параметры как эффективность использования света на фотосинтез, световой компенсационный пункт и дыхание листьев на свету ( $\alpha$ , СКП и  $R_l$  соответственно, табл. 1). Известно, что интенсивность митохондриального дыхания растений слабее на свету, чем в темноте ( $R_d$ ) из-за ингибирования данного процесса светом (Hurry *et al.*, 2005; Гармаш, 2016). Также выявлено, что  $R_l$  и  $R_d$  могут различаться в своей реакции на условия внешней среды. На примере проростков озимой пшеницы, было показано, что в ответ на продолжительное действие холода адаптивные преобразования затрагивают в большей степени дыхание в темноте, чем на свету (Икконен и др., 2020б). Под влиянием высокой концентрации ЛС в почве скорости  $R_l$  и  $R_d$  увеличивались, соответственно, на 17 и 24%, однако не выявлена достоверность влияния ЛС на величину  $R_l/R_d$ , отражающую степень ингибирования дыхания светом (табл. 1). Ингибирование в значительной степени зависит от усиления интенсивности фотодыхания растений при активизации оксигеназной активности Рубиско (Ayub *et al.*, 2014), поэтому закономерно, что в отсутствие достоверного влияния ЛС на оксигенацию Рубиско ( $v_o$ , табл. 1), эффект от его содержания в почве на степень светового ингибирования дыхания листьев огурца также был незначителен.

Дыхание и фотосинтез являются основными процессами растений, определяющими их жизнедеятельность и выживание, поэтому их соотношение часто рассматривается как показатель физиологического состояния растений и широко используется в исследованиях их адаптационной способности (Yamori *et al.*, 2009). Тогда как содержание ЛС в почве в диапазоне концентрации 10–50 г/кг мало влияло на соотношение дыхания и фотосинтеза у огурца, при его концентрации 100 г/кг величина данного соотношения возрастала в 2 раза независимо от того осуществлялось дыхание на свету или в темноте (табл. 1). Изменение под влиянием ЛС величин  $R_d/A_g$  и  $R_l/A_g$  в сто-



**Рис. 1.** Внешний вид 14-ти сут растений огурца, выращиваемых при 25/22°C на дерново-подзолистой суглинистой почве, содержащей 0, 10, 25, 50 или 100 г лигносульфоната в кг почвы.



**Рис. 2.** Сухая масса растения (а), скорость видимой ассимиляции  $CO_2$  ( $A_n$ , б), потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II ( $F_v/F_m$ , в), содержание хлорофилла (SPAD, усл. ед.) у огурца, росшего при 25/22°C или 15/12°C день/ночь на дерново-подзолистой суглинистой почве, содержащей 0 (1), 10 (2), 25 (3), 50 (4) или 100 (5) г лигносульфоната в кг почвы. Различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при  $P < 0.05$ .

рону увеличения были обусловлены как снижением интенсивности истинного фотосинтеза, так и усилением дыхательных процессов. Известно, что при насыщающем фотосинтезе ассимиляция  $CO_2$  лимитируется скоростью карбоксилирования, катализируемого Рубиско (Atkin *et al.*, 2005), а при более низкой интенсивности света лимитирование может быть вызвано снижением способности электрон-транспортной цепи (Yam-

ogi *et al.*, 2010). Высокий уровень содержания ЛС в почве понижал как карбоксилазную активность Рубиско ( $v_c$ , табл. 1), так и скорость фотосинтетического потока электронов ( $J$ , табл. 1), что, видимо, частично обусловило ЛС-опосредованное снижение фотосинтетической ассимиляции  $CO_2$ . При внесении ЛС повышение  $R_d$  и  $R_l$  могло быть связано с изменениями дыхательной способности, доступности субстрата или потребности рас-

**Таблица 1.** Физиологические параметры растений огурца, выращиваемых на дерново-подзолистой суглинистой почве, содержащей 0, 10, 25, 50 или 100 г лигносульфоната в кг сухой почвы

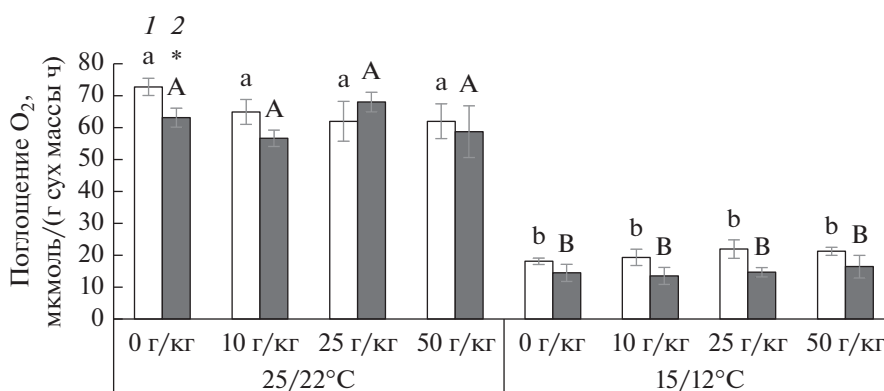
Параметры	0 г/кг	10 г/кг	25 г/кг	50 г/кг
$\alpha$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /мкмоль квант	$0.022 \pm 0.002^a$	$0.024 \pm 0.001^a$	$0.024 \pm 0.001^a$	$0.022 \pm 0.002^a$
СКП, мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$27.2 \pm 5.3^a$	$21.2 \pm 2.0^a$	$26.7 \pm 4.1^a$	$30.8 \pm 2.2^a$
$R_l$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$0.56 \pm 0.06^a$	$0.52 \pm 0.06^a$	$0.57 \pm 0.10^a$	$0.66 \pm 0.03^a$
$R_d$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$0.67 \pm 0.05^b$	$0.56 \pm 0.06^b$	$0.70 \pm 0.10^{ab}$	$0.83 \pm 0.06^a$
$R_l/R_d$	$0.84 \pm 0.06^a$	$0.94 \pm 0.04^a$	$0.79 \pm 0.05^a$	$0.80 \pm 0.04^a$
$A_g$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$11.9 \pm 0.6^a$	$10.2 \pm 1.2^{ab}$	$11.9 \pm 1.6^a$	$7.7 \pm 1.2^b$
$R_d/A_g$	$0.056 \pm 0.004^b$	$0.056 \pm 0.005^b$	$0.062 \pm 0.008^b$	$0.119 \pm 0.023^a$
$R_l/A_g$	$0.048 \pm 0.007^b$	$0.052 \pm 0.006^b$	$0.050 \pm 0.008^b$	$0.094 \pm 0.017^a$
$J$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$75.6 \pm 4.5^a$	$69.6 \pm 5.9^a$	$71.2 \pm 9.9^a$	$45.7 \pm 8.1^b$
$v_o$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$3.3 \pm 0.3^a$	$3.0 \pm 0.7^a$	$4.0 \pm 0.6^a$	$2.6 \pm 0.3^a$
$v_c$ , мкмоль $\text{CO}_2$ /( $\text{m}^2 \text{ c}$ )	$14.3 \pm 0.8^a$	$12.6 \pm 1.3^{ab}$	$13.9 \pm 1.9^a$	$8.9 \pm 1.5^b$

Примечание.  $\alpha$  – видимый квантовый выход фотосинтеза; СКП – световой компенсационный пункт;  $R_l$  – митохондриальное дыхание на свету;  $R_d$  – митохондриальное дыхание в темноте;  $R_l/R_d$  – отношение  $R_l$  к  $R_d$ ;  $A_g$  – скорость истинного фотосинтеза ( $A_g = A_n + R_l$ );  $R_d/A_g$  – отношение  $R_d$  к  $A_g$ ;  $R_l/A_g$  – отношение  $R_l$  к  $A_g$ ;  $J$  – скорость фотосинтетического транспорта электронов;  $v_o$  – оксигеназная активность Рубиско;  $v_c$  – карбоксилазная активность Рубиско.

тений в энергии. В процессе адаптации растений к стрессовым условиям, как правило, запросы на интермедиаты и энергию возрастают (Семихатова, 1998), что достигается через усиление дыхания. То, что высокие концентрации лигносульфоната натрия в почве выступили как стрессовый для растений фактор, проявилось в значительном сокращении накопления ими биомассы. Видимо изменения в энергетическом и углеродном балансе растений под влиянием ЛС, отраженные через повышение соотношения дыхания и фотосинтеза, повлияли на скорость накопления ими сухого ве-

щества. Смещение углеродного баланса в сторону увеличения потерь углерода и возможный рост у растений энергетических затрат на поддержание вызвало торможение роста огурца, выращиваемого в почве с высоким содержанием ЛС.

Внесение ЛС повышало рН почвы с 4.9 в контрольном варианте до 5.6 и 6.2 при использовании дозы 10 и 25 г/кг соответственно и до 5.7 при внесении ЛС в дозе 50 и 100 г/кг. Визуально наблюдались различия в структуре и агрегатном составе почвы, содержащей высокие концентрации ЛС и



**Рис. 3.** Дыхание листьев без ингибитора (1) и с ингибитором (2) альтернативного пути дыхания (СГА, салицилгидроксамовая кислота) у огурцов, росших при 25/22°C или 15/12°C на почве, содержащей 0, 10, 25, 50 или 100 г лигносульфоната в кг почвы. Измерения выполнены при температуре листа 25°C для растений варианта 25/22°C, и при температуре листа 15°C для растений варианта 15/12°C. \* означает достоверность различий средних значений дыхания без ингибирования и с ингибированием альтернативного пути. Различные буквы обозначают достоверность различий средних значений при  $P < 0.05$ : строчные буквы отнесены к дыханию без ингибитора, прописные – к дыханию с ингибитором.

не содержащей его, или содержащей в малых количествах. Данные изменения были схожи с признаками солонцеватых почв, таких как их вязкость и липкость во влажном состоянии и повышенная твердость при высушивании (Панкова и др., 2017). Однако данные визуальные наблюдения требуют подтверждения в ходе дальнейшего исследования изменения структурных и физико-химических свойств почв под влиянием ЛС. Видимо, осолонцевание используемой в данной работе дерново-подзолистой суглинистой почвы произошло из-за вхождения большого количества ионов натрия в поглощающий комплекс при внесении в почву ЛС, что обусловило изменение ее физико-химических свойств и плодородия и, как следствие, негативно отразилось на физиологических процессах у растений огурца.

Повышение интенсивности дыхания, как отклик растений на стрессовые воздействия, часто связывают с вовлечением альтернативного пути дыхания, способствующего поддержанию роста и защите растений от неблагоприятных воздействий среды обитания (Рахманкулова и др., 2008; Икконен и др., 2020а). Альтернативный путь дыхания протекает без запасания энергии, но вместе с основным, цитохромным дыханием, он поддерживает энергетический баланс клетки, предотвращая возникновение сверхвосстановленного состояния компонентов пути транспорта электронов (Lambers, 1982). Альтернативный путь переноса электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий чувствителен к СГК, что позволяет использовать ее как ингибитор данного пути дыхания. Результаты нашего исследования показали ожидаемое снижение интенсивности, как общего, так и устойчивого к СГК, дыхания с понижением температуры роста (рис. 3). ЛС снижал чувствительность дыхания листьев к СГК независимо от его содержания в почве и температуры роста огурца, что может косвенно отражать негативное влияние ЛС на синтез и/или активность альтернативной оксидазы, обеспечивающей поток электронов по альтернативному пути.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внесение лигносульфоната натрия в дерново-подзолистую суглинистую почву в дозе 10–25 г/кг не влияло на основные физиологические процессы огурца, но высокий уровень его содержания в почве (50–100 г/кг) ингибировал накопление растением биомассы, процесс фотосинтеза и увеличивал долю дыхательных затрат от фотосинтеза независимо от того на свету или в темноте осуществлялось дыхание. Процесс дыхания отзывался на содержание в почве ЛС усилением интенсивности в большей степени в условиях темноты, чем на свету. При этом усиление темного дыхания не было обусловлено активизацией альтернатив-

ного пути дыхания. Напротив, в присутствии ЛС в почве чувствительность дыхания листьев растений к ингибитору альтернативной оксидазы снижалась. Низкая температура роста ингибировала основные физиологические процессы жизнедеятельности растений огурца, а внесение ЛС в почву не влияло на устойчивость растений огурца к понижению температуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22-16-00145). Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гармаш Е.В.* Митохондриальное дыхание фотосинтезирующей клетки // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 1. С. 17–30.  
<https://doi.org/10.7868/S001533031506007X>
- Икконен Е.Н., Грабельных О.И., Шерудило Е.Г., Шибалева Т.Г.* Устойчивое и чувствительное к салицилгидроксамовой кислоте дыхание теплолюбивых растений в условиях кратковременных ежесуточных понижений температуры // Физиология растений. 2020а. Т. 67. № 1. С. 67–74.  
<https://doi.org/10.31857/S0015330319050063>
- Икконен Е.Н., Шибалева Т.Г., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф.* Реакция дыхания проростков озимой пшеницы на продолжительное и кратковременное ежесуточное понижение температуры // Физиология растений. 2020б. Т. 67. № 3. С. 312–318.  
<https://doi.org/10.31857/S0015330320020062>
- Максимов В.Ф., Стадницкий Г.В.* Введение в специальность: учебное пособие для Вузов. Л.: Химия, 1988. С. 168.
- Панкова Е.И., Конюшкова М.В., Горохова И.Н.* О проблеме оценки засоленности почв и методике крупномасштабного цифрового картографирования засоленных почв // Экосистемы: экология и динамика. 2017. Т. 1. № 1. С. 26–54.
- Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Абдуллина О.А., Усманов И.Ю.* Формирование адаптационных механизмов у пшеницы и кукурузы к повышенному содержанию цинка // Вестник башкирского университета. 2008. Т. 13. № 1. С. 43–46.
- Семихатова О.А.* Оценка адаптационной способности растения на основании исследований темного дыхания // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 1. С. 142–148.
- Хабаров Ю.Б., Вешняков В.А., Кузяков Н.Ю.* Получение и применение комплексов лигносульфоновых кислот с катионами железа // Лесной журнал. 2019. № 5. С. 167–187.  
<https://doi.org/10.37482/0536-1036-2019-5-167>
- Atkin O.K., Bruhn D., Hurry V.M., Tjoelker M.G.* The hot and the cold: unraveling the variable response of plant respiration to temperature // Funct. Plant Biol. 2005.

- V. 32. P. 87–105.  
<https://doi.org/10.1071/FP03176>
- Ayub G., Zaragoza-Castells J., Griffin K.L., Atkin O.K. Leaf respiration in darkness and in the light under pre-industrial, current and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations // *Plant Sci.* 2014. V. 226. P. 120–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.001>
- Carrasco J., Kovács K., Czech V., Fodor F., Lucena J., Vértes A., Hernández-Apaolaza L. Influence of pH, iron source, and Fe/ligand ratio on iron speciation in lignosulfonate complexes studied using Mössbauer spectroscopy. Implications on their fertilizer properties // *J. Agr. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 3331–3340.  
<https://doi.org/10.1021/jf204913s>
- Docquier S., Lambé P., Kevers C., Gaspar T. Beneficial use of lignosulfonates in in vitro plant cultures: Stimulation of growth, of multiplication and of rooting // *Plant Cell Tiss. Org.* 2007. V. 90. P. 285–291.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-007-9267-7>
- Ertani A., Francioso O., Tugnoli V., Righi V., Nardi S. Effect of Commercial Lignosulfonate-Humate on *Zea mays* L. Metabolism // *J. Agr. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 11940–11948.  
<https://doi.org/10.1021/jf202473e>
- Farquhar G.D., von Caemmerer S. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (eds). *Encyclopedia of plant physiology*. V. 12B. Physiological plant ecology II. Water relations and carbon assimilation. Springer Verlag. Berlin. 1982. P. 551–587.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-68150-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68150-9_17)
- Fernando V., Roberts G.R. The partial inhibition of soil urease by naturally occurring polyphenols // *Plant Soil.* 1976. V. 44. P. 81–86.  
<https://doi.org/10.1007/BF00016957>
- Hurry V., Igamberdiev A.U., Keerberg O., Pärnik T.R., Atkin O.K., Zaragoza-Castells J., Gardstrom P. Respiration in photosynthetic cells: gas exchange components, interactions with photorespiration and the operation of mitochondria in the light // *Advances in Photosynthesis and Respiration*, H. Lambers, M. Ribas-Carbo (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2005. P. 43–61.  
[https://doi.org/10.1007/1-4020-3589-6\\_4](https://doi.org/10.1007/1-4020-3589-6_4)
- Kok B. A critical consideration of the quantum yield of *Chlorella*-photosynthesis // *Enzymologia.* 1948. V. 13. P. 1–56.
- Lambers H. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow // *Physiol. Plant.* 1982. V. 55. P. 478–485.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb04530.x>
- Liu Q., Deng Y., Tang J., Chen D., Li X., Lin Q., Yin G., Zhang M., Hu H. Potassium lignosulfonate as a washing agent for remediating lead and copper co-contaminated soils // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 658. P. 836–842.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.228>
- Stapanian M.A., Shea D.W. Lignosulfonates: effects on plant growth and survival and migration through the soil profile // *Int. J. Environ. Studies.* 1986. V. 27. P. 45–56.  
<https://doi.org/10.1080/00207238608710276>
- Ta'negonbadi B., Noorzad R. Stabilization of clayey soil using lignosulfonate // *Transp. Geotech.* 2017. V. 12. P. 45–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.trgeo.2017.08.004>
- Yamori W., Evans J.R., von Caemmerer S. Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO<sub>2</sub> assimilation rate in tobacco leaves // *Plant Cell Environ.* 2010. V. 33. P. 332–343.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02067.x>
- Yamori W., Noguchi K., Hikosaka K., Terashima I. Cold tolerant crop species have greater temperature homeostasis of leaf respiration and photosynthesis than cold-sensitive species // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. P. 203–215.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcn189>

## Physiological Responses of Cucumber Plants to Sodium Lignosulfonate Application to Sandy Loam Soil

E. N. Ikkonen<sup>1, #</sup> and M. G. Yrkevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology of the Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Puskinskaja, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

<sup>#</sup>e-mail: likkonen@gmail.com

The use of lignosulfonates (LS) to improve soil fertility is currently under study and discussion. The effect of sodium LS application in the sandy loam soil on the accumulation of biomass, photosynthesis, respiration and their coupling in cucumber plants was studied. The LS rate of 10–25 g/kg did not have a significant effect on the studied parameters of the physiological state of plants. However, at a high LS content (50–100 g/kg), the plant growth rate and activity of the photosynthetic apparatus decreased, and the respiration rate increased, which caused the increase in the ratio of respiration to photosynthesis. The negative effect of high concentrations of LS on the physiological state of cucumber plants and their cold resistance is presumably associated with sodium salinization of the soil.

**Keywords:** *Cucumis sativus*, photosynthesis, respiration, chlorophyll fluorescence

## СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРНЕЙ *Arabidopsis thaliana*, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2023 г. И. В. Булавин\*, @, А. И. Сидякин\*, \*\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН”, Никитский спуск, 52, Ялта, 298648 Россия

\*\*Институт биохимических технологий, экологии и фармации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского”, просп. Академика Вернадского, 4, Симферополь, 295007 Россия

@E-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 20.03.2023 г.

Изучены две модели ризогенеза у *Arabidopsis thaliana in vitro*: 1) из каллуса и 2) черешков листовых эксплантов на безгормональной питательной среде Мурасиге–Скуга, содержащей 1/10 часть от общего минерального состава, а также среде с добавлением регулятора роста – индолил-3-масляной кислоты. Морфолого-анатомические исследования показали изменения структуры корней, образованных *de novo in vitro*. Методом Сабинина–Колосова установлено снижение процента рабочей поверхности корней у обоих вариантов. Обсуждается возникновение структурных изменений при ризогенезе *in vitro*, а также их влияние на функциональность корней.

**Ключевые слова:** листовые экспланты, каллус, ризогенез *in vitro*, анатомия, функциональность

**DOI:** 10.31857/S1026347022600741, **EDN:** VVFEGQ

Растительный организм способен проявлять морфогенетический потенциал при переносе отдельных его частей в условия, крайне отличающиеся от природных, какими является культура *in vitro*. Под методом культуры *in vitro* понимается совокупность способов, позволяющих культивировать изолированные клетки, ткани и органы растений в стерильных условиях на питательных средах. В основе данного метода лежит уникальное свойство растительных клеток – тотипотентность – способность при определенных условиях дедифференцироваться и под влиянием внешних условий реализовывать тот или иной путь морфогенеза (Ахметова, Зарипова, 2019). Клональное микроразмножение – один из наиболее эффективных способов получения растительного материала в значительных объемах за достаточно короткий промежуток времени (Катаева, Бутенко, 1983; Manokari, 2021). Сам процесс клонального микроразмножения разделен на несколько этапов: 1) выбор объекта, 2) собственно микроразмножение, 3) укоренение микропобегов или депонирование, 4) адаптация. При этом следует отметить, что использование данного метода сопряжено с рядом проблем, которые касаются непосредственно специфики культивирования материала *in vitro* и дальнейшей его адаптации в среде *in vivo*. Укорене-

ние является важным этапом клонального микроразмножения для различных видов растений. Корневая система играет важную роль в поглощении воды и питательных веществ, газотранспортных процессах, росте и развитии растений, а также в механизмах защиты от биотических и абиотических воздействий. Известно, что процесс укоренения *in vitro* регулируется различными генетическими факторами, компонентами питательной среды, типом и концентрацией регуляторов роста (Amghar *et al.*, 2021). Современное промышленное размножение растений *in vitro* невозможно без использования регуляторов роста. Как правило, для укоренения используют аналоги индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Отношение растительного материала *in vitro* к экзогенному ауксину, времени и способу его применения неоднозначно. Среди регуляторов роста обычно для индукции ризогенеза у растений используют индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) (Souza *et al.*, 2022), 1-нафталинуксусную кислоту (НУК) (Chi-ni, Schuyler, 1996; Тихомирова, 2010; Гусева и др., 2013; Souza *et al.*, 2022), ндолил-3-масляную кислоту (ИМК) (Rani *et al.*, 2003; Гусева и др., 2013; Souza *et al.*, 2022), а также безгормональные среды с уменьшенным содержанием макро-, и микроэлементов (Кушнir, Сарнацька, 2005). На питательных сре-



дах с различными регуляторами роста изучены гистологические аспекты формирования корней *in vitro* (Martínez Pastur *et al.*, 2005; Naija *et al.*, 2008), их морфология и анатомия (Reis *et al.*, 2017; Bulavin *et al.*, 2020; Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021; Manokari *et al.*, 2021), некоторые количественные признаки (Rogalski *et al.*, 2003; Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021; Soriano *et al.*, 2022), активность пероксидазы (Naija *et al.*, 2008), содержание эндогенной ИУК (Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021), накопление вторичных метаболитов (Reis *et al.*, 2017; Jagiełło-Kubiec *et al.*, 2021). Для безгормональных сред в большинстве работ исследователи указывают факт образования корней и определяют их количественные характеристики. Отмечается, что изучение особенностей ризогенеза *in vitro* с регуляторами роста и при их отсутствии является необходимым для понимания протекания данного процесса и возможности его регуляции (Rose *et al.*, 2006; Manokari *et al.*, 2021). Поскольку формирование корней в культуре *in vitro* может происходить путем прямого и непрямого органогенеза, нами было выбрано две модельные системы: ризогенез *in vitro* из черешков листовых эксплантов и каллусной ткани *Arabidopsis thaliana* на питательных средах без регуляторов роста и при их введении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для введения в культуру *A. thaliana* (Col-0) семена стерилизовали 70% раствором спирта (45 с) и 5% раствором гипохлорита натрия (7 мин) с пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой, переносили в культуральные сосуды на модифицированную питательную среду Мурашиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) без регуляторов роста с последующей стратификацией при +4°C в течение 3 сут. Материал культивировали при температуре +22–24°C с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) и освещенности 93 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Для индукции образования каллуса, розеточные листья отделяли от 22–40 дневных растений, делали насечки и помещали на модифицированную питательную среду МС, содержащую макро-, и микросоли, витамины (В1 – 0.1 мг/л, В6 – 0.5 мг/л, РР – 0.5 мг/л), глицин (3.0 мг/л), 2,4-Д (1.0 мг/л), кинетин (0.05 мг/л) и глюкозу (1.5%), агар-агар (0.7%). Культивирование материала осуществляли при температуре +22–24°C с фотопериодом 16/8 ч и освещенности 7.4–9.3 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Ризогенез из каллусной ткани и в культуре листовых эксплантов индуцировали на питательной среде МС, содержащей 1/10 часть от общего минерального состава без регуляторов роста (1/10 МС), а также с добавлением ИМК (2.0 мг/л для индукции корней из каллуса). Культивирование материала осуществляли при температуре +22–24°C с

фотопериодом 16/8 ч и освещенности 7.4–9.3 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Для анатомических исследований черешки листьев и, полученные в культуре *in vitro* корни, фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.2) при комнатной температуре в течение 3 ч, дважды промывали тем же буфером, постфиксировали 1% OsO<sub>4</sub> в течение 3 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Калусную ткань помещали в фиксатор Кларка, промывали в 70% этаноле, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и толуоле, пропитывали парафином. Полутонкие поперечные и продольные срезы корней и черешков (0.5–1.0 мкм) получали на ультрамикротоме МТ-ХЛ (RMR Instruments, США) и Ultracut E (Reichert, Австрия), срезы калусной ткани (8, 10 мкм) – на санном микротоме МС-2 (Точмедприбор, Украина). Окрашивание проводили водным раствором толуидинового синего (0.12%), исследования выполняли на микроскопе Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия) и СХ41 (Olympus, Япония), оснащенном камерой SC 50 (Olympus, Германия) и программным обеспечением CellSens Imaging Software v. 1.17.

Для анализа ультраструктурной организации клеток корней *in vitro*, использовали материал, подготовленный для анатомических исследований. Продольные ультратонкие срезы (50–60 нм) получали на ультрамикротоме МТ-ХЛ, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 1230 (Jeol, Япония).

Определение общей, рабочей и недействительной поверхности корневой системы выполняли согласно методу Сабинина–Колосова (Панфилова и др., 2010) в модификации. Корни 10 суточных проростков, 14 дневных растений, и, полученные в культуре *in vitro*, последовательно погружали в три лунки 96-луночных планшетов с 200 мкл раствора 0.0003 н метиленовой сини (96.0 мг/1.0 дм<sup>3</sup>) на 1.5 мин в каждую. При двукратном погружении происходила адсорбция красителя на всей поверхности корней. При третьем погружении корней в раствор краситель поглощался только рабочей поверхностью корней. Концентрацию метиленовой сини определяли колориметрически, используя калибровочную кривую (рис. 1), расчеты площади поверхности корневой системы общей ( $S_{\text{общ}}$ ), рабочей ( $S_{\text{раб}}$ ) и недействительной ( $S_{\text{нераб}}$ ) рассчитывали по формулам:

$$S_{\text{общ}} = 1.05 \text{ мм}^2 A_{1+2},$$

$$S_{\text{раб}} = 1.05 \text{ мм}^2 A_3,$$

$$S_{\text{нераб}} = S_{\text{общ}} - S_{\text{раб}},$$

где: 1.05 м<sup>2</sup> – коэффициент пересчета,  $A_{1+2}$ ;  $A_3$  – количество метиленовой сини, адсорбированное



корнями в первом ( $A_1$ ), втором ( $A_2$ ) и третьем ( $A_3$ ) стакане. Статистический анализ проводили с использованием ПО Statistica 7.0 и Microsoft Office 2010 (Excel).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В семени *A. thaliana* развитие корня происходит из первичного корешка, который закладывается в зародыше одновременно с почечкой (Carpon *et al.*, 2009). После гидратации семенных оболочек и поступления воды к зародышу, запускаются ростовые процессы. Дальнейшее развитие корня происходит за счет деятельности его меристемы, боковые корни разных порядков формируются за счет делений перицикла, находящегося напротив элементов ксилемы (Péret *et al.*, 2009; Vanda *et al.*, 2019). В отличие от зародышевого корешка, корни в тканях черешка листовых эксплантов и каллусе формируются *de novo*. Согласно нашим данным, после удаления верхушки листовой пластинки, части черешка и переноса листовых эксплантов абаксиальной стороной на питательную среду 1/10 МС в проводящем пучке черешка индуцируются клеточные деления, приводящие к формированию зачатка корня (рис. 2а) и в последствии к полному его формированию за счет деятельности меристемы (от 6 дней) (рис. 2б). При более длительном культивировании у корней, сформированных *de novo* из тканей черешка листовых эксплантов, наблюдалось образование боковых корней.

2.4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2.4-Д) является наиболее распространенным ауксином для индукции каллусогенеза (Dalila *et al.*, 2013; Budisantoso *et al.*, 2017), применяемым обычно в концентрации 1.0–2.0 мг/л, а также в комбинации с другими регуляторами роста (Karimian *et al.*, 2014), поскольку под ее влиянием происходит дедифференциация клеток (Dalila *et al.*, 2013). В дальнейшем эффективность морфогенетических процессов в каллусе зависит от комбинации ауксина и цитокинина, внесенных в композицию питательной среды. Под действием цитокининов происходит стимуляция деления клеток, при этом оптимальное соотношение двух регуляторов роста усиливает клеточную дифференциацию (Park *et al.*, 2002). В наших исследованиях введение в состав питательной среды 2.4-Д (1.0 мг/л) и кинетина (0.05 мг/л) обеспечивало видимый каллусогенез на листовых эксплантах, начиная с 8 сут культивирования. Появлению клеток с неорганизованным ростом предшествовало набухание тканей и разрыв эпидермы. Отмечены разные места индукции клеток каллуса: в средней, верхней, базальной частях листового экспланта, а также и по всей его поверхности. Впоследствии увеличение объема непосредственно каллуса происходило за счет деления его клеток по периферии и в верхней

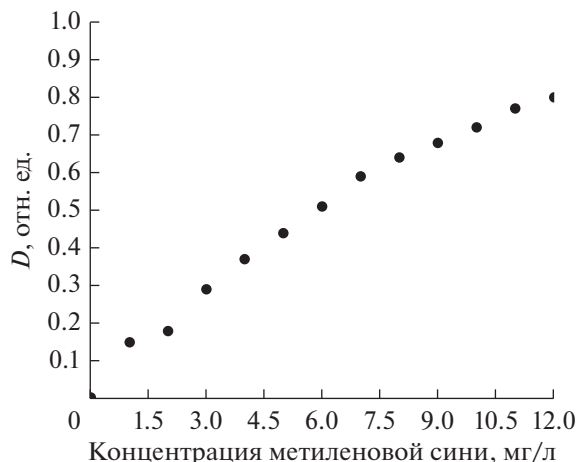


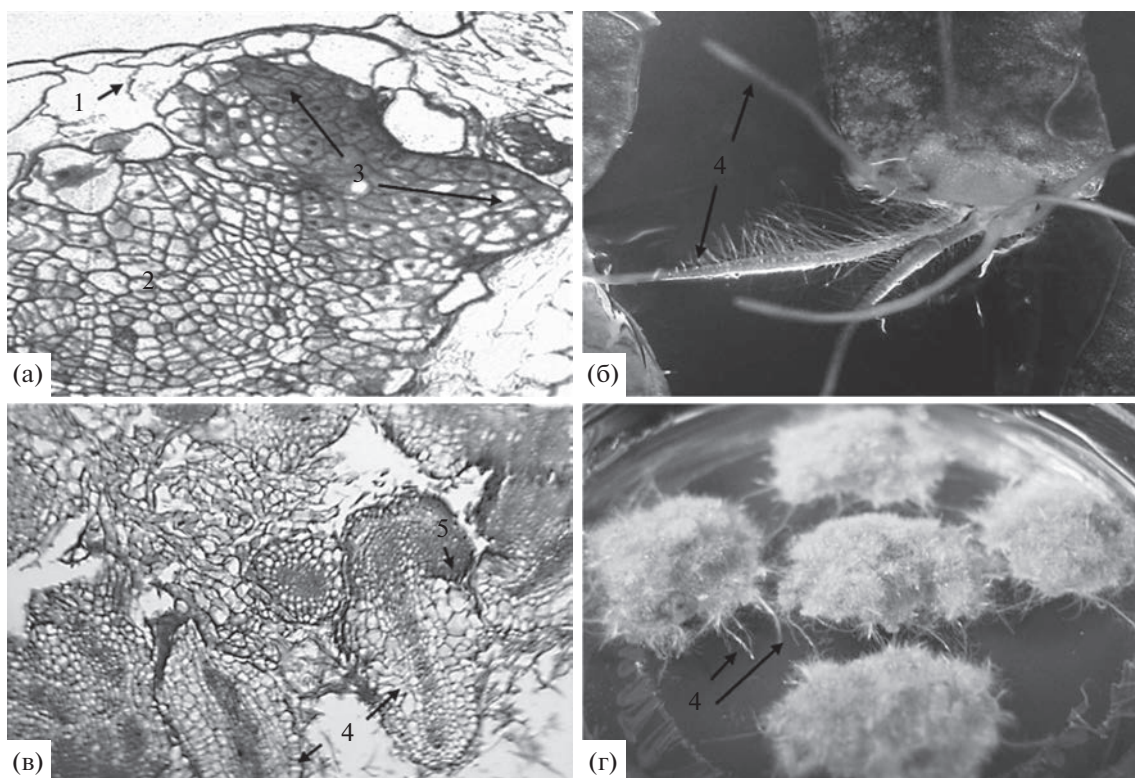
Рис. 1. Калибровочная кривая для метиленовой сини.

части. При переносе каллуса на питательную среду 1/10 МС, а также среду с ИМК инициировались процессы ризогенеза.

Морфогенез *in vitro* представляет собой сложный процесс, на который влияют эндогенные и экзогенные факторы. Проявление органогенного потенциала происходит только если клетки внутри экспланта “компетентны” или реагируют на специфические культуральные сигналы (Delporte *et al.*, 2014). По Де Клерк (De Klerk *et al.*, 1997) процесс формирования эмбриоидов, адвентивных побегов и корней *in vitro* можно разделить на несколько фаз: 1) приобретение компетенции, 2) индукция и 3) реализация. Первая фаза соответствует приобретению компетенции на этапе дедифференцировки; вторая – реакции клеток на органогенный стимул и их “готовности” к формированию специфического органа; третья – разворачиванию программы дифференциации.

Согласно гистологическим исследованиям, в каллусе формирование корней происходило из морфогенных очагов, находящихся на его периферии (рис. 2в). В отличие от ризогенеза у листовых эксплантов, образование боковых корней наблюдалось только при добавлении ИМК, в то время как на среде 1/10 МС такого эффекта не наблюдали.

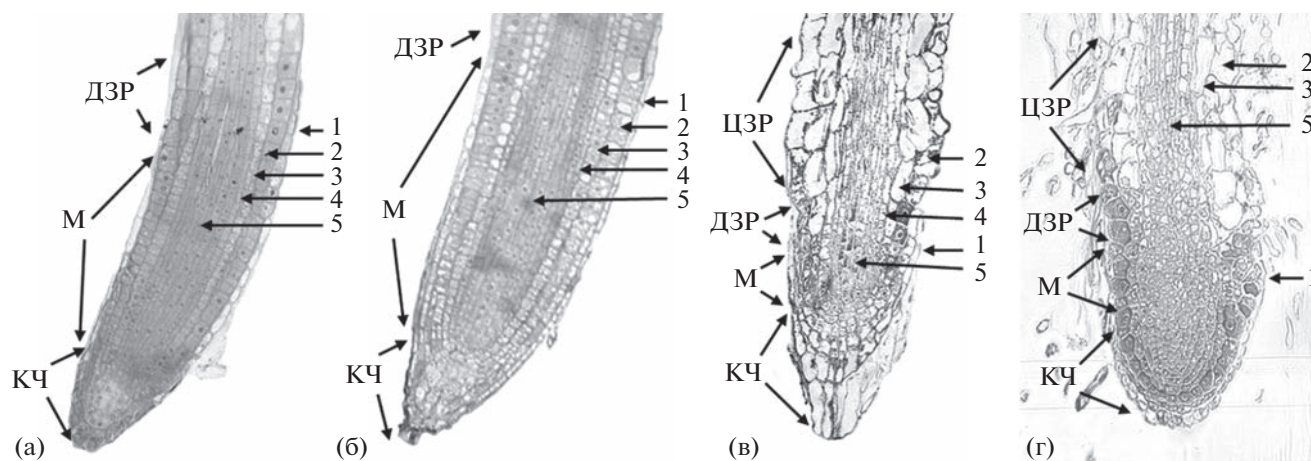
Исследования показали, что морфологически в корнях, образованных *de novo in vitro* всех вариантов формировался корневой чехлик и ростовые зоны собственно корня: меристема, растяжения (дистальная (ДЗР) и центральная (ЦЗР)), поглощения и проведения. На продольных срезах (рис. 3) в корневом чехлике различались колумелла и периферические клетки. Колумелла состояла из меристематических клеток, статоцитов на стадии дифференцировки, зрелых статоцитов и секреторных клеток. Периферические клетки окружали колумеллу и наблюдались в меристеме и дистальной



**Рис. 2.** Формирование корней *de novo in vitro* из тканей листового экспланта (а, б) и каллуса (в, г). 1 – мезофилл листового экспланта, 2 – проводящий пучок, 3 – зачаток корня, 4 – корень, 5 – меристематический очаг. Ув.  $\times 200$  (а, в),  $\times 31.5$  (б),  $\times 4.5$  (г).

зоне растяжения на поверхности покровной ткани. В ростовых зонах корня обнаружена однослойная эпидерма, двухслойная кора, в которой различались клетки паренхимы и эндодермы. Центральный цилиндр состоял из перицикла и проводящей ткани. При этом следует отметить образование сросшихся корней как в культуре листовых эксплантов (очень редко), так и при ризогенезе из каллуса (часто). Кроме того, для корней, сформировавшихся из каллуса, было характерно присутствие укороченной меристемы, а из листовых эксплантов – увеличенной по длине, в сравнении с таковой органов, полученных из семени (табл. 1). Наши результаты в отношении анатомических изменений *in vitro* находят свое подтверждение в литературе. Так, например, появление фасциаций является распространенным для стеблей растений, особенно на питательных средах, содержащих цитокинины (зеатин и 6-бензиламинопурин). Появление подобного рода органов связывают с увеличением размеров меристем и усилением роста стеблей растений (Piev, Kitin, 2011). В литературе также отмечается и срастание корней при укоренении микропобегов (Bulavin *et al.*, 2020). В наших исследованиях показано формирование меристематических очагов на периферии каллуса и в проводящем пучке листовых эксплантов. Воз-

можно, из-за образования множественных очагов и происходящих в них активных делений происходит постепенное сближение первых и дальнейшие морфогенетические процессы приводят к срастанию органов или одна точка роста разделяется на несколько (Baigu, Kane, 2011). Гистоанатомические изменения также не являются редкостью при исследовании структуры органов растений *in vitro*. Так для корней микрочеренков *Betula nigra* L. и *Acer rubrum* L. показано формирование значительных по размерам межклетников, отмечена гипертрофированность клеток коры, явившаяся причиной аномально большой площади поперечного сечения органов. Исследователями также был сделан акцент и на более рыхлой упаковке проводящих элементов (McClelland *et al.*, 1990). В подобной работе при изучении микроструктурной стабильности регенерантов *Vitex negundo* L., полученных методом клонального микроразмножения, в корнях, образованных *in vitro*, отмечена паренхиматизированность коры, недоразвитость перидермы, эндодермы и сердцевины. Такого рода изменения в большей степени связывают с приспособительными реакциями культивируемых растений к комплексу специфических факторов условий среды *in vitro* (Вечернина и др., 2008).



**Рис. 3.** Продольные срезы корней *A. thaliana*, полученных из семени (а), листовых эксплантов (б) и каллуса на питательной среде 1/10 МС (в), каллуса на среде 1/10 МС с добавлением ИМК (г). КЧ – корневой чехлик, М – меристема, ДЗР – дистальная зона растяжения, ЦЗР – центральная зона растяжения; 1 – клетки корневого чехлика, 2 – эпидерма, 3 – паренхима коры, 4 – эндодерма, 5 – центральный цилиндр. Ув.  $\times 200$ .

Поскольку корни, полученные в культуре *in vitro* из каллуса, обладали видимыми морфолого-анатомическими изменениями, нами проведен ультраструктурный анализ клеток чехлика и некоторых ростовых зон корней, полученных *in vitro* из листовых эксплантов. В гиалоплазме дифференцированных статоцитов *A. thaliana in vitro* (рис. 4а) наблюдали ядро, вакуоли, митохондрии, амилопласты, эндоплазматический ретикулум и диктиосомы. Ядро по форме округлое или овальное, находилось в проксимальной части клетки. Вакуоли имели округлую форму и характеризовались электрон-прозрачным или гранулярным содержанием средней электронной плотности. В большинстве своем они размещались в проксимальной части статоцита, под ядром, иногда встречались в его средней части. Митохондрии, овальной или удлинённой формы содержали развитую систему крист, в матриксе присутствовали электрон-прозрачные участки. Популяция митохондрий обна-

руживалась во всем объеме статоцитов. Амилопласты овальной или неправильной формы содержали электрон-плотную строу, в которой различались крахмальные зерна разного размера, формы и электронной плотности. Количество и плотность крахмальных зерен в амилопластах варьировала в зависимости от их размера. Амилопласты располагались в дистальной части статоцитов, над цистернами ЭПР. Отдельные цистерны имели удлинённую форму и размещались около продольных клеточных стенок, в то время как их скопления наблюдались в дистальной части статоцита, а также в углах проксимальной. Единичные диктиосомы встречались как в дистальной, так и в проксимальной части статоцита, состояли из 4–5 цистерн и характеризовались полярностью.

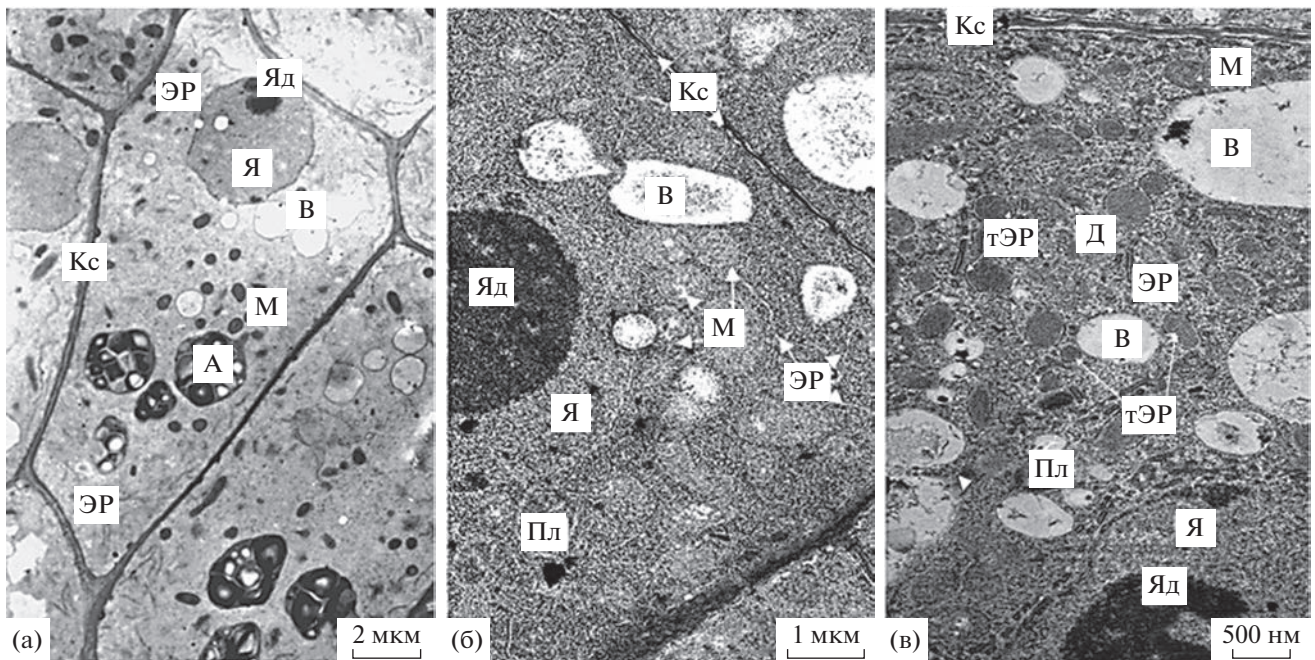
В протодерме корней (рис. 4б) в центре клеток наблюдалось округлое ядро, содержащее диффузный хроматин и ядрышко, диаметр которого со-

**Таблица 1.** Количественные показатели зон корней *A. thaliana*

Параметры	Корневой чехлик			Меристема			Дистальная зона растяжения		
	П	ЛЭ	К	П	ЛЭ	К	П	ЛЭ	К
Длина, мкм	66.21 $\pm$ 4.23	92.94 $\pm$ 3.47*	69.32 $\pm$ 4.9	144.78 $\pm$ 17.21	223.95 $\pm$ 18.42*	56.44 $\pm$ 2.54*	104.34 $\pm$ 3.37	101.89 $\pm$ 2.38	23.3 $\pm$ 1.72*
Ширина, мкм	76.25 $\pm$ 2.18	118.92 $\pm$ 3.48*	–	107.06 $\pm$ 2.17	158.11 $\pm$ 9.45*	–	110.68 $\pm$ 3.61	167.38 $\pm$ 9.77*	–
Количество клеток	5.67 $\pm$ 0.21	5.67 $\pm$ 0.21	5 $\pm$ 0.18	20.5 $\pm$ 1.96	27.67 $\pm$ 2.26*	6.83 $\pm$ 1.32*	8.67 $\pm$ 0.42	7.67 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.24*

Примечание. \* – статистически достоверные различия между одинаковыми параметрами в сравнении с первичными корнями;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $p = 0.05$ ;  $t$ -критерий; П – корни проростков; ЛЭ – корни, образованные из листовых эксплантов; К – корни, образованные из каллуса.





**Рис. 4.** Ультраструктурная организация клеток корней *A. thaliana*, образованных в культуре *in vitro* из листовых эксплантов: а – статоциты, б – фрагмент клетки протодермы, в – фрагмент клетки ДЗР. А – амилопласт, В – вакуоль, Д – диктиосома, Кс – клеточная стенка, М – митохондрия, Пл – пластида, тЭР – тельце эндоплазматического ретикула, Я – ядро, Яд – ядрышко, ЭР – эндоплазматический ретикулум.

ставлял более половины ядра. В некоторых ядрышках обнаруживали ядрышковую вакуоль. Свободные рибосомы были самым распространенным компонентом гиалоплазмы и обуславливали ее высокую электронную плотность. Контуры органелл были не четкими на фоне интенсивно окрашенных рибосом. Пластиды были округлой или удлиненной формы с плотной стромой и слабо развитой внутренней мембранной системой. Округлой или удлиненной формы митохондрии имели развитые кристы и матрикс средней электронной плотности. Немногочисленные диктиосомы характеризовались тонкими контурами мембран и слабо выраженной полярностью. Эндоплазматический ретикулум был слабо развит, наблюдались мелкие вакуоли.

При переходе клеток из меристемы в ДЗР (рис. 4в) вакуоли постепенно увеличивались в объеме за счет слияния мелких органелл. Гиалоплазма в процессе роста клеток теряла электронную плотность вследствие уменьшения количества свободных рибосом. Ядро овальной или лопастной формы обычно занимало центральное положение или несколько смещалось. Эндоплазматический ретикулум был представлен длинными цистернами, на которых плотно размещались рибосомы. Форма и размеры пластид варьировали на срезах, хотя в основном наблюдались органоиды овальной или удлиненной формы. Некоторые пластиды содержали крахмальные зерна.

Диктиосомы приобретали характерную для зрелых органелл полярность и продуцировали многочисленные везикулы разного размера. В клетках эпидермы корней *A. thaliana*, сформированных из листовых эксплантов, четко обнаруживали овальные или удлиненные тельца ЭПР.

Согласно полученным нами данным, дифференциация клеток корней, полученных *in vitro* из тканей листовых эксплантов на безгормональной среде, происходит аналогично таковой корней *in vivo*, т.е. в двух противоположных направлениях: к базальной и апикальной частям органа за счет деятельности инициалей, проксимальная часть которых, по отношению к покоящемуся центру, формирует будущие клетки коры и центрального цилиндра, латеральная – эпидермы и периферических клеток корневого чехлика, дистальная – колумеллы (Pardal, Heidstra, 2021). Так для корневого чехлика, выполняющего функции органа восприятия (давление, влажность, гравитация) и защиты меристемы (Barlow, 2002), на уровне ультраструктуры показано формирование клеток колумеллы, в первую очередь статоцитов, которым, в зрелом состоянии, была присуща полярность, выраженная в расположении ядра в проксимальной части клетки, цистерн ЭПР – в дистальной (Hilaire *et al.*, 1997). Особенностью данного типа клеток также была незначительная вакуолизация, в сравнении с таковой периферических клеток, и наличие амилопластов, строма которых заполне-

**Таблица 2.** Показатели функциональности первичных корней и, полученных в культуре *in vitro*

Вариант	Площадь корневой системы					
	Общая		Рабочая		Недеятельная	
	мм <sup>2</sup>	% от общей площади	мм <sup>2</sup>	% от общей площади	мм <sup>2</sup>	% от общей площади
Проростки (10 сут)	3.191 ± 0.151	100.00	1.774 ± 0.07	55.59	1.417 ± 0.06	44.41
Растения (14 сут)	3.436 ± 0.170*		1.893 ± 0.08*	55.09	1.543 ± 0.07	44.91
Корни из листовых эксплантов (14 сут)	2.654 ± 0.130*		1.097 ± 0.04*	41.33	1.557 ± 0.07	58.67
Корни из каллуса (14 сут)	2.666 ± 0.133		0.989 ± 0.05*	37.10	1.677 ± 0.06	62.90

Примечание. \* – статистически достоверные различия между одинаковыми параметрами в сравнении с первичными 14 сут корнями;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $p = 0.05$ ;  $t$ -критерий.

на крахмальными зернами. Клетки протодермы морфологически и структурно аналогичны меристематическим: отчетливо выделялось крупное ядро, остальные органеллы находились в гиалоплазме с большим количеством рибосом, что обуславливало ее высокую электронную плотность, плазматическая мембрана плотно прилегала к клеточной стенке (Whaley *et al.*, 1960). При переходе клеток в ДЗР постепенно происходили естественные изменения: их размеры увеличивались, гиалоплазма становилась менее электрон-плотной, увеличивалась вакуолизация, количество цистерн ЭПР, диктиосомы приобретали большую активность за счет продукции везикул. Также было заметным формирование телец ЭПР, представляющих собой расширения ГЭР, характерные для видов Brassicaceae (Iversen, 1970), и встречающиеся в клетках некоторых представителей семейств Parvaceae, Resedaceae (Bones *et al.*, 1989), Caragaceae, Tovariaceae (Behnke, Eschbeck, 1978). Согласно литературе тельца ЭПР у *A. thaliana* накапливают фермент класса гидролаз ( $\beta$ -гликозидазу РУК10) (Matsushima *et al.*, 2003), и по предположениям могут участвовать в защите растений от травоядных и патогенов (Nagano *et al.*, 2005). На сегодня в свободно доступных сведениях можно встретить отдельные исследования ультраструктурной организации клеток (Marín-Méndez *et al.*, 2009) и их органелл в каллусе (Климчук, 2001), листьев нормальных и витрифицированных побегов на этапе мультимпликации и укоренения (Louro *et al.*, 1999), зачатков корней в клеточных агрегатах (Tylicki *et al.*, 2000), в которых выявляли изменения в той или иной степени. Исследователями отмечено, что оптимально подобранные условия помогают минимизировать возникновение структурных перестроек (Wafa *et al.*, 2016).

Для характеристики функциональной активности корней *A. thaliana*, образованных из семени и, полученных путем прямого и непрямого органогебеза *in vitro*, нами проведен анализ их общей, рабочей и недейтельной поверхности. Для первичных корней на 10 и 14 сут (табл. 2) установлена общая площадь поверхности, при этом для последних наряду с увеличением общей поверхности на 7%, отмечено некоторое снижение функциональности органов. Так, у 10 сут растений рабочая площадь корней составляла 55.6% от общей, а у 14 дневных – 55.0%; при этом недейтельная площадь увеличивалась, что объясняется нормальными процессами развития органов и их общим увеличением. Данные, полученные при исследовании корней, индуцированных *de novo in vitro*, демонстрируют снижение общей площади поверхности на 22%. Корни, образованные из листовых эксплантов, в сравнении с таковыми 14 сут растений, характеризовались снижением рабочей площади и увеличением недейтельной части на 14%. Корни, индуцированные *de novo* из каллуса на среде 1/10 МС с ИМК, в сравнении с таковыми растений и образованными из листовых эксплантов, характеризовались еще большим снижением площади рабочей поверхности на 18% и 4%, соответственно. При этом недейтельная часть поверхности корней больше возрастала. Интегральным показателем работоспособности корневой системы является деятельная поверхность, которую составляют молодые корни и корневые волоски (Дуктова, 2018). Из литературных данных известно, что формирование деятельной поверхности корней зависит от многих факторов: типа субстрата, его минеральных компонентов, а также регуляторов роста (Zhang *et al.*, 2018). Кроме того, частично на структуру и функциональность корней может влиять непосредственно и гелеобразу-

ющий компонент питательной среды. Исследователями отмечено, что корни *Nemesia denticulata*, формировавшиеся на агаризированной питательной среде МС с половинным содержанием макро-, и микроэлементов имели более короткие корневые волоски, крупные клетки ризодермы и менее организованный корневой чехлик, в сравнении с таковыми, образованными на бумажной массе с добавлением жидкой питательной среды того же состава (Labrousse *et al.*, 2012). Возможно, причиной изменения функционального состояния корней *in vitro* является комплекс факторов, связанных непосредственно с условиями культивирования. Так индукция ризогенеза из листовых эксплантов происходила на среде 1/10 МС без регуляторов роста. Т. о. некоторое снижение функциональной активности органов могло происходить из-за наличия агар-агара в питательной среде. Образование корней из каллуса также индуцировали на питательной среде того же состава (с добавлением ИМК). Однако следует отметить, что до момента ризогенеза, каллусогенез поддерживали на среде, содержащей 2,4-Д, что не исключает накопление регуляторов роста в клетках. В источниках литературы имеются сведения о негативном влиянии вышеупомянутого регулятора роста на структуру корней, в виде укорочения органов и других структурных аномалий (Özkul *et al.*, 2016). Поскольку давно известна тесная связь структуры органа с выполняемыми им функциями, и, в свете выявленных анатомических изменений, можно предположить, что недействительная часть корней, т.е. апопласт, составленный из клеточных стенок и межклетников, более развит и, соответственно, имеет большую относительную площадь.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные четко продемонстрировали, что корни, образованные *de novo in vitro* из каллуса и черешков листовых эксплантов на питательной среде МС в присутствии ИМК и без регулятора роста могут характеризоваться морфолого-анатомическими изменениями, при этом степень отклонений в каллусной ткани выше, в сравнении с листовыми эксплантатами. Перестройки в анатомии корней (укорочение зон), образованных из каллуса, возможно, связаны с непосредственным влиянием 2,4-Д, при этом вероятной причиной срастания органов является близкое расположение морфогенных очагов. Из-за тесной взаимосвязи структуры органов и выполняемыми ими функциями, предполагается, что обнаруженные морфолого-анатомические изменения могут влиять на физиологические функции корней *in vitro*, снижая процент их рабочей поверхности.

Работа по исследованию функциональности корней *Arabidopsis thaliana* выполнена в рамках

Государственного задания № 122011700347-4 (FNNS-2022-0010) ФГБУН “НБС-ННЦ”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахметова А.Ш., Зарипова А.А. Индукция морфогенеза лука неридоцветного в культуре *in vitro* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 540–544.
- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Бородулина И.Д., Эрст А. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники // Известия АлтГУ. 2008. Т. 3. С. 7–10.
- Гусева К.Ю., Бородулина И.Д., Мякишева Е.П., Таварткиладзе О.К. Укоренение *in vitro* сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) // Известия АлтГУ. 2013. № 3 (79). С. 56–60.
- Дуктова Н.А. Физиологические аспекты селекции твердой пшеницы на устойчивость к корневым гнилям // Земледелие и растениеводство. 2018. № 6. С. 24–27.
- Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
- Климчук Д.О. Варіації ультраструктурної організації мітохондрій в клітинах гороху *in vitro* // Цитология и генетика. 2001. Т. 35. № 2. С. 36–42.
- Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К.: Наук. Думка, 2005. 271 с.
- Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В., Фаттахова Н.К. Практикум по физиологии растений. М.: РГАУ-МСХА, 2010. 108 с.
- Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // Turczaninowia. 2010. Т. 13. № 3. С. 147–151.
- Amghar I., Ibriz M., Ibrahim M., Boudra A., Gaboun F., Meziani R., Iraqi D., Mazri M.A., Diria G., Abdelwahd R. *In vitro* root induction from argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) adventitious shoots: influence of ammonium nitrate, auxins, silver nitrate and putrescine, and evaluation of plantlet acclimatization // Plants. 2021. V. 10. <https://doi.org/10.3390/plants10061062>
- Banda J., Bellande K., von Wangenheim D., Goh T., Guyomarc'h S., Laplaze L., Bennett M.J. Lateral root formation in *Arabidopsis*: A well-ordered L-Rexit // Trends Plant Sci. 2019. V. 24. P. 826–839. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.015>
- Bairu M.W., Kane M.E. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants // J. Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P. 101–103.
- Barlow P.W. The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function // J. Plant Growth Regul. 2002. V. 21. P. 261–286. <https://doi.org/10.1007/s00344-002-0034-z>
- Behnke H.-D., Eschlbeck G. Dilated cisternae in Capparales – an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum // Protoplasma. 1978. V. 97. P. 351–363.
- Bones A.M., Evjen K., Iversen T.-H. Characterization and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in intact plants, protoplasts, and calli of Brassicaceae // Israel J. Bot. 1989. V. 38. P. 177–192.

- Budisantoso I., Amalia N., Kamsinah.* *In vitro* callus induction from leaf explants of *Vanda* sp. stimulated by 2,4-D // Biosaintifika. 2017. V. 9. № 3. P. 492–497. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v9i3.11018>
- Bulavin I., Brailov V., Zhdanova I.* *In vitro* rhizogenesis of the *Lavandula angustifolia* cultivars // BIO Web of Conferences. 2020. V. 24. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400017>
- Capron A., Chatfield S., Provart N., Berleth T.* Embryogenesis: pattern formation from a single cell // The Arabidopsis Book. 2009. V. 7. e0126. <https://doi.org/10.1199/tab.0126>
- Chi-ni H., Schuyler S.K.* Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima* // PCTOC. 1996. V. 44. P. 1–6.
- Dalila Z.D., Jaafar H., Manaf A.A.* Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media // Asian J. Plant Sci. 2013. V. 12. P. 21–27. <https://doi.org/10.3923/ajps.2013.21.27>
- De Klerk G.J., Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R., Neumann K.-H.* Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects // Biol. Plant. 1997. V. 39. P. 53–66. <https://doi.org/10.1023/A:1000304922507>
- Delporte F., Pretova A., du Jardin P., Watillon B.* Morphology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0647-7>
- Hilaire E., Paulsen A.Q., Brown C.S., Guikema J.A.* Plastid distribution in columella cells of a starchless *Arabidopsis* mutant grown in microgravity // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. № 4. P. 490–494.
- Iliev I., Kitin P.* Origin, morphology, and anatomy of fasciation in plants cultured *in vivo* and *in vitro* // Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P. 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9540-3>
- Iversen T.-H.* The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the Cruciferae // Protoplasma. 1970. V. 71. P. 467–477.
- Jagiello-Kubiec K., Nowakowska K., Lukaszewska A.J., Pacholczak A.* Morpho-anatomical and biochemical changes associated with rooting of micropropagated ninebark cuttings // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2021. V. 147. P. 229–237. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02119-x>
- Karimian R., Lahouti M., Davarpanah S.* Effects of different concentrations of 2,4-D and kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* Nutt. // J. Appl. Biotechnol. Rep. 2014. V. 1. № 4. P. 167–170.
- Labrousse P., Delmail D., Decou R., Carlue M., Lhernould S., Krausz P.* Nemesia root hair response to paper pulp substrate for micropropagation // Sci. World J. 2012. Article ID 859243. <https://doi.org/10.1100/2012/859243>
- Louro R.P., Dos Santos A.V., Machado R.D.* Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. I. shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media // Int. J. Plant Sci. 1999. V. 160. № 2. P. 217–227. <https://doi.org/10.1086/314118>
- Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.* Microstructural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. // Microsc. Microanal. 2021. V. 27. № 3. P. 626–634. <https://doi.org/10.1017/S1431927621000283>
- Marín-Méndez W., Sanchéz-Chacón E., Gatica-Arias A.M., Ramírez-Fonseca P., Freer-Bustamante E., Valdez-Melara M.* Ultrastructure and histology of organogenesis induced from shoot tips of maize (*Zea mays*, Poaceae) // Rev. biol. trop. 2009. V. 57. Suppl. 1. P. 129–139.
- Martínez Pastur G., Arena M., Hernandez L., Curvetto N., Eliasco E.* Histological events during *in vitro* rooting of *Nothofagus nervosa* (Fagaceae) // N. Z. J. Bot. 2005. V. 43. № 1. 61–70. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2005.9512944>
- Matsushima R., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I.* A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis* // Plant J. 2003. V. 33. P. 493–502. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x>
- Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. 1962. V. 15. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- McClelland M.T., Smith M.A.L., Carothers Z.B.* The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants // PCTOC. 1990. V. 23. P. 115–123.
- Nagano A.J., Matsushima R., Hara-Nishimura I.* Activation of an ER-body-localized  $\beta$ -glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana* // Plant and Cell Physiol. 2005. V. 46. № 7. P. 1140–1148. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci126>
- Najia S., Elloumi N., Jbir N., Ammar S., Kevers C.* Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro* // C. R. Biol. 2008. V. 331. № 7. P. 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.04.002>
- Özkul M., Özel Ç.A., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F.* Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? // Cytotechnology. 2016. V. 68. P. 2395–2405. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9956-3>
- Pardal R., Heidstra R.* Root stem cell niche networks: it's complexed! Insights from *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. P. 6727–6738. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab272>
- Park J.B., Lee K.B., Lee S.* Histological study of callus formation and root regeneration from mung bean (*Vigna radiata* W.) // J. Plant Biol. 2002. V. 45. P. 170–176. <https://doi.org/10.1007/BF03030310>
- Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., Beeckman T., Bennett M.J.* *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Rani G., Arora S., Nagpal A.* Direct rhizogenesis from *in vitro* leaves of *Withania somnifera* (L.) Dunal // J. Herbs

- Spices Med. Plants. 2003. V. 10. P. 47–54.  
[https://doi.org/10.1300/J044v10n03\\_05](https://doi.org/10.1300/J044v10n03_05)
- Reis R.V., Chierrito T.P.C., Silva T.F.O., Albiero A.L.M., Souza L.A., Goncalves J.E., Oliveira A.J.B., Goncalves R.A.C. Morpho-anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown *in vitro* and *in vivo* // Rev. bras. farmacogn. 2017. V. 27. P. 34–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.007>
- Rogalski M., Moraes L.K.A., Felisbino C., Crestani L., Guerra M.P., Silva A.L. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* // Rev. Bras. Frutic. 2003. V. 25. № 2. P. 293–296.
- Rose R.J., Wang X.-D., Nolan K.E., Rolfe B.G. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 10. P. 2227–2235.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj187>
- Soriano L., de Oliveira C.R., Muniz F.R., Machado I.S. *In vitro* rhizogenesis of *Ananas comosus* var. *erectifolius* under influence of synthetic auxins // Res. Soc. Dev. 2022. V. 11. № 5. e35511528055.  
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28055>
- Souza J.A., Bettoni J.C., Costa M.D., Baldissera T.C., Mangrich dos Passos J.F., Primieri S. *In vitro* rooting and acclimatization of “Marubakaido” apple rootstock using indole-3-acetic acid from rhizobacteria // Communications in Plant Sciences. 2022. V. 12. P. 16–23.  
<https://doi.org/10.26814/cps2022003>
- Tylicki A., Burza W., Kuras M., Dziadczyk E., Malepszy S. Structural and ultrastructural analysis of root primordia *in vitro* cultures (RPC) of *Solanum lycopersicoides* Dun // Plant Sci. 2000. V. 156. № 1. P. 73–83.  
[https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00237-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00237-5)
- Wafa S.N., Mat Taha R., Mohajer S., Mahmad N., Ahmed A.B.A. Organogenesis and ultrastructural features of *in vitro* grown *Canna indica* L. // BioMed Res. Int. 2016. V. 2016. Article ID 2820454.  
<https://doi.org/10.1155/2016/2820454>
- Whaley W.G., Mollenhauer H.H., Leech J.H. The ultrastructure of the meristematic cell // Am. J. Bot. 1960. V. 47. № 6. P. 401–449.  
<https://doi.org/10.2307/2439557>
- Zhang D.J., Yang Y.J., Liu C.Y., Zhang F., Wu Q.S. Root hair growth and development in response to nutrients and phytohormones / Root Biology. Soil Biology // Eds. Giri B., Prasad R., Varma A. Springer, Cham, 2018. V. 52. P. 65–84.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_3)

## An *in vitro* *Arabidopsis thaliana* Root Structural and Functional Characterization

I. V. Bulavin<sup>1, #</sup> and A. I. Sidyakin<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Funded Institution of Science “The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS”, Nikitskiy Spusk, 52, Str., Yalta, 298648 Russia

<sup>2</sup> Institute of Biochemical Technologies, Ecology and Pharmacy of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “V.I. Vernadsky Crimean Federal University”, Academician Vernadsky Avenue, 4, Simferopol, 295007 Russia

#e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Two models of *Arabidopsis thaliana* rhizogenesis *in vitro* were studied: 1) from callus and 2) leaf explants petioles on the Murashige and Skoog one-tenth strength hormone-free nutrient medium and also with the addition of the growth regulator such as indole-3-butyric acid. Morphological and anatomical studies show significant changes in the structure of the roots formed *de novo in vitro* from callus tissue, while the organs from leaf explant petioles were similar to those formed from the seed (primary). By Sabinin-Kolosov method, a decrease in the percentage of active root surface was established. Occurrence of the structural changes during *in vitro* rhizogenesis and their effect on root functionality are discussed.

**Keywords:** leaf explants, callus, rhizogenesis *in vitro*, anatomy, functionality



## СОПРЯЖЕННОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ С СОДЕРЖАНИЕМ ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ *Festuca arundinacea* SCHREB. В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕДЕЛЬНЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

© 2023 г. Е. Г. Тюлькова\*, @, Г. Е. Савченко\*\*, Л. Ф. Кабашникова\*\*

\*Гомельский государственный медицинский университет, ул. Ланге, 5, Гомель, 246000 Беларусь

\*\*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,

ул. Академическая, 27, Минск, 220072 Беларусь

@E-mail: tut-3@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Изучали связь деградации мембраносвязанного хлорофилла с изменениями скоростей темнового дыхания и фотосинтеза в листьях *Festuca arundinacea* Schreb. под действием различных концентраций предельных и ароматических углеводов, присутствующих в техногенных выбросах. Через 1 сут после интоксикации обнаружена тесная отрицательная корреляционная взаимосвязь между содержанием бесфитольных форм пигментов и скоростью фотосинтеза и положительная – между содержанием: 1) фитольных форм и скоростью фотосинтеза; 2) бесфитольных форм и скоростью дыхания. Взаимосвязи между процессами изменялись через 3 сут, характеризуя детоксицирующие и адаптационные способности растений.

**Ключевые слова:** овсяница тростниковая, углеводороды, фотосинтез, дыхание, фитольные и бесфитольные формы хлорофиллов

**DOI:** 10.31857/S1026347022600480, **EDN:** ESTKYP

Одна из задач экологии – исследование последствий влияния техногенных токсичных соединений на живые организмы. Значительный объем в выбросах современных промышленных предприятий приходится на долю летучих и нелетучих токсичных предельных и ароматических углеводов – пентана, гексана, бензола, бутилацетата, о-ксилола и бенз(а)пирена. Важная роль в детоксикации этих веществ принадлежит растениям, прежде всего, как объектам фитотехнологий, выступающим в роли своеобразной фильтрационной системы, способствующей снижению токсического действия загрязнителей. Для этой цели оказались пригодными некоторые комнатные декоративные растения, эффективно и быстро поглощающие бензол, толуол, этилбензол, ксилол из воздуха закрытых помещений (Mosaddegh *et al.*, 2014). С другой стороны, при мониторинге состояния объектов окружающей среды все большую актуальность приобретает разработка эффективных методов оценки загрязнений с помощью растений, выступающих в роли биоиндикаторов.

Известно, что одной из наиболее уязвимых мишеней растительной клетки является фотосинтетический аппарат (Гудвин, Мерсер, 1986; Тюлькова и др., 2021), участвующий в образовании органических соединений из углекислого газа и воды с использованием энергии солнечного света в процессе фотосинтеза (Гудвин, Мерсер, 1986) – главного источника атмосферного кислорода. Экологическая направленность исследований фотосинтеза весьма разнообразна. Это – изучение воздействия тяжелых металлов (Zaouali *et al.*, 2020), ряда токсичных соединений или элементов (Kreslavski *et al.*, 2014; Jacotot *et al.*, 2018), питательных веществ (Singh, Reddy, 2015), климатических и других факторов (Акиншина и др., 2008; Kanchan *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2019; Икконен и др., 2020; Miao *et al.*, 2021; Ramazan *et al.*, 2021). В качестве информативного инструмента успешно используют флуоресцентные свойства стрессочувствительной фотосистемы 2 (ФС2) (Корнеев, 2002; Кабашникова, 2011; Тюлькова и др., 2021).

При исследовании механизмов стрессового ответа растений на различные воздействия, включая токсичные углеводороды разной хими-

**Таблица 1.** Растворимость углеводов в воде (Haynes *et al.*, 2014–2015) и их липофильность (Hansch *et al.*, 1995)

Соединение	Максимальные концентрации и дозы (300 ПДК, 50 мл)	Растворимость в воде, мг/100 мл	Липофильность, $\lg K_{o/w}$
Бутилацетат	0.26 $\mu\text{M}$ (1.5 мкг)	830.0 (при 25°C)	1.82
Бензол	0.38 $\mu\text{M}$ (1.5 мкг)	82.0 (при 16°C)	2.13
О-ксилол	0.57 $\mu\text{M}$ (3.0 мкг)	15.0 (при 16°C)	3.12
Пентан	0.42 mM (1.5 мг)	36.0 (при 16°C)	3.39
Гексан	0.21 mM (0.9 мг)	14.0 мг (при 15°C)	3.9
Бенз(а)пирен	5.95 nM ( $7.5 \times 10^{-2}$ нг)	<0.000162 (при 20°C)	6.04

ческой природы, большое значение придают активным формам кислорода (АФК) как продуктам окислительного стресса. Так, в листьях гороха обнаружено образование пероксида водорода под влиянием нафталина (Ланкин, 2016). Увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) показано в листьях овсяницы после обработки растений углеводородами (Тюлькова, Кабашникова, 2019). Усилением окислительного стресса сопровождалось и возрастание темнового дыхания на фоне снижения видимого фотосинтеза в результате действия аминолевулиновой кислоты на растения рапса (Аверина и др., 2019).

Данные последних лет указывают на возросший интерес к выяснению источников АФК при различных стрессах. Особое значение при этом придают продуктам деградации хлорофиллов. Известно, что при удалении из молекул хлорофилла жирорастворимого спирта фитола нарушается связь пигмент-белковых комплексов с фотосинтетической мембраной и их функционирование в процессе фотосинтеза. На примере активности ФС2 мы показали, что при действии на растение токсичных углеводов уровень тепловой диссипации избыточной энергии, поглощенной молекулами хлорофилла, рассматриваемый как защитный механизм, был пропорционален степени разрушения мембраносвязанных хлорофиллов (Тюлькова и др. 2022).

В продолжение этих исследований в настоящей работе изучено влияние углеводов, присутствующих в техногенных выбросах, непосредственно на параметры газообмена (поглощение и выделение кислорода) на фоне изменений содержания разных форм фотосинтетических пигментов на примере растений овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили растения одного из наиболее распространенных в городских условиях представителей многолетних травянистых растений – овсяницы тростниковой (*Festuca*

*arundinacea* Schreb.). В работе использовали выросшие в естественных условиях растения на стадии осеннего кушения (октябрь). Сначала их выдерживали в пластиковых контейнерах с грунтом при интенсивности освещения 120 мкмоль квантов  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  и температуре 22°C в течение 4–5 ч. После такой непродолжительной адаптации к лабораторным условиям растения опрыскивали водными растворами токсических соединений разной концентрации. При выборе концентраций токсических веществ мы ориентировались на санитарные нормативы, действующие при оценке нагрузки загрязняющих веществ на окружающую среду и человека (Постановление, 2016).

Известно, что одним из основных путей загрязнения экосистем являются воздушные выбросы загрязняющих веществ, оседающих на поверхности почвы и растения. На этом основании в работе использовали распыляемые воздушно-капельным путем водные растворы, содержание углеводов в которых было эквивалентно установленным предельно допустимым концентрациям (ПДК) для каждого из них в атмосферном воздухе. В табл. 1 сопоставлены значения использованных максимальных доз углеводов (для каждого из них они соответствовали 300 ПДК для воздуха) с растворимостью соединений в воде и липофильностью (Hansch *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 2014–2015). Видно, что содержание углеводов при этих дозах было значительно ниже их растворимости в воде, что позволило готовить растворы с концентрациями 300 ПДК для каждого вещества и затем разбавлять их в 3 и 300 раз.

Материал анализировали через одни и трое суток после обработки соответствующими растворами углеводов, в течение которых растения выдерживали при температуре 22°C и интенсивности освещения 120 мкмоль квантов  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  с фотопериодом 14 ч. Контролем служили растения, обработанные дистиллированной водой. Для всех анализов брали идентичные отрезки листа.

Общее содержание хлорофилловых пигментов в ацетоновых экстрактах из тканей листа определяли по спектрам поглощения (спектрофотометр

Shimadzu UV-2401 PC), используя для расчета коэффициенты, приведенные в работе (Lichenthaler, Buschmann, 2001). Разделение фитольных и бесфитольных форм хлорофиллов, основанное на их разной растворимости в гексане при соответствующих значениях pH, осуществляли по методике, описанной в работе (Harpaz-Saad *et al.*, 2007). Содержание всех пигментов в итоге пересчитывали на сырую массу. Измерения проводили в 3-кратной биологической повторности.

Активность темнового дыхания и фотосинтеза измеряли по скорости поглощения и выделения кислорода, соответственно, с помощью компьютеризированной системы PlantVital® 5030 (Руководство, 2008). Отрезок листа помещали в камеру прибора на электрод – кислородный сенсор (Sensortechnik Meinsberg, Германия) и сначала регистрировали скорость потребления кислорода в темноте, а затем – активность фотосинтеза по скорости выделения кислорода при освещении камеры. Скорости потребления и выделения кислорода (средние из 3-х повторностей) рассчитывали в мкмоль  $O_2$   $c^{-1} m^{-2}$ .

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft). Степень взаимосвязи двух переменных оценивали с помощью коэффициента корреляции ( $r$ ). Мету сходства в действии разных концентраций углеводов на исследуемые процессы определяли иерархическим кластерным анализом в программе Statistica ver. 12, используя для объединения данных метод Уорда, применяемый для задач с близко расположенными кластерами, а в качестве расстояния между кластерами – евклидово расстояние (прирост суммы квадратов расстояний объектов до центра кластера) (Ward, 1963). Для определения тенденций изменения параметров исследованных процессов в зависимости от максимальной дозы и липофильности углеводов экспериментальные данные обрабатывали в программе Excel путем построения линий тренда, близость которых к фактическим данным оценивали по величине достоверности аппроксимации  $R^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественные различия в действии исследованных углеводов на темновое дыхание в листьях овсяницы показаны на рис. 1. При действии на растения однократной ПДК пентана через сутки после обработки скорость поглощения кислорода была выше наблюдаемой в контроле, а под влиянием гексана, бензола, о-ксилола и бутилацетата снижалась по мере увеличения содержания этих токсических веществ. В случае бенз(а)пирена эффективными были только высокие дозы – 100 и 300 ПДК. Через 3 сут после обработки бензолом,

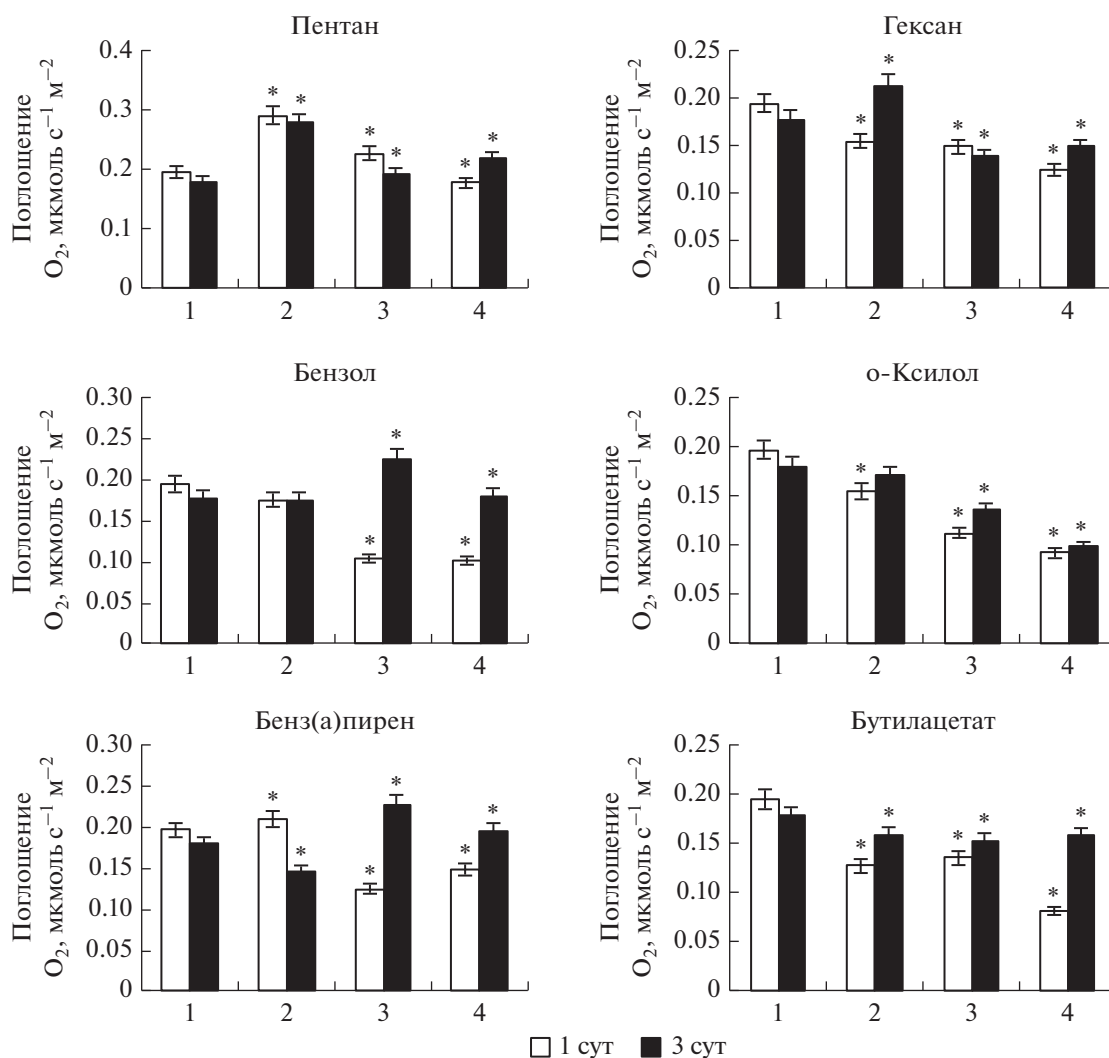
бенз(а)пиреном и бутилацетатом скорость темнового дыхания превышала значения, наблюдавшиеся спустя 1 сут.

Скорость видимого фотосинтеза (рис. 2) под действием всех веществ, кроме пентана, через сутки после обработки снижалась по сравнению с контролем. Дозовая зависимость этого снижения была особенно выразительной в случае бензола и о-ксилола. При этом скорость истинного фотосинтеза, учитывающего количество кислорода, использованного на дыхание, также снижалась по мере роста дозы всех углеводов, кроме пентана (данные не приведены).

Содержание фитольных мембраносвязанных хлорофиллов  $a$  и  $b$  снижалось через сутки после обработки всеми углеводородами по сравнению с контролем и это снижение, в основном, было дозозависимым (исключение составила однократная ПДК бенз(а)пирена) (рис. 3). Особого внимания заслуживает возрастание содержания хлорофиллов спустя 3 сут после обработки как в контрольных, так и в опытных растениях по сравнению с количеством, обнаруженным через 1 сут (рис. 3). Одной из причин этого могло быть изменение сырой массы ткани листа (ее некоторое снижение) и, как следствие, расчетное повышение содержания пигментов. Нельзя исключить и возможности новообразования хлорофиллов в растениях, адаптировавшихся за 3 сут к лучшим по сравнению с природными условиям температуры и освещению, особенно, если связать это явление с физиологическими особенностями стадии осеннего кушения, характерного для многолетних травянистых злаков. Однако при этом возникает непростой вопрос о причинах заметной стимуляции хлорофиллообразования углеводородами. В работах А.А. Шлыка нечто подобное наблюдали при нарушении целостности мембран трипсином (Шлык, Малашевич, 1970).

Изменения содержания бесфитольных хлорофиллов под влиянием углеводов (рис. 4) свидетельствуют о разной степени дефитолизации хлорофиллов через сутки после обработки. При этом дозовая зависимость процесса была невыразительной в случае пентана, гексана и бенз(а)пирена. Через 3 сут после обработки пентаном, гексаном и бензолом (1 и 100 ПДК) содержание бесфитольных форм было ниже величин, наблюдавшихся через 1 сут, а под влиянием о-ксилола, бенз(а)пирена и бутилацетата оно повышалось. В самом общем виде картина изменения содержания фитольных и бесфитольных пигментов после обработки всеми токсикантами носила противоположный характер.

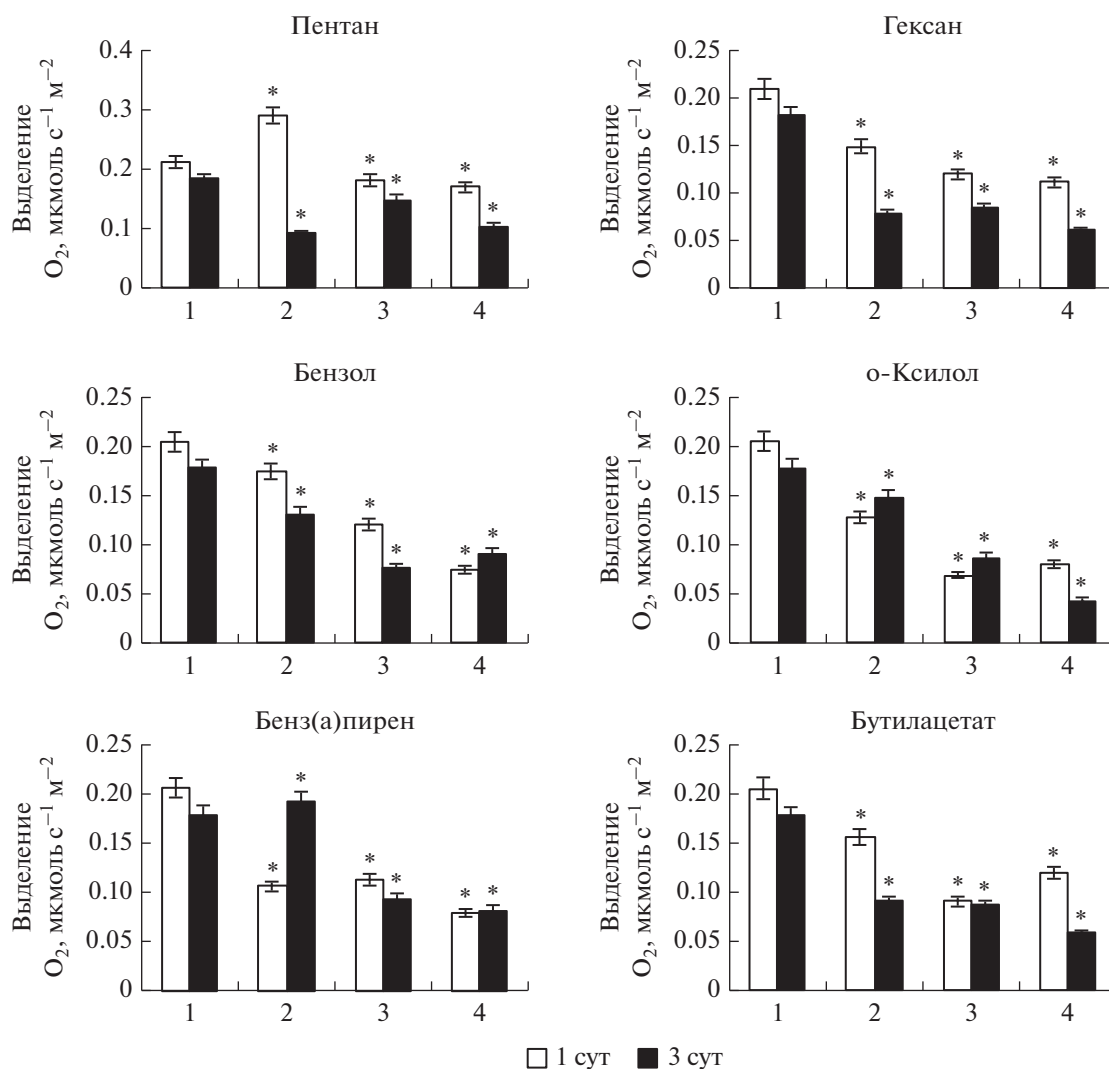
Применение кластерного анализа позволило более наглядно выявить различия (или сходство) в действии углеводов разной химической природы на исследуемые процессы по виду денд-



**Рис. 1.** Влияние углеводородов на скорость поглощения кислорода в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 – контроль, 2 – 1 ПДК, 3 – 100 ПДК, 4 – 300 ПДК, \* обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0.05$ .

рограмм. Так, через сутки после обработки влияние углеводородов на дыхание (рис. 5) и фотосинтез (видимый и истинный, рис. 6) по характеру кластеризации было близким у пяти исследованных веществ и существенно отличалось от самого летучего пентана. При действии же углеводородов на содержание фитольных пигментов от всех других отличался нелетучий бенз(а)пирен, а в случае бесфитольных – о-ксилол и бутилацетат, показывающие результаты, близкие к контролю (рис. 7). Вид дендрограмм через 3 сут после обработки растений отличался от наблюдаемого через 1 сут. Различия в ответе на обработку углеводородами с увеличением времени их последствия до 3 сут могут характеризовать не только детоксицирующие, но и адаптационные способности растений.

Характер кластеризации данных, в частности, количественная близость реакции растений на целую группу углеводородов (пять из шести для дыхания, фотосинтеза и фитольных пигментов) позволил рассмотреть влияние веществ прежде всего как стрессоров одного типа без учета их возможного специфического действия. На рис. 8 показаны тенденции изменения исследованных параметров в зависимости от максимальной дозы углеводородов (300 ПДК), которая, согласно данным табл. 1, отличалась содержанием действующих веществ на несколько порядков. Линии тренда, близость которых к фактическим данным оценивали по величине достоверности аппроксимации  $R^2$ , указывали на их полиномиальный характер (хорошо описывались полиномом степени 2), означающий, что данным кривым в той или иной мере свойственны возрастание и убывание. Ре-



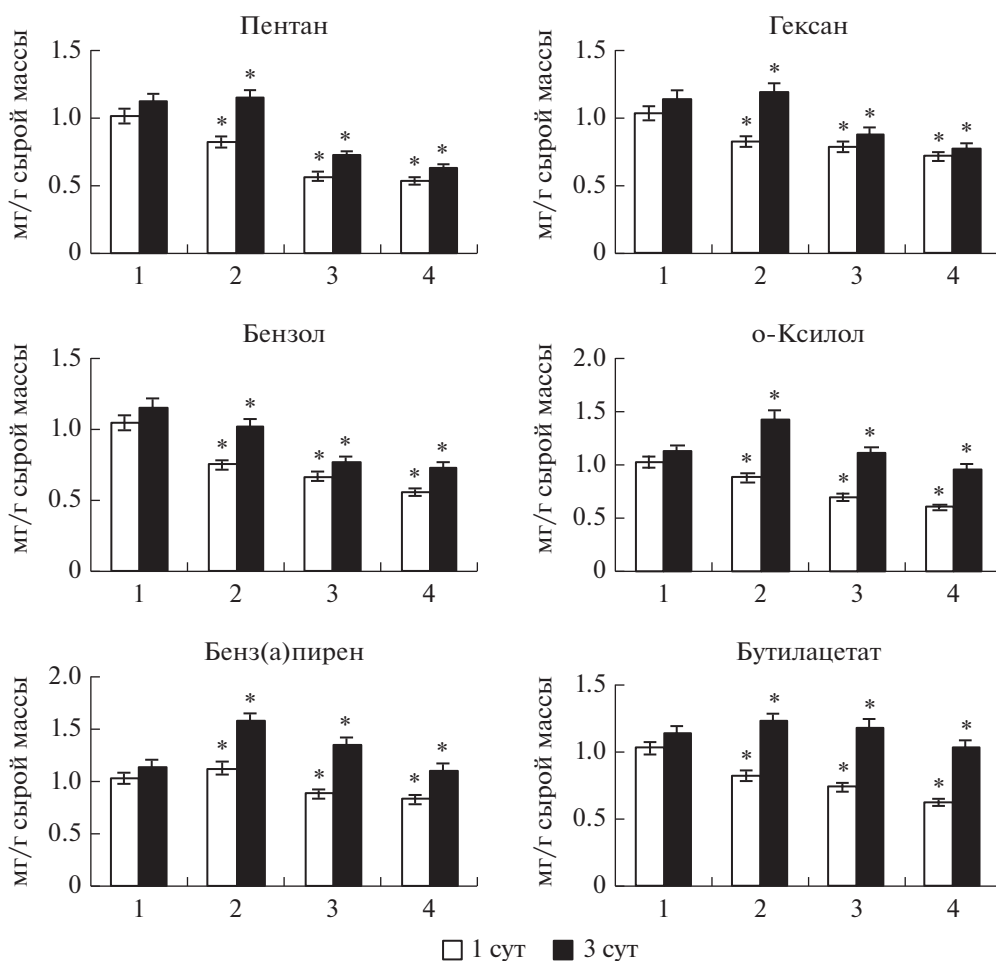
**Рис. 2.** Влияние углеводородов на видимый фотосинтез в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 – контроль, 2 – 1 ПДК, 3 – 100 ПДК, 4 – 300 ПДК, \* обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0.05$ .

зультаты последствия токсикантов через 1 сут после обработки показали, что на нисходящем участке линии тренда для дыхания (бенз(а)пирен, бензол, о-ксилол и бутилацетат) (рис. 8а) величина отношения скорости процесса к контролю снижалась с ростом концентрации, а на восходящей ветви (пентан, гексан) – возрастала. Видны также различия в ходе линий тренда для дыхания и фотосинтеза (рис. 8а, 8в). В случае фитольных пигментов с довольно высокой достоверностью наблюдалось возрастание ингибирующего действия углеводородов по мере повышения их концентрации (рис. 8д). Зависимость изменений содержания бесфитольных пигментов от концентрации действующих веществ не просматривалась (рис. 8ж). Таким образом, связывать характер влияния углеводородов только с неспецифическим действием их разных концентраций как основной причиной об-

наруженных различий, в целом весьма затруднительно, особенно для дыхания, фотосинтеза и бесфитольных пигментов.

Тенденции изменения зависимости процессов от концентрации углеводородов через 3 сут после обработки (рис. 8б, 8г, 8е, 8з) заметно отличались от наблюдавшихся через 1 сут, но достоверность аппроксимации данных существенно снижалась для дыхания и фотосинтеза. Тенденция к корреляции между ростом ингибирования содержания фитольных и бесфитольных пигментов по мере увеличения содержания углеводородов, напротив, проявилась с высокой достоверностью (рис. 8е, 8з).

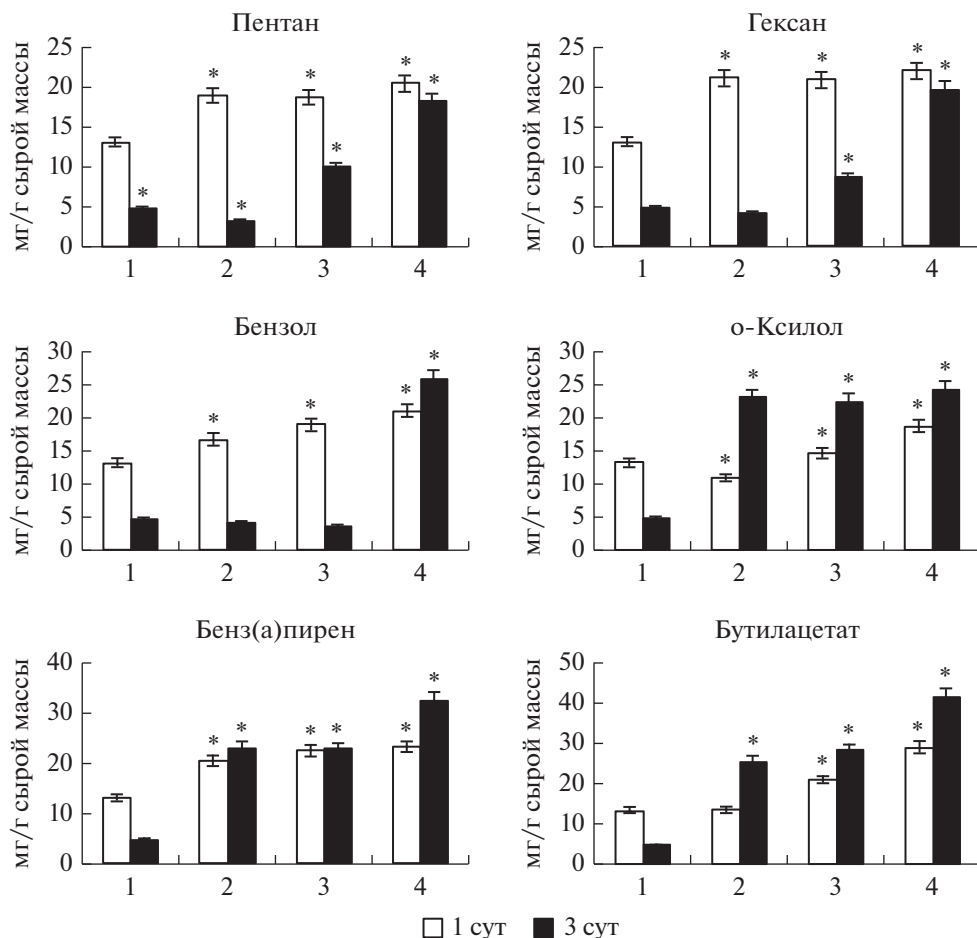
Количественные различия в кратковременном действии на растения ряда полициклических ароматических углеводородов в некоторых случаях связывают с их различной водорастворимостью (Ланкин, 2016). В наших экспериментах это пред-



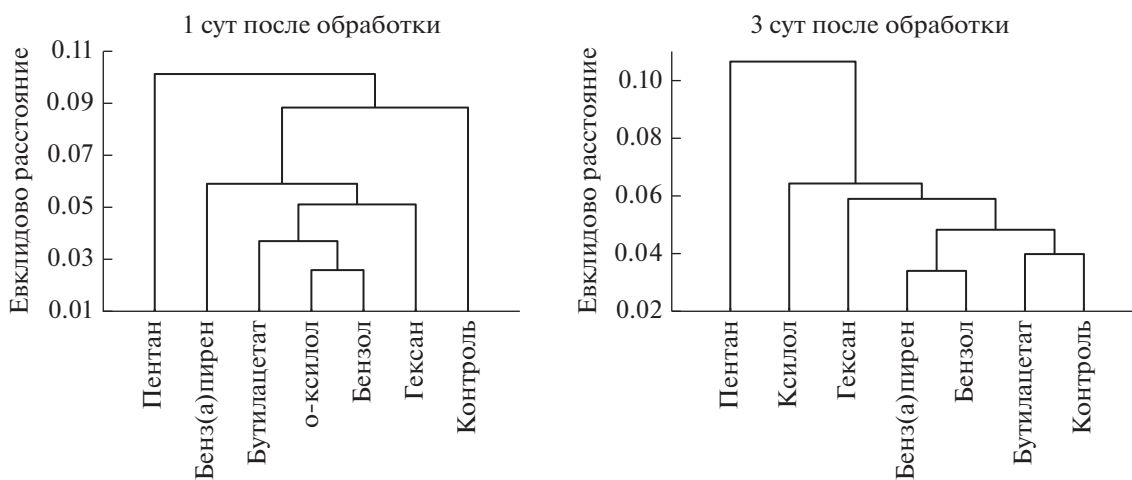
**Рис. 3.** Влияние углеводов на содержание фитольных форм хлорофилловых пигментов (хлорофиллы *a + b*) в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 – контроль, 2 – 1 ПДК, 3 – 100 ПДК, 4 – 300 ПДК. \* обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0.05$ .

положение сложно проверить из-за различий во времени последствия и содержании использованных веществ при одних и тех же уровнях ПДК. Более близкий к цитируемому выше для ПАУ пример влияния растворимости в наших опытах – сравнение данных для бензола и бутилацетата. Растворимость бензола в воде в 10 раз ниже растворимости бутилацетата, а максимальная концентрация обоих веществ при 300 ПДК одинакова. При этом заметна близость данных по степени приближения к контролю для скорости дыхания (рис. 8а) и содержанию фитольных пигментов (рис. 8д), но видимый фотосинтез ингибировался больше под действием бензола с более низкой растворимостью (рис. 8в). Количество же бесфитольных пигментов возрастало более существенно при действии бутилацетата с более высокой растворимостью (рис. 8е). Эти данные свидетельствуют скорее о разном влиянии растворимости углеводов на исследованные процессы.

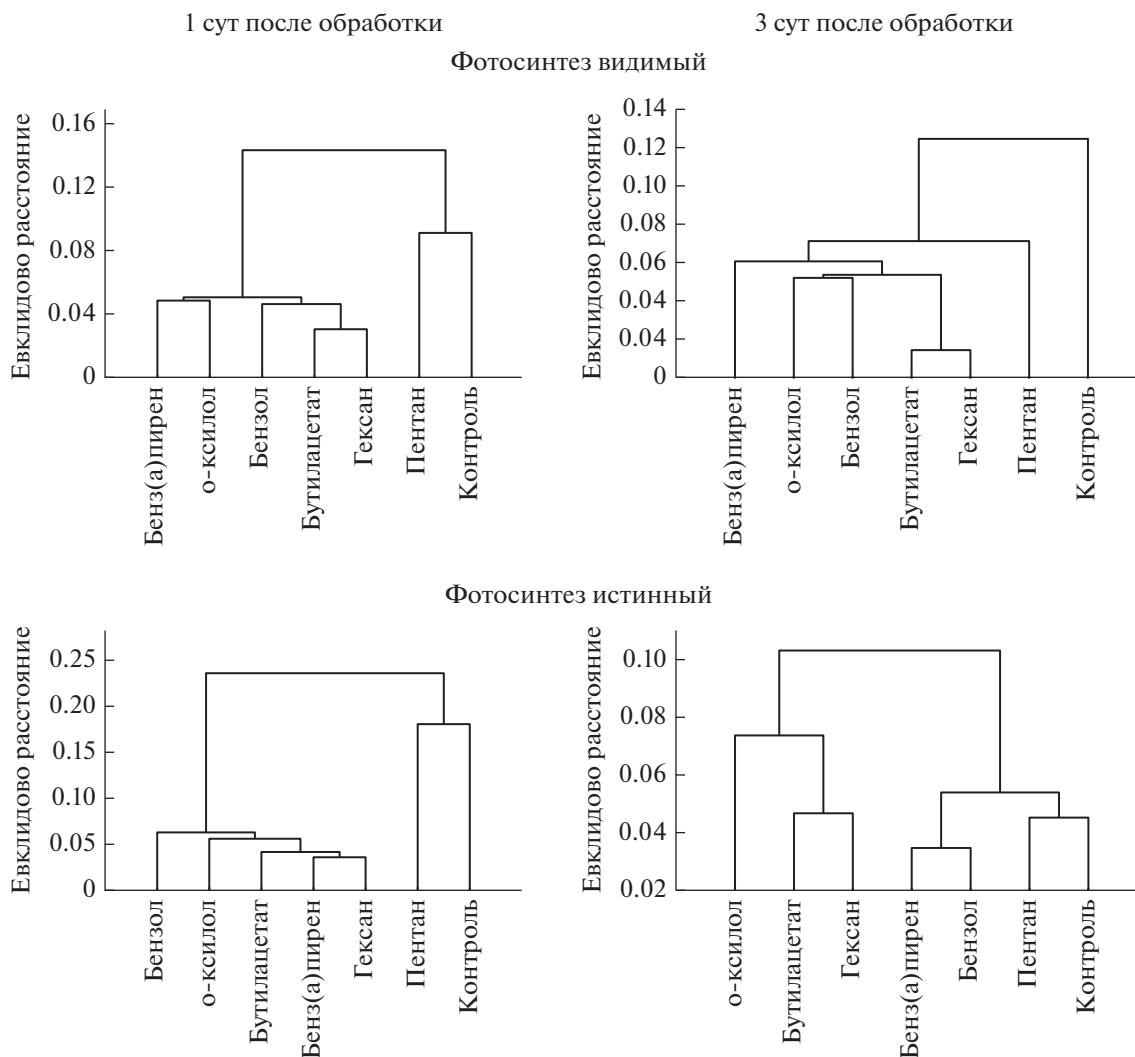
Спектр использованных нами углеводов включал соединения, отличающиеся липофильностью (табл. 1). Данные, приведенные на рис. 9, свидетельствуют о довольно сложной и разнонаправленной зависимости исследованных процессов от липофильности углеводов. Так, через сутки после обработки при повышении липофильности ингибирование дыхания снижалось (рис. 9а). Степень достоверности данных для скорости видимого фотосинтеза (рис. 9б) была невысокой, т.е., можно говорить о независимости изменений этого процесса от липофильности соединений. Содержание фитольных пигментов (рис. 9в) при росте липофильности углеводов приближалось к контролю ( $R^2 = 0.79$ ), что указывает на обратную зависимость между разрушением хлорофиллов и липофильностью. Тенденция изменения содержания хлорофиллидов, наблюдавшаяся на нисходящей ветви линии тренда (рис. 9г), может свидетельствовать о снижении дефитолиза хлорофиллов по мере ро-



**Рис. 4.** Влияние углеводородов на содержание бесфитольных форм хлорофилловых пигментов (хлорофиллид  $a + b$ ) в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 – контроль, 2 – 1 ПДК, 3 – 100 ПДК, 4 – 300 ПДК. \* обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0.05$ .



**Рис. 5.** Дендрограмма влияния углеводородов на скорость поглощения кислорода в листьях *F. arundinacea*.



**Рис. 6.** Дендрограмма влияния углеводородов на скорость выделения кислорода в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

ста липофильности углеводородов ( $R^2 = 0.51$ ). Для выяснения причин обнаруженных различий между липофильностью и направленностью разных исследованных нами процессов нужны корректные дополнительные исследования.

В настоящее время известно, что при стрессах могут изменяться физические свойства клеточных мембран живых организмов и эти изменения, в итоге, приводят к регуляции экспрессии генов стрессового ответа (Horváth *et al.*, 1998; Vigh *et al.*, 1998). Физическое состояние клеточных мембран можно регулировать экспериментально, изменяя температуру роста или обрабатывая клетки химическими веществами. Так, было показано, что под влиянием фенола, толуола и др. веществ активировался экстренный механизм изменения жирнокислотного состава и понижалась жидкость мембранных мембран (Isken *et al.*, 1997). В работе (Kabelitz *et al.*, 2003) было установлено влия-

ние алифатических спиртов на насыщенность жирных кислот и возрастание их токсичности пропорционально гидрофобности. Первичные спирты способствовали изменению физических свойств мембран цианобактерий за счет увеличения их текучести (Huffer *et al.*, 2011; Mironov *et al.*, 2018). Следует отметить, что величины липофильности спиртов в этой работе и углеводородов в наших экспериментах были близки. Однако концентрации спиртов в цитируемой работе (от 2 до 20 мМ) значительно превышали использованные нами (от 0.4 мМ до мкМ и нМ). С помощью высоких концентраций спиртов авторы (Mironov *et al.*, 2018) выявляли быстрые транскрипционные ответы уже через 30 мин. В наших экспериментах ответ на действие токсических веществ наблюдали спустя 24 и 72 ч. За это время развивалось множество событий детоксицирующего и адаптационного характера. Токсиканты могли взаимодействовать с



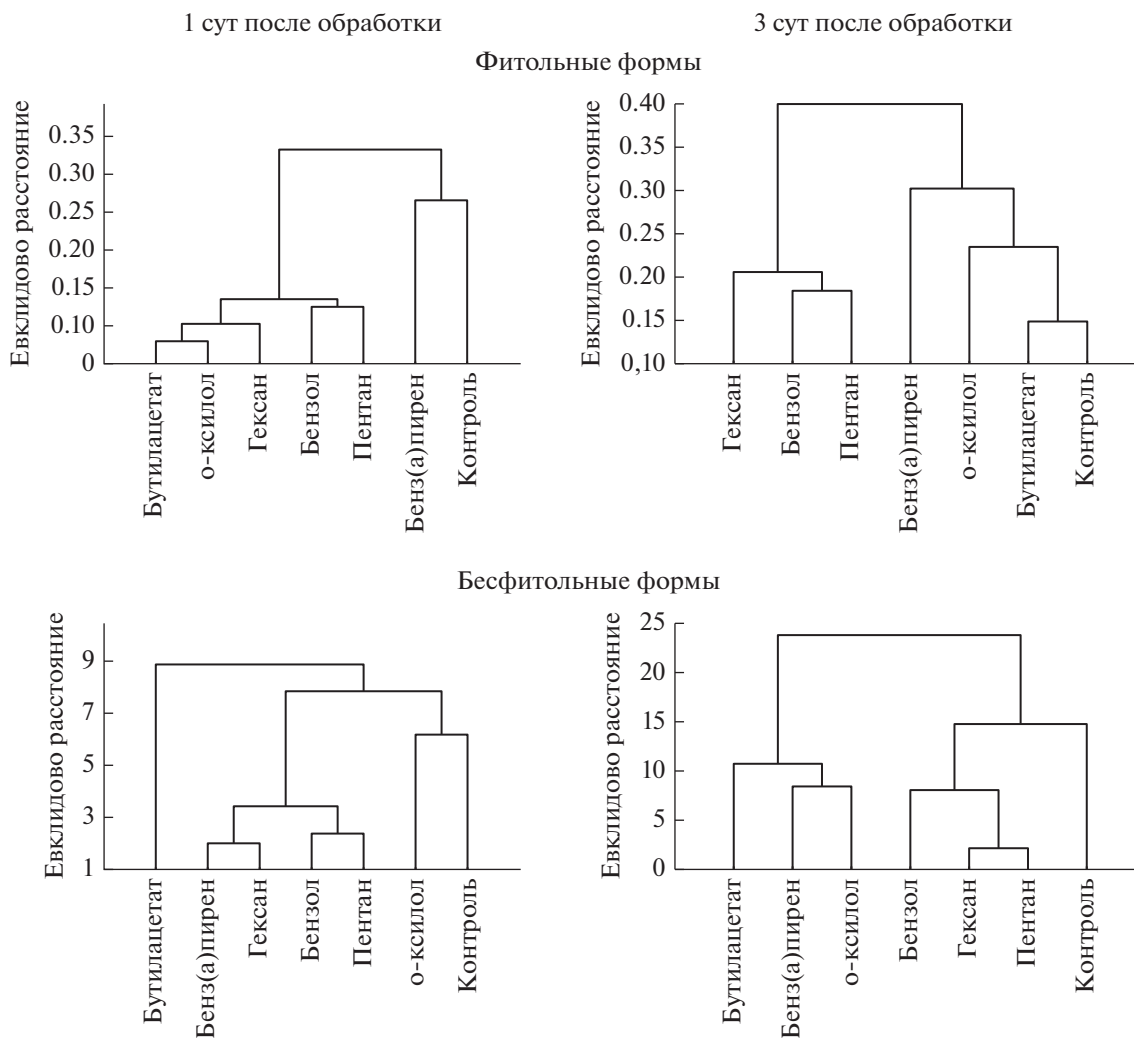
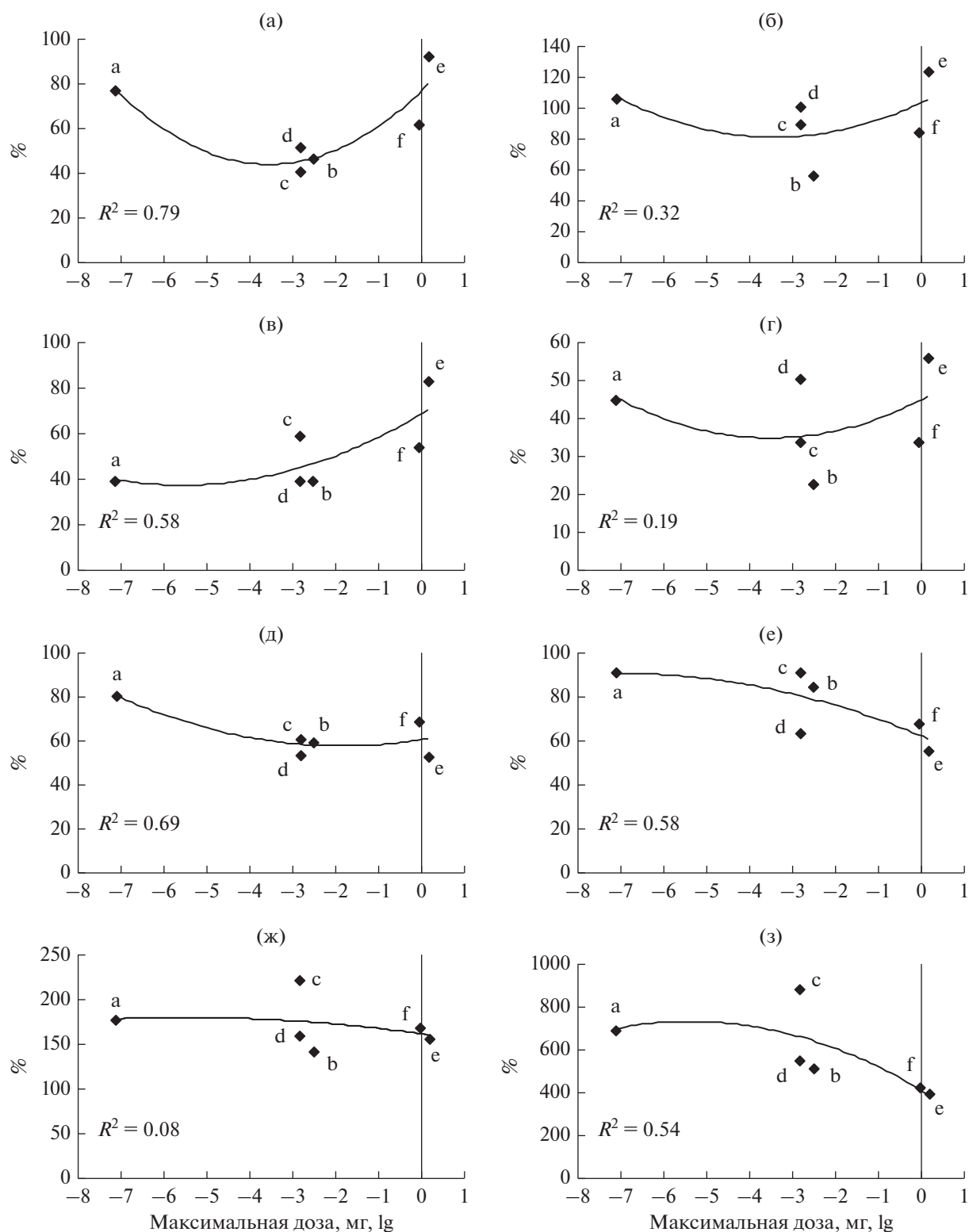


Рис. 7. Дендрограмма влияния углеводов на содержание фитольных и бесфитольных форм хлорофилловых пигментов в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

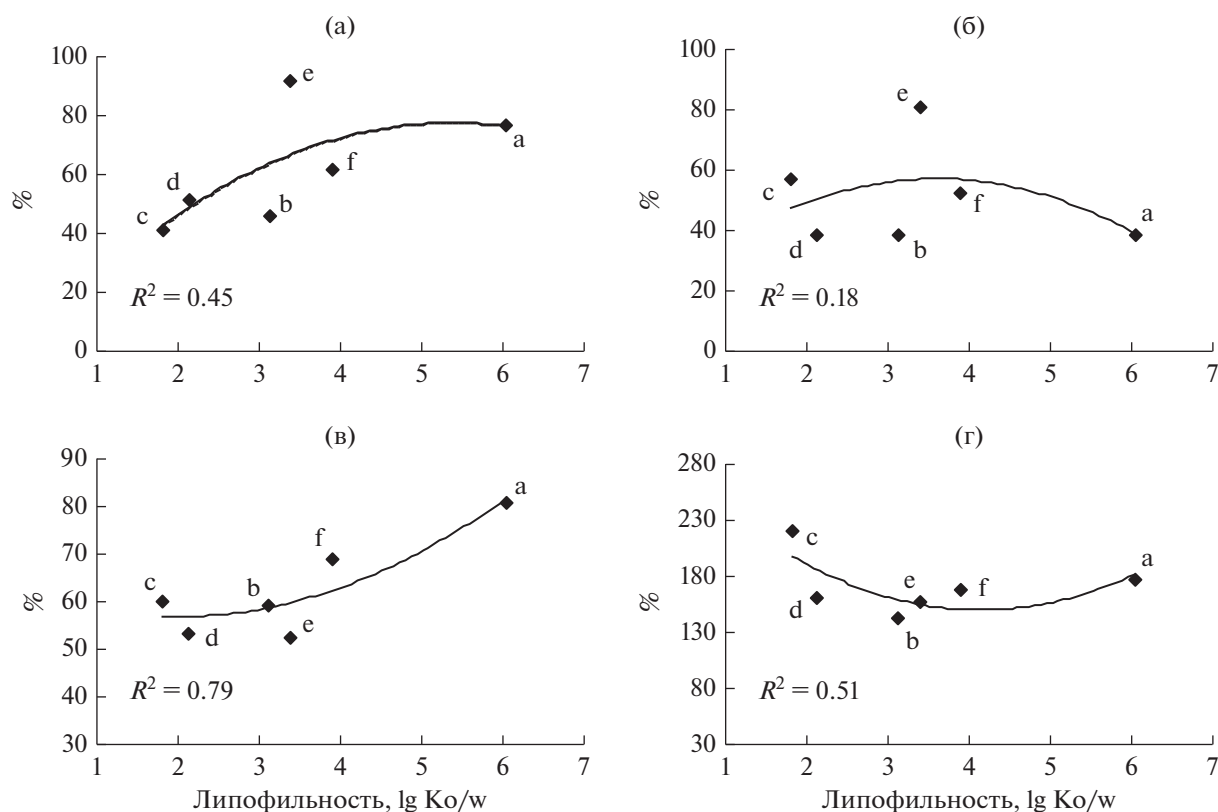
осуществляющей метаболизм ксенобиотиков и токсических веществ универсальной системой окисления липофильных соединений, существующей в разных компартментах каждой клетки (в наружной мембране митохондрий, ядерной мембране, лизосомах, митохондриях, пероксисомах). Вполне вероятно, что в итоге в наших экспериментах концентрации действующих токсичных веществ в клетках могли быть существенно ниже экзогенных, приближаясь к уровням, характерным для регуляторных веществ. Это дает возможность рассматривать исследованные в работе углеводороды прежде всего как регуляторы стрессовых ответов.

Для более полного понимания механизмов действия углеводов среди прочего важно знать и направленность корреляционных взаимодействий между процессами для разных веществ, представленных в табл. 2 и 3. Так, высокий отри-

цательный коэффициент корреляции ( $r$ ) между содержанием фитольных и бесфитольных форм хлорофилловых пигментов (табл. 3) дает возможность в общих чертах говорить о том, что вне зависимости от причины, вызывающей изменение содержания мембраносвязанных пигментов, содержащих фитол (химическая природа токсических веществ, разные их дозы либо время последствия и, возможно, даже синтез новых молекул пигментов), снижению количества фитольной формы в ткани листа сопутствовало возрастание содержания бесфитольных пигментов и наоборот. Эта закономерность не проявлялась через 3 сут после обработки листьев ароматическими о-ксилолом и бенз(а)пиреном, что может указывать на детоксикацию этих веществ. С другой стороны, характерная для большинства углеводов отрицательная корреляционная взаимосвязь между темновым дыханием и фотосинтезом (табл. 3) нарушалась уже через сутки после обработки бенз(а)пиреном и



**Рис. 8.** Тенденции изменения скорости поглощения (а, б) и выделения кислорода (в, г – видимый фотосинтез), содержания фитольных (д, е) и бесфитольных (ж, з) хлорофилловых пигментов через 1 (а, в, д, ж) и 3 сут (б, г, е, з) после обработки углеводородами в зависимости от их максимальной дозы (300 ПДК в 50 мл): а – бенз(а)пирен, б – о-ксилол, с – бутилацетат, д – бензол, е – пентан, ф – гексан. Приведены линии тренда для полинома степени 2 и величины достоверности аппроксимации  $R^2$ . На ординатах – данные в % к контролю.



**Рис. 9.** Тенденции изменения скорости поглощения (а) и выделения кислорода (б – видимый фотосинтез), содержания фитольных (в) и бесфитольных (г) хлорофилловых пигментов через 1 сут после обработки углеводородами в зависимости от их липофильности: а – бенз(а)пирен, б – о-ксилол, с – бутилацетат, d – бензол, е – пентан, f – гексан. Приведены линии тренда для полинома степени 2 и величины достоверности аппроксимации  $R^2$ . На ординатах – данные в % к контролю.

бутилацетатом, а через 3 сут обнаруживалась только у о-ксилола. При этом содержание бесфитольных пигментов, возникающих при разрушении фитольных, положительно коррелировало с дыханием и отрицательно с фотосинтезом (табл. 3). Высокая положительная корреляция между количеством хлорофиллидов и дыханием обнаружена через 1 сут после обработки всеми веществами,

а после 3 сут из этой тенденции выпадали бенз(а)пирен и бутилацетат. Разная по величине отрицательная корреляция между содержанием бесфитольных пигментов и фотосинтезом, наблюдавшаяся через сутки, нарушалась через 3 сут после обработки пентаном и бензолом.

Положительная корреляция между содержанием хлорофиллов, входящих в состав связанных

**Таблица 2.** Коэффициенты корреляции ( $r$ ) между изменениями содержания бесфитольных и фитольных форм хлорофилловых пигментов, а также показателями интенсивности дыхания и фотосинтеза

Углеводород	Бесфитольные – Фитольные		Скорость темнового дыхания – скорость фотосинтеза	
	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут
Пентан	-0.87*	-0.93*	-0.94*	0.86*
Гексан	-0.97*	-0.90*	-0.78*	-0.14
Бензол	-0.99*	-0.58*	-0.89*	0.77*
о-Ксиллол	-0.78*	0.05	-0.89*	-0.99*
Бенз(а)пирен	-0.54*	0.13	-0.07	0.88*
Бутилацетат	-0.87*	-0.93*	0.09	0.42

Примечание. \* обозначены достоверные коэффициенты корреляции при  $p < 0.05$ .

**Таблица 3.** Коэффициенты корреляции ( $r$ ) между содержанием разных форм хлорофилловых пигментов и показателями интенсивности дыхания и фотосинтеза (скорости процессов)

Углеводород	Бесфитольные – дыхание		Бесфитольные – фотосинтез		Фитольные – дыхание		Фитольные – фотосинтез	
	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут
Пентан	0.75*	0.62*	–0.47	0.15	–0.94*	–0.88*	0.99*	–0.53*
Гексан	0.94*	0.64*	–0.52*	–0.85*	–0.98*	–0.93*	0.88*	0.50*
Бензол	0.89*	0.42	–1.0*	–0.25	–0.82*	0.49*	0.99*	0.93*
о-Ксилол	0.98*	0.64*	–0.77*	–0.55*	–0.99*	–0.97*	0.87*	0.99*
Бенз(а)пирен	0.84*	–0.11	–0.61*	–0.57*	–0.90*	0.58*	0.51*	0.90*
Бутилацетат	0.80*	–0.34	–0.53*	–0.99*	–0.84*	0.30	0.46	0.99*

Примечание. \* обозначены достоверные коэффициенты корреляции при  $p < 0.05$ .

с мембраной пигмент-белковых комплексов, и фотосинтезом (табл. 3) очевидна и понятна. Однако в случае обработки бенз(а)пиреном и бутилацетатом коэффициент корреляции между содержанием хлорофиллов и фотосинтезом был более низким даже через сутки после обработки, а через 3 сут у этих углеводородов исчезала и отрицательная корреляционная связь между дыханием и фотосинтезом (табл. 3). Таким образом, установившиеся через сутки корреляционные связи между исследованными процессами нарушались через 3 сут после обработки растений углеводородами.

Мы показали ранее, что появление бесфитольных пигментов, вызывающих образование синглетного кислорода, усиливало нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, уровень которого зависел от химической природы углеводорода и времени его действия (Тюлькова и др., 2021). В настоящей работе установлено, что, несмотря на защиту от окислительного стресса посредством усиления нефотохимического тушения, после обработки углеводородами скорость фотосинтеза замедлялась и этот процесс количественно зависел от природы токсичных веществ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя полученные данные, следует отметить, прежде всего, неодинаковую зависимость изменений дыхания (рис. 1), фотосинтеза (рис. 2) и содержания пигментов (рис. 3, 4) от химической природы углеводородов. Например, дыхание и фотосинтез стимулировались минимальными дозами самого летучего из углеводородов пентана, а зависимость ингибирующего эффекта в случае фотосинтеза и хлорофиллов, связанных с мембранами, от доз использованных веществ несколько отличалась при обработке разными веществами. Вычленив сходство и различия в действии токсикантов позволил кластерный анализ данных (рис. 5–7), благодаря которому была установлена количественная близость реакции растений на целую

группу углеводородов (пять из шести): в случае дыхания и фотосинтеза в нее не вошел пентан данные для которого были близки к контролю, а при анализе содержания хлорофиллов – бенз(а)пирен. Эти данные позволили рассмотреть влияние углеводородов прежде всего как стрессоров одного типа.

Тенденции изменения параметров исследованных процессов в зависимости от максимальной дозы (рис. 8) позволили установить отсутствие прямой количественной зависимости интенсивности наблюдаемых процессов от максимальных концентраций углеводородов, которые изменялись у разных веществ в очень широких пределах (от 0.4 мМ у пентана до 6 нМ у бенз(а)пирена для 300 ПДК). Такие количества веществ, даже если бы они беспрепятственно передвигались по клетке и сохранились неизменными вплоть до внутриклеточных органелл, вряд ли могли бы растворить достаточно большие фрагменты фотосинтетических мембран, чтобы заметно заингибировать фотосинтез и солибилизировать довольно большое количество мембраносвязанных пигментов. Эти результаты позволили рассматривать действие исследованных токсичных веществ прежде всего на регуляторном уровне, для которого значение концентраций не первостепенно, что не исключает наличия их пороговых количеств.

Поскольку все использованные в работе углеводороды липофильны, но прямой количественной связи уровня липофильности со степенью ингибирования исследованных процессов не установлено (рис. 9), то вполне вероятно, что величина ингибирующего эффекта, характеризующая их токсичность, может зависеть от специфических особенностей взаимодействия углеводородов с разными типами мембран (цитоплазматическими, митохондриальными и хлоропластными).

Исследование корреляционных взаимосвязей между уровнем деструкции хлорофилловых пигментов, вызванной влиянием на растения орга-

нических соединений техногенной природы, и изменением скоростей темнового дыхания и фотосинтеза позволило получить результаты, имеющие самостоятельное значение. Кроме этого, данные о том, что установившиеся через сутки корреляционные связи между исследованными процессами нарушались через 3 сут после обработки растений углеводородами (табл. 2 и 3), наряду с информацией, полученной с помощью кластерного анализа (рис. 5–7), позволяют судить о том, что различия в ответе на обработку углеводородами с увеличением времени их последующего действия до 3 сут могут характеризовать не только детоксицирующие, но и адаптационные способности растений.

Исследование влияния на растения овсяницы продуктов выброса предприятий (предельных и ароматических углеводородов) при распылении их воздушно-капельным путем показало, что даже дозы, превышающие в 300 раз предельно допустимые по существующим нормативам, ориентированным на сохранение здоровья человека, не оказывали заметного повреждающего действия и через 3 сут после обработки визуально растения не отличались от контрольных, демонстрируя высокую устойчивость.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверина Н.Г., Емельянова А.В., Шербаков Р.А., Козел Н.В., Обуховская Л.В., Усатов А.В. Фотосинтез и скорость поглощения кислорода в растениях озимого рапса, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 6. С. 461–472.
- Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Карасева Т.А., Клозе Э. Новые возможности в оценке состояния растений // Сибирский экологический журн. 2008. Т. 2. С. 249.
- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. Т. 1. М.: Мир, 1986. 393 с.
- Икконен Е.Н., Шибаева Т.Г., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф. Реакция дыхания проростков озимой пшеницы на продолжительное и кратковременное ежесуточное понижение температуры // Физиология растений. 2020. С. 312–318.
- Кабашикова Л.Ф. Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков. Минск: Беларус. навука, 2011. 327 с.
- Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода флуоресценции хлорофилла. К.: Альтерпресс, 2002. 188 с.
- Ланкин А.В. Механизмы токсического действия полициклических ароматических углеводородов на фотосинтетический аппарат: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2016. 22 с.
- Постановление М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 08.11.2016 г., № 113 // [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://pravo.by\\_1485896400.pdf](http://pravo.by_1485896400.pdf). — Дата доступа: 22.03.2022.
- Руководство по эксплуатации PlantVital 5030. Штраусберг: INNO-Concept GmbH, 2008. 18 с.
- Тюлькова Е.Г., Кабашикова Л.Ф. Влияние летучих органических соединений на перекисное окисление липидов овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. // Весці НАН Беларусі. Серыя біял. навук. 2019. № 4. С. 411–412.
- Тюлькова Е.Г., Савченко Г.Е., Кабашикова Л.Ф. Использование амплитудно-импульсной модулированной флуориметрии для оценки действия летучих органических соединений и бенз(а)пирена на функциональную активность фотосистемы II в листьях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. // Журн. прикладной спектроскопии. 2021. № 5. С. 767–777.
- Тюлькова Е.Г., Савченко Г.Е., Кабашикова Л.Ф. Дегградация хлорофилла в листьях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* при действии летучих органических соединений и бенз(а)пирена // Известия РАН. Серия биологическая. 2022. № 4. С. 363–373.
- Шлык А.А., Малашевич А.В. Ускорение образования хлорофилла b и лабилизация хлорофилла a при гидролизе белков хлоропластов трипсином // Доклады АН СССР. 1970. Т. 194. № 3. С. 715–718.
- Carvalho R., Szlafsztajn C.F. Urban vegetation loss and ecosystem services: The influence on climate regulation and noise and air pollution // Environ. Pollut. 2019. V. 245. P. 844–852.
- Hansch C., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR – Hydrophobic, Electronic and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. 348 p.
- Harpaz-Saad S., Azoulay T., Arazi T., Ben-Yaakov E., Mett A., Shibolet Y.M., Hörtensteiner S., Gidoni D., Amit Gal-On, Goldschmidt E.E., Eyal Y. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is post-translationally regulated // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1007–1022.
- Haynes W.M., Lide D.R., Bruno T.J. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 95th Edition / CRC Press LLC, Boca Raton: FL, 2014–2015. 2666 p.
- Horvath I., Glatz A., Varvasovszki, Vigh L. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: Identification of hsp17 as a “fluidity gene” // Proc Natl Acad Sci USA. 1998. V. 95 (7). P. 3513–3518.
- Huffer S., Clark M.E., Ning J.C., Blanch H.W., Clark D.S. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 6400–6408.
- Isken S., Santos P., JAM de Bont. Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48 (5). P. 642–647.
- Jacotot A., Marchand C., Gensous S., Allenbach M. Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and increased tidal flooding on leaf gas-exchange parameters of two common mangrove species: *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa* // Photosynthesis Research. 2018. V. 138. P. 249–260.
- Kabelitz N., Santos P.M., Heipieper H.J. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of mem-

- brane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus* // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 220. P. 223–227.
- Kanchan J., Bhatia V.S., Govind, Pandey G.P. Impact of elevated temperatures on specific leaf weight, stomatal density, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in soybean // Photosynthesis Research. 2017. V. 131. P. 333–350.
- Kreslavski V.D., Lankin A.V., Vasilyeva G.K., Luybimov V.Yu., Semenova G.N., Schmitt F.-J., Friedrich T., Allakhverdiev S.I. Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 81. P. 135–142.
- Lichenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. 2001. V. 1 (1). P. F4.3.1–F4.3.8.
- Miao Qi, Xiaodi Liu, Yibo Li, He Song, Zuotian Yin, Feng Zhang, Qijin He, Zhenzhu Xu, Guangsheng Zhou. Photosynthetic resistance and resilience under drought, flooding and rewatering in maize plants // Photosynthesis Research. 2021. V. 148. P. 1–15.
- Mironov K., Shumskaya M., Sidorov R.A., Trofimova M.S., Los D.A. Membrane physical state and stress regulation in *Synechocystis*: fluidizing alcohols repress fatty acid desaturation // The Plant Journal. 2018. V. 96. P. 1007–1017.
- Mosaddegh M.H., Jafarian A., Ghasemi A., Mosaddegh A. Phytoremediation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene contaminated air by *D. deremensis* and *O. microdasys* plants // J. Environ. Health Sci. and Eng. 2014. № 12. P. 39–52.
- Ramazan S., Bhat H.A., Zargar M.A., Ahmad P., Riffat J. Combined gas exchange characteristics, chlorophyll fluorescence and response curves as selection traits for temperature tolerance in maize genotypes // Photosynthesis Research. 2021. V. 150. P. 213–225.
- Singh S.K., Reddy V.R. Response of carbon assimilation and chlorophyll fluorescence to soybean leaf phosphorus across CO<sub>2</sub>: Alternative electron sink, nutrient efficiency and critical concentration // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2015. V. 151. P. 276–284.
- Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? // Trends in biochemical sciences. 1998. V. 23. P. 369–374.
- Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function // J. of the American Statistical Association, 1963. 236 p.
- Zaouali W., Mahmoudi H., Salah I., Mejri F., Casabianca H., Hosni K., Ouerghi Z. Copper-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidative system activities and lipid metabolism of cilantro (*Coriandrum sativum* L.) // Biologia. 2020. V. 75. P. 367–380.

## Connectivity of Photosynthesis and Respiration with Content of Chlorophyll Pigments in Plants of Reed Fescue *Festuca arundinacea* Schreb. Under the Impact of Alkanes and Aromatic Hydrocarbons

E. G. Tyulkova<sup>1, #</sup>, G. E. Savchenko<sup>2</sup>, and L. F. Kabashnikova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gomel State Medical University, st. Lange, 5, Gomel, 246000 Belarus

<sup>2</sup> Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, st. Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072 Belarus

<sup>#</sup>e-mail: tut-3@mail.ru

The association of degradation of membrane-bound chlorophyll with changes in dark respiration rates and photosynthesis in *Festuca arundinacea* Schreb. leaves under the influence of various concentrations of limit and aromatic hydrocarbons present in technogenic emissions was studied. 1 day after intoxication a negative correlation between the content of non-phytol forms of pigments and the rate of photosynthesis was found. Positive correlation was found between the content of: 1) phytol forms and the rate of photosynthesis; 2) non-phytol forms and respiration rate. The relationships between the processes changed after 3 days characterizing the detoxifying and adaptability of plants.

**Keywords:** reed fescue, hydrocarbons, photosynthesis, respiration, phytol and non-phytol forms of chlorophylls

УДК 599.323.4:591.431.4:575.24

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В ЗАДНЕЙ ЧАСТИ ПЕРВОГО И ВТОРОГО ВЕРХНИХ МОЛЯРОВ У *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Rodentia: Cricetidae)

© 2023 г. М. И. Чепраков<sup>@</sup>

Институт экологии растений и животных УрО РАН, ул. 8 Марта, 202, Екатеринбург, 620144 Россия

<sup>@</sup>E-mail: Cheprakov@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 23.11.2022 г.

После доработки 16.04.2023 г.

Принята к публикации 18.04.2023 г.

Установлено, что изменчивость дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров у *L. gregalis* образует морфологический модуль, имеющий иерархическую структуру. Этот модуль обозначен как нетипичная форма (Atypical Form), а его фенотип как АФ. Фенотип типичной формы обозначен как tf (typical form). Основная составляющая модульной изменчивости — это увеличение частоты особей с АФ фенотипом с возрастом. Степень выраженности этого фенотипа также увеличивается с возрастом. Присутствие фенотипа АФ у особей определяется моногенно. Особи с фенотипом АФ являются доминантными гетерозиготами или гомозиготами. Какой фенотип (tf или АФ) реализует доминантная гетерозигота может зависеть от влияния генов-модификаторов. Выявленный морфологический модуль присутствия дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров имеет генетическую основу.

**Ключевые слова:** *Lasiopodomys gregalis*, дополнительные элементы на M<sup>1</sup> и M<sup>2</sup>, фенотипическая изменчивость, морфологическая модульность, наследование

**DOI:** 10.31857/S1026347022600996, **EDN:** EVIAKN

У ряда представителей полевок подсемейства Arvicolinae наблюдается тенденция к образованию дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров. Подобные особенности встречаются у отдельных видов и подвидов полевок родов *Neodon*, *Terricola*, *Chionomys* и подрода *Sumeriomys* (Огнев, 1950; Ангерманн, 1973; Громов, Поляков, 1977).

Выявление морфологических модулей и установление факторов, вовлеченных в их происхождение, является актуальным направлением в современной биологии (Esteve-Altava, 2017a, 2017b).

Целью настоящей работы является: описание морфотипической и фенотипической изменчивости дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров у *Lasiopodomys gregalis* и выявление факторов, влияющих на эту изменчивость; оценка модульности изменчивости изучаемых признаков и выявление характера наследования фенотипа Atypical Form.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевок содержали при свободном доступе к воде и корму, комнатной температуре ( $17 \pm 4.0^\circ\text{C}$ ) и естественном сезонном изменении фотоперио-

да (Екатеринбург,  $56^\circ 48'$  с.ш.). При рождении детенышей индивидуально метили, в возрасте около 25 дней отсаживали их от родителей, а в 1.0–1.5 мес. формировали пары. В качестве корма большую часть года давали морковь, зерна овса в шелухе. Летом кормили травяной смесью и овсом.

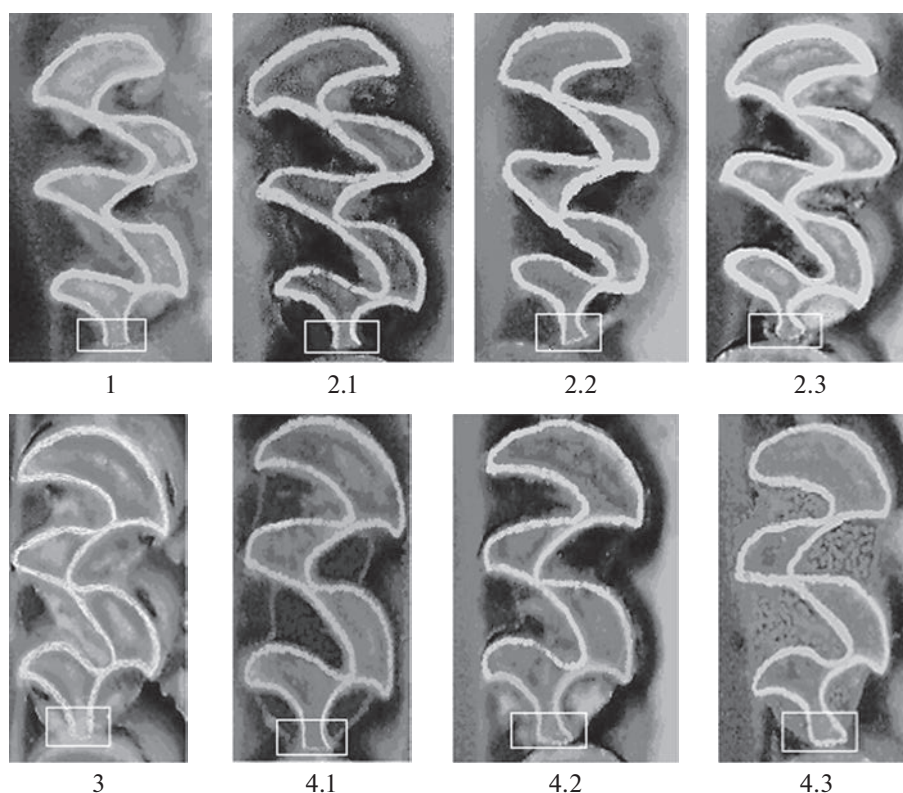
В исследовании использовали выборки черепов из трех лабораторных колоний. Время содержания колоний составляло 3–4 года. Были получены потомки до пятого поколения.

Основатели первой колонии были пойманы недалеко от пос. Яры Ямало-Ненецкий автономного округа ( $68.91^\circ$  с.ш.,  $66.50^\circ$  в.д.). Летом 1957 г., около двух десятков полевок завезли в виварий (Покровский, Большаков, 1979). Из них основателями колонии стали 7 самцов и 7 самок, черепов — 144 шт.

Основатели второй колонии были пойманы недалеко от пос. Лебяжье Курганской области ( $55.27^\circ$  с.ш.,  $66.50^\circ$  в.д.) в конце лета 1957 г. (Покровский, Большаков, 1979). Основателями стали 6 самцов и 6 самок, черепов — 146 шт.

В конце лета 2006 г. 1 самец и 1 самка были пойманы автором в окрестностях пос. Курманка Свердловской области ( $56.77^\circ$  с.ш.,  $61.28^\circ$  в.д.) и





**Рис. 1.** Морфотипическая изменчивость (выделено прямоугольником) первого (M1) и второго (M2) верхних моляров узкочерепной полевки. 1 и 3 – варианты типичной формы M1 и M2. 2.1–2.3 и 4.1–4.3 – варианты нетипичной формы M1 и M2, отличающиеся по степени выраженности лингвального выступа. Этот выступ становится крупнее при переходе от первой градации ко второй и приобретает форму открытой петли в третьей градации.

стали основателями третьей колонии, черепов – 205 шт.

Особи второй и третьей колонии относятся к одному подвиду *L. (S.) g. gregalis* Pallas, 1778 и одной сублинии A1 cyt b, а первой колонии – к другому подвиду *L. (S.) g. major* Ognev, 1918 и другой сублинии A2 cyt b (Шварц и др., 1960; Громов, Поляков, 1977; Petrova *et. al.*, 2015). Материалы хранятся в музее института экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург.

Выявленные признаки – дополнительные элементы в заднем отделе первого и второго верхних моляров у *L. gregalis* образует морфологический модуль, имеющий иерархическую структуру. Этот модуль обозначен как нетипичная форма (Atypical Form), а фенотип, маркированный этим модулем, обозначен как AF. Фенотип типичной формы обозначен как tf (typical form).

На рис. 1 представлены цифровые фотографии моляров отдельных особей. Фенотип tf представлен двумя вариантами морфотипа: 1 и 3. Фенотип AF представлен шестью морфотипами: 2.1–2.3, 4.1–4.3. Морфотипы 2.1 и 4.1 имеют слабо выраженный дополнительный элемент в задней части первого и второго верхних моляров (градация 1). В морфотипах 2.2 и 4.2 эти элементы сильнее вы-

ражены (градация 2). В морфотипах 2.3 и 4.3 они наиболее выражены (градация 3).

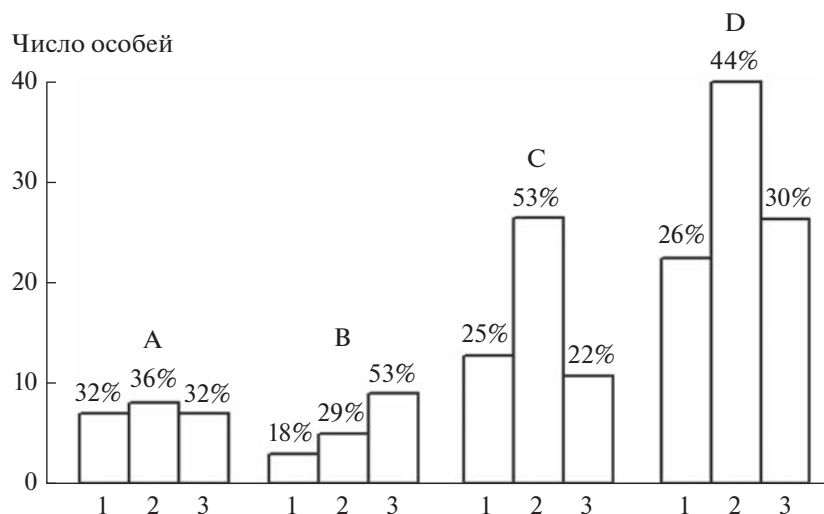
Всего выявлено 297 моляров (15.0% от 1980), имеющих дополнительные элементы на правом или левом M1 или M2, и 153 особи (30.9% от 495), имеющих фенотип AF. Для сравнения выборок из разных колоний между собой разные варианты фенотипа AF объединяли в две категории сложности. В первую категорию вошли варианты морфотипов 2.1 и 4.1, во вторую – 2.2, 2.3, 4.2 и 4.3. Для выяснения характера наследования отклонений от типичной формы проводили посемейный анализ расщеплений в разных вариантах скрещивания.

При статистической обработке данных использовали пакет программ StatSoft STATISTICA for Windows 6.0: статистика  $\chi^2$ , точный критерий Фишера – Fisher exact test (Fisher exact), ранговая корреляция Спирмена –  $R_s$ , логлинейный анализ (LLA).

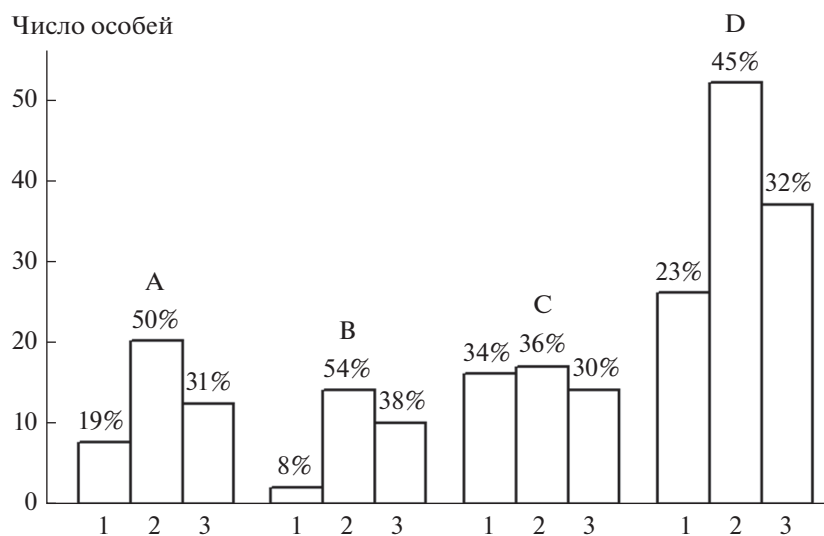
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Модульность изменчивости дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров.** Для первого верхнего моляра ранговая кор-





**Рис. 2.** Частоты особей, имеющих добавочные элементы на левом (1), левом и правом (2) и на правом (3) первом верхнем моляре в первой (А), во второй (В), в третьей (С) и суммарно в трех (D) колониях узкочерепной полевки.

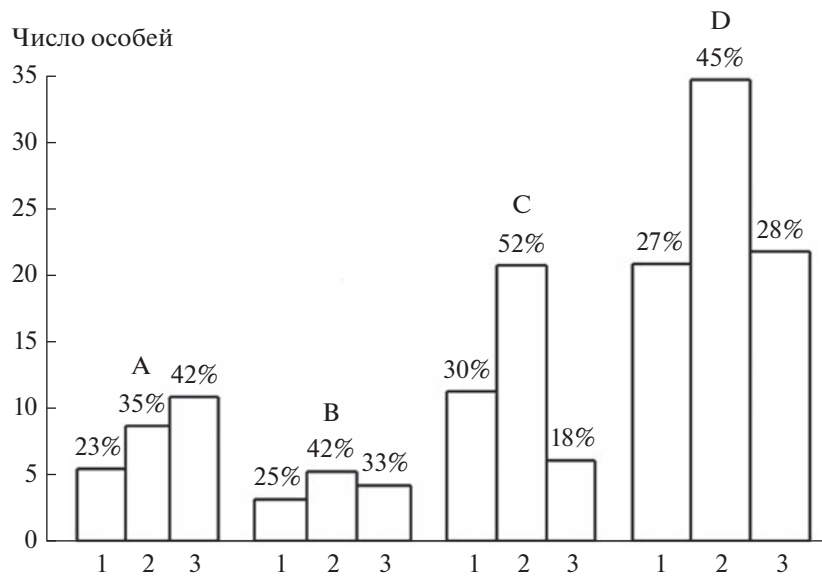


**Рис. 3.** Частоты особей, имеющих добавочные элементы на левом (1), левом и правом (2) и на правом (3) втором верхнем моляре в первой (А), во второй (В), в третьей (С) и суммарно в трех (D) колониях узкочерепной полевки.

реляция Спирмена ( $R_s$ ) между присутствием или отсутствием добавочных элементов (градации 1 и 0) на левой и правой сторонах челюсти в выборках отдельных колоний колеблется от 0.43 до 0.62, а в выборке трех колоний составляет 0.55 ( $P < 0.001$ ). Для этого моляра распределение особей, имеющих добавочные элементы на левой, на левой и правой и на правой сторонах челюсти, является симметричным и соответствуют отношению 1 : 2 : 1 ( $\chi^2 < 1.5$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.48$ , рис. 2). Колонии не отличаются по частотам этого распределения ( $\chi^2 = 6.7$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.15$ ) и половые различия не выражены ( $\chi^2 < 1.0$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.61$ ).

Для второго верхнего моляра эта же корреляция в выборках отдельных колоний колеблется от 0.44 до 0.67, а в выборке трех колоний составляет 0.55 ( $P < 0.001$ ). Распределение особей, имеющих добавочные элементы на левой, на левой и правой и на правой сторонах челюсти, для второго моляра также симметричное ( $\chi^2 < 3.2$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.21$  при сравнении с соотношением 1 : 2 : 1, рис. 3). Колонии также не отличаются по частотам этого распределения ( $\chi^2 = 7.4$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.11$ ) и половые различия не выражены ( $\chi^2 = 1.8$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.41$ ).

Ранговая корреляция Спирмена между присутствием или отсутствием добавочных элементов на первом и втором верхних молярах в выборках от-



**Рис. 4.** Частоты самок, имеющих добавочные элементы на первом (1), первом и втором (2) и на втором (3) верхних молярах в первой (А), во второй (В), в третьей (С) и суммарно в трех (D) колониях узкочерепной полевки.

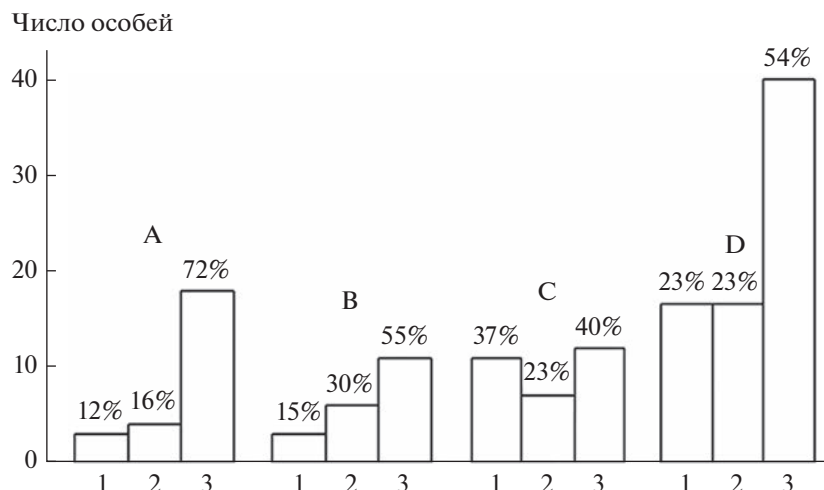
дельных колоний колеблется от 0.28 до 0.44, а в выборке трех колоний составляет 0.39 ( $P < 0.001$ ). В данном случае эта корреляция несколько ниже, но также высоко статистически значима. Колонии отличаются по частотам распределения особей, имеющих добавочные элементы на первом, первом и втором и на втором молярах ( $\chi^2 = 11.8$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.02$ ), половые различия также статистически значимы по этому показателю ( $\chi^2 = 12.3$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.002$ ). В однополых выборках отличия между колониями по частотам распределения особей, имеющих добавочные элементы, отсутствуют (самцы:  $\chi^2 = 7.4$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.11$ , самки:  $\chi^2 = 5.0$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.28$ ). Исходя из этого, данные по самцам и самкам рассматривали отдельно. У самок значения корреляции существенно (в два раза) выше, чем у самцов ( $P < 0.001$ ). Корреляция Спирмена у самок в выборках отдельных колоний колеблется от 0.38 до 0.56, а в суммарной выборке корреляция составляет 0.50. Для самцов в выборках отдельных колоний значения меняются от 0.18 до 0.40, а в суммарной выборке составляют 0.25. У самок распределение особей, имеющих добавочные элементы на первом, первом и втором и на втором молярах симметричное и соответствуют отношению 1 : 2 : 1 ( $\chi^2 < 0.85$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.65$ ). У самцов это распределение асимметричное и отличается от отношения 1 : 2 : 1 ( $\chi^2 = 37.7$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.0001$ ). У них преобладают особи, имеющих добавочные элементы на втором моляре. Наглядно это можно видеть рис. 4 и 5. Возможно, существуют генетические факторы, определяющие такие отличия между полами.

**Внутримодульная изменчивость (когда за единицу изменчивости взят моляр, а не особь).** Проявление признака. Первый и второй верхние моляры не различаются по частоте экземпляров с наличием дополнительных элементов в заднем отделе (M1: 14.2%, 141/990, M2: 15.8%, 156/990,  $\chi^2 < 0.9$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0.35$ ).

Колонии различаются по частоте моляров с дополнительными элементами. Она выше в первой (16.1%, 93/576) и третьей колонии (17.3%, 142/820), чем во второй (10.6%, 62/584,  $\chi^2 > 7.6$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ).

Частота моляров с этим признаком выше у самок (17.3%, 168/972,  $\chi^2 = 7.8$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.01$ ), чем у самцов (12.8%, 129/1008). Она увеличивается с возрастом от 11.1% (149/1344) в младшей возрастной группе (1–5 мес.) до 23.3% (148/636) в старшей ( $\chi^2 = 47.6$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ) и при переходе от левой стороны (13.1%, 130/990) к правой стороне (16.9%, 167/990,  $\chi^2 = 5.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ).

В последнем случае имеются отличия между колониями и между полами. В первой (слева – 10.4% или 30/288, справа – 21.9% или 63/288,  $\chi^2 > 13.1$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) и второй (слева – 7.5% или 22/292, справа – 13.7% или 40/292,  $\chi^2 > 5.8$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ) колониях различия между сторонами челюсти присутствуют. А в третьей колонии их нет (слева – 19.2% или 78/410, справа – 15.6% или 64/410,  $\chi^2 < 1.7$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0.19$ ). Эти отличия отсутствуют у самок: на левой стороне – 17.1% (83/486) и на правой стороне – 17.5% (85/486,  $\chi^2 < 0.1$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0.85$ ), но выражены у самцов: на левой



**Рис. 5.** Частоты самцов, имеющих добавочные элементы на первом (1), первом и втором (2) и на втором (3) верхних молярах в первой (A), во второй (B), в третьей (C) и суммарно в трех (D) колониях узкочерепной полевки.

стороне – 9.3% (47/504) и на правой стороне – 16.3% (82/504,  $\chi^2 > 10.8$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ).

Различия в поколениях по этому признаку проявляются при взаимодействии с возрастом. В молодом возрасте различия между поколениями отсутствуют (0–2: 10.1%, 67/664, 3–5: 12.1%, 82/680,  $\chi^2 = 1.3$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.25$ ). В возрасте старше 5 мес. они выражены (0–2: 27.8%, 89/320, 3–5: 18.7%, 59/316,  $\chi^2 = 7.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ).

Они также могут проявляться в разных колониях у разных полов. Так, во второй колонии они выражены у самок (0–2: 13.8%, 21/152, 3–5: 4.8%, 5/104,  $\chi^2 = 5.5$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ) и отсутствуют у самцов (0–2: 10.0%, 18/180, 3–5: 12.2%, 18/148,  $\chi^2 = 0.4$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.53$ ). Напротив, в третьей колонии различия выражены у самцов (0–2: 17.0%, 38/224, 3–5: 7.8%, 14/180,  $\chi^2 = 7.5$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ) и отсутствуют у самок (0–2: 22.6%, 48/212, 3–5: 20.0%, 42/204,  $\chi^2 = 0.3$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.61$ ). В первой колонии различия между поколениями не выражены ни у самок (0–2: 17.4%, 16/92, 3–5: 17.3%, 36/208,  $\chi^2 < 0.1$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.99$ ), ни у самцов (0–2: 12.1%, 15/124, 3–5: 17.1%, 26/152,  $\chi^2 = 1.4$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.25$ ).

**Выраженность признака.** Для оценки степени выраженности дополнительных элементов в заднем отделе M1 и M2 моляры делили на две категории. В первую вошли морфотипы 2.1 и 4.1, во вторую – морфотипы 2.2, 2.3, 4.2 и 4.3.

Лево-правостороннее положение моляров в челюсти не влияет на степень выраженности дополнительных элементов (29.2%, 38/130 и 28.7%, 48/167,  $\chi^2 < 0.1$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.92$ ). M1 и M2 также не различаются по этому параметру (25.5%, 36/141 и 32.1%, 50/156,  $\chi^2 < 1.5$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0.21$ ).

Частота моляров второй категории выраженности увеличивается с возрастом от 14.8% (22/149) у молодых особей до 43.2% (64/148,  $\chi^2 > 5.7$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ) у полевок старше 5 мес. Возрастные различия выражены в первой (10.0%, 3/30 и 33.3%, 21/63,  $\chi^2 > 5.7$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ) и третьей (12.5%, 13/96 и 54.4%, 25/46,  $\chi^2 > 28.2$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) колониях. Но не выражены во второй колонии (30.4%, 7/23 и 46.2%, 18/39,  $\chi^2 = 1.5$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.23$ ).

У самцов выраженность признака представлена в большей степени (34.9%, 45/129), чем у самок (24.4%, 41/168, Fisher exact,  $P = 0.03$ ). В первой возрастной группе половые различия не выражены: 14.6% (9/64) против 15.3% (13/85, Fisher exact,  $P = 0.51$ ), зато во второй группе имеются: 55.4% (36/65) против 33.7% (28/83, Fisher exact,  $P < 0.01$ ). В первой колонии наблюдается сходная ситуация: в молодом возрасте у самцов имеем 0% (0/10) против 15% у самок (3/20, Fisher exact,  $P = 0.28$ ), в старшем возрасте имеем 48.4% (15/31) против 18.8% (6/32, Fisher exact,  $P < 0.02$ ). Во второй колонии у молодых полевок выраженность признака выше у самцов (53.8%, 7/13), чем у самок (0%, 0/10, Fisher exact,  $P < 0.01$ ). Зато в старшем возрасте половых различий нет: 52.2% (12/23) против 37.5% (6/16, Fisher exact,  $P = 0.28$ ). В третьей колонии в молодом возрасте различия также присутствуют, но у самцов значение ниже (4.9%, 2/41), чем у самок (18.2%, 10/55, Fisher exact,  $P < 0.05$ ). В старшем возрасте в этой колонии частота у самцов (81.2%, 9/11) выше, чем у самок (45.7%, 16/35, Fisher exact,  $P < 0.04$ ).

Частота моляров второй категории выраженности уменьшается в чреде поколений (0–2: 37.2%, 58/156, 3–5: 19.9%, 28/141,  $\chi^2 = 10.8$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ). Эта особенность выражена у самок (0–2: 37.6%, 32/85, 3–5: 10.8%, 9/83,  $\chi^2 = 16.3$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ).

< 0.0001). Но она отсутствует у самцов (0–2: 36.6%, 26/71; 3–5: 32.8%, 19/58,  $\chi^2 = 0.2$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.64$ ). Она отсутствует в более молодом возрасте (0–2: 13.4%, 9/67, 3–5: 15.8%, 13/82,  $\chi^2 = 0.2$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.67$ ), но присутствует в возрасте старше 5 мес. (0–2: 55.1%, 49/89, 3–5: 25.4%, 15/59,  $\chi^2 = 12.7$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ).

**Модульная изменчивость.** В соответствии с модульным подходом считали, что фенотип AF проявился у особи независимо от того, присутствуют дополнительные элементы на одном, двух, трех или четырех молярах. Частота особей с AF фенотипом в колонии 1 составляет 35.4% (51/144). В возрасте от 1 до 5 мес. она ниже 21.3% (17/80), чем в старшем возрасте (53.1%, 34/64, Fisher exact,  $P < 0.0001$ ). В колонии 2 она составляет 21.9% (32/146) и с возрастом также увеличивается с 13.0% (12/92) до 37.0% (20/54, Fisher exact,  $P < 0.001$ ). В колонии 3 эта частота составляет 34.2% (70/205) и тоже увеличивается с возрастом с 30.5% (50/164) до 48.8% (20/41, Fisher exact  $P < 0.03$ ). Различия в частоте признака между колониями присутствуют в более молодом возрасте ( $\chi^2 = 10.3$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.01$ ) и не выражены в возрасте старше 5 мес. ( $\chi^2 = 3.2$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.21$ ).

Отсутствует влияния пола (самки: 32.1%, 78/243, самцы: 29.8%, 75/252, Fisher exact,  $df = 1$ ,  $P = 0.32$ ), поколений (0–2: 31.3%, 77/246; 3–5: 30.5%, 76/249, Fisher exact,  $df = 1$ ,  $P = 0.46$ ) и их взаимодействия (Fisher exact,  $df = 1$ ,  $P > 0.27$ ) на проявление AF фенотипа у особей (LLA:  $P > 0.09$ ).

**Выраженность фенотипа AF.** Выраженность фенотипа AF с возрастом увеличивается. В первой возрастной группе частота особей с AF фенотипом 2 и 3 градаций составляет 12.7% (10/79), тогда как в возрасте старше 5 мес. она равна 43.2% (32/74, LLA:  $\chi^2 = 15.1$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ).

Эта частота падает в чреде поколений. У полевок 0–2 поколений она выше 37.7% (29/77), чем у особей 3–5 поколений 17.1% (13/76, LLA:  $\chi^2 = 6.6$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ). Кроме того, у полевок 0–2 поколений она увеличивается с возрастом с 11.8% (4/34) до 58.1% (25/43, Fisher exact,  $P < 0.001$ ). А у полевок 3–5 поколений возрастные различия по этому показателю статистически недостоверны (13.3%, 6/45 и 22.6%, 7/31, Fisher exact,  $P = 0.23$ ). Уменьшение этого показателя в чреде поколений выражено у самок (0–2: 47.2%, 17/36 и 3–5: 9.5%, 4/42, Fisher exact,  $P < 0.001$ ), а у самцов различия между поколениями не выражены (0–2: 29.3%, 12/41 и 3–5: 26.5%, 9/34, Fisher exact,  $P = 0.50$ ). Колонии не отличаются по степени выраженности фенотипа AF ( $\chi^2 = 2.5$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.29$ ). Доля особей с более сильной выраженностью составляет 31.4% (16/51) в первой, 34.4% (11/32) во второй и 21.4% (15/70) в третьей колонии. Таким образом, степень выраженности фенотипа AF увеличивается с возрастом и уменьшается у самок в

чреде поколений. Возрастные различия также за-  
тухают в чреде поколений.

Был рассмотрен еще один модульный показатель, такой как число моляров у особи, имеющих дополнительные элементы. По этому показателю были обнаружены только различия между самками и самцами (LLA:  $\chi^2 = 5.7$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ). У самок доля особей с 3–4 молярами, имеющими дополнительные элементы, выше (33.3%, 26/78), чем у самцов (14.7%, 11/75). Ни принадлежность к разным колониям (LLA:  $\chi^2 = 0.7$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.70$ ), возрастным группам (LLA:  $\chi^2 = 0.5$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.46$ ) или поколениям (LLA:  $\chi^2 = 0.2$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.65$ ) не оказывает влияние на этот показатель. Число моляров у особи, имеющих дополнительные элементы, показывает взаимосвязь с таким показателем как степень выраженности AF фенотипа (LLA:  $\chi^2 = 10.3$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.002$  и  $\chi^2 = 21.3$ ,  $df = 6$ ,  $P < 0.002$ ,  $R_s = 0.27$ – $0.35$ ,  $P < 0.001$ ). Самая высокая ранговая корреляция Спирмена наблюдается тогда, когда обе переменные представлены полным числом градаций ( $4 \times 3$ ). В таком варианте сравнений самки ( $R_s = 0.27$ ,  $P < 0.02$ ) и самцы ( $R_s = 0.43$ ,  $P < 0.001$ ) имеют сходные и статистически значимые значения.

Так как на проявление фенотипа AF в рамках рассмотрения по сумме моляров не влияет пол особи, то дальнейший анализ проводили по обоим полам. Результаты посемейных расщеплений по фенотипу AF в разных вариантах скрещивания приведены в табл. 1. Характер генетической детерминации фенотипа AF оказался относительно простым.

**Гипотеза генетической детерминации** предполагает, что присутствие фенотипа AF у особей *L. gregalis* определяются моногенно. Особи с фенотипом AF являются доминантными гетерозиготами или гомозиготами. Особи с фенотипом tf являются рецессивными гомозиготами. В редких случаях среди них могут присутствовать доминантные гетерозиготы. Какой фенотип (tf или AF) реализует доминантна гетерозигота может зависеть от влияния генов-модификаторов.

**Анализ расщеплений.** При скрещивании родителей с фенотипом AF в семье № 1 имеется только один потомок с фенотипом AF (табл. 1). Соответственно, родители могли быть оба доминантными гетерозиготами ( $\chi^2 = 0.33$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.56$ ) либо по крайней мере один из них мог быть доминантной гомозиготой. В семьях № 2–8 наблюдаемое соотношение фенотипа tf к фенотипу AF согласуется с отношением моногенного расщепления 1 : 3 ( $\chi^2 = 0.6$ – $2.7$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.09$ – $0.80$ ). Особи с фенотипом AF – доминантные гетерозиготы, которые показывают полное проявление.

В семьях № 9–12 наблюдаемое расщепление отличается от ожидаемого 1 : 3 статистически зна-

**Таблица 1.** Расщепление по признаку дополнительные элементы в задней части первого и второго верхних моляров в потомстве родителей разных фенотипов

№ семьи	Фенотип родителей	Фенотип потомков		
		Typical form	Atypical form	всего
1	Atypical form × atypical form	0	1	1
2		1	4	5
3		2	4	6
4		1	2	3
5		2	3	5
6		5	7	12
7		1	1	2
8		2	1	3
9		4	2	6
10		24	16	40
11		15	5	20
12		13	1	14
13	Atypical form × typical form	3	6	9
14		1	2	3
15		1	2	3
16		1	2	3
17		1	1	2
18		1	1	2
19		3	2	5
20		3	2	5
21		5	3	8
22		14	1	15
23		11	3	14
24		9	3	12
25		24	11	35
26	Typical form × typical form	0	1	1
27		1	3	4
28		4	3	7
29		3	1	4

чимо ( $\chi^2 = 5.5-34.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ) с проявлением AF фенотипа от 10% до 53% в среднем 40%. В семьях № 10 и № 11 особи с фенотипом AF в возрасте старше 5 мес. показывают полное проявление ( $\chi^2 = 0.3-0.6$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.44-0.56$ ), тогда как у молодых полевок в этих семьях проявление неполное (28 и 50%,  $\chi^2 = 26.8-29.5$ ,  $df = 1$ ,  $P < 1 \times 10^4$ ). В семьях № 9 и № 12 возрастные различия не выражены.

На то, что неполное проявление фенотипа AF связано с влиянием генов-модификаторов, указывает следующий факт. В семье № 12 у потомков выражено неполное проявление ( $\chi^2 = 34.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 1 \times 10^{-7}$ ). У самца из этой семьи с другой сам-

кой в семье № 3 у потомков проявление полное ( $\chi^2 = 0.2$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.64$ ). Самка из семьи № 12 с другим самцом в семье № 6 имеет потомков с полным проявлением фенотипа AF ( $\chi^2 = 1.8$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.18$ ).

В скрещиваниях родителей с фенотипом AF и tf в семьях № 13–21 соотношение фенотипа tf к фенотипу AF согласуется с отношением моногенного расщепления 1 : 1 ( $\chi^2 = 0.0-1.0$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.32-1.0$ ). Следовательно, особи с фенотипом AF – доминантные гетерозиготы, которые показывают полное проявление. Расщепление в семьях № 13–18 также согласуется с соотношением 1 : 3 ( $\chi^2 = 0.11-0.67$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.41-0.74$ ), следова-

тельно родитель с фенотипом *tf* в этих семьях может быть непроявившейся доминантной гетерозиготой. Это маловероятно для такого родителя в семьях № 19–21 ( $\chi^2 = 3.3-6.0$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.02-0.07$ ). Наблюдаемое расщепление в семьях № 22, 23 и 25 отличается от ожидаемого 1 : 1 статистически значимо ( $\chi^2 = 4.6-34.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.032$ ), а в семье № 24 – на уровне тенденции ( $\chi^2 = 3.0$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.083$ ) с проявлением АФ фенотипа от 13 до 63% в среднем 42%. У полевок в возрасте 1–5 мес. в семьях № 22–25 наблюдаемое расщепление отличается от ожидаемого 1 : 1 ( $\chi^2 = 5.0-13.4$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.03-0.001$ ) с проявлением АФ фенотипа от 0% до 30% в среднем 7%. В большем возрасте в семьях № 22–24 соотношение фенотипа *tf* к фенотипу АФ согласуется с отношением моногенного расщепления 1 : 1 ( $\chi^2 = 0.0-1.0$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.32-1.0$ ). В этом возрасте в семье № 25 число потомков с фенотипом АФ (7) статистически значимо превышает число особей с фенотипом *tf* (1,  $\chi^2 = 4.5$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.04$ ). Видимо в этой семье проявилось избирательное попадание особей с фенотипом АФ в старшую возрастную группу.

В скрещиваниях родителей с фенотипом *tf* в семьях № 26–29 соотношение фенотипа *tf* к фенотипу АФ среди потомков согласуется с отношением моногенного расщепления 1 : 1 ( $\chi^2 = 0.14-1.0$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.32-0.71$ ). Следовательно, один из родителей является непроявившейся доминантной гетерозиготой. Для семей № 26 и № 27 оно также согласуется с соотношением 1 : 3 ( $\chi^2 = 0.0-0.33$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.56-1.0$ ), поэтому второй родитель в этих семьях может быть непроявившейся доминантной гетерозиготой. Это маловероятно для второго родителя в семьях № 28 и № 29 ( $\chi^2 = 3.9-5.3$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.02-0.05$ ).

Таким образом, особи с фенотипом АФ – доминантные гетерозиготы. В редких случаях можно допустить, что среди них могут встретиться доминантные гомозиготы. Доминантные гетерозиготы могут показывать как полное, так и неполное проявление. В ряде случаев их проявление увеличивается с возрастом от неполного к полному. Неполное проявление фенотипа АФ связано с влиянием генов-модификаторов. Особи с фенотипом *tf* в подавляющем большинстве – это рецессивные гомозиготы. Однако, среди них могут встречаться доминантные гетерозиготы с неполным проявлением.

Выявленный морфологический модуль присутствия дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров имеет генетическую основу, что согласуется с представлением о генетической компоненте интеграции и модульности морфологических структур (Klingenberg, 2014).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Модульность как взаимосвязь изменчивости признаков. Наиболее простой билатеральный модуль представляет собой взаимосвязь (корреляцию) изменчивости морфологических признаков на левой и правой стороне челюсти, черепа или тела. Это первый уровень интеграции. При наличии аналогичных структур, например моляров, модуль может иметь последующий уровень интеграции. В нашем случае это первый и второй верхние моляры. Взаимосвязь изменчивости признаков на этих молярах будет представлять собой второй уровень морфологического модуля. Это будет представлять иерархию модулей (Klingenberg, 2014, Esteve-Altava, 2017a, b). При изучении внутримодульной изменчивости было установлено, что по частоте экземпляров с наличием дополнительных элементов в заднем отделе первый и второй верхние моляры не различаются. Похожая ситуация наблюдается в одной (под № 26) из 17 локальных выборок у *Terricola savii* (Selys, 1838) – М1: 30.3%, 10/33, М2: 40.0%, 14/35, Fisher exact,  $P = 0.28$  по (Contoli, 1980). Сходные результаты наблюдаются в сборной выборке *Chionomys nivalis* (Martins, 1842) из Альп – М1: 3.2%, 4/126, М2: 4.0%, 5/126, Fisher exact,  $P = 0.50$  по (Ангерманн, 1973). В сборной выборке *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), собранной в течение 55 лет из разных локалитетов по всей стране, наблюдаются подобные результаты – М1: 59.7%, 40/67, М2: 38.8%, 26/67, Fisher exact,  $P = 0.10$  по (Dienske, 1969).

Однако в природных выборках частота присутствия дополнительных элементов в заднем отделе на М2 чаще выше, чем на М1 (Громов, Поляков, 1977, Kryštufek, Shenbrot, 2022). Так у *T. savi* выделяются четыре группы, состоящие из однородных по частоте как М2, так и М1 выборок, которые показывают различные соотношения частот проявления дополнительных элементов на М1 и М2 по (Contoli, 1980). Первая группа состоит из 3 выборок с номерами 1, 10 и 15 и имеет наиболее высокие частоты как М2: от 57 до 89% в среднем 74% (58/78), так и на М1: в среднем 12% (9/78). Возможно, в этих выборках животные более старые. По нашим данным возраст в наибольшей степени (примерно в два раза) способен повышать частоту проявления дополнительных элементов. В остальных 3 группах средняя частота проявления для М2 меняется от 23 до 39%, а для М1 – от 1 до 3%. Три аллопатрических разновидности: *T. savi*, *T. brachycercus* (Lehmann, 1961) и *T. nebrodensis* (Minà-Palumbo, 1868) недавно были выделены в пределах этого вида (Bezerra *et al.*, 2016). Две выборки (№ 30 и № 31), взятые из района обитания *T. brachycercus*, и одна выборка (№ 33), взятая из района обитания *T. nebrodensis*, входят в последние 3 группы, так что внутривидовые различия по соотношения частот проявления дополнитель-

ных элементов на М1 и М2 у *T. savi*, выражены сильнее, чем различия между близкими видами в группе видов *savi*.

Выраженность (две градации) проявления дополнительных элементов у *T. savi* прослеживается только для М2. Она сходная в группах выборок и колеблется в среднем от 26 до 47% (вторая градация) и отсутствует в выборке № 26 (все М2 первой градации).

Дополнительные элементы проявляются с большей частотой на М2: 34.2%, 130/380, чем на М1: 8.2%, 31/380,  $\chi^2 = 76$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$  у *Terricola majori* (Thomas, 1906) из Теберды и Кавказа. У *Terricola subterraneus* из Альп для М2 частота составляет 53.2%, 42/79 и выше, чем для М1: 5.1%, 4/79, Fisher exact,  $P < 0.0001$ . Для *T. subterraneus* (Selys, 1836) из Саксонии для М2 частота составляет 59.2%, 58/98 и также выше, чем для М1: 4.0%, 4/100, Fisher exact,  $P < 0.0001$ . Для этого же вида из Тюрингии частота составляет для М2 70.4%, 38/54 и также выше, чем для М1: 18.5%, 10/54, Fisher exact,  $P < 0.0001$  по (Ангерманн, 1973).

У *Chionomys roberti* (Thomas, 1906) (Турция, Кавказ) частота проявления дополнительных элементов на М2: 11.2%, 17/152 также выше, чем на М1: 1.3%, 2/152, Fisher exact  $P < 0.0001$  по (Ангерманн, 1973).

Для полевок подрода *Sumeriomys* из Малой Азии частота проявления дополнительных элементов также выше на М2: 50.0%, 63/126, чем на М1: 20.6%, 26/126, Fisher exact  $P < 0.0001$ . Для таких же полевок из Передней Азии эта частота составляет для М2: 62.1%, 72/116, а для М1: 6.0%, 7/116, Fisher exact  $P < 0.0001$  (Ангерманн, 1973). Обе выборки видимо представляют сборные группы из различных видов и подвидов подрода *Sumeriomys*. Показано, что особи отдельных представителей этого подрода как в Малой, так и Передней Азии могут иметь дополнительные элементы на М1 и М2 (Kryštufek, Shenbrot, 2022).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено, что изменчивость дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров у *L. gregalis* образует морфологический модуль, имеющий иерархическую структуру. Первый уровень модуля — билатеральной симметричности более стабильный. Колонии, а также самцы и самки не отличия по частотам распределения особей, имеющих добавочные элементы на левой, на левой и правой и на правой сторонах челюсти. Второй уровень — присутствием или отсутствием дополнительных элементов на первом и втором верхних молярах более мобильный. Колонии отличаются по частотам распределения особей с добавочными элементами, также выражены половые различия. Однако, в однополых выборках отличия между колониями отсутствую-

ют. У самок величина взаимосвязи между присутствием или отсутствием добавочных элементов на первом и втором верхних молярах оказалась в два раза выше, чем у самцов. У самок распределение особей, имеющих добавочные элементы на первом, первом и втором и на втором молярах, симметричное, а у самцов оно асимметричное.

Основная составляющая модульной изменчивости — это увеличение частота особей с АФ фенотипом с возрастом. Степень выраженности фенотипа АФ также увеличивается с возрастом, но уменьшается в чреде поколений и показывает взаимосвязь с таким показателем как число моляров у особи, имеющих дополнительные элементы.

Присутствие фенотипа АФ у особей *L. gregalis* определяются моногенно. Особи с фенотипом АФ являются доминантными гетерозиготами или гомозиготами. Какой фенотип (тf или АФ) реализует доминантная гетерозигота может зависеть от влияния генов-модификаторов. Выявленный морфологический модуль присутствия дополнительных элементов в заднем отделе первого и второго верхних моляров имеет генетическую основу.

Внутримодульная изменчивость (когда за единицу изменчивости взят моляр, а не особь) существенно в большей степени подвержена влиянию внутригрупповых (внутрипопуляционных) факторов. Все исследователи, занимающиеся изучением присутствия дополнительных элементов в заднем отделе М2 и М1, использовали именно подобный подход. Неудивительно, что результаты показывают высокую изменчивость. Кроме того, никто не занимался оценкой влияния даже таких обычных внутрипопуляционных факторов, как пол и возраст. В настоящей работе впервые показано влияние внутригрупповых факторов на частоту встречаемости дополнительных элементов в заднем отделе М2 и М1.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор благодарит анонимных рецензентов за важные замечания.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН 122021000094-3.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ангерманн Р. Гомологическая изменчивость коренных зубов у полевок (Microtinae) // Проблемы эволюции. Новосибирск: Наука, 1973. Вып. 3. С. 104–118.
- Громов И.М., Поляков И.Я. Фауна СССР. Млекопитающие. Т. 3. Вып. 8. Л.: Наука, 1977. 502 с.



- Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран (звери Восточной Европы и Северной Азии). Т. 7. Microtinae. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950. 736 с.
- Покровский А.В., Большаков В.Н. Экспериментальная экология полевок. М.: Наука, 1979. 147 с.
- Шварц С.С., Копеин К.И., Покровский Ф.В. Сравнительное изучение некоторых биологических особенностей полевок и их помесей // Зоол. журн. 1960. Т. 39. Вып. 6. С. 912–926.
- Bezerra A.M., Annesi F., Aloise G., Amori G., Giustini L., Castiglia R. Integrative taxonomy of the Italian pine voles, *Microtus savii* group (Cricetidae, Arvicolinae) // Zool. Scr. 2016. V. 45. № 3. P. 225–236.
- Contoli L. Les Pitymys de l'Italie centrale occidentale (Rodentia, Arvicolidae). Données craniométriques et dentaires // Mammalia. 1980. V. 44. P. 319–337.
- Dienske H. Notes on differences between some external and skull characters of *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) and of *Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761) from the Netherlands // Zool. Meded. 1969. V. 44. № 6. P. 83–108.
- Esteve-Altava B. In search of morphological modules: a systematic review // Biol. Rev. 2017a. V. 92. № 3. P. 1332–1347.  
<https://doi.org/10.1111/brv.12284>
- Esteve-Altava B. Challenges in identifying and interpreting organizational modules in morphology // J. Morphol. 2017b. V. 278. № 7. P. 960–974.  
<https://doi.org/10.1002/jmor.20690>
- Klingenberg C.P. Studying morphological integration and modularity at multiple levels: Concepts and analysis // Phil. Trans. R. Soc. B. 2014. V. 369. № 1649. P. 20130249.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0249>
- Kryštufek B., Shenbrot G. Voles and Lemmings (Arvicolinae) of the Palaearctic Region. Maribor: Sloven. Research Agency, 2022. 449 p.
- Petrova T.V., Zakharov E.S., Samiya R., Abramson N.I. Phylogeography of the narrow-headed vole *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Cricetidae, Rodentia) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences: an echo of Pleistocene prosperity // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2015. V. 53. № 2. P. 97–108.  
<https://doi.org/10.1111/jzs.12082>

## Additional Elements in the Posterior Part of the First and Second Upper Molars in *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Rodentia: Cricetidae)

M. I. Cheprakov<sup>#</sup>

*Institute of Plant and Animal Ecology, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: Cheprakov@ipae.uran.ru*

It was found that the variability of additional elements in the posterior part of the first and second upper molars in *L. gregalis* forms a morphological module with a hierarchical structure. This module is designated as an atypical form (Atypical Form), and its phenotype as AF. The phenotype of the typical form is designated as tf (typical form). The main component of modular variability is an increase in the frequency of individuals with AF phenotype with age. The severity of this phenotype also increases with age. The presence of the AF phenotype in individuals is determined monogenously. Individuals with the AF phenotype are dominant heterozygotes or homozygotes. Which phenotype (tf or AF) the dominant heterozygote implements may depend on the influence of modifier genes. The revealed morphological module of the presence of additional elements in the posterior part of the first and second upper molars has a genetic basis.

*Keywords:* *Lasiopodomys gregalis*, additional elements on M1 and M2, phenotypic variability, morphological modularity, inheritance



УДК 599.363

## К ЭКОЛОГИИ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ — *Microtus arvalis* Pall. И *Microtus rossiaemeridionalis* Ognev НА СЕВЕРНОЙ ПЕРИФЕРИИ АРЕАЛА

© 2023 г. Э. В. Ивантер\*, \*\*, @

\* Петрозаводский государственный университет, просп. Ленина, 33, Петрозаводск, 185910 Россия

\*\* Карельский научный центр РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185000 Россия

@E-mail: Ivanter@petsu.ru

Поступила в редакцию 07.08.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 11.06.2023 г.

На основании многолетних (1958–2018 гг.) полевых и стационарных исследований дана характеристика численности, демографической структуры популяции, хода репродукции, питания и других экологических особенностей, общих для видов-двойников обыкновенной полевки (*Microtus arvalis* sensu lato). Установлено, что в прошедшее шестидесятилетие северная граница их распространения сначала переместилась к северу и достигла 63°40' с.ш., а затем также быстро отступила к югу. Причина последнего — резкое сокращение посевных площадей, прежде всего, зерновых, в связи с переориентацией сельского хозяйства с зернового на молочно-овощное. Это, а также замещение обыкновенных полевков аборигенными видами грызунов (экономкой, водяной, темной и рыжей полевками) вызвало резкое сокращение численности и сужение ареала видов в восточных районах Фенноскандии. В питании видов-двойников основное место занимает зеленая масса травянистых растений (показатель встречаемости 72%), меньшую — семена (25%) и совсем редкий компонент — кора деревьев (3%). В условиях северной периферии ареала размножение протекает лишь в течение одного, причем достаточно ограниченного, весенне-летнего сезона. Возрастной и половой состав населения неоднороден и меняется по сезонам.

**Ключевые слова:** ареал, виды-двойники, популяция, динамика численности, биотопическое размещение, уровень репродукции, интенсивность размножения, плодовитость, особенности питания

DOI: 10.31857/S1026347022600881, EDN: NZFQVS

Вопросу дифференциации хромосомных видов-двойников серых полевков группы *arvalis*, обитающих в Восточной Фенноскандии в условиях северной периферии ареала, до последнего времени практически не уделялось должного внимания. Тем не менее установлено, (Малыгин, 1983; Соколов и др., 1994; Громов, Ембаева, 1995; Мейер и др., 1996; Бобров и др., 2008; Хляп, Варшавский, 2010; Малыгин и др., 2019), что в северной части европейской области распространения, в том числе и в Карелии, встречаются, хотя и не часто, оба вида, причем считается, что преобладающим из них является обыкновенная полевка. Что же касается различий в образе жизни, то в целом, по мнению большинства исследователей, они вряд ли существенны (Малыгин, 1974; Жигарев, 1993, 2004; Доброхотов и др., 1985; Баскевич и др., 2009, 2012; Малыгин, Рябов, 2013, Жигарев и др., 2019), что и позволило нам приводить полученные по их экологии материалы совместно, не разделяя их по видам.

Обыкновенная и восточноевропейская полевки, обе обитатели нелесных биотопов (Башенина, 1962; Малыгин, 1974; Доброхотов и др., 1985; Жигарев, 1993, 2004, Малыгин, Рябов, 2013). Использование ими лесных местообитаний ограничено нарушенными участками, такими как лесопарки, сады, рекреационно-нарушенные леса (Мейер и др., 1996; Карасева и др., 1999; Ермолаева и др., 2000; Жигарев, 2004). По мнению В.М. Малыгина (1983), восточноевропейские полевки в большей степени, чем обыкновенные, занимают пограничные местообитания, сочетающие луга и поля с кустарниками и садами. В целом же в большинстве мест, при совместном обитании видов-двойников, обычно численно доминируют обыкновенные полевки, лишь в природных биотопах Москвы восточноевропейские полевки в этой паре видов преобладают (Жигарев и др., 2019). Большую склонность к обитанию *Microtus rossiaemeridionalis* на урбанизированных территориях отмечают многие исследователи (Карасева и др., 1999; Ермолаева и др., 2000; Жигарев, 2004; Жигарев и др.,

2019). Имеются данные об определенной склонности восточноевропейских полевков к заселению хозяйственных построек человека (Жигарев, 1993). Кроме того, были обнаружены и некоторые отличия в предпочтении видами-двойниками различных типов антропогенных биотопов. Так, обыкновенные полевки чаще занимают влажные и мезофильные луга и поля, а восточноевропейские — более сухие участки. Отмечено также, что восточноевропейские полевки достигают большей численности на сильно нарушенных человеком территориях (Жигарев, 2004).

Такова общая ситуация с существованием видов-двойников обыкновенной полевки в различных частях их ареала. Этому соответствует и крайняя территориальная неравномерность их изученности. В итоге большинство публикаций, касающихся экологии этих видов, относится к центральным и южным районам Европейской России (Виноградов, 1934; Формозов, 1947; Огнев, 1950; Карасева, Кучерук, 1954; Башенина, 1962, 1968, 1977; Лапинь, 1063; Громов, Поляков, 1977; Мейер и др., 1996; Малыгин, 1983; Соколов и др., 1994; Жигарев, 2004; Баскевич и др., 2009), приграничные же их популяции, и в том числе занимающие северную периферию ареала, изучены совершенно недостаточно. Появляющиеся от случая к случаю и, как правило, фрагментарные исследования видов-двойников в этих условиях крайне немногочисленны и спорадичны (Исаков, 1939; Снигиревская, 1954; Марвин, 1959; Айрапетьян, 1970). Настоящее сообщение — достаточно скромная попытка частично восполнить этот существенный пробел.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящей работы послужили проводившиеся в Карелии многолетние (1958–2018 гг.) сборы зверьков рассматриваемых видов *Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*, отлавливаемые при учетах численности двумя основными методами: ловушко-линиями (плашки Геро) и ловчими 30-метровыми канавками. При этом общий объем проведенных нами учетов составил свыше 360 тыс. ловушко-суток и более 9 тыс. канавко-суток. В итоге на ловушко-линиях, относительно равномерно разбросанных по всей исследованной территории было поймано 33 обыкновенные полевки, а в ловчие канавки — 45. Таким образом, общее число добытых и исследованных нами при вскрытии особей рассматриваемых видов-двойников составило 78. К ним можно добавить 144 экз. недифференцированных по видам зверьков, добытых в антропогенном ландшафте в различных районах Карелии в период до 1960-х гг., сведения по которым сохранились в архивах Института биологии Карельского центра

РАН (в картотеке и коллекционных журналах того времени).

Устройство нор изучали путем их раскапывания и зарисовки на планшетах, питание — посредством разбора поедой на кормовых столиках и при анализе содержимого желудков, возраст — по конфигурации черепа и стертости зубов, активность репродукции, зрелость и активность половой системы — по ее состоянию и характерным изменениям у вскрытых животных. Оценку динамики численности, полового и возрастного состава популяции, а также биотопического размещения животных, проводили по общепринятым методикам (Новиков, 1953; Карасева и др., 2008).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Численность и ее изменения*

Проводившееся на Северо-западе России многолетние учеты численности мелких млекопитающих (1965–2018 гг.) показывают, что в изученном регионе оба вида обыкновенной полевки встречаются спорадически и в целом редки. В коллекционных сборах 1948–1972 гг., их насчитывалось всего 49 экз., в Карельской же части бывшего ареала численность вида и вовсе упала до нуля. Правда, затем, с 2001 по 2011 гг., представители этого вида снова стали ежегодно попадаться по несколько экземпляров в уловах наших южных стационаров — Приладожском (Карку, Питкярантский р-н Карелии) и Каскеснаволоцком (Пряжинский). В первом из них после почти 40-летнего перерыва зверьков этого вида впервые (6 экз.) отловили на линиях ловушек в 2001 г., а затем в ловчие канавки — в 2005 (1 экз.), 2009 (3) и 2011 (1), после чего они полностью исчезли. В Каскеснаволоке же с 2001 г. она по несколько экземпляров ловилась ежегодно, но с 2012 г. снова перестала появляться в уловах и отсутствует в них до сих пор, причем это касается обоих южных стационаров (Якимова, 2018). Показательны в этом отношении и учеты в окрестностях с. Кончезеро (Кондопожский р-н Средней Карелии). Если в 1948–1956 гг. обыкновенная полевка составляла здесь от 3 до 10% отловленных зверьков, то в 1966–1972 гг. она вообще не была здесь ни разу встречена. То же самое происходило и в Лахденпохском районе. В 1951 г. здесь отловили 22 экз. обыкновенных полевков, или 3% от общего числа отловленных зверьков, тогда как проведенные там же учеты в 1959 и 1961 гг. вообще не выявили присутствие этого вида. Причем, это связано с тем, что на Северо-Западе России происходит, связанное с переходом на молочно-овощное сельское хозяйство, резкое сокращение зерновых площадей, что вместе с вытеснением обыкновенной полевки аборигенными видами грызунов и вызвало резкое сокращение численности и сужение ее ареала.

В общем же, как показывают учеты, на таежном Северо-Западе России и, в частности, в Карелии численность видов-двойников обыкновенной полевки держится в последние десятилетия на крайне низком уровне: средний многолетний показатель учетов составил для них 0.06 экз. на 100 ловушко-суток (степень доминирования 0.05%) и 0.17 на 10 канавко-суток (0.2%). Недостаток подходящих местообитаний и основных кормов для обыкновенной полевки, связанный с переходом земледелия с зерновых на пропашные культуры, зарастанием полей сенокосных и выпасных лугов, исчезновением деревень и общим значительным сокращением сельхозугодий, а также вытеснение ее аборигенными видами грызунов (экономкой, водяной, темной и рыжей полевками) послужило для видов-двойников обыкновенной полевки главной причиной наблюдавшегося в последние годы сокращения численности и сужения ареалов на территории Карелии

По М.Я. Марвину (1959), волосяной покров обыкновенных полевых по сравнению с другими видами грызунов Карелии отличается наименьшей густотой. Это обстоятельство он считает главной причиной отсутствия представителей этих видов в северной половине республики.

Между тем, по мнению Н.В. Башениной (1962), проникновению обыкновенных полевых на Крайний Север препятствует весь комплекс экологических условий: заболачивание, малая площадь пашен, биоценотические конкурентные отношения с близкими видами и т.д. Это хорошо объясняет как процесс постепенного продвижения видов на север вслед за земледелием, так и отступление их в последние годы в связи с резким сокращением здесь посевных площадей под зерновые.

При стабильном чрезвычайно низком уровне численности обыкновенных полевых, характерном для всей территории Восточной Фенноскандии, как, впрочем, и для других периферических популяций этого, да и других видов наших мелких млекопитающих, уловить ее колебания ни по годам, ни по сезонам не представляется возможным. В других же регионах она демонстрирует вполне определенные периодически повторяющиеся подъемы и спады, позволяющие говорить о четкой их цикличности. Еще Н.В. Башениной (1962, 1977, 1994) было показано, что для рассматриваемых видов на всем протяжении их ареалов, скорее всего, можно с достаточной долей уверенности выделить определенную периодичность наступления пиков и депрессий численности с частотой их повторяемости через 3–5–8–12 лет. Правда, для всего ареала такой единой цикличности, наверное, и не существует, однако для отдельных, но достаточно больших территорий ее, как правило, удается вычленить. В частности, были установле-

ны и впоследствии многократно подтверждены “большие волны” колебания численности мышевидных грызунов на обширных территориях с периодом 10–11 лет и “малые волны” с периодом 3–5 лет на более локальных территориях.

По расстоянию между пиками определен 3–4-летний цикл у видов-двойников обыкновенной полевки а также темной и американских видов рода *Microtus* (Frank, 1957; Migula *et al.*, 1975), что позволило авторам считать цикличность, в принципе, присущей всем этим грызунам (Krebs, Myers, 1974), однако для тех же видов описываются и “нециклические популяции” (Krebs, Myers 1974; Keller, 1981), правда, при наблюдениях не более 5 лет. Тем не менее, проведенное математическое моделирование многолетней динамики численности изучаемых видов в условиях Стрелецкой степи (Баскевич и др., 2012) показало, что в наблюдаемых там изменениях прослеживается цикличность близкая к трехлетней, причем наряду с этим имеются все основания предполагать колебания с интервалом 10–11 лет. При этом особенно важно, что в данном случае гипотеза цикличности не задавалась в модели заранее, а была получена в результате учета экологических факторов.

В итоге удалось установить, что в связи с существенными изменениями, которые вносит в динамику численности исследуемых видов антропогенный пресс, наблюдаются периодически повторяющиеся всплески их численности. Так, в Польше установлены трехлетние циклы массового размножения грызунов с доминированием обыкновенной полевки (Пекарчик, 1983). На территории Молдавии в течение 1971–1986 гг. отмечены три высоких (1975, 1981, 1985) и четыре средних пика численности (Мунтяну и др., 1987). В Латвии массовые размножения (большие волны) повторяются через 9–12 лет (в среднем 11). Фазы с высоким уровнем численности обычно охватывали все районы республики и проявлялись в местах, где выращивались многолетние травы и озимые культуры (Тауриныш, 1964).

В течение 1978–2002 гг. сезонную и многолетнюю динамику численности обыкновенной полевки изучали в различных биотопах юго-западной и центральной Белоруссии (Блоцкая, Гайдук, 2004). В итоге удалось установить, что в связи с существенными изменениями, которые вносит в динамику численности этого вида антропогенный пресс, периодически повторяющиеся всплески его численности в естественных биотопах и агроценозах полностью не реализуются.

В этом ключ к эффективному прогнозированию и регулированию численности грызунов. Без знания реальных популяционных процессов, их закономерностей и определяющих факторов, не возможно ни управление природными популяциями и контролирование их численности, ни со-

хранение уникального природного баланса, ни рациональное земледелие.

#### *Биотопическое размещение*

Согласно В.М. Малыгину с соавторами (2019), собственно инвазионный процесс, заключающийся в ускоренном расселении видов далеко за пределы нативного ареала — у полевок группы “arvalis” повсеместно был связан с антропогенными факторами, и прежде всего с сельскохозяйственным освоением земель человеком. Будучи мезофильными видами, эти полевки изначально обитали во второстепенных по площади луговых участках лесостепей и северных степей, в основном расположенных вдоль рек и озер. В зоне же хвойных лесов подходящих для них местообитаний было крайне мало разве что мелкие разрозненные участки приречных и приручьевых лугов и и олуговевшие гари. В итоге изначально весь исконный ареал полевок группы “arvalis” представлял собой редкое “кружево”, и поселения этого вида нигде, тем более у границ ареала, не занимали фоновых биотопов (Тупикова и др., 2000; Бобров и др., 2008; Малыгин и др., 2019). Так постепенно новым местообитанием, значительно более благоприятным, чем исконные, оказались агроценозы, где рассматриваемые виды полевок достигали все более высоких показателей численности (Тупикова и др., 2000; Неронов и др., 2001), при этом площадь пригодных местообитаний росла по мере увеличения площадей пахотных земель и снижалась соответственно сокращению посевов зерновых. Все это и привело к становлению общей картины современного биотопического размещения видов-двойников обыкновенной полевки.

Как установлено нашими исследованиями, в настоящее время на таежном Северо-Западе России эти оба селятся преимущественно в открытых местообитаниях, включая культурные земли (сельскохозяйственные угодья и др.) — на возделываемых полях и среди посевов многолетних трав. Зимой же они встречаются в стогах сена и скирдах соломы, где обитают вместе с другими представителями рода *Microtus* — темной полевкой и экономкой, не избегая, впрочем, и соседства с рыжей полевкой. Очевидно, в этот период конкурентные отношения у этих видов выражены слабо. Близкие данные по особенностям современного биотопического размещению обыкновенных полевок получены и в других областях их ареала (Малыгин, 1974; Доброхотов и др., 1985; Соколов и др., 1994).

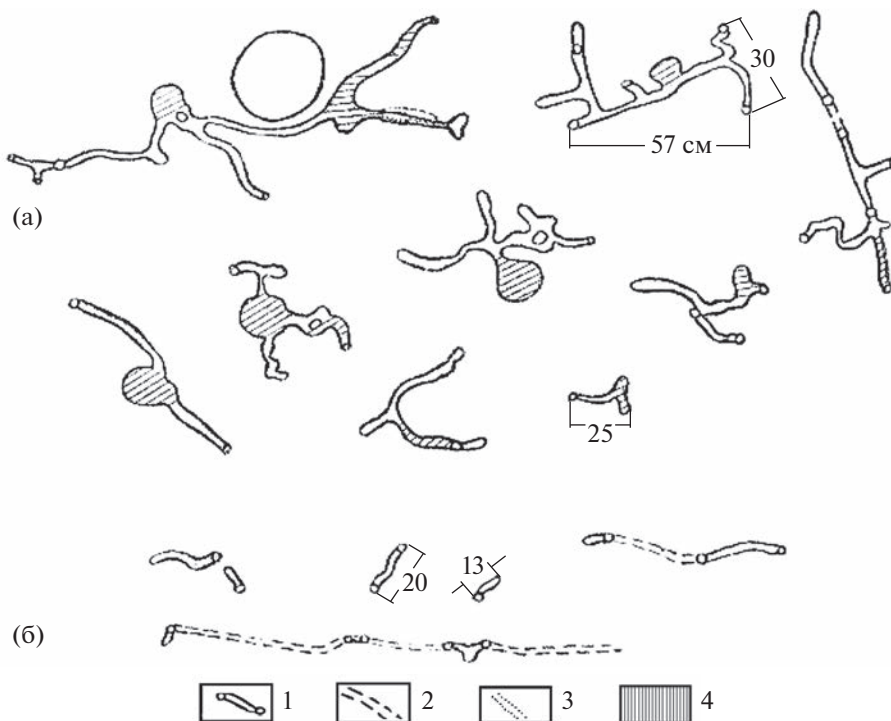
#### *Устройство убежищ*

Подземные убежища обыкновенные полевки устраивают обычно на небольшой глубине: чаще всего 10–30 см, а если глубже (например, в пахотном слое почвы), до 30 и даже 50 см, то норка кон-

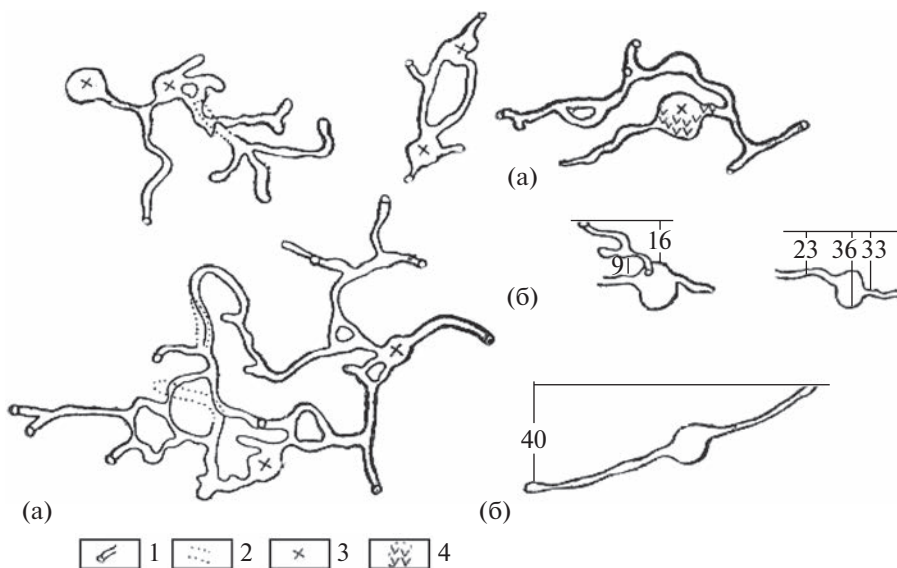
чается обычно глухой камерой и имеет один выход. Строение же гнездовых нор наиболее разнообразно (рис. 1, 2). Количество выходов бывает от 1 до нескольких десятков, но обычно не более 10. В наших условиях, как и вообще у северных границ ареала, где норная деятельность полевок наименее выражена, этот зверек довольствуется самыми примитивными по строению подземными жилищами с 1–2, реже 3–4 выходами. Общая длина норы редко превышает здесь 0.5–1, максимум — 1.5 м. Общая площадь раскопанных Н.В. Башениной (1962) гнездовых нор колебалась от 0.18 до 6 м<sup>2</sup>, в северных же районах, в том числе в Карелии, не превышала, по нашим данным, 0.5–1.5 м<sup>2</sup>. Расположенные на глубине до 60, но чаще в пределах 20–30 см, гнездовые камеры имеют обычно форму неправильного шара с диаметром не превышающим 9–17 (в среднем 14.5) см с отходящими от них на различной высоте от 1 до 3–4 ходов.

Гнездо устраивается из листьев и расщепленных вдоль на узкие полоски стеблей злаков. Изнутри оно обычно выстилается растительным пухом. Подснежные гнезда обыкновенных полевок размещаются на участках, где глубина снежного покрова превышает 40 см. Обычно они располагаются на межах, оврагах, стерне. Например, в Белоруссии (Блоцкая, Гайдук, 2004) плотность таких гнезд на 100 м<sup>2</sup> в различные годы варьировала от 1 до 3. Подснежные гнезда отличались там от летних большей толщиной стенок и теплой выстилкой. В основании гнезда в большинстве случаев присутствует земля, а в качестве строительного материала, как и летом, используются сухие стебли и листья растений. Так как в подснежных гнездах часто находятся несколько зверьков, то такие коллективные жилища имеют, по сравнению с летними гнездами, гораздо большие размеры. Диаметр подснежных гнезд, по их данным, варьировал в пределах 10–22, в среднем 15.6 см, высота 7–14, в среднем 11.2, см, толщина дна — 3–7, в среднем 5.1, см. Температура же в гнездах, в которых находились детеныши, колебалась от 17 до 35°C (ср. = 28.4 ± 1.3°C (n = 12)).

Иногда обыкновенные полевки делают убежища в несвойственных им местах. Один из таких случаев описывает Н.В. Башенина (1962), обнаружившая на севере Вологодской области на окраине обследованной ею заброшенной пашни небольшое поселение этих полевок, устроивших норы в старых замшелых грудах валунов, заросших травой и кустарником. Сеть тропинок в траве неизменно приводила к центру заросшей полосы, где под кустами и дерновинами можно было найти в земле 2–3 отверстия, остальными входами служили щели между камнями.



**Рис. 1.** Защитно-кормовые (а) и защитные (б) норы обыкновенной полевки. 1 – подземные ходы с отверстиями; 2 – наземные тропинки; 3 – подземные ходы (нижние этажи); 4 – запасы.



**Рис. 2.** Примеры строения гнездовых нор обыкновенной полевки: (а) – план; (б) – разрез (цифры – глубина в см). 1 – подземные ходы; 2 – ходы “нижних этажей”; 3 – жилые гнезда; 4 – старые гнезда.

*Питание*

Согласно проведенному нами исследованию содержимого 42 желудков, основную роль в питании обоих видов обыкновенных полевков играют зеленые части травянистых растений (показатель встречаемости 72%), меньшую – семена (25%) и

совсем редкий компонент – кора деревьев (3%). В то же время проведенное нами вслед за М.Я. Марвиным (1959) экспериментальное скармливание карельским полевкам различных кормов в неволе дополняет приведенный им список из 71 вида растений, еще несколькими десятками кормовых

**Таблица 1.** Величины выводков молодых и взрослых обыкновенных полевков в разных регионах

Место	Средняя величина выводка		Источник
	взрослые	молодые	
Ленинградская обл.	5.8	5.6	Айрапетьянц, 1970
Карелия	6.9	5.3	Наши данные
Вологодская обл.	5.4	4.1	Башенина, 1962
Московская обл.	5.6	4.6	Башенина, 1962
Брянская обл.	6–7	4.9	Башенина, 1962
Татария	5.4–6.3	4.4	Назарова, 1958
Башкирия	6.2	5.3	Снигиревская, 1954
Среднее Поволжье	4.5–5.6	4.7–5.0	Башенина, 1968
Черкасская обл.	5.4	4.65	Башенина, 1994
Красноярский край	4.0–6.1	3.5–5.7	Башенина, 1994
Сев. Осетия	5.1–5.8	4.9–5.6	Башенина, 1994
Запорожская обл.	5.6	4.8	Наумов, 1948
Белоруссия	5.1	4.95	Блоцкая, Гайдук, 2004

объектов, в том числе обнаруженных в норах и кормовых камерах пищевых остатков. В числе предпочитаемых зверьками кормов можно назвать различные виды клевера, вику, шавель, одуванчик, мышинный горошек, чину, сныть, подорожник, тысячелистник, ячмень, пшеницу, рожь, овес, картофель и др.

#### *Размножение и экологическая структура популяции*

Известно (Башенина, 1962), что в пределах всего обширного ареала оба рассматриваемых вида отличается высоким репродуктивным потенциалом и способны даже к круглогодичному размножению. В Карелии же, в условиях северных пределов ареала, они размножаются в течение лишь одного, причем достаточно ограниченного весенне-летнего сезона. При этом сперматогенез и овогенез происходит у них по общей, типичной для всех мелких млекопитающих схеме. Тем не менее, данные по размножению обыкновенных полевков в Карелии весьма фрагментарны. Почти все отловленные нами самки (18 из 22) или размножились (были беременными, кормили выводок), или уже завершили размножение (темные пятна на рогах матки и рубцы в яичниках).

Как и в других частях ареала, в Карелии размножение зверьков рассматриваемых видов, в основном, определяется состоянием самок, течка которых подвержена влиянию многочисленных и разнообразных факторов среды и зависит от внутреннего состояния организма в большей степени, чем гон самцов. Средняя продолжительность цикла, как и у других мелких грызунов, 5–6 дней, одна-

ко продолжительность фаз может варьировать в зависимости от условий.

В Карелии, как и в других, более южных областях обитания, обыкновенные полевки могут, видимо, хотя и не регулярно, размножаться и зимой. Косвенным подтверждением этого является поимка 6.03.1981 г. в стоге сена на агробазе Института биологии Карельского филиала АН СССР трех самок с отчетливо выраженными плацентарными пятнами в рогах матки. Там же была добыта пара молодых самцов весом 12 и 16 г. В то же время зимнее размножение происходит здесь при хорошей обеспеченности кормом в скирдах, ометах и зернохранилищах

Приведенная в табл. 1 характерная для карельских полевков средняя величина выводка ( $6.7 \pm 0.6$ ) оказалась несколько (но все-таки статистически достоверно) выше средней видовой нормы, равной 5.0–6.0. Обыкновенные полевки Ленинградской обл. также отличаются повышенной плодовитостью: среднее число эмбрионов на 1 самку – 5.8 (Айрапетьянц, 1970). Это согласуется с обнаруженной наличием у них тенденции к увеличению плодовитости в зоне пессимума (Башенина, 1962).

Возрастная структура карельских популяций обыкновенной полевки закономерно изменяется в течение года (табл. 2). Зимой в них присутствуют исключительно прибылые зверьки поздних выводков прошлого года, в Белоруссии же (Блоцкая, Гайдук, 2004), как и в большинстве других расположенных ближе к центру ареала регионов, еще и часть особей ранних выводков. Взрослые перезимовавшие полевки прошлого года рождения в уловах не попадаются. Продолжительность их жизни в природе составляет около 20 мес., так что две зимы зверьки этого вида в наши условиях

Таблица 2. Возрастной и половой состав карельских популяций обыкновенной полевки

Месяцы	Число взрослых		Число прибылых ранних выводков		Число прибылых поздних выводков		Общее число, <i>n</i>	Относительное число зверьков, %		
	<i>n</i>	из них самцы, %	<i>n</i>	из них самцы, %	<i>n</i>	из них самцы, %		взрослые	прибылые	
									ранних выводков	поздних выводков
Май–июнь	21	66.7	15	60.0	–	–	36	58.3	41.7	–
Июль–август	11	54.5	43	58.1	49	67.1	103	15.5	59.2	25.3
Сентябрь–октябрь	5	60.0	26	50.0	52	59.3	83	8.4	31.3	60.3
Весь период	37	62.1	84	57.1	101	57.4	222	19.8	45.9	34.3

не переживают. В конце марта – первой декаде апреля (у северных границ ареала, включая Карелию, это происходит почти на месяц позднее) обыкновенные полевки начинают размножаться, и во второй половине мая в уловах нашего региона начинают попадаться прибылые, которые весной составляют до 40% населения зверьков.

В летний период к группам зимовавших и зверьков ранних выводков в популяцию включаются прибылые поздних выводков, причем их становится все больше и больше. В Белоруссии, и других зонах оптимума в летних уловах на их долю приходится до 60%, в Карелии же, где оборот популяции проходит гораздо быстрее, еще больше 64–75%. Поздней осенью зимовавшие особи составляют в Белоруссии не более 15%, а на северной периферии ареала, в том числе и в нашем регионе, их уже нет вовсе. Они присутствуют в уловах до августа, иногда задерживаясь до середины – конца сентября. В дальнейшем же они быстро стареют и полностью вымирают. Фактически та же судьба постигает и подавляющее большинство полевков ранних выводков. Все они, как правило, активно участвуют в размножении, принося от 1 до 3 выводков, однако к концу репродуктивного сезона растрачивают все свои внутренние резервы и к концу лета – началу осени полностью элиминируются из популяции. Особи же поздних выводков, напротив, осенью преобладают в популяции и практически составляют основу зимнего населения зверьков. Половое же созревание происходит у них лишь следующей весной, после успешной зимовки и ускоренного весеннего роста.

Тем не менее, в целом для репродукции изученных популяций характерен крайне низкий темп и неровный ритм репродукции, определяющий соответствующий “рваный” ритм изменений численности вида, что весьма типично для периферийных зон видовых ареалов этих грызунов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные в процессе исследований экологические особенности, характерные для видов-двойников обыкновенной полевки в специфических условиях северо-западных пределов ареала, отличаются значительной лабильностью и гармоничной согласованностью с эндо- и экзогенными факторами среды. Наряду с узкими специальными приспособлениями индивидуального ранга здесь успешно реализуются структурно-популяционные адаптивные комплексы, отличающиеся гибкостью, динамичностью и высокой скоростью компенсаторной перестройки. Более выражены и гораздо рельефнее проявляются вблизи северных границ распространения и специфические структурно-популяционные адаптации, направленные на максимально эффективное воспроизводство видового населения, способное обеспечить виду и его популяциям возможности преодолевать экстремальные условия экологического пессимума. Наиболее характерны в этих условиях частые, глубокие и длительные депрессии численности при относительно коротких и невысоких ее подъемах.

Тем не менее в начале сезона размножения численность молодых зверьков и полнота их участия в репродукции во многом определяется погодными условиями. К концу же сезона размножения большое значение приобретает ускоренное половое созревание и максимально полное участие в воспроизводстве популяции сеголеток разного времени рождения.

Работа проводилась в соответствии с Государственным заданием федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук.”

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Айрапетьянц А.Э. Насекомоядные и грызуны // Звери Ленинградской области. Л.: ЛГУ, 1970. С. 47–165.

- Баскевич М.И., Потапов С.Г., Окулова Н.М., Сапельников С.Ф., Власов А.А. и др. К распространению и изменчивости видов двойников *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье по хромосомным и молекулярно-генетическим данным // Зоологический журн. 2009. Т. 88. Вып. 4. С. 473–483.
- Баскевич М.И., Окулова Н.М., Потапов С.Г., Миронова Т.А., Сапельников С.Ф. и др. Новые данные о распространении видов-двойников и гибридизации 46 хромосомных форм *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье // Зоологический журн. 2012. Т. 91. Вып. 8. С. 994–1005.
- Башенина Н.В. Экология обыкновенной полевки и некоторые черты ее географической изменчивости. М.: МГУ, 1962. 307 С.
- Башенина Н.В. Материалы к экологии мелких млекопитающих зоны европейской тайги // Уч. зап. Пермск. гос. пед. ин-та. 1968. Т. 52.
- Башенина Н.В. Пути адаптаций мышевидных грызунов. М.: Наука, 1977. 294 с.
- Блоцкая Е.С., Гайдук В.Е. Популяционная экология мелких млекопитающих. Брест: Брест. гос. ун-та, 2004. 187 с.
- Бобров В.В., Варшавский А.А., Хляп Л.А. Чужеродные виды млекопитающих в экосистемах России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 232 с.
- Виноградов Б.С. Материалы по динамике фауны мышевидных грызунов СССР Л., 1934. с.
- Громов И.М., Ербаева М.А. Зайцеобразные и грызуны. Млекопитающие фауны России. СПб., 1995. 522 с.
- Громов И.М., Поляков И.Я. Полевки Microtinae // Фауна СССР. Л.: Наука, 1977. Млекопитающие. Т. 3. Вып. 8. 504 с.
- Доброхотов Б.П., Барановский П.М., Демидова Т.Н. Особенности стационального распределения видов-двойников *Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* (Rodentia, Microtinae) и их роль в природных очагах туляремии луго-полевого типа // Зоологический журн. 1985. Т. 64. Вып. 2. С. 269–275.
- Ермолаева Е.З., Карасева Е.В., Телицына А.Ю. Особенности обитания мелких млекопитающих в Ботаническом саду МГУ (Воробьевы горы) // Животные в городе. Материалы научно-практической конференции. М. 2000. С. 34–37.
- Жигарев И.А. Изменения плотности населения мышевидных грызунов под влиянием рекреационного пресса на юге Подмосковья // Зоологический журн. 1993. Т. 72. Вып. 12. С. 117–137.
- Жигарев И.А. Мелкие млекопитающие рекреационных и естественных лесов Подмосковья. М.: Изд-во Прометей, 2004. 232 с.
- Жигарев И.А., Жигарев Д.И., Алтатов В.В., Лапковский В.В., Малыгин В.М., Симак С.В. Белковый электрофорез в полиакриламидном геле, как метод идентификации видов-двойников обыкновенной полевки (*Microtus arvalis* Pallas 1779 и *M. rossiaemeridionalis* Ognev 1924 (Rodentia, Cricetidae)) // Известия РАН. Серия биологическая, 2019. № 4. С. 380–388.
- Исаков Ю.А. Материалы по фауне млекопитающих Средней и Северной Карелии // Бюл. Моск. о-ва испыт. прир. Отд. биол. 1939. Т. 48. Вып. 2–3.
- Карасева Е.В., Кучерук В.В. Изучение подвижности обыкновенных полевков с помощью мечения зверьков // Матер. экол. конф. Тез. докл. М. 54. С. 80–83.
- Карасева Е.В., Телицына А.Ю., Жигальский О.А. Методы изучения грызунов в полевых условиях. М.: Изд-во ЛКИ, 2008. 416 с.
- Карасева Е.В., Телицына А.Ю., Самойлов Б.Л. Млекопитающие Москвы в прошлом и настоящем. М.: Наука, 1999. 245 с.
- Лапкин И.М. Биология и паразитофауна мелких лесных млекопитающих Латвийской ССР. Рига, 1963. 135 с.
- Малыгин В.М. Стациональное размещение видов-двойников обыкновенной полевки // Экология 1974. Т. 5. № 1. С. 89–91.
- Малыгин В.М. Систематика обыкновенных полевков. М.: Наука, 1983. 208 с.
- Малыгин В.М., Баскевич М.И., Хляп Л.А. Инвазии видов-двойников обыкновенной полевки // Российский журн. Биологических Инвазий 2019. № 4. С. 71–93.
- Малыгин В.М., Рябов С.В. Распространение и биология видов-двойников обыкновенной полевки в зоомедицинском аспекте // Дезинфекционное дело. 2013. № 4. С. 27–35.
- Марвин М.Я. Млекопитающие Карелии Петрозаводск. 1959. 238 с.
- Мейер М.Н., Голенищев Н.М., Рабджабли С.И., Саблина О.Э. Серые полевки фауны России и сопредельных территорий // Труды Зоологического института РАН. СПб. 1996. С. 320
- Мунтяну А.И., Савин А.И., Патрашк В.И., Сытник В.Л. Флуктуации численности опуляций обыкновенной полевки // Влияние антроп. трансф. ландшафта на население назем, позв. животных. Тез. Всес. совещ. М. 1987. Ч. 2. С. 26–27.
- Назарова И.В. Эколого-морфологический очерк серых полевков Волжско-Камского края // Изв. Казанск. фил. АН СССР. Сер. биол. 1958. № 6. С. 27–41.
- Наумов Н.П. Очерки сравнительной экологии мышевидных грызунов. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 1948. 203 с.
- Неронов В.Н., Хляп Л., Тушикова Н.В., Варшавский А.А. Изучение мирования сообщества грызунов на пахотных землях Северной Евразии // Экология, 2001. № 5. С. 355–362.
- Новиков Г.А. Полевые исследования экологии наземных позвоночных животных Л.: Сов. наука. 1953. 602 с.
- Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран. 1950. Т. VII. Грызуны. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 706 с.
- Пекарчик К. Исследование по образованию прогнозов появления и развития вредителей сельскохозяйственных культур в Польше // Тр. ВИЗР, 1983. Вып. 18. С. 338–341.
- Снигиревская Е.М. Экология и хозяйственное значение мышевидных грызунов в широколиственных лесах



- Жигулевской возвышенности. Автореф. дис. .... канд. биол. наук. Л., 1854. 24 с.
- Соколов В.Е., Башенина Н.В., Малыгин В.М. и др. Обыкновенная полевка: виды-двойники. *Microtus arvalis*. Pallas. 1779, *M. rossiaemeridionalis*, Москва: Наука, 1994. 431 с.
- Тауринши Э.Я. Динамика размножения полевых мышевидных грызунов в Латвийской ССР с 1948 по 1962 г. // Прогноз в защите растений от вредителей и болезней. Рига, 1964: Изд-во АН Латв. ССР. 239–261 с.
- Тупикова Н.В., Хляп Л.А., Варшавский А.А., Грызуны полей Северо-Восточной Палеарктики // Зоологический журн. 2000. Т. 79. № 4. С 480–494.
- Формозов А.Н. Очерк экологии мышевидных грызунов, носителей туляремии. М., 1947. 94 с.
- Хляп Л.А., Варшавский А.А. Синантропные и агрофильные грызуны как чужеродные млекопитающие // Российский журн. биологических инвазий. 2010. № 3. С. 73–91.
- Якимова А.Е. Результаты мониторинга мелких млекопитающих в Средней Карелии // Тр. КарНЦ РАН. Серия биогеография. 2018. № 1. С. 67–80.
- Frank F. The causality of microtine cycles in Germany. J. Wildl. Manag., 1957. 21 p.
- Keller A. Determination des mammiferes de la uisse par leur pelage. IV. Crlcetidae et Muridae. Rev. uisse zool., 1981. V. 88. № 2. P. 463–473.
- Krebs C.J., Myers J.H. Population cycles small mammals // Adv. Ecol. Res., V. 8. London-New York., 1974. P. 267–399.
- Migula P., Gano B., Stepin Z., Bugdal U. Ocena zageszczenia i prizeplyw energii przez populacje drobnych (Male Plenu) // Prz. Zool. 1975. V. 19. № 4. P. 467–474.

## To the Ecology of Species-Double of Common Vole (*Microtus arvalis*, Pall.) at the Northern Limit of the Range

E. V. Ivanter<sup>1, 2, #</sup>

<sup>1</sup> *Petrozavodsk State University, prosp. Lenina, 33, Petrozavodsk, 185910 Russia*

<sup>2</sup> *Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, st. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185000 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: Ivanter@petrsu.ru*

Based on long-term expeditionary and stationary studies in the taiga Northwest of Russia, the features of distribution, biotopic distribution, reproduction, population dynamics and other ecological features of the common voles are characterized, including those associated with its habitat at the northern boundaries of the range. It is established that in the past fiftieth anniversary the northern boundary of its distribution first moved to the north and reached 63°40' s. and then also quickly retreated to the south. The reason for the latter is a sharp reduction in crop areas, primarily cereals, in connection with the reorientation of agriculture to dairy and vegetable. This, as well as the replacement of the common voles by native rodent species (housekeeper, dark and red-breasted voles) caused a sharp decrease in the abundance and narrowing of the species range in the eastern regions of Fennoscandia. In the taiga Northwest of Russia during the snowless period, the common voles live primarily in open habitats, including horticultural plots, and in winter they concentrate in haystacks and in straw stacks, where they live together with other representatives of the *Microtus*. According to V.V. Gromov [2008] and our observations, the elementary structural unit in the settlements of the common voles, is a family group occupying a limited habitat that has been in operation for a fairly long time. In the diet, the main role is played by the participation of herbaceous plants (72% of the occurrence), the smaller – seeds (25%) and a very rare component – tree bark (3%). Under the conditions of the northern periphery, the range reproduces only during one, rather limited, spring-summer season. The age and sex composition of the population varies by season.

**Keywords:** small mammals, ecology, population dynamics, population, reproduction

УДК 599.32:57.024

## СУТОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ЖЕЛТОГО СУСЛИКА *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae): ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2023 г. Н. А. Васильева\*, @, А. А. Лупырёв\*, \*\*, Н. С. Васильев\*, \*\*

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

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, Ленинские горы, 1, Москва, 119234 Россия

@E-mail: ninavasilieva@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Большая часть информации о суточной активности животных основана на лабораторных данных. Для получения сведений из природной популяции мы впервые провели инструментальное исследование суточного цикла активности желтого суслика – крупного зимоспящего грызуна. Восемь особей были оснащены радиопередатчиками с акселерометрами и датчиками освещенности летом 2021 г. Полученные данные подтвердили, что желтые суслики покидают норы только днем; уход суслика в нору соответствовал переходу в состоянии покоя. По мере приближения залегания в спячку время пребывания на поверхности сокращалось. Наземная активность сусликов была однофазной, в отличие от близких видов с двумя пиками активности. Возможно, желтые суслики более интенсивно используют дневные часы из-за дефицита времени, который является следствием длительной спячки.

*Ключевые слова:* суточная активность, радиопередатчики, наземные беличьи, желтый суслик

DOI: 10.31857/S1026347022600777, EDN: UBZLPS

Особенности суточной активности у животных входят в число ключевых характеристик биологии вида. Они тесно связаны с экологическими свойствами вида: способами поиска пищи, использованием пространства, характеристиками местообитания и др. При этом, суточным циклом подвержены ключевые физиологические процессы в организме животного: цикл сна и бодрствования, активность сердечно-сосудистой, эндокринной, пищеварительной систем, температуры тела и др. (Froy, 2007; Refinetti, 2019). Известно, что млекопитающие демонстрируют широкое разнообразие паттернов суточной активности, в том числе, различные 24-часовые ритмы (дневной, ночной, круглосуточный), а также краткосрочный ритм активности; для многих видов показано, что синхронизация этих ритмов осуществляется в соответствии с интенсивностью освещения (Ashby, 1972). При этом, изменчивость паттернов суточной активности внутри вида может быть очень значительной и определяться полом (Schmidt, 1999; Everts *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2010), физическим состоянием, стадией репродуктивного цикла (Clutton-Brock *et al.*, 1982; Kenagy, Hoyt, 1989), внешними условиями (Рашитов, 2018; Podolski *et al.*, 2013; Allen *et al.*, 2018) и др.

Традиционно, изучение режима суточной активности животных ограничивалось лабораторными исследованиями, проводимыми, зачастую, при неестественном режиме освещения. Инструментальные методы регистрации активности до последнего времени применялись лишь на небольшом числе видов и в условиях неволи (напр., Daan, Aschoff, 1975; Bartness, Albers, 2000; Refinetti, 2019). В дикой природе информация об изменениях в активности животных в течение суток ограничивалась данными, полученными в ходе визуальных наблюдений, которые особенно ненадежны в случае мелких, скрытных и осторожных видов животных. Такое положение дел препятствовало получению релевантных данных от широкого спектра видов и проведению сравнительного анализа. В последние годы стремительное развитие технологий позволило перевести исследования ритмов активности животных на новый уровень: представителей разных видов начали оснащать разнообразными датчиками, в том числе, в дикой природе. Появление мощной вычислительной аппаратуры позволило разработать подходы к анализу больших массивов информации, получаемых с таких регистраторов. Тем не менее, инструментальные исследования в природе до сих пор крайне немногочисленны.

Зимоспящие млекопитающие, которые значительную часть года проводят в состоянии глубокого угнетения жизненных процессов, представляют особый интерес с точки зрения исследования суточных ритмов. Он связан с тем, что механизмы регуляции процессов, связанных со спячкой (в том числе, циклов пробуждения во время спячки) могут иметь общую природу с механизмами регуляции суточных циклов активности (Heller, Ruby, 2004; Malan, 2010). Наземные беличьи (суслики, сурки) — группа норных зимоспящих грызунов, которые ведут дневной образ жизни (Шилова, 2000; Dobson, 1984; Armitage, 1986; Waterman, 2007). Они являются традиционной модельной группой в поведенческой экологии, поскольку широкое разнообразие социальных систем и репродуктивных стратегий у этих грызунов сочетается с сравнительно малыми морфологическими, физиологическими и экологическими различиями между видами. Это дает возможность на модели этой группы видов исследовать эволюцию формирования самых разных признаков у млекопитающих (Шилова, 2000; Шилова, 2004, Васильева, Чабовский, 2017).

Норный образ жизни разделяет активность наземных беличьих на две составляющие: пребывание в норе и пребывание на поверхности земли, что определяет специфику исследований активности этих животных. С одной стороны, возникает возможность упрощенного подхода к исследованию активности: животное, находящееся на поверхности земли, автоматически можно считать активным, а под землей — неактивным (см. напр., Bronson, 1962; Hut *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2005). С другой стороны, возникают очевидные методические трудности для получения информации о животном из норы, в особенности в условиях дикой природы. На сегодня инструментальные исследования паттернов суточной активности были проведены лишь на единичных видах наземных беличьих, в первую очередь, на европейском (*Spermophilus citellus*) (Hut *et al.*, 1999) и арктическом (*Urocitellus parryi*) (Long *et al.*, 2005; 2007; Chmura *et al.*, 2020) сусликах, для изучения соотношения наземной и подземной активности которых были использованы светочувствительные датчики.

Желтый суслик (*Spermophilus fulvus* Licht., 1823) — самый крупный из сусликов, самцы перед спячкой могут достигать массы 2 кг (Млекопитающие..., 1969; Васильева и др., 2009). Этот вид населяет сухие степи, полупустыни, пустыни и характеризуется экстремально длительной зимней спячкой — до 9 мес. (Шилова, 2000; Васильева, Чабовский, 2017). При столь коротком периоде активной наземной жизни можно ожидать присутствия специфических черт режима суточной активности у этого вида. Однако до сих пор информация об этом виде крайне ограничена, имеются лишь сведения, полученные в ходе визуальных наблюдений,

свидетельствующие о том, что это строго дневные животные (Орлов, 1925; Материалы..., 1929; Огнев, 1947). Некоторые авторы утверждают, что наземная активность (т.е., пребывание вне норы в течение дня) у желтого суслика двухфазная: суслики пребывают на поверхности утром и вечером, в то время как в середине дня они не покидают нор (Орлов, 1925; Огнев, 1947; Млекопитающие..., 1969; Россолимо и др., 2004).

В данной работе мы впервые предприняли инструментальное исследование суточной активности желтого суслика в дикой природе с использованием светочувствительных датчиков и акселерометров, целью которого было получить сведения о суточной динамике пребывания на поверхности земли и локомоторной активности сусликов в период подготовки к спячке.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект и место исследования.** Мы проводили сбор данных в период подготовки сусликов к спячке в июне—июле 2021 г. в рамках долговременного исследования природного поселения желтого суслика (*Spermophilus fulvus orlovii* Ogn. 1937) в окрестностях с. Дьяковка Краснокутского района Саратовской области (50°43'88" N, 46°46'04" E). В данном поселении индивидуальное мечение сусликов проводится с 2001 года. Как следствие, возраст, происхождение, основные события годового цикла известны практически для всех особей.

Сусликов отлавливали с помощью сетчатых ловушек оригинальной конструкции и петель с радиопередатчиками, которые при срабатывании мгновенно передавали предупреждающий сигнал по радиоканалу. При отлове сусликов метили с помощью подкожных ветеринарных микрочипов и с помощью черного красителя (урзола) для визуального распознавания. Детальное описание отлова и мечения желтых сусликов можно найти в ранее опубликованных работах (Васильева и др., 2009; Vasilieva *et al.*, 2014; Vasilieva, Tchabovsky, 2014, 2015).

**Разработка и использование радиопередатчиков для желтого суслика.** Желтый суслик — одиночный вид, который и сегодня является объектом охоты (Шилова и др., 2015). Возможно, это отчасти определяет чрезвычайную осторожность этих животных, которую еще в начале XX века особо отмечали исследователи (Материалы..., 1929). Отлов желтых сусликов крайне трудоемок: для некоторых особей установка практически невидимой петли из тонкого тросика с датчиком прикосновения служит поводом не выходить из норы на протяжении суток. Как следствие, большинство сусликов удается отловить не более двух раз за весь сезон активности (т.е., за год). При этом желтым сусликам свойственны резкие изменения

массы тела на протяжении годового цикла: с момента выхода из спячки и до залегания зверьки увеличивают массу тела в 1.5–2 раза, а детеныши после первого выхода из нор и до момента залегания в спячку увеличивают массу в 4–5 раз и более (Васильева и др., 2009). Таким образом, использование ошейников в качестве физической основы для каких-либо устройств слежения и регистраторов для этого вида недопустимо: надетый на зверьку ошейник может привести к удушью при быстром увеличении массы тела, а вовремя отловить животное и снять устройство может оказаться невозможным. Кроме того, ошейник в условиях колючей степной растительности может привести к нарушению целостности кожи, воспалению и раздражению при попадании колючих семян под ошейник (Williams *et al.*, 2014). Чтобы избежать этих неблагоприятных сценариев, мы разработали безопасный способ крепления устройств слежения для желтого суслика. В ходе этой работы были впервые использованы радиопередатчики оригинальной конструкции, специально разработанные для желтого суслика в лаборатории популяционной экологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова. Малогабаритные передатчики массой 12 г (0.8–2.5% от массы животного), были упакованы в термоусадочную пленку и закреплены на коже спины сусликов с помощью медицинского клея Perma-Type Surgical Cement (Perma Type Company, USA). После линьки радиопередатчики самопроизвольно отделялись от кожи зверьков, при этом ни у одной особи на месте крепления передатчиков на коже не было раздражения или повреждений. У перелинявших особей не было визуальных признаков того, что ранее на них был закреплен передатчик.

Радиопередатчики были снабжены датчиками освещенности, которые каждые 10 мин регистрировали, где находится зверек – в норе или на поверхности, также они записывали точное время входа и выхода из норы. Кроме того, радиопередатчики были оснащены акселерометрами, которые каждые 10 мин регистрировали долю времени из предыдущих 10 мин, когда животное находилось в движении. Эти показания складывались из пятисекундных срезов: каждые 5 с передатчик сохранял “1”, если животное двигалось (движение регистрировалось при ускорении  $\geq 0.19$  g хотя бы по одной из трех осей акселерометра), и “0”, если оно было неподвижно (ускорение составляло  $< 0.19$  g), и “единицы” суммировались за каждые 10 мин.

Данные с радиопередатчиков передавались по радиоканалу на два радиоприемника (использовались диапазоны гражданской радиосвязи 434 МГц), расположенных на деревьях. За 2021 г. с помощью радиопередатчиков были получены данные (40310 регистраций) от 4 самцов (1 взрослого и 3 детены-

шей) и 4 самок (1 взрослой и 3 детенышей) на протяжении периода с 21 июня по 30 июля.

Все манипуляции с животными прошли экспертизу и были одобрены Комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН (протоколы № 31, 44), используемые методы соответствовали рекомендациям “Руководства по обращению с животными при проведении поведенческих исследований и обучении” (ASAB/ABS, Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching (Buchanan *et al.*, 2012)).

**Анализ данных.** Для оценки изменений в активности сусликов по мере приближения спячки мы использовали следующие переменные, полученные для каждой особи для каждого дня наблюдений:

1) время начала дневной активности (время первого выхода из норы утром);

2) продолжительность дневной активности: разность во времени от первого выхода из норы утром до последней регистрации особи на поверхности;

3) точное время пребывания на поверхности в течение дня: рассчитывалось как продолжительность дневной активности за вычетом суммарного времени, проведенного в норе в течение дня (от первого выхода из норы утром до последней регистрации на поверхности);

4) время конца дневной активности (время последней регистрации на поверхности вечером).

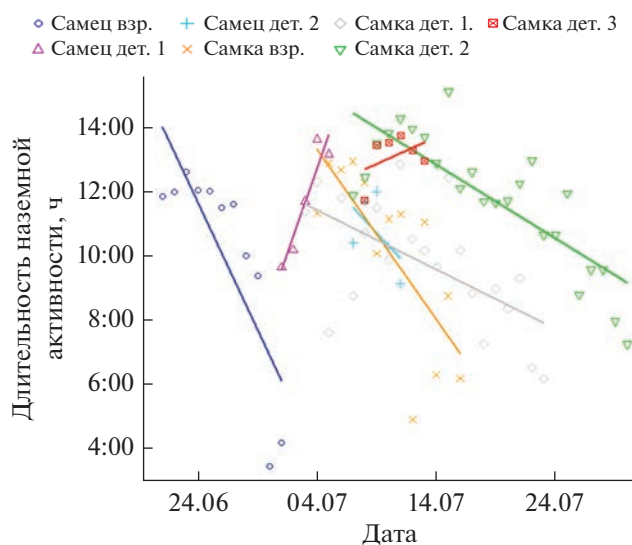
Для анализа суточной динамики наземной активности и подвижности мы использовали две переменные:

1) Пребывание в норе/на поверхности на протяжении суток: последовательность нулей и единиц, полученных с частотой раз в 10 мин на основе показаний датчика освещенности. Единицы соответствовали нахождению на поверхности, а нули – пребыванию в норе. Дополнительными единицами отмечались моменты каждого выхода из норы, поэтому фактически регистрации были несколько чаще, чем раз в 10 мин.

2) Уровень локомоторной активности на протяжении суток: для тех же моментов времени, что и показания наземной активности, отмечалась доля времени в движении от времени, прошедшего с момента предыдущей регистрации; эта доля варьировала от 0 (полная неподвижность) до 1 (непрерывное движение).

Дни поимки зверьков, дни залегания в спячку, а также дни гибели от нападения хищников (один молодой самец был убит орлом-карликом, другой – собакой) были исключены из анализа.

Анализ данных был проведен в среде R 4.1.0 (R Development Core Team, 2021). В первую очередь, мы описали общий паттерн дневной активности зверьков и проанализировали, как время



**Рис. 1.** Изменение продолжительности наземной активности (в часах) в зависимости от календарной даты у желтого суслика в период подготовки к спячке. Разными цветами обозначены разные особи. Длительность наземной активности достоверно снижалась (линейные модели смешанных эффектов,  $p < 0.05$ ).

начала, конца дневной активности и продолжительность дневной активности зверьков менялись в зависимости от календарной даты. Также мы проверили, насколько при пребывании в норе суслики находятся в состоянии покоя по сравнению с пребыванием на поверхности, чтобы оценить правомерность подхода, при котором животное на поверхности земли считается активным, а животное в норе – неактивным (Hut *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2005). Для этого мы исследовали, как меняется уровень локомоторной активности сусликов при переходе между норой и поверхностью земли. Чтобы разделить эффекты суточного ритма и ухода в нору как такового, мы построили две модели: одну – для всех измерений в течение суток, и другую – только для измерений с момента первого выхода каждого зверька утром из норы до момента последнего ухода вечером в нору. Для решения всех этих задач мы построили линейные модели смешанных эффектов в пакете *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2022), при этом номер особи был включен во все модели как случайный фактор.

Чтобы визуализировать суточную динамику наземной активности зверьков (пребывания в норе/на поверхности земли) мы использовали пакет *activity* (Rowcliffe, Rowcliffe, 2022) в среде R. Для построения кривых были получены частотные распределения регистраций каждого зверька на поверхности земли (при этом, данные о том, в норе или на поверхности находилось животное, поступали с постоянной частотой на протяжении суток). Кроме того, мы использовали пакет *overlap* (Ridout, Linkie, 2009; Meredith *et al.*, 2021) и тест

Вальда (Wald test) из пакета *activity* для того, чтобы количественно сравнить суточную динамику наземной активности самцов и самок (это сравнение мы проводили только для молодых особей), а также взрослых и молодых особей. Чтобы визуализировать изменения в режиме наземной активности по мере приближения залегания в спячку, мы для тех особей, которые были прослежены до спячки ( $N = 4$ ), сравнили суточную динамику активности в последние 7 дней перед спячкой (т.е., непосредственно перед залеганием) и в период 8–14 дней до залегания. Результаты статистических тестов мы считали достоверными при значении  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Общая характеристика суточной активности.** Все особи желтого суслика были активны строго в дневное время, ни один суслик не покидал нору в темное время суток. В среднем, суслики выходили из нор в  $6:16 \pm 1:49$  утра и уходили в норы в  $17:07 \pm 1:22$  в то время, как восход солнца в эти дни был до 4:00, а заход около 20:00 (время везде указано по Московскому времени). Таким образом, в среднем продолжительность дневной наземной активности сусликов составила  $10:51 \pm 2:22$  ч, из которых на поверхности зверьки проводили в среднем около  $67 \pm 13\%$  времени, а остальную часть дня они находились в норах. Бюджет наземной активности сусликов зависел от календарной даты: чем больше была дата, тем позже суслики выходили из нор утром (модель смешанных эффектов, номер особи добавлен в данную и последующие модели как случайный фактор;  $B = 0.50 \pm 0.14$ ,  $t = 3.5$ ,  $p = 0.0007$ ) и тем раньше они уходили в норы вечером ( $B = -0.71 \pm 0.14$ ,  $t = -5.1$ ,  $p < 0.0001$ ). Таким образом, продолжительность дневной наземной активности сокращалась по мере приближения спячки ( $B = -0.87 \pm 0.13$ ,  $t = -6.7$ ,  $p < 0.0001$ , рис. 1). При этом точное время пребывания на поверхности земли (за вычетом времени, которое зверек проводил в норе в течение дня) сокращалось даже несколько быстрее, чем продолжительность наземной активности ( $B = -0.83 \pm 0.09$ ,  $t = -9.0$ ,  $p < 0.0001$ ).

**Соответствие бюджета наземной и локомоторной активности.** Уровень локомоторной активности сильно зависел от того, где находился суслик – в норе или на поверхности: двигательная активность на поверхности была многократно выше, чем в норе ( $B = 1.46 \pm 0.01$ ,  $t = 99.7$ ,  $p < 0.0001$ ). В среднем, из каждого 10-минутного промежутка, проведенного на поверхности, суслик двигался  $5.3 \pm 2.9$  мин (медиана = 5.3 мин/10 мин), в то время как в норе время в движении в среднем составляло  $1.2 \pm 1.7$  мин/10 мин (медиана = 0.6 мин/10 мин). При этом ночью суслики в норе были практически неподвижны (время в движении составляло  $0.1 \pm 0.2$  мин/10 мин, медиана = 0.05 мин/10 мин).

При уходе в нору в дневное время суслики резко снижали двигательную активность по сравнению с уровнем подвижности при нахождении на поверхности земли ( $B = 1.14 \pm 0.02$ ,  $t = 48.3$ ,  $p < 0.0001$ ). Таким образом, бюджет наземной активности в данном исследовании можно использовать в качестве оценки бюджета двигательной активности.

**Суточная изменчивость наземной активности.** С помощью пакета *activity* мы построили графики вероятности нахождения сусликов на поверхности земли в зависимости от времени суток (рис. 2). В первую очередь, эти графики демонстрируют большую изменчивость бюджета активности между особями: у некоторых особей пик наземной активности приходился на вечер, у других — на утро, у некоторых — на середину дня. Лишь взрослый самец (рис. 2а) придерживался двухфазной наземной активности: в середине дня он находился преимущественно в норе. Остальные суслики, включая взрослую самку (рис. 2б), были активны на протяжении всего дня, и их активность можно назвать однофазной.

Анализ перекрытия сроков наземной активности у взрослых и молодых особей в пакете *overlap* показал, что молодые в течение дня активны несколько дольше, при этом они больше пребывают на поверхности утром по сравнению со взрослыми (тест Вальда,  $p = 0.005$ , рис. 3а). При сравнении бюджетов самцов и самок (только молодых особей) различий между ними мы не выявили ( $p = 0.2$ , рис. 3б). Наконец, мы сравнили бюджет наземной активности перед спячкой и за 7–14 дней до спячки: длительность наземной активности снижалась по мере приближения залегания в спячку ( $p = 0.047$ , рис. 3в), что согласуется с результатами линейных моделей.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа является первым инструментальным исследованием бюджета активности желтого суслика, в ходе которого были получены надежные данные о суточном цикле этого вида в период подготовки к спячке. Ранние работы, описывающие бюджет суточной активности желтого суслика, опирались на визуальные наблюдения за особями, которые не были помечены для индивидуального распознавания (Млекопитающие..., 1969); в некоторых работах исследователи закрывали входы в норы сусликов и судили о бюджете наземной активности зверьков по тому, когда суслики открывали их вновь (Материалы..., 1929). Эти методы могут быть недостаточно надежными для столь пугливых и осторожных животных, какими являются желтые суслики, кроме того, при таких подходах трудно оценить точное время всех заходов в норы и выходов из них. Наш подход исключает необходимость присутствия наблюдателя на поселении, ошибки наблюдателей и т.п., и дает

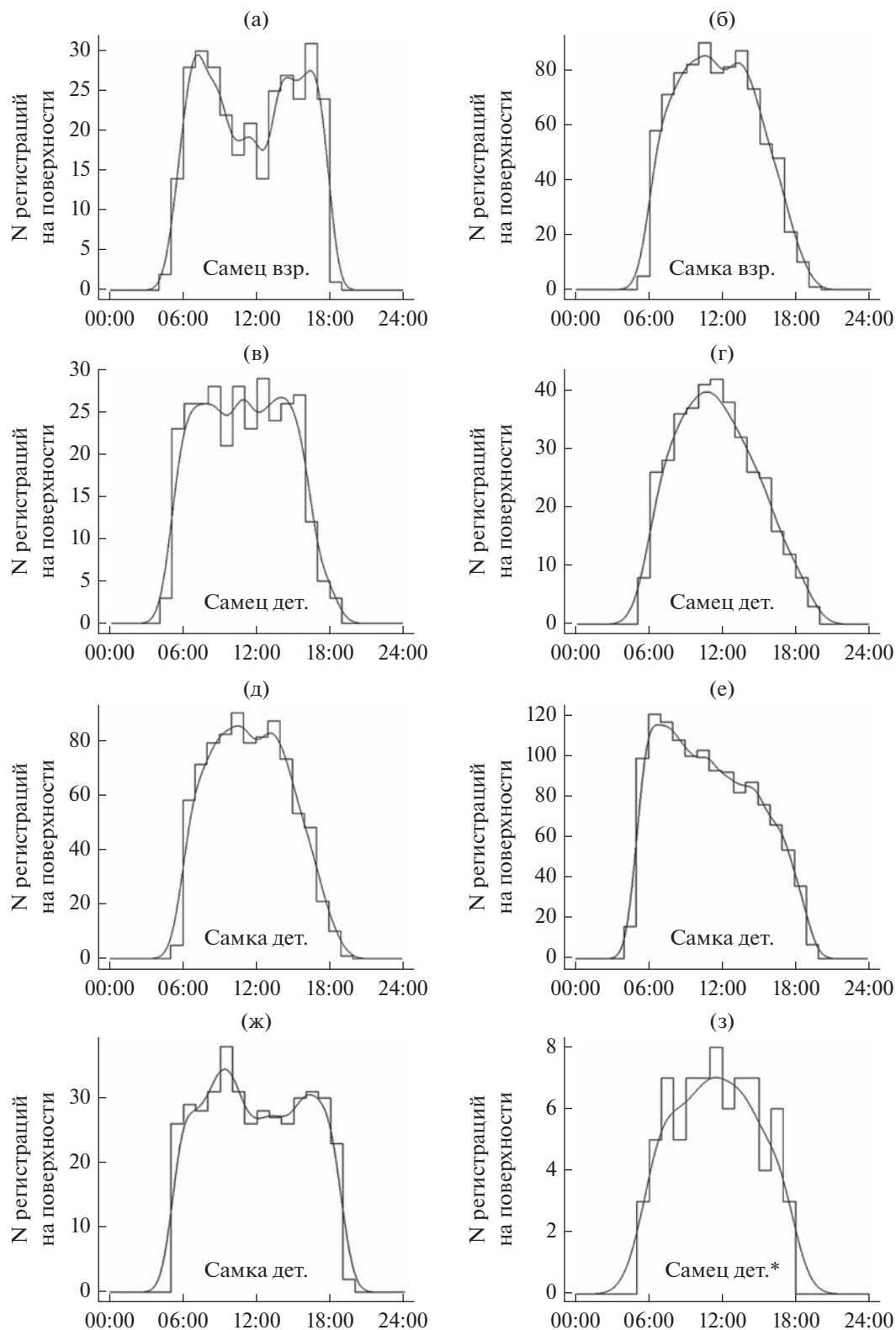
высокую точность оценки времени входа/выхода. Разумеется, выборка в нашей работе крайне мала, и это исследование можно считать пилотным; однако мы можем хотя бы на качественном уровне сделать ряд выводов.

Наши данные подтверждают ранние наблюдения о том, что желтые суслики являются строго дневными животными. Ни одна особь не выходила из норы до восхода солнца или после заката, что согласуется с другими работами по желтому суслику, в которых упоминается, что суслики практически не бывают на поверхности до 6:00 и после 18:00 (Орлов, 1925; Материалы..., 1929; Млекопитающие..., 1969) и в целом соответствует данным по другим видам наземных беличьих (Шилова, 2000).

В других работах по наземным беличьим связь между наземной и двигательной активностью подразумевается неявно, без инструментальной валидации (Hut *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2005). В ходе данного исследования с помощью сочетания акселерометров и датчиков освещенности мы проверили, насколько для желтого суслика правомерен подобный подход. Мы показали, что практически вся двигательная активность сусликов на протяжении суток приходилась на то время, когда зверьки пребывали на поверхности земли. Ночью суслики в норах были практически полностью неподвижны; но и в дневное время при уходе в нору зверьки снижали двигательную активность в несколько раз, хотя можно было ожидать, что в период подготовки к спячке суслики будут интенсивно расчищать норы. Вероятно, наиболее активная роющая деятельность у желтых сусликов приходится на другую фазу годового цикла, которая не попала в период, который мы анализируем в данной работе. Таким образом можно утверждать, что в норе желтые суслики находятся в состоянии покоя, и пребывание зверька на поверхности земли может быть использовано в качестве индикатора двигательной активности. По крайней мере, эта закономерность свойственна желтым сусликам в последние недели перед уходом в спячку.

В нашем исследовании бросается в глаза высокая вариабельность паттернов активности между особями: максимум наземной активности мог приходиться на утро, вечер или день; он мог быть не один, как у взрослого самца (см. рис. 2). Эту особенность наблюдали и ранее: Е. И. Орлов (1925) писал о сусликах, обитавших в районе с. Дьяковка в 1924 г.: “у каждого из них замечаются излюбленные моменты выхода из нор”; сходным образом, у голохвостого суслика (*Xerospermophilus tereticaudus*) разные особи демонстрировали устойчивые различия во времени начала дневной активности (Drabek, 1973). Наши данные недостаточны для исследования индивидуальных особенностей бюджета наземной активности, но имеющиеся сведения допускают существование внутри по-



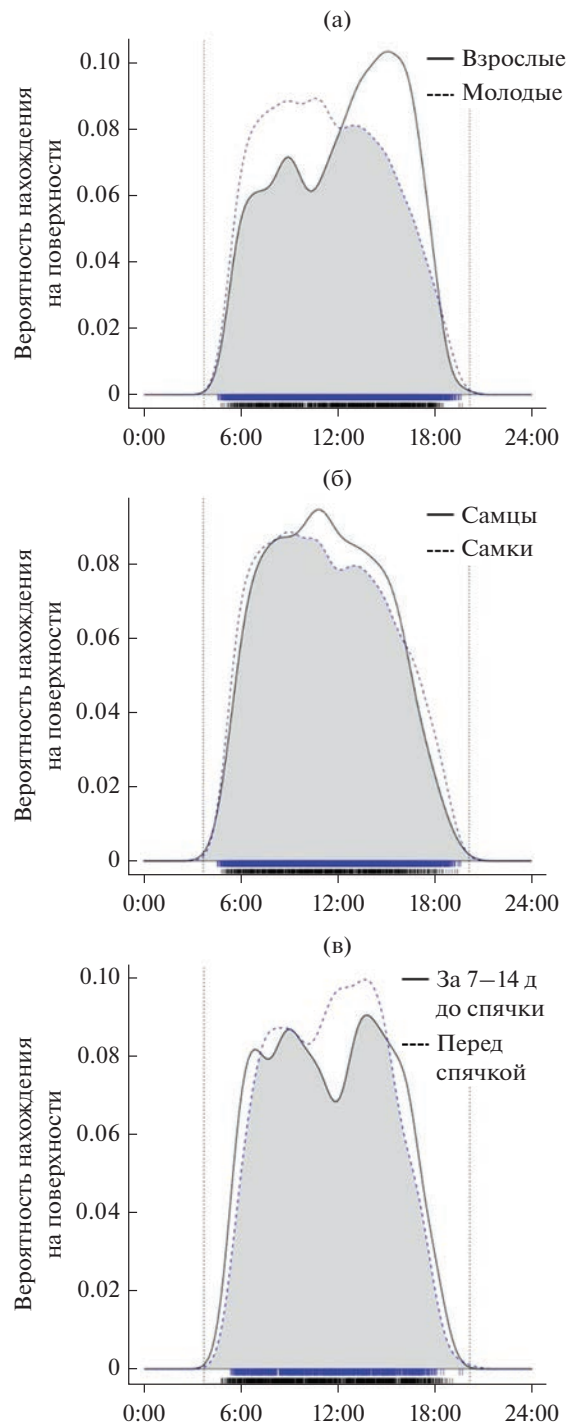


**Рис. 2.** Суточная динамика пребывания на поверхности земли желтых сузиков в период подготовки к спячке. По оси ординат представлено число регистраций на поверхности земли на каждый час на протяжении суток. “Взр.” = взрослый зверек, “дет.” = детеныш. \* График построен лишь по одному дню работы радиопередатчика (эта особь была убита собакой на третий день после поимки).

пуляции различных поведенческих стратегий распределения активности в течение суток, что требует дополнительных данных из природных популяций.

В ряде работ по желтому суслику исследователи отмечали, что в разгар лета наземная активность у этого вида, как правило, двухфазная: зверьки находятся на поверхности в утренние и вечерние часы, а в середине дня как взрослые, так и молодые зверьки уходят в норы (Орлов, 1925; Млекопитающие..., 1969). Например, на острове Барсакельмес (Казахстан) в июне перерыв в наземной активности желтых сусликов в течение дня продолжался с 10:00 до 16:00 (Млекопитающие..., 1969). Однако некоторые авторы указывают, что у желтого суслика может быть один пик наземной активности в течение суток (Орлов, 1925; Материалы..., 1929), что не вполне обычно для наземных белчихих.

Двухфазная наземная активность в середине лета, при которой днем зверьки отдыхают в норах, описана для многих других сусликов и сурков (напр., Bronson, 1962; Drabek, 1973; Шубин, 1988; Armitage, 1991; Katona *et al.*, 2002), а также для других видов дневных грызунов (Vasigalure *et al.*, 2003). У дневных грызунов снижение наземной активности днем связывают с приспособленностью к жизни в местообитаниях с высокими дневными температурами воздуха; то есть, уход в нору в середине дня является у таких видов своего рода поведенческой терморегуляцией, защищающей зверьков от перегрева (Млекопитающие..., 1969; Loehr, Risser, 1977; Vispo, Bakken, 1993; Váczi *et al.*, 2006). В течение срока наблюдений в нашем исследовании дневные температуры достигали +40°C градусов в тени (данные с регистратора температуры, размещенного на модельной территории). Тем не менее, в нашей выборке двухфазный паттерн бюджета активности был присущ только взрослому самцу, остальные особи, в том числе взрослая самка, демонстрировали однофазную наземную активность, в отличие от других видов наземных белчихих. Одна из причин подобного расхождения наших данных с другими работами может быть в том, что бюджет наземной активности у этого вида зависит от возраста: существуют свидетельства того, что детеныши пребывают на поверхности в течение всего дня, в то время как взрослым свойственна двухфазная наземная активность (Млекопитающие..., 1969). Согласно нашим данным, и молодые самцы, и самки дольше пребывали на поверхности земли на протяжении суток по сравнению со взрослыми зверьками. Можно предполагать, что экстремально длительная спячка задает жесткие временные рамки для детенышей, которые с момента выхода из нор в мае-июне к концу июля должны успеть в несколько раз увеличить массу тела, чтобы успешно перезимовать, а некоторые детеныши еще и успевают расселиться (Шилова и др., 2006; Васильева,



**Рис. 3.** Сравнение суточной динамики пребывания желтых сусликов на поверхности у взрослых и молодых особей (а), самцов и самок (б) а также в сроки 7–14 дней до спячки и в последнюю неделю перед спячкой (в). Различия достоверны (тест Вальда,  $p < 0.05$ ) для а) и в); кривые соответствуют функциям плотности, построенным в пакете *overlap*; серым цветом показаны области перекрытия. В нижней части графиков черным и синим цветами отмечены точные моменты регистраций (синий цвет везде соответствует пунктирным линиям, черный – сплошным). Вертикальные пунктирные линии соответствуют среднему времени восхода и заката в сроки наблюдений.

2011). В таких условиях молодые зверьки остаются на поверхности на протяжении дня максимально долго, в том числе в наиболее жаркие часы. Не вполне ожидаемым было отсутствие различий в бюджетах активности между молодыми самцами и самками, поскольку самцы у наземных беличьих являются расселяющимся полом, а самки склонны к филопатрии, и можно было предположить большую продолжительность наземной активности у самцов. Отчасти, это может объясняться недостаточным размером выборки; в то же время, вероятно, что молодые самцы и самки при одинаковых бюджетах наземной активности по-разному используют время, проведенное на поверхности, и по-разному используют пространство.

Снижение продолжительности пребывания на поверхности земли по мере приближения момента залегания в спячку не было очевидным образом связано с сокращением светового дня или с погодными условиями, поскольку эта закономерность прослеживалась у разных зверьков в разные календарные даты: как во второй половине июня, так и в конце июля. Данных в настоящем исследовании недостаточно для детального анализа этих взаимосвязей, поэтому мы можем обсуждать эти закономерности лишь на качественном уровне. Отметим, что у двух зверьков, у которых сокращения активности не было выявлено, был очень короткий период наблюдений, а в первые дни после поимки можно предполагать, наоборот, увеличение активности у этих пугливых животных. Снижение продолжительности наземной активности перед спячкой было описано, например, для колумбийского суслика *Urocitellus columbianus* (Betts, 1976).

Следует отметить, что не вполне понятно, как у желтого суслика и других дневных наземных беличьих возможна синхронизация бюджета активности с длиной светового дня. Такая синхронизация присуща млекопитающим в целом (Refinetti, 2019), однако наши данные и данные по близким видам сусликов свидетельствуют о том, что суслики никогда не находятся на поверхности земли в сумерках (Hut *et al.*, 1999; Everts *et al.*, 2004). Более того, использование датчиков освещенности позволяет утверждать, что они даже не приближаются к выходу из норы в эти периоды, чтобы определить моменты захода и восхода солнца и освещенность, при том, что такое поведение (“light sampling behaviour”) известно для некоторых видов млекопитающих (De Coursey, 1986). Известно, что у других видов наземных беличьих по мере приближения спячки в организме происходят существенные изменения в гормональном статусе, биохимических показателях крови и др. (напр., Boonstra *et al.*, 2011; Wilsterman *et al.*, 2015). Возможно, постепенные изменения в продолжительности наземной активности у желтых сусли-

ков в большей степени могут быть связаны с физиологическими перестройками, обусловленными подготовкой к спячке, а не с изменениями внешних условий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы впервые получили детальные данные о суточном бюджете наземной активности желтого суслика. Несмотря на ограниченный объем выборки, эти данные могут быть полезны при планировании исследований данного вида, в том числе, учетов численности, мониторинга популяций и др. Один из результатов данной работы – отсутствие выраженного снижения уровня наземной активности в середине дня – согласуется с представлениями о желтом суслике как о виде с “быстрым” жизненным циклом. Возможно, в условиях экстремально длительной зимней спячки и, соответственно, ограниченного времени на рост и набор веса, желтые суслики (в первую очередь, детеныши) максимально используют дневные часы для питания, подготовки нор к зиме и др., однако, это предположение требует дальнейших исследований в природе.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарны Л.Е. Савинецкой, А.В. Чабовскому, Н.В. Сидорчук, Е.В. Кузнецовой. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00610, <https://rscf.ru/project/22-24-00610/>.

This research was supported by the Russian Science Foundation, project number 22-24-00610, <https://rscf.ru/project/22-24-00610/>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васьлева Н.А., Савинецкая Л.Е., Чабовский А.В. Крупный размер тела и короткий период наземной активности не препятствуют быстрому росту желтого суслика *Spermophilus fulvus* // Зоол. Журн. 2009. Т. 88. № 3. С. 339–343.
- Васьлева Н.А. Факторы, влияющие на репродуктивное поведение и успех размножения у желтого суслика (*Spermophilus fulvus*): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 2011. 24 с.
- Васьлева Н.А., Чабовский А.В. Принятие репродуктивных решений в контексте “быстрого” жизненного цикла (на примере желтого суслика *Spermophilus fulvus*) // Журн. Общ. Биол. 2017. Т. 78. № 1. С. 3–14.
- Материалы к познанию фауны нижнего Поволжья. Вып. IV / Ред. Траут И.И., Орлов Е.И. Саратов: Изд. отдела применения Нилов. 1929. 122 с.
- Млекопитающие Казахстана. Т. 1 / Ред. Слудский А.А. Алма-Ата: Наука, 1969. 455 с.
- Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран (звери Восточной Европы и Северной Азии). М.-Л.: АН СССР. 1947. 559 с.

- Орлов Е.И. Желтый суслик. Биологические наблюдения // Вестн. Микробиол. и Эпидемиол. 1925. Т. 4. Вып. 1. С. 58–66.
- Рашитов С.С. Влияние суточной активности сурков на накопление ими жира // Извест. Межд. Акад. Аграр. Образ. 2018. № 43. С. 175–179.
- Росолимо О.Л., Павлинов И.Я., Крускоп С.В., Лисовский А.А., Спаская Н.Н., Борисенко А.В., Панютина А.А. Разнообразии млекопитающих. Ред. Россолимо О.Л. М.: КМК, 2004. 366 с.
- Шилова С.А. Пространственная и социальная организация земляных белок (р. *Spermophilus*, *Xerus*, *Cynomys*) как модель эколого-этологических исследований // Усп. Совр. Биол. 2000. Т. 120. № 6. С. 559–572.
- Шилова С.А. Земляные белки // Природа. 2004. № 3. С. 41–48.
- Шилова С.А., Савинецкая Л.Е., Чабовский А.В. Долговременная и современная динамика популяции желтого суслика (*Spermophilus fulvus*, Rodentia, Sciuridae) в Приерусланских песках Заволжья // Зоол. журн. 2015. Т. 94. № 8. С. 944–954.
- Шилова С.А., Чабовский А.В., Попов В.С. Особенности формирования поселений желтого суслика (*Spermophilus fulvus* Licht., 1823) при вселении на свободную территорию // Бюллетень МОИП. Отдел биологический. 2006. Т. 111. № 5. С. 71–75.
- Шубин В.И. Особенности взаимоотношений в семейных группах байбака // Экология и поведение млекопитающих Казахстана // Тр. Ин-та зоологии АН Каз. ССР. 1988. Т. 44. С. 112–132.
- Allen M.L., Peterson B., Krofel M. No respect for apex carnivores: distribution and activity patterns of honey badgers in the Serengeti // Mamm. Biol. 2018. V. 89. P. 90–94.
- Armitage K.B. Individual differences in the behavior of juvenile yellow-bellied marmots // Behav. Ecol. Soc. 1986. V. 18. P. 419–424.
- Armitage K.B. Social and population dynamics of yellow-bellied marmots: results from long-term research // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1991. V. 22. P. 379–407.
- Ashby K.R. Patterns of daily activity in mammals // Mammal Review. 1972 V. 1. P. 171–185.
- Bacigalupe L.D., Rezende E.L., Kenagy G.J., Bozinovic F. Activity and space use by degus: a trade-off between thermal conditions and food availability? // J. Mammal. 2003. V. 84. P. 311–318.
- Bartness T.J., Albers H.E. Activity patterns and the biological clock in mammals // Activity patterns in small mammals / Springer, Berlin, Heidelberg. 2000. P. 23–47.
- Betts B.J. Behaviour in a population of Columbian ground squirrels, *Spermophilus columbianus columbianus* // Anim. Behav. 1976. V. 24. P. 652–680.
- Boonstra R., Bradley A.J., Delehanty B. Preparing for hibernation in ground squirrels: adrenal androgen production in summer linked to environmental severity in winter // Funct. Ecol. 2011. V. 25. P. 1348–1359.
- Bronson F.H. Daily and seasonal activity patterns in woodchucks // J. Mammal. 1962. V. 43. P. 425–427.
- Buchanan K., Burt de Perera T., Carere C., Carter T., Hailey A., Hubrecht R., Jennings D., Metcalfe N., Pitcher T., Peron F., Sneddon L., Sherwin C., Talling J., Thomas R., Thompson M. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching // Anim. Behav. 2012. V. 83. P. 301–309.
- Chmura H.E., Zhang V.Y., Wilbur S.M., Barnes B.M., Buck C.L., Williams C.T. Plasticity and repeatability of activity patterns in free-living Arctic ground squirrels // Anim. Behav. 2020. V. 169. P. 81–91.
- Clutton-Brock T.H., Iason G.R., Albon S.D., Guinness F.E. Effects of lactation on feeding behaviour and habitat use in wild red deer hinds // J. Zool. 1982. V. 198. P. 227–236.
- Daan S., Aschoff J. Circadian rhythms of locomotor activity in captive birds and mammals: their variations with season and latitude // Oecologia. 1975. V. 18. P. 269–316.
- De Coursey P.J. Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm // J. Comp. Physiol. A. 1986. V. 159. P. 161–169.
- Dobson F.S. Environmental influences on sciurid mating systems // The Biology of Ground-Dwelling Squirrels / Eds Murie J.O., Michener G.R. Lincoln, L.: Univ. Nebraska Press. 1984. P. 227–249.
- Drabek C.M. Home range and daily activity of the round-tailed ground squirrel, *Spermophilus tereticaudus neglectus* // Am. Midl. Nat. 1973. V. 89. P. 287–293.
- Everts L.G., Strijkstra A.M., Hut R.A., Hoffmann I.E., Millesi E. Seasonal variation in daily activity patterns of free-ranging European ground squirrels (*Spermophilus citellus*) // Chronobiol. Int. 2004. V. 21. P. 57–71.
- Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals // Front. Neuroendocrinol. 2007. V. 28. P. 61–71.
- Heller H.C., Ruby N.F. Sleep and circadian rhythms in mammalian torpor // Annu. Rev. Physiol., 2004. V. 66. P. 275–289.
- Hut R.A., van Oort B.E., Daan S. Natural entrainment without dawn and dusk: the case of the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*) // J. Biol. Rhythms. 1999. V. 14. P. 290–299.
- Katona K., Vácz O., Altbäcker V. Topographic distribution and daily activity of the European ground squirrel population in Bugacpuszta, Hungary // Acta Theriol. 2002. V. 47. P. 45–54.
- Kenagy G.J., Hoyt D.F. Speed and time-energy budget for locomotion in golden-mantled ground squirrels // Ecology. 1989. V. 70. P. 1834–1839.
- Loehr K.A., Risser A.C. Daily and seasonal activity patterns of the Belding ground squirrel in the Sierra Nevada // J. Mammal. 1977. V. 58. P. 445–448.
- Long R.A., Hut R.A., Barnes B.M. Simultaneous collection of body temperature and activity data in burrowing mammals: a new technique // J. Wildl. Manag. 2007. V. 71. P. 1375–1379.
- Long R.A., Martin T.J., Barnes B.M. Body temperature and activity patterns in free-living arctic ground squirrels // J. Mammal. 2005. V. 86. P. 314–322.
- Malan A. Is the torpor-arousal cycle of hibernation controlled by a non-temperature-compensated circadian clock? // J. Biol. Rhythms. 2010. V. 25. P. 166–175.
- Meredith M., Ridout M., Meredith M.M. Package ‘overlap’. Estimates of coefficient of overlapping for animal activ-

- ity patterns. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=overlap>.
- Pinheiro J., Bates D. R Core Team. nlme: Linear and Non-linear Mixed Effects Models. R package version 3.1-159. 2022. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Podolski I., Belotti E., Bufka L., Reulen H., Heurich M. Seasonal and daily activity patterns of free-living Eurasian lynx *Lynx lynx* in relation to availability of kills // *Wildlife Biol.* 2013. V. 19. P. 69–77.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing. 2021. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Refinetti R. Circadian physiology. CRC press. 2019. 174 p.
- Ridout M.S., Linkie M. Estimating overlap of daily activity patterns from camera trap data // *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 2009. V. 14. P. 322–337.
- Rowcliffe M., Rowcliffe M.M. Package ‘activity’. Animal activity statistics R Package Version 1.3.2.2022. <https://CRAN.R-project.org/package=activity>.
- Schmidt K. Variation in daily activity of the free-living Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Białowieża Primeval Forest, Poland // *J. Zool.* 1999. V. 249. P. 417–425.
- Váczí O., Koósz B., Altbäcker V. Modified ambient temperature perception affects daily activity patterns in the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J. Mammal.* 2006. V. 87. P. 54–59.
- Vasilieva N.A., Pavlova E.V., Naidenko S.V., Tchabovsky A.V. Age of maturation and behavioral tactics in male yellow ground squirrel *Spermophilus fulvus* during mating season // *Cur. Zool.* 2014. V. 60. P. 700–711.
- Vasilieva N.A., Tchabovsky A.V. Timing is the only thing: Reproduction in female yellow ground squirrels (*Spermophilus fulvus*) // *Can. J. Zool.* 2014. V. 92. P. 737–747.
- Vasilieva N.A., Tchabovsky A.V. A shortage of males causes female reproductive failure in yellow ground squirrels // *Science Advances.* 2015. V. 1. № 9. e1500401.
- Vieira E.M., Baumgarten L.C., Paise G., Becker R.G. Seasonal patterns and influence of temperature on the daily activity of the diurnal neotropical rodent *Necomys lasiurus*. *Can. J. Zool.* 2010. V. 88. P. 259–265.
- Vispo C.R., Bakken G.S. The influence of thermal conditions on the surface activity of thirteen-lined ground squirrels. *Ecology.* 1993. V. 74. P. 377–389.
- Waterman J.M. Male mating strategies in rodents // *Rodent societies: an ecological and evolutionary perspective* / Eds Sherman P.W., Wolff J.O. Chicago: Univ. Chicago Press. 2007. P. 27–41.
- Williams C.T., Wilsterman K., Kelley A.D., Breton A.R., Stark H., Humphries M.M., McAdam A.G., Barnes B.M., Boutin S., Buck C.L. Light loggers reveal weather-driven changes in the daily activity patterns of arboreal and semifossorial rodents // *J. Mammal.* 2014. V. 95. P. 1230–1239.
- Wilsterman K., Buck C.L., Barnes B.M., Williams C.T. Energy regulation in context: free-living female arctic ground squirrels modulate the relationship between thyroid hormones and activity among life history stages // *Horm. Behav.* 2015. V. 75. P. 111–119.

## Circadian Activity in Yellow Ground Squirrels *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae): the Pilot Instrumental Study

N. A. Vasilieva<sup>1, #</sup>, A. A. Lupyrev<sup>1, 2</sup>, and N. S. Vasiliev<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect, 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>2</sup> *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

#e-mail: [ninavasilieva@gmail.com](mailto:ninavasilieva@gmail.com)

Animal circadian activity was mostly studied in captivity with artificial environment. We performed pioneer study of daily activity using telemetry for yellow ground squirrels (*Spermophilus fulvus*), burrowing hibernating rodents. Eight individuals were fitted with glued-on radio transmitters contained accelerometers and light sensors in the wild colony in 2021. Our data showed that *S. fulvus* was strictly diurnal and active aboveground only during daytime. The squirrels ceased locomotor activity and rested when they entered their burrows. As the season progressed, the duration of aboveground activity decreased. In contrast to similar species with peaks of aboveground activity in the morning and in the evening, yellow ground squirrels didn't break the activity in midday. Probably, prolonged hibernation and, therefore, time deficiency induced *S. fulvus* to use day hours as effective as possible.

**Keywords:** daily activity, radio transmitters, ground squirrels, yellow ground squirrel

ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 591.15:91.545

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ СВЕТОВОГО ДНЯ  
НА ВРОЖДЕННУЮ И ПРИОБРЕТЕННУЮ ГУМОРАЛЬНУЮ  
ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ ХОМЯЧКА КЭМПБЕЛЛА  
(*Phodopus campbelli* Thomas, 1905)

© 2023 г. А. М. Хрушова\*, @, Н. Ю. Васильева\*, О. Н. Шекарова\*, К. А. Роговин\*

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

@E-mail: cricetulus@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.03.2023 г.

После доработки 31.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

У самцов хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905), содержащихся при долгом (LD, 16С : 8Т) и коротком (SD, 6С : 18Т) световом дне, исследовали врожденную гуморальную иммуно-реактивность (ВГИ) – гемолиз кроличьих эритроцитов белками комплемента, приобретенный гуморальный (В-клеточный) иммунный ответ (ПГИ) на внутрибрюшинную инъекцию эритроцитов барана, морфологические и гормональные репродуктивные характеристики и уровень стресса (кортизол в крови). Через два месяца экспозиции SD самцы имели меньшую относительно LD массу тела, уменьшенное аногенитальное расстояние и размер специфической среднебрюшной железы, более низкий уровень тестостерона, но не уровень кортизола в крови. Результаты свидетельствуют об усилении ВГИ, но не ПГИ на коротком дне. Сравнение SD фоторефрактерных, SD фоточувствительных и LD особей продемонстрировало статистически значимое усиление ВГИ у SD фоточувствительных хомячков по сравнению с LD. Связь между ВГИ и ПГИ отсутствовала, что свидетельствует о независимой реакции на фотопериод разных ветвей системы иммунитета.

**Ключевые слова:** фотопериодизм, гуморальный врожденный иммунитет, гуморальный приобретенный иммунитет, зимнее усиление иммунитета, *Phodopus campbelli*

**DOI:** 10.31857/S1026347023600280, **EDN:** GFFOPS

Известное явление зимнего усиления иммунитета у сезонно размножающихся млекопитающих умеренных и холодных климатических зон (Sinclair, Lochmiller, 2000) может рассматриваться как адаптация к противодействию сезонным инфекциям, чаще встречающимся в осеннее и зимнее время (Nelson, 2004). Механизм зимнего усиления иммунитета обычно объясняется с позиции двух не исключают одна другую гипотез – гипотезы эндогенных компенсаторных механизмов, усиливающих иммунную функцию зимой в условиях действия зимних стрессоров (бескормица, низкие температуры) (Nelson, Demas, 1996; Sinclair, Lochmiller, 2000; Nelson, 2004), и гипотезы компромисса жизненных интересов (tradeoff hypothesis), согласно которой усиление иммунитета зимой происходит в результате снижения конкурентного давления со стороны репродуктивной системы и сопутствующих размножению ресурсозатратных функций (Martin *et al.*, 2004, 2006; Greenman *et al.*, 2005). Действительно, хорошо известно, что у сезонно размножающихся млекопитающих продолжительность светлого

времени суток является сигнальным фактором, определяющим ряд функций, в первую очередь репродуктивную (обзор: Prendergast *et al.*, 2002; Hazlerigg 2012). В отношении иммунитета эффекты влияния фотопериода не столь однозначны, результаты исследований и выводы из них противоречивы (Martin *et al.*, 2008; Ter Horst *et al.*, 2021). Так, в природе эффект усиления иммунитета зимой может быть замаскирован действием внешних зимних стрессоров, а летом внутренними стрессовыми ситуациями (репродукция, линька, подготовка к зиме) (Martin *et al.*, 2008). Различия в образе жизни и местообитаниях могут также объяснить усиление иммунитета зимой у одних видов и его отсутствие у других (Nelson, 2004; Lee, 2006; Martin *et al.*, 2008).

Работы, посвященные изучению сезонной изменчивости иммунитета, касаются, как правило, одной, реже двух ветвей многоуровневой, глубоко эшелонированной системы иммунной защиты организма (Martin *et al.*, 2008). Вопрос о том, в какой степени разные звенья иммунной системы подвержены сезонной изменчивости и насколько

может различаться глубина таких изменений у разных видов, продолжает оставаться дискуссионным (Лохмиллер, Мошкин, 1999; Martin *et al.*, 2008; Scheiermann *et al.*, 2018; Onishi *et al.*, 2020). Результаты исследований могут зависеть от того, какая ветвь сложной системы иммунной защиты организма исследуется (врожденный, приобретенный клеточный, приобретенный гуморальный) и особенностей используемых методических приемов (Martin *et al.*, 2008; Zysling *et al.*, 2009; Adelman *et al.*, 2013; Stevenson, Prendergast 2015; Schults *et al.*, 2017).

Наиболее простой вариант сравнения реакции разных ветвей иммунной системы на сезонные факторы – лабораторный эксперимент с изменением продолжительности светового дня при стандартизации и оптимизации всех других условий содержания животных (Nelson, 2004). Несомненно, что особенности зимней биологии видов, на которых проводятся исследования, могут определять результаты экспериментов. Поэтому для решения спорных вопросов, касающихся сезонных изменений иммунитета, представляется перспективным изучение таксономически близких видов, отличающихся по характеру адаптаций к зимним условиям. Удобной моделью для подобного рода исследований являются хомячки рода *Phodopus*.

Джунгарский хомячок (*Phodopus sungorus* Pallas, 1773) используется в хронобиологических исследованиях с середины прошлого века. В условиях короткого дня у самцов происходит ослабление репродуктивной функции с одновременным усилением агрессивности (Jasnow *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2007; Bedrosian *et al.*, 2012; Rendon *et al.*, 2016) и повышением концентрации глюкокортикоидов в крови (Bilbo *et al.*, 2002). У хомячков наблюдается подавление вторичного приобретенного В-клеточного иммунного ответа на KLH-антиген (Prendergast *et al.*, 2004). При этом разные показатели, отражающие состояние врожденного иммунитета, в условиях короткого дня меняются разнонаправленно. Так, в условиях эксперимента у самцов усиливалась выраженность реакции воспаления в ответ на внутрикожное введение DNFB антигена, возрастало абсолютное количество циркулирующих в крови лейкоцитов и лимфоцитов (Bilbo *et al.*, 2002; Prendergast *et al.*, 2004). В то же время, ослабевала выраженность синдрома болезненного поведения, определяемого воздействием на мозг высвобождаемых Т-лимфоцитами цитокинов в ответ на антигены разного происхождения (Baillie, Prendergast, 2008), не развивался перитонит в ответ на внутрибрюшинное введение зимозана (Pawlak *et al.*, 2009). Эти данные свидетельствуют о наличии сложной связи между разными физиологическими процессами, участвующими в регуляции врожденного иммунитета

и запускаемыми снижением длины светового дня (Pawlak *et al.*, 2009).

Результаты экспериментов по влиянию короткого светового дня на иммунитет хомячка Роборовского (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903) также противоречивы. Так, у самцов режим короткого дня вызывал снижение массы тела, усиление удельного основного и удельного максимального обмена, инволюцию репродуктивных органов, повышал фоновый уровень стресса, однако не отражался на интенсивности приобретенного гуморального иммунного ответа на введение бараньих эритроцитов. В то же время у экспериментальных животных уменьшалось число гранулоцитов в профилях периферической крови, но при этом возрастало число лимфоцитов (Vasilieva *et al.*, 2020).

Данные о влиянии длины светового дня на показатели иммунитета представителей третьего вида рода, хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905) – обитателя сухих степей и полупустынь Центральной Азии, вида с сезонным размножением (Соколов, Орлов, 1980; Rogovin *et al.*, 2014a), не известны. Показано, однако, что половозрелые особи разных лабораторных популяций, происходящих от животных из разных частей ареала, различаются по реакции на содержание в условиях короткого светового дня. Так, выраженное торможение роста и развития половой системы демонстрировали молодые особи, полученные от животных из крайней западной части ареала, Чуйской степи (Васильева, Парфенова, 2003), представляющих по результатам анализа митохондриальной ДНК самостоятельную кладогруппу (Мещерский, Феоктистова, 2009). Поэтому хомячки этой линии были выбраны в качестве модели для работы, целью которой была проверка предположения о том, что индуцированное содержанием на коротком световом дне угнетение половой системы может привести к повышению иммунокомпетентности животных.

В задачи исследования входило оценить: 1) влияние экспозиции короткого светового дня на врожденную и приобретенную иммунореактивность, репродуктивные и размерные характеристики хомячков, 2) возможное наличие и направление связи показателей активности двух сравниваемых ветвей иммунной системы, 3) связь каждого из иммунных показателей с состоянием репродуктивной системы самцов, содержащихся на коротком и длинном световом дне.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Экспериментальные хомячки происходили из лабораторной популяции ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, ведущей начало от особей, вывезенных в 1980–1990-е гг. из популяции



окрестностей села Кош-Агач (Кош-Агачский район Республики Алтай). Животных содержали в стандартных условиях, при фотопериоде 16С : 8Т и температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Корм (комбикорм для крыс, мышей и хомячков, овес, семена подсолнечника, черный хлеб, свежие овощи) и вода всегда были *ad libitum*. В качестве подстилки использовали древесную стружку. Смену подстилки производили раз в 10 дней, не менее чем за неделю до любых манипуляций с животными. Все клетки были снабжены укрытиями и беговыми колесами.

**Схема эксперимента.** Экспериментальные самцы находились с родителями и сибсами до возраста 1 мес. Затем их содержали в садках из пластика ( $70 \times 40 \times 40$  см) однополыми группами по 10 особей. Первого июля 2021 г. у всех хомячков, возраст которых составил к этому времени 2–3 мес., определили массу и длину тела, аногенитальное расстояние (АГР) и размер среднебрюшной железы (СБЖ) ( $L \times l$ ), отражающей репродуктивный статус самцов (Соколов и др., 1990). Затем животных разделили на небольшие группы по 4–5 особей, подобрав их состав таким образом, чтобы по указанным морфометрическим параметрам и возрасту группы были попарно выровнены. Через 25 дней подобранные таким образом пары групп были равномерно распределены на экспериментальные (короткий световой день, SD, 6С : 18Т) (37 самцов) и контрольные группы, которые продолжали находиться на длинном световом дне (LD, 16С : 8Т) (40 самцов). Свет в обоих помещениях включался в 8 ч утра. На момент начала эксперимента различия между SD и LD выборками по морфометрическим показателям и возрасту отсутствовали.

Через два месяца, в период между 24 и 27 сентября 2021 г., у самцов были взяты пробы крови для определения уровня тестостерона и кортизола в сыворотке крови и для характеристики активности нативного врожденного гуморального иммунитета (подробнее см. ниже).

Кровь (около 350 мкл) брали из подъязычного синуса по модифицированной методике Б.М. Граевской (Graievskaya *et al.*, 1986) в одно и то же время в начале световой фазы (в промежутке 1–2 ч после включения света). На процедуру взятия пробы у одного животного затрачивали не более 1.5 мин, что в 2 раза меньше времени выброса глюкокортикоидов в кровь в ответ на стрессовое воздействие (Rogovin *et al.*, 2014b). Сыворотку отделяли путем центрифугирования в течение 15 мин при относительном центробежном ускорении ротора  $RCF = 800$ , замораживали и до анализа хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

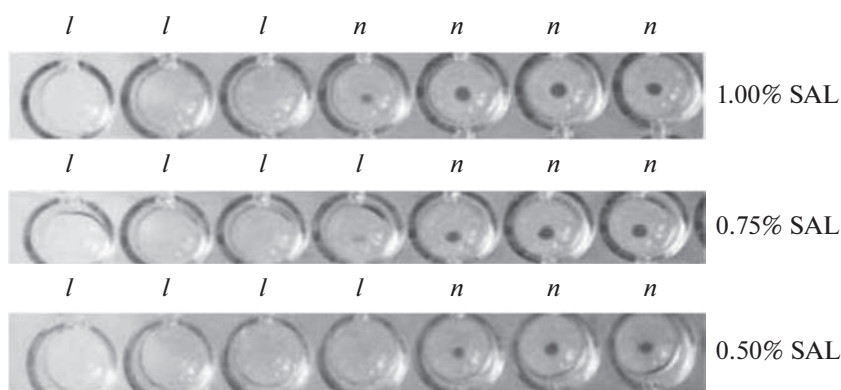
После взятия крови хомячков взвешивали с точностью до 0.1 г, измеряли у них длину тела, АГР, длину и ширину СБЖ с точностью до 0.1 мм цифровым штангенциркулем.

Иммунизацию хомячков бараными эритроцитами из дефибринированной крови, законсервированной в растворе Олсвера (производитель ООО “КролИнфо”, Орехово-Зуево, Московская обл., РФ), проводили 11–12.10.2021 и 13–14.10.2021. В интервале с 18 до 19 ч вечера самцам вводили внутривенно 2%-ную по объему суспензию эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе из расчета 2 мкл/г веса. Предварительно ЭБ трижды отмывали физиологическим раствором от консерванта, центрифугируя при  $RCF = 800$  в течение 15 мин. Полученную эритроцитарную массу суспендировали в физиологическом растворе до необходимой концентрации. На 7-е сут после иммунизации брали вторую порцию крови из подъязычной вены для оценки титра антител к ЭБ на пике иммунного ответа (Rogovin *et al.*, 2014b). После взятия крови хомячков взвешивали, измеряли у них длину тела, аногенитальное расстояние, длину и ширину среднебрюшной железы.

**Врожденная иммунореактивность.** Метод гемолиза-гемагглютинации ЕАТ (hemolysis-hemagglutination assay) эритроцитов был впервые предложен для характеристики состояния конституционального врожденного иммунитета у разных видов птиц К. Матсоном с соавторами (Matson *et al.*, 2005). С тех пор метод был многократно применен орнитологами в неизменном виде (Butler *et al.*, 2013). В исследованиях млекопитающих методика К. Матсона с соавторами использовалась значительно реже и с дополнительными модификациями, что было связано с физиолого-биохимическими отличиями исследованных видов млекопитающих от птиц (Gilot-Fromont *et al.*, 2012; Racca *et al.*, 2014; Heinrich *et al.*, 2017; Ruoss *et al.*, 2019 и др.).

В настоящей работе использовали частично модифицированную нами методику К. Матсона с соавторами (Matson *et al.*, 2005). Мы оценивали исключительно реакцию гемолиза (лизиса) чужеродных эритроцитов сывороткой крови хомячков. Мы отказались от использования гепарина при взятии крови из-за слабой выраженности реакции гемагглютинации, перекрываемой лизисом. Добавление эритроцитов в качестве антигена к сыворотке крови неиммунизированных хомячков дает хорошо выраженную картину гемолитической активности, что также может быть связано с развитием каскада реакций активации комплемента по альтернативному пути без участия антител.

В качестве чужеродных красных кровяных клеток были выбраны эритроциты кролика (ЭК) (Seto, Henderson, 1968; Matson *et al.*, 2005), поскольку в предварительном тесте было показано, что их использование дает более высокие показатели гемолитической активности по сравнению с традиционно используемыми в исследованиях приобретенной гуморальной иммунореактивно-



**Рис. 1.** Пример реакции гемолиза эритроцитов кролика сывороткой крови самцов хомячка Кэмпбелла. Цифровое фото. SAL – физиологический раствор; *l* – лизис, *n* – отсутствие реакции.

сти ЭБ (Wilcoxon Matched Pairs Test;  $Z = 2.49$ ;  $N_1 = N_2 = 11$ ;  $p = 0.01$ )

ЭК получали из дефибринированной крови, законсервированной в растворе Олсвера (1 : 1; производитель: ООО “КролИнфо” Орехово-Зуево, Московская обл., РФ). Эритроциты отмывали четыре раза физиологическим раствором с центрифугированием взвеси при шадящем режиме ( $RCF = 200$ ) в течение 5 мин. Рабочую объемную концентрацию взвеси эритроцитов рассчитывали с использованием гематокритных капилляров. Вместо рекомендованного 0.01 М фосфатно-солевого буферного раствора (Matson *et al.*, 2005) использовали физиологический раствор, поскольку он обеспечивал лучшее разрешение при визуальной оценке гемолиза. Предварительно проверяли три концентрации добавляемой к сыворотке крови хомячков взвеси эритроцитов: 0.5% (Rogovin *et al.*, 2014b), 1% (Matson *et al.*, 2005) и 0.75%. При оценке гемолитической активности сыворотки чувствительность метода оказалась более высокой при использовании 0.5% взвеси ЭК в физиологическом растворе по сравнению с рекомендованной 1% суспензией (Wilcoxon Matched Pairs Test:  $Z = 2.2$ ,  $p = 0.028$ ,  $N_1 = N_2 = 10$ ). Учитывая низкие в норме показатели гемолиза, концентрация 0.5% может быть предпочтительной, т.к. обеспечивает большую чувствительность метода. С другой стороны, 1% суспензия ЭК дает лучшую воспроизводимость результата и более четкую оценку границы реакции, упрощая визуальную оценку в ущерб чувствительности метода (рис. 1). Мы остановились на промежуточном варианте – 0.75% по объему. Эта концентрация также обеспечивает хорошую воспроизводимость оценки ( $y = 0.97x - 0.11$ ;  $R^2 = 0.93$ ;  $n = 14$ ).

Использовали 96-луночный иммунологический планшет из полистирола с U-образными лунками. Автоматической пипеткой-дозатором в лунки 1 и 2 вносили по 25 мкл сыворотки крови хомячка, в лунки 2–9 – по 25 мкл физиологическо-

го раствора. Титрование начинали со 2-й лунки, переноса по 25 мкл перемешанного содержимого из лунки в лунку. Из 8-й лунки 25 мкл жидкости после перемешивания удаляли. Девятая лунка служила отрицательным контролем. В лунки 1–9 добавляли по 25 мкл взвеси эритроцитов кролика в физиологическом растворе в концентрации 0.75% по объему. Планшет после легкого перемешивания закрывали крышкой, помещали в полиэтиленовый пакет и ставили на инкубацию при температуре 38°C на 90 мин. Температурный режим был подобран как оптимальный для вида ранее при оценках реакции гемагглютинации после иммунизации хомячков Кэмпбелла ЭБ (Rogovin *et al.*, 2014b). Через 90 мин планшет вынимали и оставляли при комнатной температуре для визуализации максимума гемолитической реакции на 20 мин в наклонном положении под углом 45° и затем еще на 70 мин в горизонтальном положении (Matson *et al.*, 2005). Критерием оценки интенсивности гемолиза внесенных эритроцитов служил номер лунки, после которого реакция уже не наблюдалась (рис. 1).

**Приобретенная гуморальная (В-клеточная) иммунореактивность.** Уровень антител в сыворотке крови иммунизированных хомячков определяли по реакции гемагглютинации (Wegmann, Smithies, 1966) в лунках 96-луночного иммунологического планшета путем титрования образцов сыворотки крови в лунках и добавления к пробам сыворотки в кратных разведениях 0.5% суспензии ЭБ в физиологическом растворе (производитель: ООО “КролИнфо” Орехово-Зуево, Московская обл., РФ). Эритроциты из законсервированной раствором Олсвера дефибринированной бараньей крови были предварительно трижды отмывали от консерванта с центрифугированием при  $RCF = 800$ . Принимая во внимание в норме хорошо выраженный индуцированный иммунизацией гуморальный иммунный ответ, с целью экономии сыворотки крови хомячков раскапывание начинали

с 3-й ячейки ряда. Предварительно в ячейки, начиная с 4-й, вносили по 50 мкл физиологического раствора. В третью ячейку вносили 25 мкл образца сыворотки и 75 мкл физиологического раствора, тщательно перемешивали пипеткой-дозатором и переносили 50 мкл суспензии в следующую лунку, тщательно перемешивали и т.д. Из последней лунки ряда 50 мкл содержимого удаляли. В лунку добавляли по 50 мкл суспензии эритроцитов. Герметично закрытый планшет инкубировали в течение 120 мин при  $+38^{\circ}\text{C}$ . Титр антител (ТАТ) в сыворотке крови оценивали визуально по номеру последней лунки планшета, в которой при последовательных кратных разведениях содержалось еще достаточное для агглютинации количество антител. Порядковый номер лунки использовали как показатель интенсивности иммунного ответа. В случае значения, промежуточного между двумя соседними лунками, к номеру предыдущей лунки прибавляли 0.5. В редких случаях, когда реакция в 3-й лунке отсутствовала, проводили оценку для больших концентраций сыворотки крови: первая лунка – 50 мкл сыворотки, вторая лунка – 50 мкл сыворотки + 50 мкл физиологического раствора.

**Гормоны.** Концентрации тестостерона и кортизола в сыворотке крови оценивали методом прямого конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Использовали готовые тест-системы “ИФА-ТС (тестостерон)” и “ИФА-кортизол” (ЗАО “НВО Иммунотех”, Москва, Россия). Перекрестная реакция кортизола с тестостероном для указанных наборов составляла 0.08%. Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре Multiskan FC ThermoScientific при длине волны 450 нм. Концентрации гормонов были рассчитаны автоматически сразу после измерения с помощью программного обеспечения ScanIt Software 6.0.1. В случае, если концентрация тестостерона оказывалась выше предлагаемого производителем предела чувствительности тест-системы, сыворотку разводили буферным “Раствором для разведения сыворотки крови” того же производителя.

**Статистика.** Статистический анализ был проведен на базе пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., USA). Сравнения независимых выборок самцов, после содержания на SD и LD режимах, были проведены по следующим переменным: 1) врожденный иммунитет (гемолиз, у. е.), 2) приобретенный В-клеточный иммунитет (у. е.), 3) фоновый уровень тестостерона (до иммунизации ЭБ; Lg, нмоль/л), 4) фоновый уровень кортизола (до иммунизации ЭБ; Lg, нмоль/л), 5) масса тела (г), 6) длина тела (мм), 7) отношение массы к длине тела, 8) аногенитальное расстояние, АГР (мм), 9) среднебрюшная железа, СБЖ (мм<sup>2</sup>).

Для оценки отклонений от нормальных распределений использовали в качестве основного

тест Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk test) и как дополнительный, параллельно с визуальной оценкой гистограмм, – тест Колмогорова–Смирнова. Для оценки гомогенности распределений использовали тест Левена (Levene’s test for homogeneity of variances). Значения концентрации гормонов с целью нормализации распределений логарифмировали. Для сравнения нормально распределенных характеристик SD и LD самцов использовали средние с ошибкой и *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок. В случаях значимых отклонений от нормального распределения по критерию Шапиро–Уилка использовали непараметрический тест Манна–Уитни (Mann–Whitney *U* test). В табл. 1 для переменных, распределение которых удовлетворяло критерию Колмогорова–Смирнова, но не проходивших по критерию Шапиро–Уилка, приведены значения критериев оценки различий параметрическими и непараметрическими методами. Средние и медианы с пределами изменчивости приведены в табл. 1 для всех случаев. Связь индивидуальных показателей врожденного и приобретенного иммунитета у хомячков в SD и LD группах оценена с помощью непараметрического коэффициента корреляции Спирмена, поскольку распределения по критерию Шапиро–Уилка отличались от нормальных.

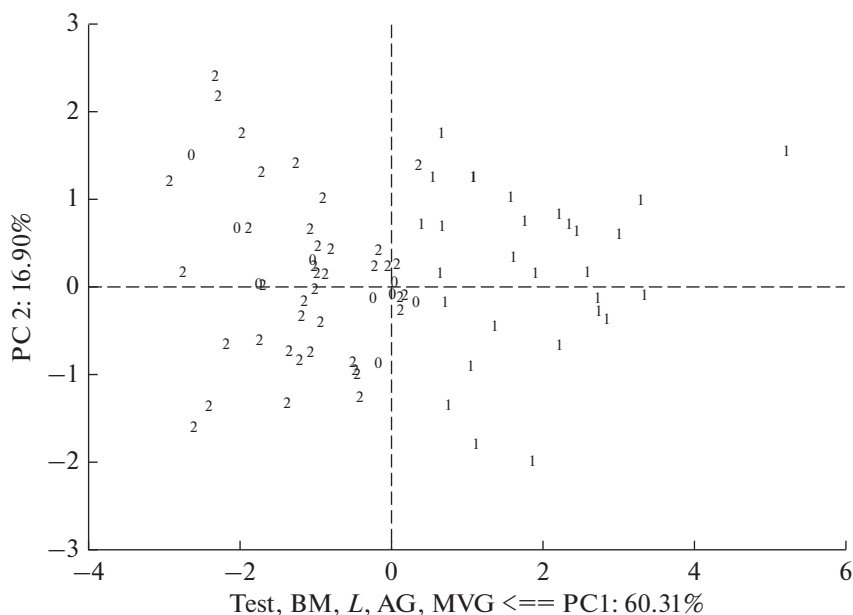
Поскольку масса и длина тела, уровень тестостерона, АГР и размер СБЖ оказались взаимосвязанными характеристиками, мы использовали Метод главных компонент (PCA) для объединения этих переменных в одну интегральную переменную, в целом характеризующую состояние репродуктивной функции. Данные были предварительно стандартизированы. Поскольку первая компонента объясняла 60.3% вариации внутри выборки, а факторные нагрузки всех включенных в анализ переменных находились в пределах от  $-0.86$  (АГР) до  $-0.63$  (СБЖ), мы использовали эту интегральную переменную для отделения фоторефрактерных особей в SD группе от чувствительных к SD режиму. Это было сделано сравнением распределений вдоль интегральной факторной оси PC1 полученных значений в SD и LD группах. Вторая компонента объясняла лишь 16.9% внутривыборочной дисперсии и была плохо интерпретируема (рис. 2). Фоточувствительными SD считали животных, у которых индивидуальные значения интегрального показателя находились за пределами области распределения индивидуальных значений в LD группе. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA) для оценки эффекта фотопериода на врожденную и приобретенную гуморальную иммунореактивность, и тест Тьюки (Tukey HSD test) для последующих парных сравнений.

**Этические принципы работы с животными.** В нашем исследовании мы руководствовались рекомендациями “Guidelines for the treatment of animals in

**Таблица 1.** Морфофизиологические характеристики самцов хомячка Кэмпбелла, содержащихся при коротком (SD) и долгом (LD) дне. Фотоперфрактерные особи в SD группе включены в анализ (полная выборка)

Характеристика	Короткий день (SD)			Долгий день (LD)			$t_{St}$	$p$	$Z_{MW-U}$	$p$	
	mean $\pm SE$ <sup>†</sup>		median (min-max) <sup>‡</sup>	mean $\pm SE$		median (min-max)					$N$
Врожденный иммунитет	2.69 $\pm$ 0.23		2.5 (0–7)	37	1.80 $\pm$ 0.19	2 (0–5)	40	2.98	<b>0.004</b>	2.851	<b>0.004</b>
Приобретенный иммунитет	6.32 $\pm$ 0.27		6 (1.5–9)	37	6.42 $\pm$ 0.35	6.25(0–10)	40	–0.22	0.82	–0.67	0.50
Тестостерон (Lg, nm/L)	0.12 $\pm$ 0.11		0.11 (–3.0–1.34)	37	0.83 $\pm$ 0.06	0.83 (0.21–1.48)	40	–5.72	<b>&lt;0.001</b>	–5.41	<b>&lt;0.001</b>
Кортизол (Lg, nm/L)	1.54 $\pm$ 0.05		1.51 (0.86–2.27)	37	1.63 $\pm$ 0.06	1.60 (1.06–2.43)	40	–0.95	0.34		
Масса тела, г	45.07 $\pm$ 1.55		45 (32.0–69.5)	37	56.88 $\pm$ 0.95	56.7 (44.5–69.0)	40	–6.62	<b>&lt;0.001</b>		
Длина тела, мм	97.3 $\pm$ 0.9		98 (88–114)	37	102.7 $\pm$ 0.8	103 (95–115)	40	–4.39	<b>&lt;0.001</b>		
Масса/Длина	0.46 $\pm$ 0.01		0.45 (0.35–0.66)	37	0.55 $\pm$ 0.01	0.54 (0.45–0.68)	40	–6.08	<b>&lt;0.001</b>		
Аногенитальное расстояние, мм	15.16 $\pm$ 0.53		15 (7–22)	37	18.82 $\pm$ 0.26	19 (15–23)	40	–6.32	<b>&lt;0.001</b>		
Среднебрюшная железа, мм <sup>2</sup>	19.65 $\pm$ 1.71		16 (4–36)	37	30.55 $\pm$ 1.91	25 (9–64)	40			–3.66	<b>&lt;0.001</b>

Примечание. <sup>†</sup> Среднее и ошибка. <sup>‡</sup> медиана и пределы изменчивости (в скобках).  $N$  – размер выборки.  $t_{St}$  – значения  $t$ -критерия Стьюдента для независимых выборок,  $Z_{MW-U}$  –  $Z$ -статистика в тесте Манна–Уитни,  $p$  – вероятность ошибочного прогноза.



**Рис. 2.** Положение индивидуальных проб фоторефрактерных SD (0), фоточувствительных SD (1) и LD (2) хомячков в пространстве двух главных компонент (PC1 и PC2) по результатам анализа Методом главных компонент взаимосвязанных репродуктивных характеристик самцов после содержания на коротком (SD) и длинном (LD) дне: Test – фондовый уровень тестостерона, BM – масса тела, L – длина тела, AG – аногенитальное расстояние, MVG – среднебрюшная железа. Величина значений нарастает справа налево. PC1 объясняет 60.31%, PC2 – 16.9% внутривыборочной дисперсии и плохо интерпретируема.

behavioural research and teaching. ASAB/ABS 2012” (Buchanan *et al.*, 2012) и законодательством РФ. Схема исследования одобрена Комиссией по биоэтике при ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, протокол № 23 от 31.01.2018.

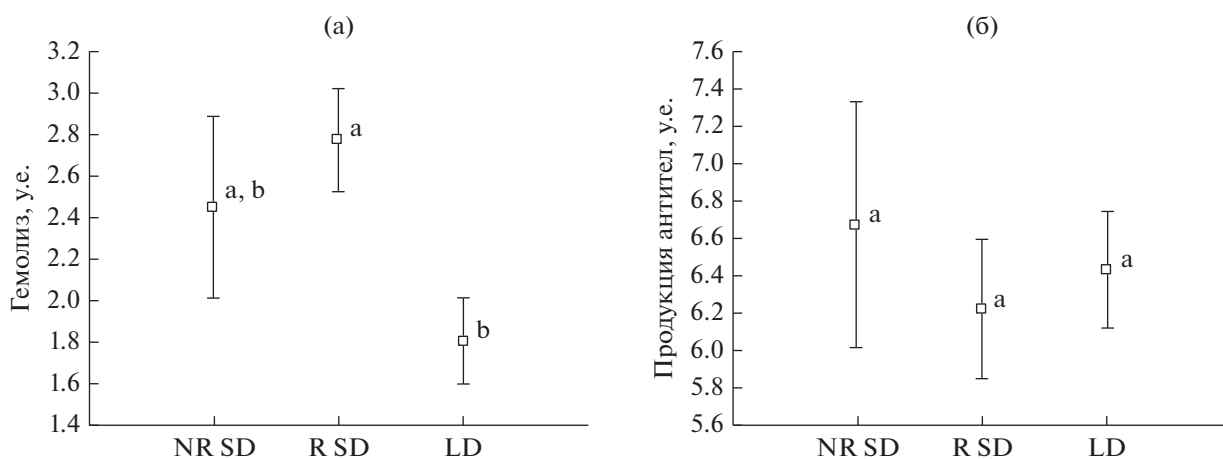
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У самцов, содержавшихся в условиях короткого светового дня (SD), средние значения массы и длины тела, отношения массы к длине тела, АГР, размера СБЖ и уровня тестостерона в крови были значительно ниже, чем у особей, находившихся в условиях длинного светового дня (LD). При этом у хомячков группы SD показатели ВГИ были значительно выше, чем у особей LD группы (табл. 1). Различия между группами по величине ПГИ в ответ на иммунизацию хомячков ЭБ отсутствовали. Уровень стресса у самцов, оцененный по содержанию кортизола в крови, не различался статистически у самцов SD и LD групп (табл. 1). У экспериментальных животных была хорошо выражена индивидуальная вариабельность морфофизиологических параметров, связанных с репродуктивной системой (рис. 2). Сравнение ВГИ фоторефрактерных SD ( $n = 9$ ), фоточувствительных SD ( $n = 28$ ) и LD ( $n = 40$ ) особей свидетельствует о влиянии на нее фотопериода (One-way ANOVA:  $F_{(2, 74)} = 4.607, p = 0.013$ ). При этом только фоточувствительные SD особи (75.6%) статистически

значимо превосходили самцов LD группы по показателям ВГИ (Tukey HSD test:  $p = 0.011$ ; рис. 3а). Различия между всеми тремя группами по ПГИ отсутствовали (One-way ANOVA:  $F_{(2, 74)} = 0.203, p = .816$ ; рис. 3б).

Показатели состояния врожденного иммунитета и приобретенного В-клеточного не коррелировали друг с другом как внутри SD и LD выборок без выделения фоторефрактерных и фоточувствительных особей (SD:  $R_{Sp} = -0.014, p = 0.93, N = 37$ ; LD:  $R_{Sp} = 0.14, p = 0.39, N = 40$ ), так и внутри групп фоторефрактерных SD ( $R_{Sp} = -0.30, p = 0.43, N = 9$ ) и фоточувствительных SD особей ( $R_{Sp} = 0.13, p = 0.52, N = 28$ ).

Показатель состояния ВГИ не коррелировал с интегральной переменной (PC1), характеризующей репродуктивное состояние как в целом SD и LD групп (SD:  $R_{Sp} = 0.03, p = 0.84, N = 37$ ; LD:  $R_{Sp} = -0.17, p = 0.29, N = 40$ ), так и внутри групп фоторефрактерных SD ( $R_{Sp} = 0.27, p = 0.48, N = 9$ ) и фоточувствительных SD особей ( $R_{Sp} = -0.26, p = 0.17, N = 28$ ). Показатель состояния ПГИ не был связан с интегральной репродуктивной переменной (PC1) как у хомячков SD в целом ( $R_{Sp} = -0.12, p = 0.44, N = 37$ ), так и внутри групп фоторефрактерных SD ( $R_{Sp} = 0.07, p = 0.86, N = 9$ ) и фоточувствительных SD особей ( $R_{Sp} = -0.09, p = 0.67, N = 28$ ). В LD группе наблюдалась достоверная, хотя и слабая отрицательная связь показателя со-



**Рис. 3.** Гемолитическая активность сыворотки крови до иммунизации (а) и продукция антител после иммунизации хомячков бараньими эритроцитами (б) в группах SD и LD самцов: у фоторефрактерных (NR) SD, фоточувствительных (R) SD и LD особей по окончании режимов экспозиции короткого и длинного дня. Приведены средние значения и стандартные ошибки. Разные буквы на графике указывают на статистически значимое отличие (Tukey HSD test:  $p < 0.05$ ).

стояния ПГИ и интегрального показателя репродуктивной активности (PC1) ( $R_{Sp} = -0.36$ ,  $p = 0.024$ ,  $N = 40$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание самцов хомячка Кэмпбелла в условиях, имитирующих зимний фотопериод (короткий световой день), приводит к изменению ряда морфобиологических параметров, свидетельствующих о замедлении роста и угнетении репродуктивной системы. Эти данные согласуются с результатами наблюдений за динамикой морфометрических показателей и размножения хомячков Кэмпбелла, содержащихся в течение круглого года в условиях естественных температур и освещенности (уличная вольтера) (Khrushchova *et al.*, 2023), и свидетельствуют о том, что экспозиция короткого светового дня является адекватным методическим приемом для изучения разных аспектов зимней экологии этого вида. Полученные данные также согласуются с классическими представлениями о реакции на экспозицию короткого светового дня и перестройках организма на режим зимней физиологии, в частности, у джунгарского хомячка (Scherbarth, Steinlechner, 2010).

Полученные данные свидетельствуют о том, что на фоне депрессии репродуктивной функции у SD самцов хомячка Кэмпбелла регистрируется повышенный (по сравнению с группой LD) уровень ВГИ. Разделение SD самцов на фоторефрактерных и фоточувствительных показало, что последние значимо превосходили по ВГИ хомячков группы LD.

В основе усиления врожденной компоненты иммунного реагирования у SD особей могут лежать разные причины, в частности — конфликт

между иммунной системой и репродуктивной, подавление функции которой происходит в условиях короткого дня. Недавние обзоры публикаций о влиянии тестостерона на показатели активности разных ветвей иммунной системы у разных видов животных в целом подтверждают негативный эффект тестостерона в отношении приобретенного В-клеточного иммунитета, но сведения о влиянии тестостерона на врожденный иммунитет противоречивы (Foo *et al.*, 2016; Roved *et al.*, 2017). Противоречивость результатов в отношении врожденного иммунитета может быть связана с вовлеченностью в механизм регуляции посредников. В частности, таким посредником является мелатонин, концентрация которого увеличивается при коротком световом дне (Goldman, 2001). У сезонно размножающихся видов млекопитающих при коротком фотопериоде мелатонин подавляет сезонно зависимую секрецию гонадотропинов (Martin *et al.*, 2008) и вызывает регрессию гонад (Bartness *et al.*, 1993). Повышенная секреция мелатонина при коротком дне может быть непосредственной причиной снижения уровня тестостерона (Hotchkiss, Nelson 2002; Li, Zhou, 2015). В отношении иммунных функций эффекты мелатонина разнообразны и их направленность может быть различной (Prendergast *et al.*, 2001; Martin, 2008; Calvo, 2013). Однако роль мелатонина как важнейшего антиоксиданта и значимого иммуномодулятора, не вызывает сомнений. Не исключено, что в нашем случае повышенная врожденная иммунореактивность при SD режиме на фоне пониженного уровня тестостерона могла быть опосредована именно мелатонином.

С другой стороны, если в основе зимнего усиления иммунитета лежит эндогенный, генетически детерминированный механизм (Nelson, De-



mas, 1996; Nelson, 2004), содержание хомячков на коротком дне вполне может усиливать не дорогостоящую приобретенную гуморальную иммунореактивность, а “недорогие” врожденные механизмы защиты быстрого реагирования, направленные на переживание неблагоприятных условий зимы в преддверии будущего размножения (McDode *et al.*, 2016), которое у хомячка Кэмпбелла при содержании на улице начинается уже во второй половине зимы (Khrushchova *et al.*, 2023).

Если в основе различий в иммунореактивности SD и LD групп лежит конфликт (tradeoff) между соматическими инвестициями и репродуктивной функцией (Martin *et al.*, 2004, 2006, 2008), то на долгом световом дне антителообразование могло быть ослаблено конкуренцией с последней. Наше предположение, что на фоне снижения активности репродуктивной системы у SD самцов будет наблюдаться более интенсивный иммунный ответ на введение ЭБ, требующий затрат как на пролиферацию В-лимфоцитов, так и на продукцию антител, не оправдалось. Однако, хотя мы не получили ожидаемых различий по интенсивности ответа на иммунизацию ЭБ между SD и LD группами, наличие слабой, но статистически значимой отрицательной связи между этим параметром и интегральным показателем репродуктивной активности в LD группе, не противоречит гипотезе компромисса (tradeoff hypothesis) между репродукцией и иммунитетом.

Косвенным свидетельством в пользу наличия конкурентных отношений между иммунной и репродуктивной системами у хомячка Кэмпбелла могут служить результаты экспериментов, проведенных на животных, происходящих из восточной части ареала (Монголия). Иммунизация ЭБ кастрированных самцов не приводила к ожидаемому росту интенсивности иммунного ответа при повторной иммунизации. Правда на фоне последней заместительной гормонотерапии, поднявшей уровень тестостерона у кастрированных животных, иммунореактивность к ЭБ по сравнению с контролем, получавшим плацебо, все же снижалась (Васильева и др., 2015). В другой работе, при сравнении интенсивности антителообразования в ответ на иммунизацию ЭБ самцов весенней и осенней генераций, у последних, при более низких концентрациях тестостерона и размерах семенников, все же наблюдалась слабая тенденция ( $p = 0.13$ ) к более интенсивному иммунному ответу. В том же эксперименте реакция гиперчувствительности замедленного типа на внутрикожное введение РНА-митогена была более высокой у самцов весенней генерации на фоне повышенной активности половой системы (Rogovin *et al.*, 2014b). Как видно, данные разных экспериментов дают неоднозначные результаты, что свидетельствует о сложной системе связей между иммунитетом и репродуктивными функциями.

Еще одним примером этому служат результаты экспериментов по селекции в трех поколениях хомячков Кэмпбелла на низкий и высокий гуморальный иммунный ответ на ЭБ, которая при стабильном закреплении признака не отразилась ни на АГР, ни на уровне тестостерона в крови. Вопреки ожиданиям, тестостерон-зависимая СБЖ у половозрелых самцов двухмесячного возраста оказалась менее развитой в группе низкоиммунных животных (Роговин и др. 2014).

Следует отметить, что в настоящей работе показатели ВГИ и ПГИ у самцов хомячка Кэмпбелла не коррелировали друг с другом. Это еще одно свидетельство разной и независимой реакции на длину светового дня разных ветвей общей системы иммунитета. Существующие данные о реакции иммунной системы на имитацию зимних условий по другим видам, в частности, по близкородственному — джунгарскому хомячку, также свидетельствуют об этом. В экспериментах, в которых для оценки врожденного иммунитета использовали синдром болезненного поведения и выраженность реакции перитонита в ответ на введение разных антигенов, были сделаны выводы о его снижении в условиях короткого дня (Wen *et al.*, 2007; Baillie, Prendergast, 2008; Pawlak *et al.*, 2009). В то же время у SD самцов была более выражена реакция кожного воспаления в ответ на внутрикожное введение DNFB антигена, что свидетельствует об усилении врожденного звена иммунной защиты (Bilbo *et al.*, 2002; Prendergast *et al.*, 2005). Хотя внутрикожное введение DNFB антигена или растительных митогенов (РНА, ConA) активирует в основном врожденные механизмы иммунного реагирования (Vinkler *et al.*, 2014), интенсивность кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа может также свидетельствовать и о состоянии приобретенного Т-клеточного иммунитета, и используется также в качестве теста на Т-клеточную иммунореактивность (Bilbo *et al.*, 2002, Tella *et al.*, 2008). Если при коротком световом дне у джунгарского хомячка происходило усиление реакции кожного воспаления (Bilbo *et al.*, 2002), то приобретенный В-клеточный иммунный ответ на КЛН-антиген при повторной иммунизации на коротком дне подавлялся (Prendergast *et al.*, 2004). В той же статье авторы указывают, что первичный ответ на иммунизацию ЭБ, а также на КЛН-антиген был одинаков у SD и LD хомячков, что соответствует результатам нашего эксперимента. Мы не исключаем, что и у хомячка Кэмпбелла могут быть получены различия между SD и LD группами по В-клеточной иммунореактивности при повторной иммунизации, от которой в данной работе мы отказались, поскольку ставилась задача оценить врожденную иммунореактивность до контакта с антигеном. Несомненно, однако, что видовая специфика может играть роль в характере ответа на введение антигенов.



Так, у SD и LD самцов хомячка Роборовского, в отличие от джунгарского, различия во вторичном иммунном ответе на ЭБ отсутствовали (Vasilieva *et al.*, 2020).

Полученные данные по усилению врожденной гуморальной компоненты в целом согласуются с концепцией зимнего усиления иммунитета. Следует помнить, что в настоящем эксперименте мы помещали животных в условия, лишь частично имитирующие переход на зимний режим. Нельзя исключить, что при естественной температуре, влажности и нехватке корма у животных могут происходить как более существенное внутреннее перераспределение ресурсов, так и более глубокие физиологические перестройки, затрагивающие как врожденную, так и приобретенную компоненту иммунной системы.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в соответствии с планом НИР ИПЭЭ РАН, тема “Экология организмов и сообществ”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильева Н.Ю., Парфенова В.М. Есть ли зимняя спячка у хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*): экспериментальный подход к решению вопроса // Териологические исследования. 2003. № 3. С. 105–123.
- Васильева Н.Ю., Хрущова А.М., Шекарова О.Н., Роговин К.А. Тестостерон и индуцированный гуморальный иммунитет у самцов хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905, Rodentia, Cricetidae). Модуляция уровня гормона в эксперименте // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 3. С. 278–278. <https://doi.org/10.7868/S0002332915030133>
- Лохмиллер Р.Л., Мошкин М.П. Экологические факторы и адаптивная значимость изменчивости иммунитета мелких млекопитающих // Сибирский экологический журнал. 1999. Т. 1. С. 37–58.
- Мещерский И.Г., Феоктистова Н.Ю. Внутривидовая структура мохноногих хомячков *Phodopus campbelli* и *Phodopus sungorus* (Rodentia: Cricetinae) по данным анализа митохондриальной ДНК // Доклады Академии Наук. 2009. Т. 424. № 2. С. 279–282.
- Роговин К.А., Хрущова А.М., Шекарова О.Н., Бушуев А.В., Соколова О.В., Васильева Н.Ю. Имунокомпетентность и репродуктивные качества самцов хомячка Кэмпбелла, селекционированных на низкий и высокий гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана (SRBC). К проверке гипотезы “иммунного гандикапа” // Журн. общей биологии. 2014. Т. 75. Вып. 5. С. 372–384.
- Соколов В.Е., Орлов В.Н. Определитель млекопитающих Монгольской Народной Республики. М.: Наука, 1980. 351 с.
- Соколов В.Е., Демина Н.И., Васильева Н.Ю. Формирование специфических кожных желез сального типа в раннем постнатальном онтогенезе // Доклады Академии Наук СССР, 1990. Т. 312. № 6. С. 1486–1490.
- Adelman J.S., Ardia D.R., Schat K.A. Ecoimmunology // Avian Immunology / Eds Schat K.A., Kaspers B., Kaiser P. Academic Press. 2013. 2nd ed. Chapter 22. P. 391–411. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00022-4>
- Baillie S.R., Prendergast B.J. Photoperiodic regulation of behavioral responses to bacterial and viral mimetics: a test of the winter immunoenhancement hypothesis // Journal of Biological Rhythms. 2008. V. 23. P. 81–90. <https://doi.org/10.1177/0748730407311518>
- Bartness T.J., Powers J.B., Hastings M.H., Bittman E.L., Goldman B.D. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? J. Pineal. Res. 1993. Nov; 15 (4): 161–90. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1993.tb00903.x>
- Bedrosian T.A., Fonken L.K., Demas G.E., Nelson R.J. Photoperiod-dependent effects of neuronal nitric oxide synthase inhibition on aggression in Siberian hamsters // Hormones and Behavior. 2012. V. 61. P. 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.11.011>
- Bilbo S.D., Dhabhar F.S., Viswanathan K., Saul A., Yellon S.M., Nelson R.J. Short day lengths augment stress-induced leukocyte trafficking and stress-induced enhancement of skin immune function // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. V. 99. № 6. P. 4067–4072. <https://doi.org/10.1073/pnas.062001899>
- Buchanan K., Perera T.B., Carere C., Carter T., Hailey A., Hubrecht R., Jennings D., Metcalfe N., Pitcher T., Péron F., Sneddon L., Sherwin C., Talling J., Thomas R., Thompson M. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching // Animal Behaviour. 2012. V. 83. № 1. P. 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.10.031>
- Butler M.W., Stahlschmidt Z.R., Ardia D.R., Davies S., Davis J., Guilette Jr.L.J., Johnson N., McCormick S.D., McGraw K.J., DeNardo D.F. Thermal sensitivity of immune function: evidence against a generalist-specialist trade-off among endothermic and ectothermic vertebrates // American Naturalist. 2013. V. 181. № 6. P. 761–774. <https://doi.org/10.1086/670191>
- Calvo J.R., González-Yanes C., Maldonado M.D. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review // Journal of Pineal Research, 2013. V. 55. № 2. P. 103–120. <https://doi.org/10.1111/jpi.12075>
- Foo Y.Z., Nakagawa S., Rhodes G., Simmons L.W. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis // Biological Reviews. 2016. V. 92. № 1. P. 551–571. <https://doi.org/10.1111/brv.12243>
- Gilot-Fromont E., Jégo M., Bonenfant C., Gibert P., Rannou B., Klein F., Gaillard J.M. Immune phenotype and body condition in Roe deer: Individuals with high body con-

- dition have different, not stronger immunity // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. e45576.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045576>
- Goldman B.D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement // J. Biol. Rhythms. 2001. V. 16. P. 283–301.  
<https://doi.org/10.1177/074873001129001980>
- Graievskaya B.M., Surov A.V., Mesherski I.G. The tongue vein as a source of blood in the golden hamster // Zeitschrift für Versuchstierkunde. 1986. № 28. P. 41–43.
- Greenman C.G., Martin L.B., Hau M. Reproductive state, but not testosterone, reduces immune function in male house sparrows (*Passer domesticus*) // Physiological and Biochemical Zoology. 2005. V. 78. P. 60–68.  
<https://doi.org/10.1086/425194>
- Hazlerigg D. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates // Progress in Brain Research. 2012. V. 199. P. 413–422.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00023-X>
- Heinrich S.K., Hofer H., Courtiol A., Melzheimer J., Dehnhard M., Czirják G.Á., Wachter B. Cheetahs have a stronger constitutive innate immunity than leopards // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–11 (44837).  
<https://doi.org/10.1038/srep44837>
- Hotchkiss A.K., Nelson R.J. Melatonin and immune function: hype or hypothesis? // Critic. Rev. Immunol. 2002. V. 22. P. 351–371.  
<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v22.i5-6.10>
- Jasnow A.M., Huhman K.L., Bartness T.J., Demas G.E. Short-day increases in aggression are inversely related to circulating testosterone concentrations in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) // Hormones and Behavior. 2000. V. 38. P. 102–110.  
<https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1604>
- Khrushchova A.M., Vasilieva N.Yu., Shekarova O.N., Vasilieva N.A., Rogovin K.A. Daily torpor in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905): proximate factors and ultimate fitness consequences // Russian Journal of Theriology. 2023. V. 22. № 1. P. 32–43.  
<https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.22.1.04>
- Lee K.A. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species // Integrative and Comparative Biology. 2006. V. 46. № 6. P. 1000–1015.  
<https://doi.org/10.1093/icb/icl049>
- Li C., Zhou X. Melatonin and male reproduction // Clinica Chimica Acta. V. 2015. 446. P. 175–180.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.04.029>
- McDade T.W., Georgiev A.V., Kuzawa C.W. Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans // Evolution, medicine, and public health. 2016. V. 2016. № 1. P. 1–16.  
<https://doi.org/10.1093/emph/eov033>
- Matson K.D., Ricklefs R.E., Klasing K.C. A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds // Developmental and Comparative Immunology. 2005. V. 29. № 3. P. 275–286.  
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.07.006>
- Martin L.B., Pless M., Svoboda J., Wikelski M. Immune activity in temperate and tropical house sparrows: A common-garden experiment // Ecology. 2004. V. 85. P. 2323–2331.  
<https://doi.org/10.1890/03-0365>
- Martin L.B., Han P., Kwong J., Hau M. Cutaneous immune activity varies with physiological state in female house sparrows (*Passer domesticus*) // Physiological and Biochemical Zoology. 2006. V. 79. P. 775–783.  
<https://doi.org/10.1086/504608>
- Martin L.B., Weil Z.M., Nelson R.J. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2008. V. 363. № 1490. P. 321–339.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2142>
- Nelson R.J. Seasonal immune function and sickness responses // Trends in immunology. 2004. V. 25. P. 187–192.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2004.02.001>
- Nelson R.J., Demas G.E. Seasonal changes in immune function // The Quarterly Review of Biology. 1996. V. 71. P. 511–548.  
<https://doi.org/10.1086/419555>
- Onishi K.G., Maneval A.C., Cable E.C., Tuohy M.C., Scasny A.J., Sterina E., Love J.A., Riggle J.P., Malamut L.K., Mukerji A., Novo J.S., Appah-Sampong A., Gary J.B., Prendergast B.J. Circadian and circannual timescales interact to generate seasonal changes in immune function // Brain, Behavior, and Immunity. 2020. V. 83. P. 33–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.024>
- Pawlak J., Golab M., Markowska M., Majewski P., Skwarlo-Sonta K. Photoperiod-related changes in hormonal and immune status of male Siberian hamsters, *Phodopus sungorus* // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2009. V. 152. № 3. P. 299–303.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.10.016>
- Prendergast B.J., Bilbo S.D., Nelson R.J. Photoperiod controls the induction, retention, and retrieval of antigen-specific immunological memory // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2004. V. 286. P. R54–R60.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00381.2003>
- Prendergast B.J., Bilbo S.D., Nelson R.J. Short day lengths enhance skin immune responses in gonadectomized Siberian hamsters // Journal of Neuroendocrinology. 2005. V. 17. P. 18–21.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01273.x>
- Prendergast B.J., Nelson R.J., Zucker I. Mammalian seasonal rhythms: behavior and neuroendocrine substrates // Hormones, brain and behavior / Eds Pfaff D.W., Arnold A.P., Etgen A.M., Fahrbach S.E., Rubin R.T.; Academic Press. 2002. P. 507–540.  
<https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00014-0>
- Prendergast B.J., Yellon S.M., Tran L.T., Nelson R.J. Photoperiod modulates the inhibitory effect of in vitro melatonin

- tonin on lymphocyte proliferation in female Siberian hamsters // *J. Biol. Rhythms*. 2001. V. 16. P. 224–233. <https://doi.org/10.1177/074873040101600305>
- Racca A.L., Eberhardt A.T., Moreno P.G., Baldi C., Beldomenico P.M. Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) // *The Veterinary Journal*. 2014. V. 199. № 2. P. 308–309. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.036>
- Rendon N.M., Soini H.A., Scotti M.A.L., Weigel E.R., Novotny M.V., Demas G.E. Photoperiod and aggression induce changes in ventral gland compounds exclusively in male Siberian hamsters // *Hormones and Behavior*. 2016. V. 81. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.02.005>
- Rogovin K.A., Khrushcheva A.M., Shekarova O.N., Ushakova M.V., Manskikh V.N., Sokolova O.V., Vasilieva N.Yu. Effects of mitochondria-targeted plastoquinone derivative antioxidant (SkQ1) on demography of free-breeding Campbell dwarf hamsters (*Phodopus campbelli*) kept in outdoor conditions. Reproduction and lifespan: Explanation in the framework of ultimate loads // *Biochemistry (Moscow)*. 2014a. V. 79. № 10. P. 1117–1129. <https://doi.org/10.1134/S0006297914100125>
- Rogovin K.A., Bushuev A.V., Khrushcheva A.M., Vasilieva N.Y. Resting metabolic rate, stress, testosterone, and induced immune response in spring- and fall-born males of Campbell's dwarf hamsters: Maintenance in long-day conditions // *Biology Bulletin Reviews*. 2014b. V. 4. № 3. P. 181–191. <https://doi.org/10.1134/S2079086414030062>
- Roved J., Westerdahl H., Hasselquist D. Sex differences in immune responses: hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences // *Hormones and Behavior*. 2017. V. 88. P. 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.017>
- Ruoss S., Becker N.I., Otto M.S., Czirájk G.Á., Encarnação J.A. Effect of sex and reproductive status on the immunity of the temperate bat *Myotis daubentonii* // *Mammalian Biology*. 2019. V. 94. № 1. P. 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.05.010>
- Scherbarth F., Steinlechner S. Endocrine mechanisms of seasonal adaptation in small mammals: from early results to present understanding // *Journal of Comparative Physiology B*. 2010. V. 180. P. 935–952. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0498-2>
- Scheiermann C., Gibbs J., Ince L., Loudon A. Clocking in to immunity // *Nature Reviews Immunology*. 2018. V. 18. № 7. P. 423–437. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0008-4>
- Schultz E.M., Hahn T.P., Klasing K.C. Photoperiod but not food restriction modulates innate immunity in an opportunistic breeder, *Loxia curvirostra* // *Journal of Experimental Biology*. 2017. V. 220. P. 722–730. <https://doi.org/10.1242/jeb.149898>
- Scotti M.-A.L., Place N.J., Demas G.E. Short-day increases in aggression are independent of circulating gonadal steroids in female Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) // *Hormones and Behavior*. 2007. V. 52. P. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.029>
- Seto F., Henderson W.G. Natural and immune hemagglutinin forming capacity of immature chickens // *Journal of Experimental Zoology*. 1968. V. 169. P. 501–511. <https://doi.org/10.1002/jez.1401690412>
- Sinclair J.A., Lochmiller R.L. The winter immunoenhancement hypothesis: Associations among immunity, density, and survival in prairie vole (*Microtus ochrogaster*) populations // *Canadian Journal of Zoology*. 2000. V. 78. P. 254–264. <https://doi.org/10.1139/z99-203>
- Stevenson T.J., Prendergast B.J. Photoperiodic time measurement and seasonal immunological plasticity // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2015. T. 37. C. 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.10.002>
- Tella J.L., Lemus J.A., Carrete M., Blanco G. The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. P. e3295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003295>
- Ter Horst R., Jaeger M., van de Wijer L., van der Heijden W.A., Janssen A.M., Smeekens S.P., Brouwer M.A., van Cranenbroek B., Aguirre-Gamboa R., Netea-Maier R.T., van Herwaarden A.E., Lemmers H., Dijkstra H., Joosten I., Koenen H., Netea M.G., Joosten L.A. Seasonal and non-seasonal longitudinal variation of immune function // *Journal of Immunology*. 2021. V. 207. № 2. P. 696–708. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000133>
- Vasilieva N.Y., Khrushchova A.M., Kuptsov A.V., Shekarova O.N., Sokolova O.V., Wang D., Rogovin K.A. On the winter enhancement of adaptive humoral immunity: hypothesis testing in desert hamsters (*Phodopus roborovskii*: Cricetidae, Rodentia) kept under long-day and short-day photoperiod // *Integrative Zoology*. 2020. V. 15. № 3. P. 232–247. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12419>
- Wegmann T.G., Smithies O. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies // *Transfusion*. 1966. V. 6. № 1. P. 67–73. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1966.tb04696.x>
- Wen J.C., Dhabhar F.S., Prendergast B.J. Pineal-dependent and-independent effects of photoperiod on immune function in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) // *Hormones and Behavior*. 2007. V. 51. № 1. P. 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.08.001>
- Vinkler M., Svobodova J., Gabrielova B., Bainova H., Bryjova A. Cytokine expression in phytohaemagglutinin induced skin inflammation in a galliform bird // *Journal of Avian Biology*. 2014. V. 45. P. 43–50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2011.05860.x>
- Zysling D.A., Garst A.D., Demas G.E. Photoperiod and food restriction differentially affect reproductive and immune responses in Siberian hamsters *Phodopus sungorus* // *Functional Ecology*. 2009. V. 23. № 5. P. 979–988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01572.x>

## The Effect of Photoperiod Duration on Humoral Innate and Humoral Adaptive Immune Responsiveness in Campbell's Dwarf Hamster

A. M. Khrushchova<sup>1, #</sup>, N. Yu. Vasilieva<sup>1</sup>, O. N. Shekarova<sup>1</sup>, and K. A. Rogovin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninskii prospect, 33, Moscow 119071 Russia

<sup>#</sup>e-mail: cricetus@yandex.ru

We studied the humoral innate immune responsiveness (HII), i.e. a hemolysis of rabbit erythrocytes by complement proteins, and adaptive humoral (antibody production) immune responsiveness (AHI) to SRBC, morphological and hormonal reproductive characteristics and stress level in male Campbell hamsters kept under long-day (LD; 16D: 8N) and short-day (SD; 8D: 16N) photoperiods. The results indicate lower HII, but not AHI in SD. In SD males we observed body mass, anogenital distance, midventral gland size and level of testosterone in the peripheral blood (but not the level of cortisol) decreased. Comparison of SD non-responders, SD responders and LD individuals demonstrated a statistically significant increase of HII in SD photosensitive hamsters, but not in non-responders compared to LD. There was no link between HII and AHI, which indicates an independent photoperiodic responsiveness of different branches of the immune system in Campbell's hamster.

*Keywords:* photoperiodism, constitutive innate immunity, acquired B-cell immunity, winter immunity enhancement, *Phodopus campbelli*

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.115.3-577.35

### ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ЛЕЙЦИНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИПРОЛИНОВ ПРИ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИИ

© 2023 г. М. Е. Григорьева\*, @, Т. Ю. Оберган\*, Л. А. Ляпина\*

\*ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова, Ленинские горы, дом 1/12, Москва, 119234 Россия

@E-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 11.06.2023 г.

Исследовали эффекты двух лейцинсодержащих пептидов глипролинового ряда Leu-Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro-Leu, включающих лейцин с N- и C-концов молекул, на показатели сосудисто-тромбоцитарного (первичного) и плазменного гемостаза. Пептиды применяли интраназально в течение 5 сут в ежедневной дозе 500 мкг/кг массы тела в условиях гиперкоагуляции, вызванной внутривенным введением тканевого тромбoplastина крысам, у которых заранее индуцировали развитие метаболического синдрома высококалорийной диеты. Оба пептида способствовали повышению всех видов фибринолиза (суммарного, ферментативного и неферментативного), антикоагулянтной активности и снижению агрегации тромбоцитов в плазме крови крыс по сравнению с контролем. Максимум противосвертывающего действия установлен у пептида, содержащего лейцин с C-конца.

**Ключевые слова:** лейцинсодержащие пептиды, метаболический синдром, система гемостаза, гиперкоагуляция, противосвертывающая активность

**DOI:** 10.31857/S1026347022600509, **EDN:** LIYUG

В настоящее время известно, что такие регуляторные пептиды глипролинового ряда как Pro-Gly-Pro-Leu и Leu-Pro-Gly-Pro при интраназальном и внутривенном применении здоровым животным оказывают антикоагулянтно-фибринолитическое действие *in vitro* и *in vivo* (Оберган, Рочев, 2010; Шабалина и др., 2015). Выявлено также, что эти пептиды проявляют гипополипидемическую активность, что может быть обусловлено наличием аминокислоты лейцин в составе пептидов (Myasoedov *et al.*, 2016). Эта аминокислота входит в состав всех природных белков, участвует в их синтезе в мышцах и печени, служит источником энергии и ускоряет утилизацию жиров в митохондриях (Wilkinson *et al.*, 2017; López *et al.*, 2018). Установлено, что конформационные изменения остатков L-лейцина в молекуле пептидов, содержащих глицин и лейцин, влияют на их активность и зависят от места их расположения (Ichimura, Kasama, 2012; Okabayashi *et al.*, 2016).

Пептидные соединения способны регулировать компенсаторно-приспособительные реакции организма, одновременно предотвращая нарушения в системе гемостаза и восстанавливая метаболизм в органах и тканях, тогда как обычно при развитии атеросклеротических изменений в сосудах, метаболического синдрома, дислипиде-

миях рекомендуется применять антилипемические средства совместно с антитромботическими (Баркаган, Костюченко, 2006; Watson *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2011). Исходя из вышесказанного становится понятно, что проведение исследований, посвященных поиску средств фармакологической коррекции гемостаза и нарушений метаболизма, до сих пор не потеряло своей актуальности.

Цель настоящей работы заключалась в изучении действия новых пептидов, содержащих аминокислоту лейцин с разных концов молекулы глипролинов (Pro-Gly-Pro-Leu и Leu-Pro-Gly-Pro) при их интраназальном многократном применении на функциональное состояние свертывающей и противосвертывающей систем и выявлении их антитромботических эффектов в условиях гиперкоагуляции, вызванной внутривенным введением тканевого тромбoplastина крысам, у которых заранее индуцировали развитие метаболического синдрома высококалорийной диеты.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы лейцин-содержащие пептиды – Leu-Pro-Gly-Pro (LPGP) и Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL), синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН.

Эксперименты проведены на 58 лабораторных белых крысах-самцах Wistar массой тела 250–280 г. в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейским научным фондом, Базельской декларацией, Европейской конвенцией по охране позвоночных животных (Стокгольм, 15.06.2006). Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь – 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26 град, относительная влажность 50–70%).

Проведено 2 серии экспериментов. Первая серия включала создание эффективной модели гиперкоагуляции тремя методами: 1) введение тканевого тромбопластина (ТТ) из мозга крысы в дозе 0.6 мл/200 г (1%-й раствор); 2) индуцирование метаболического синдрома (МС) содержанием крыс на высококалорийной диете (ВКД), энергетическая ценность которой составляла не менее 3500 ккал/кг, в течение 8 нед. с использованием в качестве питья 10%-ный раствор глюкозы (Оберган, Григорьева, 2016); 3) сочетание длительного содержания крыс на ВКД (в течение 8 нед.), приводящего к развитию МС, с последующей однократной инъекцией ТТ. Оценивали в сравнительном аспекте вызванную у крыс гиперкоагуляцию каждым из методов. В результате в экспериментах использовали модель гиперкоагуляции, которая включала применение ТТ и ВКД.

Во второй серии экспериментов животные, которые предварительно в течение 2 мес. содержались на ВКД, были разделены на три группы (по 10 особей в каждой группе): первой группе (контроль) вводили 0.85%-ый раствор NaCl (физиологический раствор), второй группе (опыт 1) – PGPL и третьей группе (опыт2) – LPGP в течение 5 сут ежедневно через каждые 24 ч. Препараты применяли интраназально в ежедневной дозе 500 мкг/кг в объеме 0.2 мл/200 г массы тела крыс. В течение всего эксперимента животные этих групп продолжали получать ВКД.

Дополнительно использовали интактных здоровых крыс (норма), которые содержались на обычном лабораторном рационе (Лабораторкорм, 2800 ккал/кг) и не получали никаких препаратов.

Через 18 ч после последнего 5-го введения пептидов или физиологического раствора внутривенно каждой крысе вводили тканевой тромбопластин (по 0.6 мл/200 г) и через 6–8 мин после этого у них брали кровь через яремную вену (*v. jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3.8%-го раствора цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Кровь центрифугировали в двух режимах: при 1000 об./мин в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы и при 2000 об./мин в течение 15 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. В богатой тромбоцитами плазме определяли агрегацию тромбоцитов с использованием в

качестве индуктора агрегации АДФ в концентрации  $10^{-6}$  М. Измерения проводили на агрегометре марки “Биола” (Россия). В бедной тромбоцитами плазме проводили измерения следующих биохимических показателей плазменного гемостаза: антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на анализаторе свертывания крови марки “Астра 2-01” (Россия); фибринолиз по тестам: суммарной фибринолитической активности (СФА), неферментативного фибринолиза (НФ), ферментативного фибринолиза (ФФ) (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012).

В работе использовали прикладной пакет статистических программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Полученные данные выражали в виде  $M \pm m$  (среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего). Статистическую обработку полученных результатов производили методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Ньюмена-Кейлса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения сравнительной оценки развития гиперкоагуляции каждым из используемых методов, было показано, что через 10 мин после внутривенного однократного введения 1%-ого раствора ТТ в дозе 0.6 мл (модель 1) усиливается свертываемость крови, определяемая по тесту АЧТВ на 26%, снижаются СФА и НФ на 25 и 20% соответственно, что сопровождается резким повышением агрегации тромбоцитов на 45% по сравнению с соответствующими показателями в группе норма.

При использовании модели 2 (содержание крыс на ВКД в течение 8 нед.) было установлено, что в результате развития у крыс МС повышалась агрегация тромбоцитов под действием АДФ на 55%, снижались все виды фибринолиза (СФА – на 30%, НФ – на 44% и ФФ – на 22%) и АЧТВ – на 21% по сравнению с теми же показателями у интактных животных.

Было также показано, что внутривенное однократное введение ТТ на фоне развившегося МС (модель 3) крысам способствовало значительному возрастанию агрегации тромбоцитов на 75%, повышению свертываемости крови по тесту АЧТВ на 31% и подавлению фибринолитической активности (СФА – на 43%, НФ – на 53%, ФФ – на 26%) по сравнению с параметрами у нормальных крыс. Эти данные свидетельствовали о развитии наиболее выраженной гиперкоагуляции на модели крыс при длительном их содержании на ВКД с последующим однократным внутривенным введением ТТ (табл. 1).

**Таблица 1.** Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и агрегация тромбоцитов в плазме крыс на фоне гиперкоагуляции, вызванной введением тканевого тромбопластина (ТТ), содержанием крыс на ВКД в течение 2-х мес. и совместным воздействием ТТ и ВКД у крыс ( $M \pm m$ )

Показатели	Интактные крысы (норма)	Введение ТТ (модель 1)	ВКД (модель 2)	ТТ + ВКД (модель 3)
СФА, мм <sup>2</sup> (%)	34.9 ± 1.0 (100%)	26.3 ± 0.8 <sup>##</sup> (75%)	24.4 ± 2.7 <sup>##</sup> (70%)	19.8 ± 1.4 <sup>##</sup> (57%)
НФ, мм <sup>2</sup> (%)	22.4 ± 0.5 (100%)	18.0 ± 0.1 <sup>##</sup> (80%)	14.6 ± 1.7 <sup>##</sup> (56%)	10.6 ± 1.7 <sup>##</sup> (47%)
ФФ, мм <sup>2</sup> (%)	12.5 ± 1.2 (100%)	9.2 ± 0.7 <sup>##</sup> (74%)	9.8 ± 1.5 <sup>##</sup> (78%)	9.2 ± 0.7 <sup>##</sup> (74%)
АЧТВ, с (%)	31.5 ± 1.9 (100%)	23.3 ± 1.4 <sup>##</sup> (74%)	24.8 ± 1.1 <sup>#</sup> (79%)	21.7 ± 1.4 <sup>##</sup> (69%)
Агрегация тромбоцитов, индекс (%)	4.9 ± 1.1 (100%)	7.1 ± 1.7 <sup>##</sup> (145%)	7.6 ± 1.7 <sup>##</sup> (155%)	8.6 ± 1.4 <sup>##</sup> (175%)

Примечание. <sup>##</sup>  $p < 0.01$ , <sup>#</sup>  $p < 0.05$  – по сравнению с интактными крысами (группа “Норма”).

**Таблица 2.** Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ), ферментативный фибринолиз (ФФ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и агрегация тромбоцитов в плазме крыс после действия пептидов на фоне гиперкоагуляции, вызванной введением тромбопластина (ТТ) и развитием метаболического синдрома (МС) у крыс ( $M \pm m$ )

Показатели	МС + 0.85%-ый NaCl + ТТ (контроль)	МС + PGPL + ТТ (опыт 1)	МС + LPGP + ТТ (опыт 2)	Интактные крысы (норма)
СФА, мм <sup>2</sup>	19.8 ± 1.4 <sup>##</sup> (100%)	34.4 ± 2.7 <sup>**</sup> (174%)	31.7 ± 2.7 <sup>**</sup> (160%)	36.7 ± 1.1
НФ, мм <sup>2</sup>	10.6 ± 1.7 <sup>##</sup> (100%)	20.6 ± 1.7 <sup>**</sup> (194%)	18.5 ± 4.6 <sup>**</sup> (174%)	18.9 ± 1.4
ФФ, мм <sup>2</sup>	9.2 ± 0.7 <sup>##</sup> (100%)	13.4 ± 1.5 <sup>**</sup> (146%)	12.5 ± 1.1 <sup>*</sup> (138%)	17.8 ± 1.2
АЧТВ, с	26.7 ± 1.4 <sup>#</sup> (100%)	42.7 ± 2.1 <sup>**</sup> (160%)	36.9 ± 2.8 <sup>*</sup> (138%)	37.8 ± 2.0
Агрегация тромбоцитов, индекс (%)	5.7 ± 1.4 <sup>##</sup> (100%)	2.6 ± 0.8 <sup>**</sup> (45%)	2.3 ± 0.7 <sup>**</sup> (41%)	3.2 ± 0.3 (56%)

Примечание. <sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ , <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  – по сравнению с группой контроль; <sup>##</sup>  $p < 0.01$ , <sup>#</sup>  $p < 0.05$  – по сравнению с группой норма.

На основании результатов проведения сравнительной оценки гиперкоагуляционных сдвигов, возникающих в крови крыс при использовании каждого из трех используемых методов, для дальнейших экспериментов была выбрана модель 3, включающая развитие МС с последующим введением животным ТТ.

Во второй серии экспериментов при оценке параметров гемостаза у контрольных животных (МС + 0.85%-ый NaCl + ТТ) была подтверждена значительная гиперкоагуляция, проявляющаяся резким снижением фибринолиза на 44–48%, АЧТВ на 30% и повышением агрегации тромбо-

цитов на 78% по сравнению с показателями у интактных крыс (табл. 2).

Как видно из табл. 2 в выбранных условиях эксперимента (МС + пептид + ТТ) у опытных крыс многократное применение лейцин-содержащих пептидов при продолжении содержания крыс на ВКД приводило к достоверному подавлению агрегации тромбоцитов на 55–59%, повышению антикоагулянтной активности по тесту АЧТВ на 38–60% и всех видов фибринолиза плазмы крови, причем СФА увеличивалась на 60–74%, НФ – на 74–94%, ФФ – на 38–46%. Следует отметить, что противосвертывающие эффекты превалировали после применения пептида PGPL.



Настоящее исследование было проведено с целью выявления антитромботических свойств пептидов, включающих лейцин с N- или C-концов молекулы в сравнительном аспекте. Для этого была создана эффективная модель гиперкоагуляции, включающая применение свертывающего фактора III (тканевой тромбопластин) на фоне уже развившегося метаболического синдрома. Ранее было показано, что содержание крыс на ВКД в течение длительного времени приводит к метаболическим нарушениям в организме, сопровождающимся повышенной свертываемостью крови (Оберган, Григорьева, 2016). Использование в этих условиях тканевого тромбопластина способствовало выраженному состоянию гиперкоагуляции вследствие усиленного тромбоза (Баркаган, Костюченко, 2006).

Было установлено, что оба пептида в этих условиях обладали антитромбоцитарной, антикоагулянтной и фибринолитической активностью ферментативной и неферментативной природы и предотвращали самосборку фибрина, о чем свидетельствовало наличие неферментативной фибринолитической (фибриндеполимеризационной) активности. Существуют данные, что лейцин, входящий в состав ферментов, оказывает положительные эффекты не только на организм животных, но и растений (He *et al.*, 2018). В процессе самосборки фибрина участвуют не только различные регуляторные пептиды глипролинового ряда (Myasoedov *et al.*, 2016), но и растительные гепариноподобные компоненты (Бышевский и др. 2012). Механизм действия этих веществ обусловлен наличием у них фибриндеполимеризационных и антиагрегационных в отношении тромбоцитов свойств. Следовательно, пептиды глипролинового ряда, содержащие лейцин с разных концов молекулы, обладая противосвертывающим эффектом, могут быть отнесены к перспективным антитромботическим агентам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая представленный экспериментальный материал, можно утверждать, что действие обоих пептидов при атравматичном интраназальном их применении в условиях провокации длительной гиперкоагуляции направлено в сторону возрастания противосвертывающих свойств крови с максимальным эффектом у пептида Pro-Gly-Pro-Leu, содержащего аминокислоту лейцин с C-конца.

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о перспективности изучения лейцин-содержащих коротких пептидов глипролинового ряда в качестве средств, предупреждающих длительно протекающие тромбоопасные состояния организма. Это указывает на потенциальные возможности регуляторных пептидов, включающих лейцин, влиять на функциональное состояние

системы гемостаза. На основе представленных данных получен новый фактический материал, который позволяет охарактеризовать структурно-функциональную обусловленность эффектов регуляторных пептидов. Актуальным представляется проведение дальнейших исследований коротких лейцин-содержащих пептидов при патологиях, осложняющихся тромбофилиями или тромбозами.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность академику РАН Мясонову Н.Ф. и Андреевой Л.А. за любезное предоставление пептидов, синтезированных в ИМГ РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке МГУ имени М.В.Ломоносова по госбюджетной фундаментальной теме "Регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем в норме и при патологии" Номер Цитис 121032300076-3.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркаган З.С., Костюченко Г.И. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных // Бюл. СО РАМН. 2006. № 2 (120). С. 132–138.
- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008.
- Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А., Созонюк А.Д., Сулкарнаева Г.А., Тарасов Д.Б., Чирятев Е.А., Шаповалов П.Я., Шаповалова Е.М. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения // Медицинская наука и образование Урала. 2012. Т. 13. № 1. С. 163–170.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е. Исследование параметров гемостаза, липидного и углеводного обмена у крыс с модифицированной моделью экспериментального метаболического синдрома // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8. № 4. С. 303–305.
- Оберган Т.Ю., Рочев Д.Л. Противосвертывающие и антитромбоцитарные эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Leu и лейцина при внутривенном введении животным // Сборник: Физиологическая активность регуляторных пептидов. М.: 2010. С. 67–68.
- Шабалина А.А., Ляпина Л.А., Рочев Д.Л., Костырева М.В., Танащян М.М., Суслина З.А. Гиполипидемические и фибриндеполимеризационные эффекты регуляторных лейцинсодержащих глипролинов в крови человека *in vitro* // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 42 (1). С. 85–89.

- He X., Feng T., Zhang D., Zhuo R., Liu M. Identification and comprehensive analysis of the characteristics and roles of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in *Sedum alfredii* Hance responding to cadmium stress // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. № 167. P. 95–106.
- Ichimura N., Kasama T. Identification of valine- or leucine-containing glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium*-intracellular complex // *Curr. Microbiol.* 2012. V. 64. № 6. P. 561–568.
- Kong X., Zhang D.Y., Wu H.B., Li F.X. Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34. № 5. P. 693–698.
- López N., Sánchez J., Palou A., Serra F. Gender-Associated Impact of Early Leucine Supplementation on Adult Predisposition to Obesity in Rats // *Nutrients.* 2018. V. 10. № 1. P. E76.
- Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanisms for glyproline protection in hypercholesterolemia // *Pathophysiology.* 2016. V. 23. № 1. P. 27–33.
- Okabayashi H.F., Kanbe H.H., O'Connor C.J. The role of an L-leucine residue on the conformations of glycyl-L-leucine oligomers and its N- or C-terminal dependence: infrared absorption and Raman scattering studies // *Euk. Biophys. J.* 2016. № 1. P. 23–34.
- Watson T., Arya A., Sulke N., Lip G.Y.H. Antithrombotic therapy: relationship of indices of inflammation and thrombogenesis to arrhythmia burden in paroxysmal arterial fibrillation // *Chest.* 2010. V. 137. P. 869–876.
- Wilkinson D.J., Bukhari S.S.I., Phillips B.E., Limb M.C., Cegielski J., Brook M.S., Rankin D., Mitchell W.K., Kobayashi H., Williams J.P., Lund J., Greenhaff P.L., Smith K., Atherton P.J. Effects of leucine-enriched essential amino acid and whey protein bolus dosing upon skeletal muscle protein synthesis at rest and after exercise in older women // *Clin. Nutr.* 2017. № 17. P. 31340–31347.

## Anticoagulation Effects of Leucine-Containing Glyprolines in Hypercoagulation

M. E. Grigorieva<sup>1, #</sup>, T. Y. Obergan<sup>1</sup>, and L. A. Lyapina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Biology Faculty, Department of Human and Animal Physiology, Laboratory of Protective Blood Systems named after prof. B.A. Kudryashov, Leninsky Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: mgrigorjeva@mail.ru*

The effects of two leucine-containing glyproline peptides Leu-Pro-Gly-Pro and Pro-Gly-Pro-Leu, including leucine from the N- and C-ends of the molecules, on the parameters of platelet (primary) and plasma hemostasis were studied. Peptides were administered intranasally for 5 days at a daily dose of 500 mcg/kg of body weight under conditions of hypercoagulation caused by intravenous administration of tissue thromboplastin to metabolic syndrome rats on high-calorie diet. Both peptides contributed to an increase in all types of fibrinolysis (total, enzymatic and non-enzymatic), anticoagulant activity and a decrease in platelet aggregation in rat blood plasma compared with the control. The maximum anticoagulant effect was established in a peptide containing leucine from the C-terminus.

**Keywords:** leucine-containing peptides, metabolic syndrome, hemostasis system, hypercoagulation, anticoagulation activity

УДК 574.58:504.455:543.399

## БИОДЕСТРУКЦИЯ МИКРОЦИСТИНА-LR АВТОХТОННОЙ МИКРОБИОТОЙ РАЗНОТИПНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ

© 2023 г. Н. Г. Медведева\*, @, Т. Б. Зайцева\*, И. Л. Кузикова\*, Е. Н. Чернова\*

\* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук” (СПб ФИЦ РАН), Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, ул. Корпусная, д. 18, Санкт-Петербург, 197110 Россия

@E-mail: ngmedvedeva@gmail.com

Поступила в редакцию 03.10.2022 г.

После доработки 26.01.2023 г.

Принята к публикации 26.01.2023 г.

Впервые показана способность автохтонной микробиоты разнотипных водных объектов Северо-Запада РФ деструктировать высокотоксичный микроцистин-LR (MC-LR). Максимальная скорость деградации MC-LR отмечена в водных образцах, отобранных в Сестрорецком разливе и Нижнем Суздальском озере в период массового развития цианобактерий. В образцах воды Ладожского озера, где ранее не были отмечены токсичные цианобактериальные цветения, биодеградация MC-LR проходила со значительно меньшей скоростью и более длительной лаг-фазой. Состав продуктов биодеградации MC-LR свидетельствует о наличии в составе автохтонной микробиоты исследуемых объектов микроорганизмов, способных деструктировать микроцистины как по *mI*r механизму, так и по биохимическому пути с участием глутатиона.

**Ключевые слова:** водные объекты, цианобактерии, микроцистин, автохтонная микробиота, биодеградация

DOI: 10.31857/S1026347022600820, EDN: AKYUTC

Изменение климата и загрязнение водных объектов органическими и минеральными соединениями, в том числе биогенными элементами, способствует массовому развитию микроводорослей, или “цветению” водных объектов во всем мире (Sivarajah *et al.*, 2021). “Цветения” могут вызывать представители различных отделов водорослей – золотистые (*Chrysophyta*), желто-зеленые (*Xanthophyta*), диатомовые (*Bacillariophyta*), криптофитовые (*Cryptophyta*), зеленые (*Chlorophyta*), а также цианобактерии (*Cyanophyta*) (Белякова и др., 2006). Цианобактерии являются одними из основных и наиболее опасных возбудителей “цветения” воды. Это связано со способностью данной группы прокариотов продуцировать токсины, опасные для человека и животных (Chorus *et al.*, 2000; Codd *et al.*, 2005).

Микроцистины (MC) являются одними из широко распространенных цианотоксинов в пресноводных водоемах по всему миру. Их основными продуцентами являются цианобактерии родов *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix* и др. (Chorus, Bartram, 1999). В процессе роста ци-

анобактерий микроцистины находятся в клетках и попадают в воду в результате их разрушения.

Микроцистины являются ингибиторами эукариотической серин/треонин фосфатазы 1 и 2A (PP1 и PP2A), что приводит к гиперфосфорилированию белков цитоскелета с последующей их деструкцией и деформацией гепатоцитов человека и животных. В результате возникают обширные кровоизлияния, увеличение размеров печени, а также онкологические заболевания (Zurawell *et al.*, 2005; Carmichael, Boyer, 2016; Massey, Yang, 2020).

Микроцистины относятся к циклическим гептапептидам с основной структурой цикло-(D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha), где D-Ala – D-аланин, D-MeAsp – D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, Adda – 3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота, D-Glu – D-глутамат, Mdha – N-метилдегидроаланин, X и Z – переменные L-аминокислоты (Chorus, Bartram, 1999).

В настоящее время известно 246 изомеров микроцистинов, отличающихся разной токсичностью (Tsuji *et al.*, 1994; Meriluoto *et al.*, 2017; Massey, Yang, 2020). Согласно рекомендациям ВОЗ

концентрация наиболее токсичного микроцистина-LR (MC-LR) в питьевой воде не должна превышать 1 мкг/л (Cyanobacterial toxins, 2020).

Благодаря циклической структуре микроцистина устойчивы к воздействию высоких температур, экстремальных pH, солнечному свету, вследствие чего могут сохраняться в водоемах месяцами (Tsuji *et al.*, 1994; Sivonen, Jones, 1999; Ras-togi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017).

Несмотря на свою стабильность микроцистины могут подвергаться биодegradации. Способностью разрушать микроцистины обладают как прокариотические, так и эукариотические микроорганизмы. Большинство бактерий-деструкторов относятся к *Proteobacteria* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), *Actinobacteria* и *Bacilli* (Li *et al.*, 2017; Massey, Yang, 2020). Многие из них имеют кластер генов *mlr*, ответственных за деградацию этих токсинов (Redouane *et al.*, 2019). Однако у ряда бактерий-деструкторов микроцистинов *mlr*-гены не обнаружены, что предполагает участие других генов в деструкции этих токсинов. Обсуждается участие в процессах микробной деструкции микроцистинов щелочных протеаз и глутатион-S-трансферазы (GST) (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2017; Krishnan *et al.*, 2018; Krausfeldt *et al.*, 2019). Весьма вероятно, что список ферментов, участвующих в процессах биотрансформации микроцистинов, со временем будет расширяться. Знание о биодegradации MC в окружающей среде на молекулярном уровне могло бы быть использовано для прогнозирования способности автохтонной микробиоты к удалению микроцистинов из среды. Однако отсутствие информации о молекулярных механизмах, отличных от биохимических путей, кодируемых *mlr* кластером, не позволяет в настоящее время использовать молекулярные методы для адекватной оценки способности природных сообществ микроорганизмов к деструкции MC.

Именно процесс биодegradации лежит в основе механизма разрушения микроцистинов в природных условиях (Christoffersen *et al.*, 2002; Bukowska *et al.*, 2018). Многочисленные публикации посвящены разложению микроцистинов автохтонной микробиотой озер (Christoffersen *et al.*, 2002; Dziga *et al.*, 2017; Krishnan *et al.*, 2018; Lezcano *et al.*, 2018), водохранилищ (Ho *et al.*, 2012; Medvedeva, Kuzikova, 2021), морей (Toruńska-Sitarz *et al.*, 2018), донных осадков (Rapala *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019), почв (Cao *et al.*, 2018; Redouane *et al.*, 2019). В большинстве этих исследований получены данные о способности природных микробных сообществ разрушать микроцистины, в том числе наиболее токсичный микроцистин-LR. Однако в ряде водоемов деструкция микроцистинов природной микробиотой не наблюдалась (Kiviranta *et al.*, 1991; Dziga *et al.*, 2017).

В России, несмотря на актуальность проблемы токсичных “цветений” водоемов исследования по оценке способности автохтонной микробиоты водных объектов разрушать альготоксины, в том числе микроцистины, до настоящего времени практически не проводились (Medvedeva, Kuzikova, 2021).

В настоящей работе была исследована биодеструкция микроцистина-LR природными микробными сообществами разнотипных водных объектов Северо-Запада России. В задачи исследования входило документирование наличия/отсутствия процессов деструкции MC-LR, определение кинетических характеристик и продуктов деструкции микроцистина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Водные объекты и отбор проб.** Пробы воды отбирали в водоемах, отличающихся как по природным характеристикам, так и по уровню антропогенной нагрузки – оз. Сестрорецкий Разлив, Нижнее Суздальское озеро, а также в Монастырской бухте и заливе Крестовый Ладожского озера (рис. 1, табл. 1).

Отбор проб в озерах Нижнее Суздальское и Сестрорецкий Разлив проводили дважды – в отсутствие массового развития водорослей (24.05.2018 г.) и во время “цветения” водоемов (28.06.2018 г. и 08.08.2018 г. соответственно). В Ладожском озере (Валаамский архипелаг – залив Крестовый, Монастырская бухта) пробы отбирали 16.06.2018 г. в отсутствие “цветения” воды.

Образцы поверхностных вод (2 л) отбирали в стерильную посуду, фильтровали через 5 мкм мембранные фильтры (Whatman) и использовали для определения профиля цианобактериальных токсинов в природных образцах и в экспериментах по деструкции микроцистина-LR.

**Определение профиля цианобактериальных токсинов и продуктов их деструкции в образцах природных вод.** При определении профиля цианобактериальных токсинов и продуктов их деструкции для подготовки проб воды использовали метод твердофазной экстракции (Oasis HLB, Waters), а для проб отфильтрованной биомассы – экстракцию 75% водным метанолом под воздействием ультразвука. Анализ выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС-ВР) с использованием системы ВЭЖХ Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение анализируемых соединений проводили на колонке Thermo Hypersil Gold RP C18 (100 × 3 мм, 3 мкм, Thermo Fisher Scientific) в режиме градиентного элюирования (0.2 мл/мин) смесью воды и ацетонитрила,

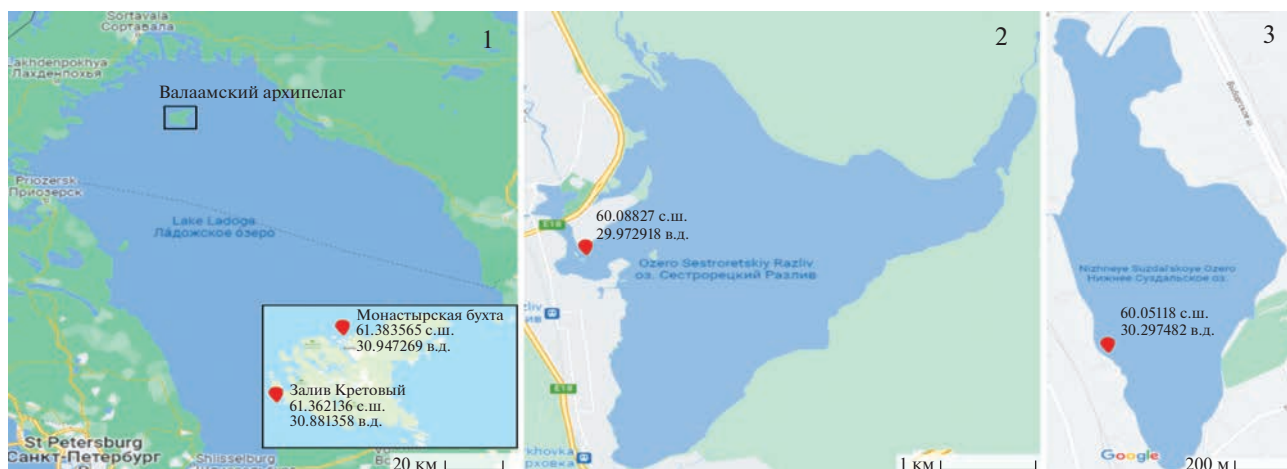


Рис. 1. Места отбора проб: 1 – Ладожское озеро, Валаамский архипелаг; 2 – озеро Сестрорецкий Разлив; 3 – Нижнее Суздальское озеро.

содержащих 0.05% муравьиной кислоты. Масс-спектрометрический анализ проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме детектирования положительных ионов. Целевые соединения идентифицировали на основании точного измерения массы ионов  $[M + H]^+$  или  $[M + 2H]^{2+}$  (разрешение 30000, точность в пределах 5 ppm) (Chernova *et al.*, 2016), данных из спектров фрагментации (Чернова и др., 2016) и хроматографических времен удерживания. Количественное определение проводили методом внутреннего и внешнего стандартов.

Были использовали следующие реактивы: ацетонитрил (Криохром, сорт “0”), метанол (LiChrosolvhypergrade для LC-MS, Merck, Германия), му-

равьиная кислота (98–100%, FlukaChemika, Buchs, Швейцария); стандартные соединения микроцистинов MC-LR, MC-RR, MC-YR (SigmaAldrich), а также MC-LY, MC-LA, MC-LW, MC-LF, [D-Asp<sup>3</sup>] MC-LR и [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR (EnzoLifeSciences, Inc., США). Вода, очищенная с помощью системы Direct-Q (Millipore, электропроводность 0.056  $\mu$ S/cm при 25°C) (Массачусетс, США).

**Деструкция микроцистина-LR.** Микроцистин-LR (Sigma-Aldrich) вносили в 250 мл колбы Эрленмейера со 100 мл природной воды из расчета 100 мкг/л. Образцы инкубировали при температуре  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , освещении 1000 лк в режиме свет : темнота = 12 : 12 ч до 60 сут. Образцы природных вод, стерилизованные при 1 атм в течение 30 мин

Таблица 1. Характеристика водных объектов

Водный объект	Использование	Площадь, га	Минимальная (средняя) глубина, м	Трофический статус	pH	Станция отбора
Оз. Сестрорецкий Разлив	РК	1100	5.5 (1.6)	Г (Chernova <i>et al.</i> , 2016)	8.0	60.08827 с.ш. 29.972918 в.д.
Нижнее Суздальское озеро	РК	97	4.5 (3.0)	Э (Chernova <i>et al.</i> , 2016)	7.7	60.05118 с.ш. 30.297482 в.д.
Ладожское озеро	ИВ, РК, Р	1787000	230 (46.9)	О–М (Степанова и др., 2020)	8.1	Залив Крестовый 61.362136 с.ш. 30.881358 в.д.
					8.5	Монастырская бухта 61.383565 с.ш. 30.947269 в.д.

Примечание. ИВ – источник водоснабжения; Р – рыболовство; РК – рекреационные цели; Г – гипертрофное; О – олиготрофное; М – мезотрофное; Э – эвтрофное.

**Таблица 2.** Содержание внутриклеточных токсинов в биомассе, отделенной при помощи фильтрации из проб воды

Микроцистин	[M + H] <sup>+</sup>	Содержание микроцистинов, нг/л			
		Оз. Сестрорецкий разлив		Нижнее Суздальское озеро	
		до “цветения”	во время “цветения”	до “цветения”	во время “цветения”
[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-LR	981.54095	–	–	–	–
MC-LR	995.55658	–	359	–	6
[D-Glu-OCH <sub>3</sub> <sup>6</sup> ]MC-LR	1009.57227	–	6	–	–
[D-Asp <sup>3</sup> ,Dha <sup>7</sup> ]MC-RR	1010.54236	–	9	8	41
[Dha <sup>7</sup> ]MC-FR	1015.52533	–	4	–	–
[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-RR	1024.55798	25	815	14	133
[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-YR	1031.52026	–	198	–	–
MC-RR	1038.57373	1	743	2	21
MC-YR	1045.53589	–	264	–	–
MC-(H <sub>4</sub> )-YR	1049.56714	–	104	–	–
[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-WR	1054.53625	–	51	–	–
MC-WR	1068.55188	–	81	–	–
Сумма MC		26	3267	26	228

и содержащие то же количество MC-LR, использовали в качестве контроля для определения абиотической деструкции токсина и испарения воды в процессе длительного инкубирования проб.

Для определения содержания MC-LR в воде образцы (5 мл) лиофилизировали и растворяли в 400 мкл 25%-го водного метанола. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 10000 об./мин в течение 5 мин. Концентрацию MC-LR определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе HP1090 (“Hewlett-Packard”, США) с диодно-матричным детектором (длина волны 238 нм, разрешение 1.2 нм) по методике, описанной ранее (Medvedeva *et al.*, 2017). Стандартный раствор MC-LR получен от Alexis Corporation (Швейцария).

Кинетические параметры деградации MC-LR в образцах рассчитывали в соответствии с уравнением реакции первого порядка:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt},$$

где  $C$  – концентрация MC-LR в пробе, мкг/л;  $C_0$  – исходная концентрация MC-LR, мкг/л;  $k$  – константа скорости реакции;  $t$  – время инкубирования, сут.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием Past 4.x software (<http://folk.vio.no/ohammer/past>). Статистическую значимость различий между вариантами оценивали с помощью one-way Anova и Tukey’s post hoc теста.

Для оценки нормальности данных и равенства дисперсий использовали Shapiro-Wilk и Levene тесты. Различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых повторений каждого варианта с тремя параллельными повторностями в каждом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В образцах, отобранных в водоемах, для которых характерно регулярное токсичное “цветение” воды (озера Сестрорецкий Разлив и Нижнее Суздальское), зарегистрированы структурные варианты микроцистинов, в том числе наиболее токсичный MC-LR (табл. 2, 3). Наименьшее разнообразие и количество внутриклеточных (26 нг/л) и отсутствие внеклеточных токсинов отмечено в образцах, отобранных до начала активной вегетации цианобактерий.

В образцах, отобранных в Сестрорецком Разливе во время “цветения” содержание внутриклеточных токсинов (11 структурных вариантов) достигало 3267 нг/л, внеклеточных – 4 нг/л. В пробах из Нижнего Суздальского озера во время “цветения” воды зарегистрировано наличие 5 структурных вариантов MC, их суммарное содержание в пробах биомассы составляло 228 нг/л, при этом внеклеточных токсинов детектировано не было. Следует отметить, что в озерах Сестрорецкий Разлив и Нижнем Суздальском, начиная с 2008 г., ежегодно детектируются микроцистины в

**Таблица 3.** Содержание внеклеточных токсинов в пробах воды

Микроцистин	[M + H] <sup>+</sup>	Содержание микроцистинов, нг/л			
		Оз. Сестрорецкий Разлив		Нижнее Суздальское озеро	
		до “цветения”	во время “цветения”	до “цветения”	во время “цветения”
MC-LR	995.55658	—	1	—	—
[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-RR	1024.55798	—	1	—	—
MC-RR	1038.57373	—	1	—	—
MC-YR	1045.53589	—	1	—	—
Сумма MC		0	4	0	0

**Таблица 4.** Параметры кинетики деструкции MC-LR автохтонной микробиотой водных объектов

Место отбора	Время отбора проб	<i>k</i> , сут <sup>-1</sup>	<i>T</i> <sub>50</sub> , сутки	R <sup>2</sup>	Лag-фаза, сутки
Оз. Сестрорецкий Разлив	Во время цветения	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.97	0
	До цветения	0.16 ± 0.01 <sup>b</sup>	9.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.982	5
Нижнее Суздальское озеро	Во время цветения	0.27 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.962	0
	До цветения	0.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	10 ± 2 <sup>b</sup>	0.941	5
Ладожское озеро, Монастырская бухта	Отсутствие цветения	0.013 ± 0.001 <sup>b</sup>	> 60	0.985	14
Ладожское озеро, залив Крестовый	Отсутствие цветения	0.015 ± 0.001 <sup>b</sup>	57.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	0.986	14

Примечание. Разные буквы (а, б, в) указывают на статистически значимые различия между местами отбора проб (*p* < 0.05).

период активной вегетации цианобактерий с доминированием потенциально токсичных видов *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralf et Born et Flah., *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. et Kom. и различных видов р. *Microcystis* (Chernova et al., 2016; Воякина и др., 2020).

В отличие от озер Сестрорецкий Разлив и Нижнее Суздальское информация о цианобактериальных цветениях и содержании цианотоксинов в прибрежной зоне Ладожского озера в районе Валаамского архипелага (Монастырская бухта и залив Крестовый) отсутствует. Это связано, прежде всего, с невысоким уровнем вегетации цианобактерий, несмотря на доминирование в планктоне потенциально токсичных видов *Dolichospermum spiroides* (Kleb.) Wacklinetal. (2009), *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anag. and Kom. (1988) и видов рода *Woronichinia* (Степанова и др., 2020).

В пробах, отобранных в Ладожском озере 16.06.2018 г., микроцистины также не были детектированы.

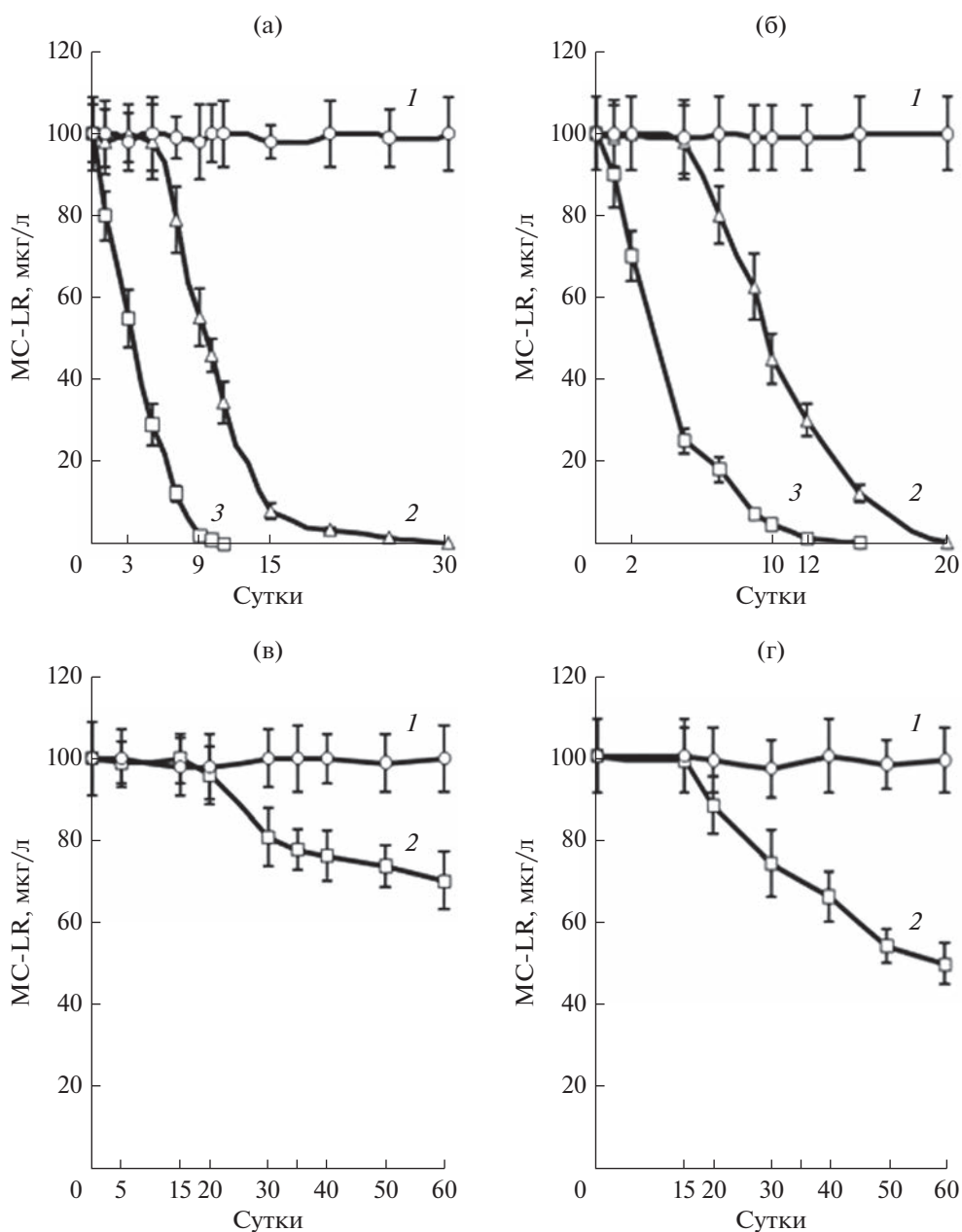
При инкубировании всех образцов природных вод с внесенным микроцистином-LR (100 мкг/л) наблюдается убыль токсина вне зависимости от уровня трофности и параметров водоема, времени отбора (в отсутствии или во время “цветения”), наличия или отсутствия токсичных “цветений” в предыдущие годы (рис. 2).

Следует отметить, что в стерильных образцах (абиотический контроль) статистически значимых изменений концентрации MC-LR не выявлено (*p* ≥ 0.05), что свидетельствует о его микробной деградации в опытных вариантах.

Наиболее активно и без лаг-фазы деструкция MC-LR проходила в образцах воды, отобранных во время “цветения” в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озере (рис. 2а, 2б, табл. 4).

Полная деструкция MC-LR в этих образцах отмечена на 11–12 сут инкубирования. Статистически значимых различий констант скорости и времени полураспада MC-LR в образцах, отобранных из “цветущих” Сестрорецкого Разлива и Нижнего Суздальского озера, не выявлено (*p* ≥ 0.05).





**Рис. 2.** Деструкция MC-LR в образцах воды: а – Сестрорецкий разлив, б – Нижнее Суздальское озеро, в – Ладожское озеро, Монастырская бухта, г – Ладожское озеро, залив Крестовый; 1 – стерильные образцы; 2 – образцы, отобранные в отсутствие “цветения” воды; 3 – образцы, отобранные во время “цветения” воды.

Разложение микроцистина автохтонной микробиотой этих водных объектов, отобранных в образцах воды до начала массового развития водорослей, характеризовалась меньшей скоростью деструкции (более чем в 1.5 раза) и увеличенным более чем в 3 раза временем полураспада MC-LR, по сравнению с аналогичными показателями “цветущих” объектов, а также наличием 5-ти суточной лаг-фазы.

В образцах воды, отобранных в Монастырской бухте и заливе Крестовом Ладожского озера, в ко-

торых ранее не были задокументированы токсичные цветения цианобактерий, и не были определены алготоксины, в том числе микроцистины, деструкция MC-LR также происходит, но со значительно меньшей скоростью по сравнению с ежегодно “цветущими” Сестрорецким Разливом и Нижним Суздальским озерами. В обоих образцах, отобранных в Ладожском озере, наблюдается длительная лаг-фаза (14–15 сут), и через 60 сут убыль MC-LR не превышала 29.6 и 50% для Монастырской бухты и залива Крестового соответ-

ственно. Скорость деструкции MC-LR в образцах воды Ладожского озера была в 11 раз ниже по сравнению с образцами воды, отобранными в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озерах до начала активной вегетации цианобактерий.

Различия в скоростях деградации микроцистинов в окружающей среде может быть результатом различных факторов – температуры, pH, содержания органического вещества, присутствия ионов металлов ( $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ), состава и активности автохтонной микробиоты (Kumar *et al.*, 2019). Хорошо известно, что скорость разложения MC природными сообществами микроорганизмов значительно выше, если в этом водном объекте уже наблюдались “цветения” и наличие MC в воде (Christoffersen *et al.*, 2002; Dziga *et al.*, 2017). Присутствие в водной среде микроцистинов приводит к изменению структуры бактериального сообщества и повышению в нем количества MC-деградирующих бактерий, а также к индукции ферментов, участвующих в процессах трансформации этих токсинов (Giaramida *et al.*, 2013; Ну *et al.*, 2021). В ряде исследований показано, что микроцистины индуцируют экспрессию генов *mlr* кластера, отвечающего за деструкцию этих токсинов у некоторых микроорганизмов (Shimizu *et al.*, 2011; Maghsoudi *et al.*, 2016). Для образцов воды, отобранных из водоемов, где ранее не фиксировались “цветения” и микроцистины, характерно наличие лаг-фазы, в течение которой происходит адаптация микробиоты к MC, индукция необходимых для их деструкции ферментов (Edwards *et al.*, 2008; Dziga *et al.*, 2017). В лабораторных условиях после лаг-фазы обычно следует быстрая стадия убыли микроцистинов (Edwards *et al.*, 2008; Giaramida *et al.*, 2013).

Полученные нами результаты частично согласуются с этими выводами. Самая длительная лаг-фаза – 15 сут, отмечена для образцов воды, отобранных в Монастырской бухте и заливе Крестовый, в которых ранее не было зафиксировано токсичных цианобактериальных цветений (рис. 2в, табл. 4).

Однако в отличие от данных зарубежных исследователей (Edwards *et al.*, 2008) мы наблюдали лаг-фазу до 5 сут и для проб воды, отобранных из регулярно “цветущих” Сестрорецкого Разлива и Нижнего Суздальского озера, в которых ежегодно фиксируются микроцистины. Следует отметить, что лаг-фаза зафиксирована только в пробах, отобранных в этих водоемах до начала массового развития цианобактерий. В образцах воды во время “цветения” водоемов биодеструкция MC происходила значительно быстрее и без лаг-фазы.

Методом ВЭЖХ-MC-VP в инкубированных с микроцистином образцах воды из Сестрорецкого Разлива, Нижнего Суздальского озера и Ладожского озера (залив Крестовый и Монастырская

бухта) идентифицированы продукты деструкции MC-LR (рис. 3).

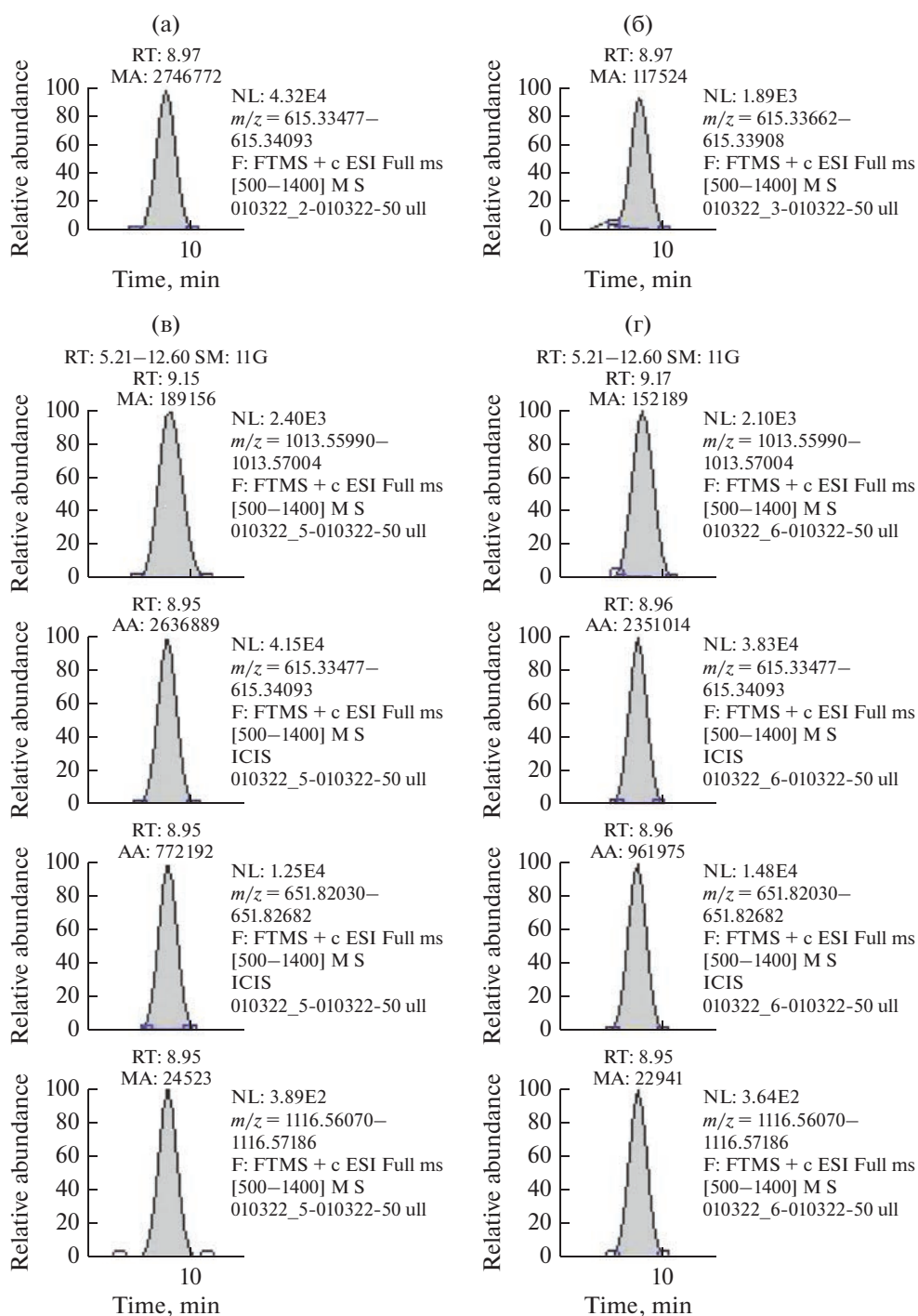
Соединение с  $m/z$  615.33785, фрагментный спектр которого соответствует описанному ранее продукту деструкции MC-LR тетрапептиду Adda-Glu-Mdha-Ala-OH (Bourne *et al.*, 1996), детектирован во всех анализируемых образцах (рис. 4). Фрагментные спектры содержали характеристичные дочерние ионы с  $m/z$  598; 566; 509; 477; 464; 375, приведенные в (Bourne *et al.*, 1996).

Наряду с тетрапептидом ( $m/z$  615) в образцах, отобранных в Ладожском озере, детектировано соединение с  $m/z$  1013, 56497 (рис. 3в).

Соединение с  $m/z$  1013.56497, фрагментный спектр которого представлен на рис. 5, идентифицировано как линеализированная форма MC-LR – Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-Masp-Arg-OH. Фрагментные спектры содержали характеристичные дочерние ионы с  $m/z$  995; 862; 571; 488, приведенные в (Bourne *et al.*, 1996), и кроме того, дочерние ионы, присутствующие в фрагментном спектре MC-LR с  $m/z$  995; 977; 844; 728; 710; 682; 599; 571; 553; 470 (Чернова и др., 2016).

Наличие в продуктах деструкции MC-LR тетрапептида с  $m/z$  615 и линеализированной формы MC-LR с  $m/z$  1013 свидетельствует о биохимическом пути деградации микроцистина бактериальными штаммами, имеющими кластер генов *mlr* (Bourne *et al.*, 1996; Dziga *et al.*, 2017). Биохимические пути деградации микроцистинов бактериями, имеющими ген *mlr*, хорошо изучены для бактерий рр. *Sphingopyxis*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, а также *Bacillus*, *Novosphingomonas* и некоторых других (Li *et al.*, 2017; Massey, Yang, 2020). Тем не менее, *mlr* деградация микроцистинов не является единственным путем их трансформации. Кластер генов *mlr* не детектирован у некоторых MC-деградирующих бактерий, в т.ч. *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Paucibacter* sp. (Li *et al.*, 2017). Обсуждается наличие альтернативных путей биохимической трансформации микроцистинов автохтонной микробиотой озера Эри (Северная Америка), ряда озер Польши, в которых не были детектированы *mlr* гены деструкции (Krishnan *et al.*, 2018; Krausfeldt *et al.*, 2019; Salter *et al.*, 2021).

Продукты трансформации MC-LR, отличные от промежуточных продуктов *mlr*-деструкции, – конъюгаты микроцистина с глутатионом MC-LR-Glu ( $m/z$  651.82356) и с цистеином MC-LR-Cys ( $m/z$  1116.56628) детектированы нами в процессе биодеструкции MC-LR автохтонной микробиотой Ладожского озера (залив Крестовый и Монастырская бухта) (рис. 6). Идентификация данных конъюгатов осуществлялась по точной массе протонированного молекулярного иона, а также согласно данным фрагментных спектров. В фрагментном спектре соединения с  $m/z$  651, соответ-



**Рис. 3.** Масс-хроматограммы продуктов трансформации микроцистина-LR: а – Сестрорецкий Разлив, б – Нижнее Суздальское озеро, в – Ладожское озеро, залив Крестовый, г – Ладожское озеро, Монастырская бухта. RT – время удерживания.

ствующего MC-LR-Glu, отмечали присутствие характеристического дочернего иона с  $m/z$  587, а в фрагменте спектре соединения с  $m/z$  1116, соответствующего MC-LR-Cys, дочерних ионов с  $m/z$  1029 и 599 (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2017). Кроме того, в фрагментном спектре последнему присут-

ствовали дочерние ионы, принадлежащие MC-LR: 553; 571; 599; 682; 710; 728 (Чернова и др., 2016).

Несмотря на то, что роль глутатиона в бактериальной деградации микроцистинов еще не подтверждена, известно, что первой стадией биodeградации MC-LR высшими растениями

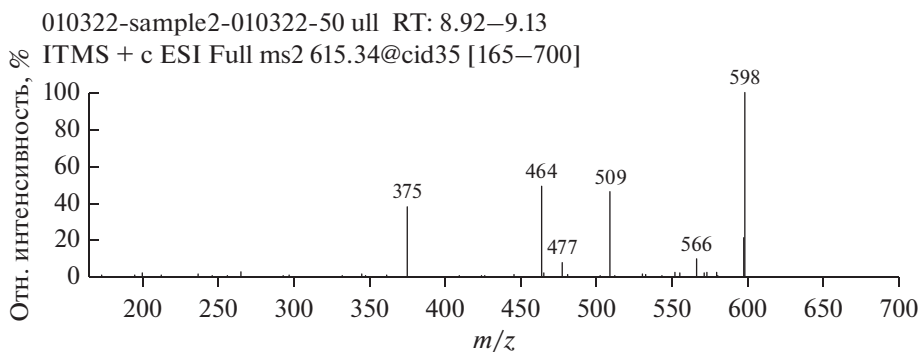


Рис. 4. Фрагментный спектр тетрапептида ( $m/z$  615).

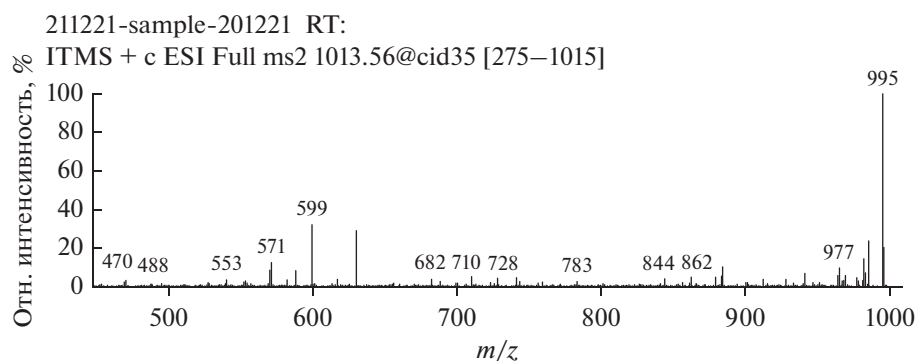
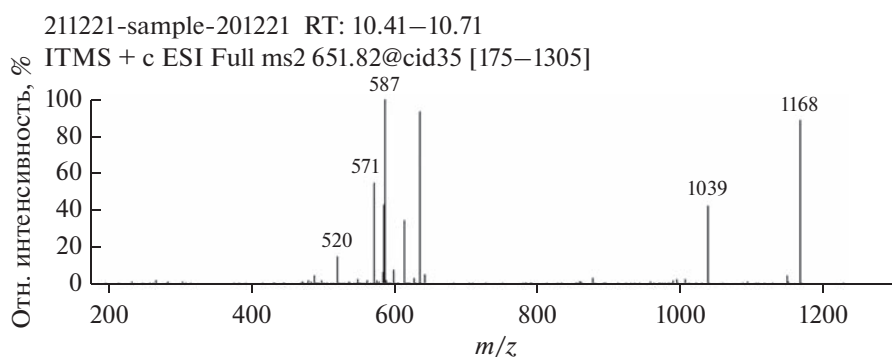


Рис. 5. Фрагментный спектр линеализированного MC-LR ( $m/z$  1013).

(а)



(б)

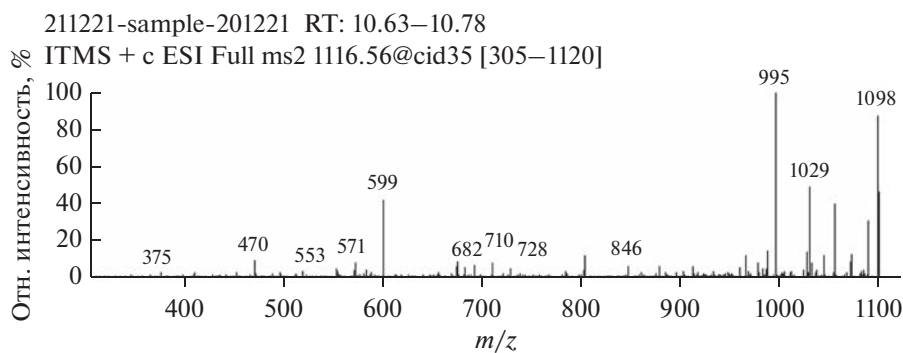


Рис. 6. Фрагментные спектры конъюгатов MC-LR с глутатионом ( $m/z$  651) (а) и цистеином ( $m/z$  1116) (б).

*Ceratophyllum demersum*, беспозвоночными *Daphnia magna*, моллюсками *Dreissena polymorpha*, крысами является конъюгация МС с GSH с последующим образованием цистеинового конъюгата МС-LR-CYS (Schmidt *et al.*, 2014; Krausfeldt *et al.*, 2019). Учитывая роль GSH в бактериальной деградации многих ксенобиотиков (Allocati *et al.*, 2009), предполагается участие глутатиона и в микробном метаболизме микроцистина (Mou *et al.*, 2013; Krausfeldt *et al.*, 2019). Полученные нами результаты подтверждают ранее высказанную гипотезу о широком распространении в природных объектах микроорганизмов, способных разлагать микроцистины как по *mlr* механизму, так и по другим биохимическим путям, в том числе с образованием конъюгатов микроцистина с глутатионом и цистеином (Krausfeldt *et al.*, 2019; Salter *et al.*, 2021).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробная деградация микроцистинов играет важнейшую роль в снижении их концентрации в природных объектах. В настоящей работе установлено, что деградация наиболее токсичного МС-LR автохтонной микробиотой происходит в образцах воды разнотипных водных объектов Северо-Запада РФ с площадью от 97 до 1787000 га, глубиной от 4.5 до 230 м, уровнем трофности от мезо- до гипертрофного. Структурные изомеры микроцистинов, в т.ч. МС-LR определены только в образцах воды, отобранных в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озерах, в которых ежегодно отмечается массовое развитие цианобактерий. При этом максимальное содержание микроцистинов 3271 нг/л (Сестрорецкий Разлив) и 228 нг/л (Нижнее Суздальское озеро) отмечено в пробах, отобранных в период “цветения” этих водоемов.

Автохтонная микробиота изучаемых объектов деградировала МС-LR независимо от истории “цветения” водоемов и их предварительной экспозиции с микроцистинами. Однако максимальная скорость деградации МС-LR отмечена в водных образцах, отобранных в Сестрорецком Разливе и Нижнем Суздальском озерах в период массового развития цианобактерий. Скорость деградации МС-LR в образцах воды в отсутствие “цветения” была ниже в 1.5 раза (Сестрорецкий Разлив и Нижнее Суздальское озеро) и 18 раз (Ладожское озеро) по сравнению с “цветущими” водоемами. В этих же образцах наблюдалась лаг-фаза от 5 до 15 сут соответственно. Обычно лаг-фаза требуется для адаптации автохтонной микробиоты к МС-LR, увеличению количества МС-деградирующих микроорганизмов в популяции.

Состав детектируемых продуктов биодеструкции МС-LR позволяет предположить разные пу-

ти деградации МС в изучаемых водных объектах. Идентификация в продуктах деструкции линеализированного МС-LR ( $m/z$  1013) и тетрапептида ( $m/z$  615) свидетельствует о наличии в составе автохтонной микробиоты всех изучаемых водных объектов микроорганизмов, обладающих кластером генов *mlr*, отвечающих за деструкцию микроцистинов у целого ряда бактериальных культур рр. *Sphingopyxis*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Novosphingomonas*.

Наличие в продуктах деструкции МС-LR микробиотой Ладожского озера (залив Крестовый, Монастырская бухта) конъюгатов МС-LR с глутатионом ( $m/z$  651) и цистеином ( $m/z$  1116) свидетельствует о присутствии в этих образцах микроорганизмов, способных деструктировать МС-LR не только по *mlr* механизму, но и по другому биохимическому пути с участием глутатиона.

Полученные нами результаты подтверждают ранее выдвинутую гипотезу о широком распространении способности автохтонной микробиоты различных водных объектов к деструкции микроцистинов, которая может осуществляться как по *mlr* механизму, так и другими биохимическими путями. Представленные в данном исследовании данные важны для понимания процессов детоксикации автохтонной микробиотой водных объектов, загрязненных микроцистинами, а также могут быть использованы для выделения новых МС-деградирующих микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041100086-5).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белякова З.Н., Волошко Л.Н., Гаврилова О.В., Гогорев З.М., Макарова Ю.Б., Рундина Л.А. Водоросли, вызывающие “цветение” водоемов Северо-Запада России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 367 с.
- Воякина Е.Ю., Русских Я.В., Чернова Е.Н., Жаковская З.А. Токсичные цианобактерии и их метаболиты в водоемах Северо-Запада России // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 1. С. 124–129. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-1-124-129>
- Степанова А.Б., Воякина Е.Ю., Бабин А.В., Зуева Н.В., Зуев Ю.А. Результаты исследований прибрежной зоны Ладожского озера в районе Валаамского архипелага (1998–2019 гг.) в РГГМУ // Гидрометеорология и экология. 2020. № 60. С. 325–350. (Stepanova A.B., Voyakina E.Yu., Babin A.V., Zueva N.V., Zuev Yu.A. Results of studies of the coastal zone of Lake Ladoga in the area of the Valaam archipelago (1998–2019) at RSHU // *Gidrometeorologiya i Ekologiya. Hydrometeorology and Ecology (Proceedings of the Russian State Hydrometeorological Univer-*

- sity). 2020. № 60. P. 325–350  
<https://doi.org/10.33933/2074-2762-2020-60-325-350>
- Чернова Е.Н., Русских Я.В., Подольская Е.П., Жаковская З.А. Определение микроцистинов и анатоксина-а методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения // Научное приборостроение. 2016. Т. 26. № 1. С. 11–25.
- Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. Glutathione transferases in bacteria // FEBS J. 2009. V. 276. P. 58–75.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x>
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L., Jones A., Negri A.P., Riddles P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4086–4094.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.62.11.4086-4094.1996>
- Bukowska A., Kaliński T., Chróst R.J. Degradation of microcystins by water and bottom sediment bacterial communities from a eutrophic freshwater lake // Aquat. Microb. Ecol. 2018. V. 82. № 523. P. 129–144.  
<https://doi.org/10.3354/ame01887>
- Cao Q., Steinman A.D., Yao L., Xie L. Effects of light, microorganisms, farming chemicals and water content on the degradation of microcystin-LR in agricultural soils // Ecotoxicol Environ Saf. 2018. V. 156. P. 141–147.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.030>
- Carmichael W.W., Boyer G.L. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes // Harmful Algae. 2016. V. 54. P. 194–212.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.002>
- Chernova E., Russkikh I., Voyakina E., Zhakovskaya Z. Occurrence of microcystins and anatoxin-a in eutrophic lakes of Saint Petersburg, Northwestern Russia // Oceanol Hydrobiol Stud. 2016. V. 45. № 4. P. 466–476.  
<https://doi.org/10.1515/ohs-2016-0040>
- Chorus I., Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management // World Health Organization. London: Für WHO durch E & FN Spon / Chapman & Hall, 1999. 416 p.
- Chorus I., Falconer I.R., Salas H.J., Bartram J. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters // J. Toxicol. Environ. Health. Part B. 2000. V. 3. № 4. P. 323–347.  
<https://doi.org/10.1080/109374000436364>
- Christoffersen K., Lyck S., Winding A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins // Aquat. Microb. Ecol. 2002. V. 27. № 2. P. 125–136.  
<https://doi.org/10.3354/ame027125>
- Codd G.A., Lindsay J., Young F.M., Morrison L., Metcalf J.S. Harmful cyanobacteria: From mass mortalities to management measures // Harmful cyanobacteria / Eds Huisman J., Matthijs H.C.P., Visser P.M.; Netherlands: Springer, 2005. P. 1–23.
- Cyanobacterial toxins: microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: World Health Organization 2020 (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Dziga D., Maksylewicz A., Maroszek M., Budzyńska A., Nap-iorkowska-Krzebietke A., Toporowska M., Grabowska M., Kozak A., Rosińska J., Meriluoto J. The biodegradation of microcystins in temperate freshwater bodies with previous cyanobacterial history // Ecotoxicol Environ Saf. 2017. V. 145. P. 420–430.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.046>
- Edwards C., Graham D., Fowler N., Lawton L.A. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters // Chemosphere. 2008. V. 73. № 8. P. 1315–1321.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07>
- Esterhuizen-Londt M., Hertel S., Pflugmacher S. Uptake and biotransformation of pure commercial microcystin-LR versus microcystin-LR from a natural cyanobacterial bloom extract in the aquatic fungus *Mucor hiemalis* // Biotechnology letters / Eds Esterhuizen-Londt M., Hertel S., Pflugmacher S. 2017. V. 39. № 10. P. 1537–1545.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-017-2378-2>
- Giaramida L., Manage P.M., Edwards C., Singh B.K., Lawton L.A. Bacterial communities' response to microcystins exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2013. V. 84. P. 111–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.036>
- Ho L., Dreyfus J., Boyer J., Lowe T., Bustamante H., Duker P., Meli T., Newcombe G. Fate of cyanobacteria and their metabolites during water treatment sludge management processes // Sci. Total Environ. 2012. V. 424. P. 232–238.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.025>
- Hu C., Zuo Y., Peng L., Gan N., Song L. Widespread Distribution and Adaptive Degradation of Microcystin Degradation (mlr-Genotype) in Lake Taihu, China // Toxins. 2021. V. 13. Article 864.  
<https://doi.org/10.3390/toxins13120864>
- Kiviranta J., Sivonen K., Lahti K., Luukkainen R., Niemelä S.I. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins – a laboratory study // Arch. Hydrobiol. 1991. V. 121. № 3. P. 281–294.  
<https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/121/1991/281>
- Krausfeldt L.E., Steffen M.M., McKay R.M., Bullerjahn G.S., Boyer G.L., Wilhelm S.W. Insight into the molecular mechanisms for microcystin biodegradation in Lake Erie and Lake Taihu // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Article 2741.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02741>
- Krishnan A., Zhang Y.-Q., Mou X. Isolation and Characterization of Microcystin-Degrading Bacteria from Lake Erie // Bull Environ Contam and Toxicol. 2018.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-018-2468-4>
- Kumar P., Hegde K., Brar S.K., Cledon M., Kermanshahi-Pour A. Potential of biological approaches for cyanotoxin removal from drinking water: A review // Ecotox-

- icol Environ Saf. 2019. V. 172. P. 488–503.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.066>
- Lezcano M.Á., Quesada A., El-Shehawey R.* Seasonal dynamics of microcystin-degrading bacteria and toxic cyanobacterial blooms: Interaction and influence of abiotic factors // *Harmful Algae*. 2018. V. 71. P. 19–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.11.002>
- Li J., Li R., Li J.* Current research scenario for microcystins biodegradation – A review on fundamental knowledge, application prospects and challenges // *Sci Total Environ*. 2017. V. 595. P. 615–632.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.285>
- Li J., Li J., Shi G., Mei Z., Wang R., Li D.* Discerning biodegradation and adsorption of microcystin-LR in a shallow semi-enclosed bay and bacterial community shifts in response to associated process // *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016. V. 132. P. 123–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.033>
- Maghsoudi E., Fortin N., Greer C., Maynard C., Pagé A., Duy S.V., Sauvé S., Prévost M., Dorner S.* Cyanotoxin degradation activity and mlr gene expression profiles of a *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Champlain, Canada // *Environ Sci Process Impacts*. 2016. V. 18. № 11. P. 1417–1426.  
<https://doi.org/10.1039/c6em00001k>
- Massey I.Y., Yang F.A.* Mini Review on Microcystins and Bacterial Degradation // *Toxins*. 2020. V. 12. № 4. 268.  
<https://doi.org/10.3390/toxins12040268>
- Medvedeva N.G., Kuzikova I.L.* Mycrocystin-LR degradation by indigenous bacterial community of Rybinsk reservoir // *IOP Conference Series “Earth and Environmental Science”*. 2021. V. 834. № 1. Article 012066.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/834/1/012066>
- Medvedeva N., Zaytseva T., Kuzikova I.* Cellular responses and bioremoval of nonylphenol by the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii* 1113 // *J. Mar. Syst.* 2017. V. 171. P. 120–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2017.01.009>
- Meriluoto J., Spoof L., Codd G.A.* Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. 2017.
- Mou X., Lu X., Jacob J., Sun S., Heath R.* Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie // *PloS one*. 2013. V. 8. № 4. Article e61890.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061890>
- Rapala J., Lahti K., Sivonen K., Niemelä S.* Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a // *Lett. Appl Microbiol*. 1994. V. 19. P. 423–428.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00972.x>
- Rastogi R.P., Sinha R.P., Incharoensakdi A.* The cyanotoxin-microcystins: current overview // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. 2014. V. 13. P. 215–249.  
<https://doi.org/10.1007/s11157-014-9334-6>
- Redouane E.M., El Amrani Zerrifi S., El Khalloufi F., Oufdou K., Oudra B., Lahrouni M., Campos A., Vasconcelos V.* Mode of action and fate of microcystins in the complex soil-plant ecosystems // *Chemosphere*. 2019. V. 225. P. 270–281.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03>
- Salter C., VanMensel D., Reid T., Birbeck J., Westrick J., Mundle S.O.C., Weisener C.G.* Investigating the microbial dynamics of microcystin-LR degradation in Lake Erie sand // *Chemosphere*. 2021. V. 272. Article 129873.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.12>
- Schmidt J., Wilhelm S., Boyer G.* The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring // *Toxins*. 2014. V. 6. № 12. P. 3354–3387.  
<https://doi.org/10.3390/toxins6123354>
- Shimizu K., Maseda H., Okano K., Itayama T., Kawauchi Y., Chen R., Zhang Z., Sugiura N.* How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity // *Lakes & Reservoirs: Research & Management*. 2011. V. 16. № 3. P. 169–178.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1770.2011.00480.x>
- Sivarajah B., Simmatis B., Favot E.J., Palmer M.J., Smol J.P.* Eutrophication and climatic changes lead to unprecedented cyanobacterial blooms in a Canadian sub-Arctic landscape // *Harmful Algae*. 2021. V. 105. Article 102036.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102036>
- Sivonen K., Jones G.* Chapter 3: Cyanobacterial toxins. In: *Chorus I., Bartram J. (Eds.), Toxic Cyanobacterial in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, 1999. P. 55–124.
- Toruńska-Sitarz A., Kotlarska E., Mazur-Marzec H.* Biodegradation of nodularin and other nonribosomal peptides by the Baltic bacteria // *Int Biodeterior Biodegradation*. 2018. V. 134. P. 48–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.08.004>
- Tsuji K., Naito S., Kondo F., Ishikawa N., Watanabe M.F., Suzuki M., Harada K.* Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization // *Environ. Sci. Technol*. 1994. V. 28. P. 173–177.  
<https://doi.org/10.1021/es00050a024>
- Zurawell R.W., Chen H., Burke J.M., Prepas E.E.* Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments // *J. Toxicol. Environ. Health, Part B: Critical Reviews*. 2005. V. 8. P. 1–37.  
<https://doi.org/10.1080/10937400590889412>
- Zhu F.-P., Han Z.L., Duan J.L., Shi X.S., Wang T.T., Sheng G.P., Wang S.-G., Yuan X.-Z.* A novel pathway for the anaerobic biotransformation of microcystin-LR using enrichment cultures // *Environ Polut*. 2019. V. 247. P. 1064–1070.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.013>



## **Microcystin-LR Biodestruction by Autochthonous Microbiota of Different Water Bodies in the North-West of Russia**

**N. G. Medvedeva<sup>1, #</sup>, T. B. Zaytseva<sup>1</sup>, I. L. Kuzikova<sup>1</sup>, and E. N. Chernova<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences (SPC RAS), Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences, Korpusnaya st., 18, St. Petersburg, 197110 Russia*

*<sup>#</sup>e-mail: ngmedvedeva@gmail.com*

The ability of the autochthonous microbiota of different water bodies in the North-West of the Russian Federation to degrade the highly toxic microcystin-LR (MC-LR) was shown for the first time. The maximum rate of degradation of MC-LR was noted in water samples from the Sestroretskij Razliv Lake and the Lower Suzdal Lake during the period of mass development of cyanobacteria. In water samples from Lake Ladoga, where no toxic cyanobacterial blooms were previously noted, MC-LR biodegradation proceeded at a much lower rate and with a longer lag phase. The composition of MC-LR biodegradation products indicates the presence in the autochthonous microbiota of the studied objects of microorganisms capable of degrading microcystins both by the mlr mechanism and by the biochemical pathway involving glutathione.

*Keywords:* water bodies, cyanobacteria, microcystin, autochthonous microbiota, biodegradation

УДК 551.464.4:551.464.7

## РАКОВИННЫЕ АМЕБЫ ПРИРОДНО-ИСТОРИЧЕСКОГО ПАРКА “БИТЦЕВСКИЙ ЛЕС” Г. МОСКВЫ

© 2023 г. А. А. Бобров<sup>®</sup>

Факультет почвоведения, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119992 Россия

<sup>®</sup>E-mail: anatoly-bobrov@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.12.2022 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Впервые в протозоологии проведены исследования фауны раковинных амёб городского парка. В различных типах местообитаний парка “Битцевский лес” г. Москвы было найдено сто девять видов и инфравидовых таксонов этой группы свободноживущих простейших. Для оценки видового разнообразия раковинных амёб были отобраны пробы из дупел деревьев; небольших олиго-мезотрофных болот; эпифитных мхов со стволов деревьев; мхов на валежнике; донные пробы из водоемов; почвенные пробы у стволов деревьев, а также непосредственно в зоне парковой усадьбы “Ясенево”. Выделены различные экологические группы раковинных амёб, наиболее богатые по численности сообщества из эврибионтов населяли, почвы, а также мхи на валежнике. Донные отложения усадебных прудов были заселены в основном гидрофильными видами из рода *Diffflugia*.

**Ключевые слова:** раковинные амёбы, заказник – городской парк “Битцевский лес” г. Москвы

**DOI:** 10.31857/S1026347023600036, **EDN:** LLGJIS

Хорошо известно, какую роль выполняют исторические парки во многих странах мира. Это сохранение исторического ландшафта, включающего садово-парковую территорию и исторические здания. Кроме этого в большинстве парков ландшафтные зоны представлены разнообразными элементами ландшафта и рельефа – плоскими участками, склонами, древесными насаждениями, лугами, озерами, реками и ручьями. Ботаническая часть парков, как правило, хорошо изучена в отличие от населения почв, особенно, микрофауны и в частности такой группы одноклеточных животных, как раковинные амёбы. Раковинные амёбы – это группа простейших, имеющих раковинку, которая может быть органической, а также построенной из кремнезема, фосфата кальция или из разнообразных минеральных микроскопических частиц включая панцири диатомовых водорослей. Это определяет их значимую роль в биогеохимических циклах углерода, кремния, кальция и фосфора.

Они населяют практически все известные типы местообитаний – донные отложения, почвы, болота. В публикации бельгийского исследователя Д. Шардэ (Chardez, 1965) выделены 12 типов местообитаний раковинных амёб. Это водная среда, субареальная, воздушная и эндогенная. Население раковинных амёб он разделял на три экологических группы – гидробионты, гидрофилы и ксе-

рофилы. Их географическое распространение охватывает все континенты, включая антарктический остров (Smith et al., 2008).

Раковинные амёбы играют важную роль в экосистемах. В частности была дана количественная оценка их участия в процессах разложения органического вещества в балансе углерода и азота, где они уступили первое место только микроскопическим грибам (Schröter, 2001).

Учитывая ландшафтную неоднородность исторических парков, разнообразие типов местообитаний, сосредоточенных компактно, их возраст и, как правило, высокий природно-охранный статус, то есть их ненарушенность, можно высказать гипотезу об их роли как рефугиумов, то есть убежищ для сохранения видового разнообразия почвенной биоты, в частности, таких одноклеточных организмов, как раковинные амёбы. Изученность населения этой группы простейших в почвах исторических парков очень слабая. Опубликованы результаты несколько исследований, в которых показана уникальность местообитаний Битцевского леса (Bobrov, Mazey, 2020, 2021). Проведен анализ влияния случайных (стохастических) и определяемых процессов на сообщества раковинных амёб, населяющих различные типы биотопов в городских парках г. Москвы (включая Битцевский парк) и г. Сямынь в Китае (Nday-

ishimiye *et al.*, 2022). Была найдена только одна публикация (Balik, 1991), в которой рассматривалось в общем контексте влияние дорог на раковинных амёб в городском ландшафте, в том числе и в парках. Была опубликована обобщающая статья по раковинным амёбам исторических парков г. Потсдама (Bobrov *et al.*, 2022). В этом исследовании фауны раковинных амёб были получены первые данные об особенностях их населения в пяти парках Потсдама — первая работа по паркам не только Европы, но и мировым паркам. Она восполняет в какой-то мере пробел в протозоологии, а также расширяет наши знания о населении городских исторических парков. В работе был проведен сравнительный анализ населения раковинных амёб парков, показана их разнообразная фауна и описан на основе изучения населения одной из проб новый род и новый вид. Цель настоящей работы — впервые описать разнообразие сообществ раковинных амёб, населяющих природно-исторический парк “Битцевский лес” в статусе особо охраняемой природной территории, с учетом разнообразия почвенного покрова.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Природно-исторический парк “Битцевский лес” — особо охраняемая природная территория, второй по величине лесопарк Москвы более двух тысяч гектар. Занимает по площади второе место, после Лосиногостинского острова и расположен между Севастопольским проспектом и микрорайоном Чертаново. Часть Битцевского городского парка включает территорию усадьбы Ясенево, которая известна с 14-го века. На территории парка представлено практически все разнообразие лесов ближнего Подмосковья (хвойные — еловые и сосновые, широколиственные — дубовые и липовые, мелколиственные — из березы, осины, ольхи серой, ольхи черной). Теплостанская возвышенность, где расположен Битцевский лес, считается широколиственно-лесной, что в немалой степени обусловлено ее геолого-геоморфологической основой и связанными с ней микроклиматическими, почвенными и фитоценоотическими условиями. Немногим более 11% площади занимают культуры хвойных пород ели и сосны, иногда с примесью лиственницы. Обедненный состав травяного яруса свидетельствует о том, что значительная часть культур создана на месте пашни примерно 70 лет назад. Дубравы с подростом из лещины, жимолости и бересклета; березняки и осинники с густыми зарослями крушины и рябины; липняки с участием клена остролистного, вяза обыкновенного, ясеня обыкновенного, березы повислой, сосняки, ельники (Полякова, 1992; Кузнецов и др., 2017).

Почвы Битцевского леса — дерново-среднеподзолистые среднесуглинистые на покровных

суглинках (реже средних); занимают вершины и склоны водоразделов, а также дерново-слабоподзолистые среднесуглинистые почвы на покровных суглинках, которые распространены в нижних покатах частях склонов вершин и занимают полосы вдоль оврагов и долин рек. Кислотность почв в среднем считается близкой к слабокислой и равна 5.8 (Кузнецов и др. 2017, 2019; Жидков, 2016). Почвы Битцевского парка относятся к наименее загрязненным в Москве. На территории Битцевского леса и его окрестностей имеется несколько искусственных водоемов.

В 2020–2021 гг. для оценки видовой разнообразия раковинных амёб всего было отобрано 45 проб в природно-историческом парке “Битцевский лес” г. Москвы. Пять проб из дупел лип, две из дупел березы, одна проба из дупла клена; пять проб из небольших олиго-мезотрофных болот; пять проб эпифитных мхов со стволов ели, липы, клена, березы и дуба; шесть проб мхов на валежнике в парке; пять проб со дна небольших водоемов; семь поверхностных проб (0–3 см) у стволов елей, сосны, березы, дуба, клена; одиннадцать поверхностных проб непосредственно в зоне парковой усадьбы “Ясенево”.

Математические методы, использованные для анализа полученных данных — программа Past 4.03. Для количественной оценки сходства–различия сообществ разных типов местообитаний были использованы два статистических метода — кластерный анализ, метод ближайших соседей (Neighbour joining clustering) и анализ основных координат (PCO scatter diagram). Дана краткая характеристика доминантных комплексов и общих видов раковинных амёб, значения которых могли повлиять на результаты этих методов.

Сокращения названий мест отбора проб (приведены латинские названия и цифровое обозначение в скобках для удобства работы в статистических пакетах): Н (1) — дупла; SW (2) — верхние 0–3 см лесных заболоченных местообитаний; EM (3) — эпифитные мхи; В (4) — донные отложения; SF (5) — почва, парковый лес; FS (6) — почва на территории усадьбы “Ясенево”; MD (7) — мхи на валежнике в парке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ДИСКУССИЯ

В 45 пробах обнаружено 109 таксонов раковинных амёб видовой и инфравидовой уровней (Appendix). Распределение по типам местообитаний: наибольшее видовое разнообразие было в пробах лесных заболоченных местообитаний, эпифитных мхах и донных отложений парковых прудов (рис. 1, табл. 1). Самые бедные пробы были характерны для верхних почвенных слоев гумусово-аккумулятивных горизонтов лесных и усадебных почв, взятых в подкромовых простран-

ствах деревьев, а также дупел деревьев и мхах на валежнике. Этот факт подчеркивает высокую избирательность раковинных амёб по отношению к влажности местообитаний.

Основную группу доминантов в пробах составляют эврибионтные виды — *Plagiopyxis callida*, *P. declivis*, *Centropyxis sylvatica*, *C. constricta* v. *minima*, *Cyclopyxis eurystoma* v. *parvula*, *C. kahli*, *Euglypha laevis*.

Дупла деревьев. Найдено 29 таксонов раковинных амёб видового и инфравидового уровней. Доминирующие виды-эврибионты — *Centropyxis aerophila*, *Plagiopyxis penardi* и *Euglypha laevis*. Найдены, описанные только в пробах Битцевского леса новый род *Frenopyxis* и виды, *Frenopyxis stirlizovi* (Bobrov, Mazeu, 2020) и *Meisterfeldia bitsevi* (Bobrov, Mazeu, 2021). В работе в настоящее время готовится статья с еще двумя новыми таксонами, чей таксономический статус в настоящее время уточняется. К редким видам нужно отнести также *Georuxella sylvicola* и *Diffflugia nana*, чьи находки в дуплах деревьев были неожиданными. Если первый вид характеризует околонеутральную или щелочную реакцию местообитаний, что и подтверждается также находками таких видов как кальцефильного *Centropyxis plagiostoma* и *Centropyxis delicatula* с околонеутральным оптимумом. В свою очередь *Diffflugia nana* предпочитает влажные условия, что, очевидно, отражает более стабильный режим влажности в дуплах по сравнению с почвенными условиями.

Небольшие олиго-мезотрофные болота. Наиболее богатые по видовому составу местообитания — 48 таксонов. Основную группу составляют виды гигро- и гидрофилы из родов *Arcella*, *Centropyxis*, *Diffflugia* и *Euglypha*. Общее количество таких видов составляет более 50%. Предположительно в этих местообитаниях реакция почвенного раствора не кислая, а околонеутральная, судя по находкам таких типичных почвенных видов, как *Plagiopyxis callida*, *P. declivis*, *P. minuta*, *Centropyxis plagiostoma*, *C. constricta* v. *major*, *C. sylvatica* f. *major*, *Georuxella sylvicola*. Полученные данные подтверждаются полученными ранее результатами других исследователей. В почвах хвойно-широко-

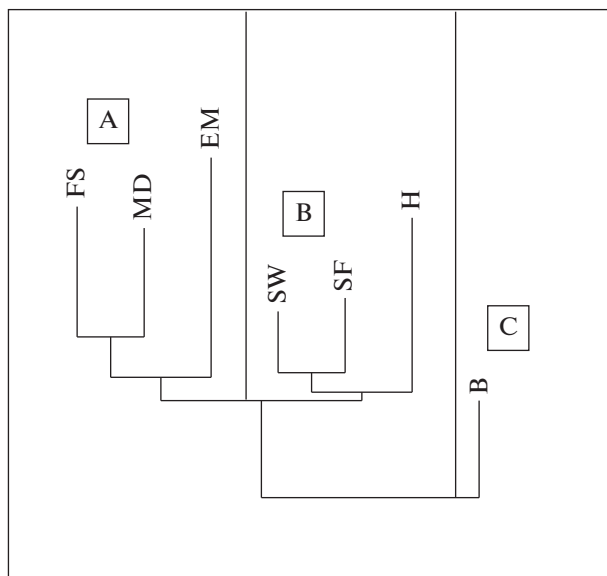


Рис. 1. Результаты кластерного анализа сообществ раковинных. Обозначения: Н — дупла; SW — верхние 0–3 см лесных заболоченных местообитаний; EM — эпифитные мхи; В — донные отложения; SF — почва, парковый лес; FS — почва на территории усадьбы “Ясенево”; MD — мхи валежнике в парке.

лиственных лесов, луга и болота Подмосквы был найден 121 таксон (Корганова, 1978; Корганова, Рахлеева, 1997; Рахлеева, Корганова, 2005). Наибольшее видовое разнообразие было отмечено также в болотной дерново-глеевой почве (68 видов), среди автоморфных почв в почвах ельников (до 58 видов), самое бедное местообитание (24 вида) в лещиново-олосистоосоковом березняке.

Эпифитные мхи. Найдено 38 видов и внутри-видовых таксонов. В пробах мхов почти не обнаружены гигро- и гидрофильные виды, за исключением *Arcella arenaria*, *Diffflugia nana* и единственной находки такого гигрофильного, болотного вида как *Weilesella ebocacensis*. Доминантный комплекс в эпифитных мхах помимо эврибионтных видов был сформирован видами преимущественно с органической раковинкой или из биогенного

Таблица 1. Индексы альфа-разнообразия сообществ раковинных амёб парка Битцевский лес

Парк	Н	SW	EM	В	SF	FS	MD
Число видов	29	48	38	42	19	25	27
Dominance_D	0.19	0.03	0.06	0.09	0.09	0.17	0.09
Shannon_H	2.71	3.78	3.18	3.15	2.68	2.69	2.81
Menhinick	2.76	6.09	2.97	4.08	2.77	2.77	2.62
Margalef	5.44	11.39	7.13	8.66	4.67	5.15	5.57
Berger–Parker	0.21	0.05	0.13	0.26	0.19	0.18	0.19

Примечание. Н — дупла; SW — верхние 0–3 см лесных заболоченных местообитаний; EM — эпифитные мхи; В — донные отложения; SF — почва, парковый лес; FS — почва на территории усадьбы “Ясенево”; MD — мхи валежнике в парке.

кремнезема — *Arcella arenaria*, *A. artocrea* v. *catinus*, *A. arenaria* v. *compressa*, *A. arenaria sphagnicola* v. *undulata*, *Cyclopyxis arcelloides*, *C. eurystoma* v. *deflandrei*, *Geopyxella sylvicola*, *Assulina minuta*, *A. muscorum*, *Valkanovia delicatula*, *Euglypha compressa* f. *glabra*, *E. strigosa* f. *glabra*, *Corythion dubium*.

Донные отложения небольших водоемов и прудов на территории парка и частично в лесном массиве. Всего 42 вида и внутривидовых таксона. Доминируют виды гидрофильного комплекса из родов *Arcella*, *Centropyxis*, *Diffflugia* и *Lagenodiffflugia*, в частности — *Arcella discoidea*, *A. cf. megastoma*, *A. pigmea*, *Centropyxis* cf. *discoidea*, *C. ecornis*, *Plagiopyxis callida*, *Diffflugia bipartita*, *D. curvicaulis*, *D. gassowski*, *D. globularis*, *D. globulosa*, *D. globulus*, *D. gramen*, *D. microstoma*, *D. lacustris*, *D. lanceolata*, *D. lata*, *D. lithophila*, *D. oblonga*, *D. oblonga* v. *cornuta*, *D. paulii*, *D. pristris*, *D. regularis*, *D. smilion*, *D. sphincta*, *Lagenodiffflugia* vas. Отмечены морфологические вариации двух видов — *Arcella megastoma* и *Centropyxis discoidea*, что, возможно, говорит о неблагоприятных экологических условиях донных отложений этих водоемов, как аккумулятивных зонах парка.

Почва, парковый лес. Наиболее бедное сообщество раковинных амёб, представленное в основном эврибионтными видами *Centropyxis aerophila*, *C. ecornis*, *C. orbicularis*, *C. plagiostoma*, *C. plagiostoma* f. *minor*, *C. sylvatica*, *C. sylvatica* v. *minor*, *Cyclopyxis eurystoma* v. *parvula*, *C. kahli*, *Plagiopyxis declivis*, *P. callida*, *Schoenbornia viscidula*, *Euglypha laevis*, *Trinema penardi*. Всего 19 видов. Найдена очень редкая окрашенная в коричневый цвет форма *Cyclopyxis* cf. *eurystoma* f. A (braun).

Почва в усадьбе. Несколько более богатое по видовому составу население почв усадебного парка — 25 видов и более разнообразное по экологическим группам включает такие редкие виды как *Arcella pigmea*, *Geopyxella sylvicola*, а также группу эврибионтных видов — *Centropyxis constricta* v. *minima*, *C. orbicularis*, *C. sylvatica*, *C. sylvatica* v. *minor*, *Cyclopyxis eurystoma* v. *parvula*, небольшую группу видов, предпочитающих околонеутральную реакцию почвенного раствора — *Centropyxis plagiostoma*, *C. plagiostoma* f. *minor*, *Cyclopyxis kahli*, *Plagiopyxis declivis*, *P. minuta*, *P. penardi* v. *oblonga*, и гидрофильных видов — *Diffflugia lucida*, *D. penardi*. Такой состав экологических групп характеризует уникальность экологических условий почв усадебного парка.

Мхи, валежник. Население раковинных амёб моховых сообществ состояло из 27 видов, включало в основном эврибионты, характерные для начальных стадий разложения отмерших растительных остатков — *Arcella arenaria* v. *compressa*, *Centropyxis aerophila*, *C. aerophila* v. *sphagnicola*, *C. cassis*, *C. cassis* f. *minor*, *C. constricta*, *C. constricta* v. *major*, *C. constricta* v. *minima*, *C. sylvatica*, *C. sylvatica* v. *minor*, *Cyclopyxis eurystoma*, *C. eurystoma* v. *parvula*,

*C. kahli*, *Plagiopyxis callida*, *P. declivis*, *P. declivis* v. *oblonga*, *Euglypha laevis*, *Trinema lineare*, *T. penardi*, *Corythion dubium*.

Для оценки разнообразия сообществ был использован ряд индексов (табл. 1). Наиболее высокий индекс доминирования отмечен для населения дупел деревьев. Уменьшение величины индекса Бергера—Паркера в лесных заболоченных местообитаниях отражает увеличение разнообразия и снижение индекса доминирования в этом типе местообитаний по сравнению с другими. Этот подтверждается и высокими значениями индексов Шеннона, Менхинка и Маргалефа (табл. 1).

Три группы основных кластеров (рис. 1): группа А — сообщества почв на территории усадьбы “Ясенево”, мхов на валежнике; отдельную позицию занимают эпифитные мхи. Их объединяет сходство населения этой группы простейших, а, следовательно, и относительная ненарушенность местообитаний. Группа В — лесные заболоченные местообитания, почвы паркового леса, а также сообщества дупел. В этой группе близкие значения по составу сообществ раковинных амёб в лесных заболоченных местообитаниях и почвах паркового леса; несколько отличаются сообщества, населяющие дупла деревьев; кластер С — сообщество донных отложений с преобладанием облигатных гидробионтов.

Результаты анализа методом основных координат (рис. 2) показывают несколько отличаю-

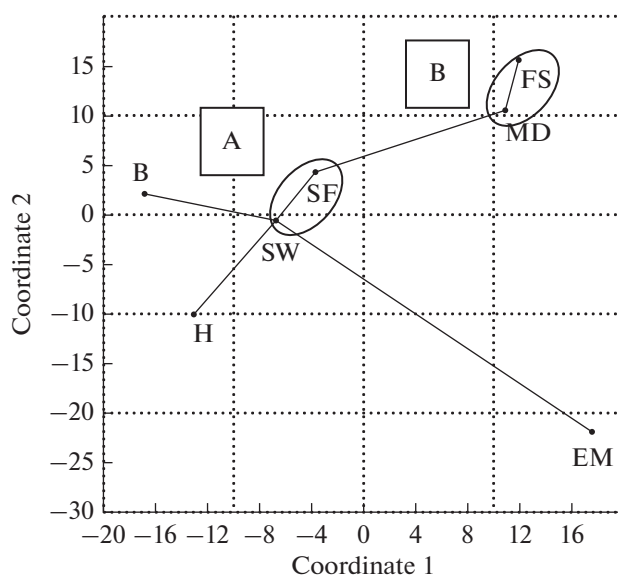


Рис. 2. Результаты анализа основных координат исследованных сообществ раковинных амёб. Обозначения: Н — дупла; SW — верхние 0–3 см лесных заболоченных местообитаний; EM — эпифитные мхи; В — донные отложения; SF — почва, парковый лес; FS — почва на территории усадьбы “Ясенево”; MD — мхи валежнике в парке.

щиеся результаты. Хотя три типа местообитаний — эпифитные мхи, дупла и поверхностный слой донных отложений, также выделены отдельно и не включены в группы с другими типами местообитаний.

Таким образом, получены довольно близкие результаты, несмотря на то, что были использованы два разных математических метода оценки близости—различия видового состава сообществ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог оценки населения раковинных амёб разных типов местообитаний городского парка “Битцевский лес”, можно сказать, что режим заказника, позволяет сохранять довольно высокое видовое разнообразие этой группы свободноживущих простейших, сравнимое, а нередко и превышающее разнообразие раковинных амёб в почвах лесов, вмещающих эту часть Московской области.

Для сравнения в 45 пробах парка “Битцевский лес” было найдено 109 таксонов, а в пробах отдельных биотопов видовое разнообразие было сравнительно низкое — от 19 до 48 видов и инфравидовых таксонов. В то же время общее разнообразие было сравнимо с литературными данными о населении раковинных амёб Подмоскovie. Это объясняется различиями в видовом разнообразии разных биотопов, что при суммарной оценке по населению всех биотопов позволяет получить довольно высокое значение, в частности для парка “Битцевский лес”. Разнообразие биотопов с разными экологическими условиями влияет, безусловно, и на видовой состав экологических групп раковинных амёб. В этом, в том числе, и определяется важное значение парка, как заказника, в сохранении широкого разнообразия биоты парка, в том числе и такой группы почвенных простейших как раковинные амёбы.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено в рамках темы государственного задания 121040800147-0 и частично поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (№№ 20-54-53017 и 19-05-50093\20).

Список видов и инфравидовых таксонов раковинных амёб парка Битцевский лес:

*Arcella arenaria*, *A. arenaria* v. *compressa*, *A. arenaria sphagnicola* v. *undulata*, *A. artocrea* v. *catinus*, *A. discoides*, *A. hemicphaerica*, *A. infraterricola*, *A. cf. megastoma*, *A. pigmea*, *Trigonopyxis arcuata*, *T. minuta*, *Centropyxis aculeata*, *C. aerophila*, *C. aerophila* v. *grandis*, *C. aerophila* f. *minor*, *C. aerophila* v. *sphagnicola*, *C. cassis*, *C. cassis* f. *minor*, *C. constricta*, *C. constricta* v. *major*, *C. constricta* v. *minima*, *C. delicatula*, *C. cf. discoides*, *C. cf. discoides minor*, *C. ecornis*, *C. ecornis* v. *quadrigipannosa*, *C. elongata*, *C. orbicularis*, *C. orchidensis*, *C. plagiostoma*, *C. plagiostoma* f. *minor*,

*C. platystoma*, *C. sylvatica*, *C. sylvatica* f. *major*, *C. sylvatica* v. *minor*, *Frenopyxis stierlitzovi*, *Cyclopyxis arcelloides*, *C. eurystoma*, *C. eurystoma* v. *parvula*, *C. eurystoma* v. *deflandrei*, *C. cf. eurystoma* f. *A* (braun), *C. kahli*, *C. kahli* f. *A* (minor), *C. sp.*, *Plagiopyxis callida*, *P. callida* v. *grandis*, *P. callida* f. *minor*, *P. declivis*, *P. declivis* v. *oblonga*, *P. minuta*, *P. penardi*, *P. penardi* v. *oblonga*, *Geopyxella sylvicola*, *Schoenbornia humicola*, *Sch. viscicola*, *Diffflugia bipartita*, *D. brevicola*, *D. curvicaulis*, *Diffflugia gassowski*, *D. globulosa*, *D. globulus*, *D. globularis*, *D. gramen*, *D. lacustris*, *D. lanceolata*, *D. lata*, *D. linearis*, *D. litophila*, *D. lucida*, *D. microstoma*, *D. nana*, *D. oblonga*, *D. oblonga* v. *cornuta*, *D. paulii*, *D. penardi*, *D. perflieri*, *D. pristris*, *D. regularis*, *D. schurmani*, *D. smil-ion*, *D. sphincta*, *Lagenodiffflugia vas*, *Phryganella acropodia*, *Valkanovia delicatula*, *V. elegans*, *Assulina minuta*, *A. muscorum*, *Euglypha acantophora*, *E. ciliata*, *E. ciliata* f. *glabra*, *E. compressa* f. *glabra*, *E. cuspidata*, *E. laevis*, *E. strigosa* f. *glabra*, *E. tuberculata*, *E. sp.*, *Corythion dubium*, *C. dubium* v. *minima*, *Trinema complanatum*, *T. complanatum* v. *aerophila*, *T. complanatum* f. *minor*, *T. enchelys*, *T. lineare*, *T. lineare* v. *minuscule*, *T. penardi*, *Cryptodiffflugia oviformis* f. *fusca*, *Meisterfeldia bitsevi*, *Wailesella ebocacensis*, *Testacea* sp. 1, *Testacea* sp. 2, *Testacea* sp. 3.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жидков А.Н. Трансформации ландшафта и почв Битцевского лесопарка // Лесоведение и лесоводство. 2016. № 5. С. 117–121.  
<https://doi.org/10.24419/LNI.2304-3083.2021.2.05>
- Корганова Г.А. Раковинные корненожки (Protozoa Testacea) как показатель почвенных условий. Обзор литературы // Итоги науки и техники ВИНТИ. 1978. Сер. Зоология беспозвоночных. М. № 5. С. 153–178.
- Корганова Г.А., Рахлеева А.А. Раковинные амёбы (Testacea) почв Мещерской низменности // Зоологический журн. М.: Наука, 1997. Т. 76. № 3. С. 261–268.
- Кузнецов В.А., Рыжова И.М., Стома Г.В. Изменение свойств почв лесопарков Москвы при высоком уровне рекреационной нагрузки // Почвоведение. 2017. № 10. С. 1270–1280.  
<https://doi.org/10.31857/S0032180X22601256>
- Нагибина И.Ю. Значение парковых зон для жителей городской среды. 2014. И.Ю. Нагибина, Е.Ю. Жукова. Молодой ученый. 2014. № 20 (79). С. 84–85.
- Полякова Г.А. Флора и растительность старых парков Подмоскovie. 1992. М.: Наука, 225 с.
- Рахлеева А.А., Корганова Г.А. К вопросу об оценке численности и видового разнообразия раковинных амёб (Rhizopoda, Testacea) в таежных почвах // Зоологический журн. М.: Наука, 2005. Т. 84. № 12. С. 1427–1436.
- Balik V. The effect of the road traffic pollution on the communities of testate amoebae (Rhizopoda, Testacea) in Warsaw (Poland) // Acta Protozoologica. 1991. V. 30. P. 5–11.  
<https://doi.org/10.4467/16890027AP>
- Bobrov A., Mazei Y. *Frenopyxis stierlitzii* gen. nov. sp. nov. — new testate amoeba (Amoebozoa: Arcellinida) from the

- urban parks with notes on the systematics of the family Centropyxidae Jung, 1942 // *Zootaxa*. 2020. V. 85. № 3. P. 384–394.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4885.3.4>
- Bobrov A., Mazei Y.* *Meisterfeldia bitsevi* – new testate amoeba of the family Cryptodiffugiidae Jung, 1942 (Amoebozoa: Arcellinida) from the tree hollow in the urban park (Moscow, Russia) with a key to species of the genus *Meisterfeldia* // *Zootaxa*. 2021. № 4908 (4). P. 595–600.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.5254.2>
- Bobrov A., Wetterich S., Schirrmeyer L.* Testate Amoebae in Historical parks of Potsdam, Germany // 2022. *Protist*. V. 173. Iss. 6: 125911. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2022.125911>
- Chardez D.* Ecologie generale des Thecamoebiens (Rhizopoda, testacea) // *Bulletin Institut Agronomique Stations de Recherches Gembl.* 1965. № 3. P. 306–341.
- Kosakyan A., Goma F., Lara E., Lahr D.* Current and future perspectives on the systematics, taxonomy and nomenclature of testate amoebae // *European Journal of Protistology*. Urban & Fisher. 2016. V. 55. P. 105–117.
- Ndayishimiye J.C., Mazei Y., Babeshko K., Tsyganov A., Bobrov A., Mazei N., Kexim R., Abdullah M., Chen H., Wenping W., Saidaev D., Ivanovskii A., Nyirabuhoro., Yang J.* Stochastic and deterministic processes shaping the testate amoebacommunities across different biotopes of urban parks in Moscow and Xiamen cities // *Urban Ecosystems*. 2022. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.1007/s11251-022-01306-8>
- Schröter D.* Structure and function of decomposer food webs of forests a long a European North-South-transsect with special focus on testate amoebae (Protozoa) // PhD-thesis. 2001. Department of Animal Ecology, University of Giessen. 172 p.
- Smith H.G., Bobrov A., Lara E.* Diversity and biogeography of testate amoebae // *Biodiversity and Conservation*. 2008. № 17. Iss. 2. P. 329–343.  
<https://doi.org/10.1080/23766808.2021.2006550>

## Shell Amebas of the Natural and Historical Park “Bitsevsky Forest”, Moscow

A. A. Bobrov<sup>#</sup>

*Department of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1/12, Moscow, 119992 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: anatoly-bobrov@yandex.ru*

For the first time in protozoology, research was carried out on the fauna of testate amoebae in a city park. One hundred and nine species and infraspecific taxa of this group of free-living protozoa were found in various types of habitats in the Bitsevsky Forest park in Moscow. To assess the species diversity of testate amoebae, samples were taken from tree hollows; small oligo-mesotrophic swamps; epiphytic mosses from tree trunks; mosses on deadwood; bottom samples from reservoirs; soil samples near tree trunks, as well as directly in the area of the Yasenevo park estate. Various ecological groups of testate amoebae have been identified, the richest communities of eurybionts inhabited soils, as well as mosses on deadwood. Bottom sediments of man- or ponds were inhabited mainly by hydrophilic species of the genus *Diffugia*.

*Keywords:* testate amoebae, nature reserve – city park “Bitsevsky forest” in Moscow



УДК 598.285571.1/5:591543.4

## ЭКОЛОГИЯ ЮРКОВ *Fringilla montifringilla* L. НА СЕВЕРЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

© 2023 г. В. Н. Рыжановский<sup>@, @@</sup>

Институт экологии растений и животных УрО РАН, ул. 8 марта, 202, Екатеринбург, 620144 Россия

<sup>@</sup>E-mail: ryzhanovskiy@ya.ru

<sup>@@</sup>E-mail: ryzhanovsky@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 17.03.2022 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Рассмотрены особенности экологии юрков на северном пределе ареала в Приобской лесотундре. Плотность гнездования остается высокой, локально 50–100 пар/км<sup>2</sup>, вплоть до границы распространения прибрежных лесов и пойменных редколесий вдоль 67-й параллели. Местообитания, пригодные для гнездования юрков, имеются и севернее, но птицы малочисленны. Биотопические условия продвижения птиц на север существенно не ограничивают. Велико значение фенологических условий — летняя часть годового цикла вида должна вписаться в определенный лимит температур и сезонных явлений природы. У юрков нет адаптаций к условиям Субарктики. Это средне- и северо-таежный вид осваивающий лесотундру по мере ее потепления и загущения редколесий.

**Ключевые слова:** Приобская лесотундра, юрок, ареал, экология, размножение, линька

**DOI:** 10.31857/S1026347022100262, **EDN:** UDDKRG

Юрок — обычная гнездящаяся перелетная птица лесных и лесотундровых ландшафтов Северной Евразии, поэтому многие авифаунистические сводки по регионам России содержат очерки экологии вида. Общим свойством очерков является фрагментарность материала, на основании которого они написаны. Как правило, нет обсуждения адаптивных черт экологии, позволяющих популяциям юрков существовать в той или иной части ареала. Материалы, имеющиеся в моем распоряжении, собраны на северной границе ареала вида, в Приобской лесотундре. Сочетание разных методов сбора: отлов сетями и ловушками с прижизненной обработкой, мечение и повторные отловы; содержание юрков в неволе при разных фотопериодических условиях, учеты на пробных площадках, наблюдения и длительный период исследований позволяют рассмотреть особенности жизни юрков на северном пределе ареала детальнее, чем делалось ранее, в том числе и в нашей (Данилов и др., 1984) сводке. Поскольку ареал юрков заходит в Субарктику, несомненный интерес представляют адаптации к освоению Заполярья, что также является задачей данной работы.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основной район исследований — долина реки Обь в окрестностях г. Лабытнанги (стационар

Октябрьский, 66°40' с.ш. 66°40' в.д.) и среднее течение р. Сось на Полярном Урале (ж. д. ст. Красный Камень, 66°40' с.ш. 66°30' в.д.), где в 1976–1989, 2002–2004, 2016–2018 гг. отыскивали и контролировали гнезда, отлавливали молодых и взрослых юрков, в том числе птиц, ранее окольцованных в гнездовое время. Там же набирали птенцов для выкармливания и дальнейшего содержания при разных фотопериодических условиях. Имеется небольшое количество данных по гнездованию (68 гнездовых карточек), данные по отловам птиц паутиными сетями и большой конусной ловушкой, результаты ежедневных учетов птиц на участке площадью 24 га в 1978–1983 гг. в период занятия территорий, на территории 36 га в 2002–2004 гг.; результаты маршрутных учетов птиц в долине Соби в 1977, 2002–2004 гг., результаты вскрытия птиц, погибших в сетях; материалы экспериментов по передержке взрослых и молодых юрков в неволе при разных фотопериодических условиях. При определении дат начала яйцекладки использовали сведения по гнездам, найденным в период откладывания яиц и по срокам вылупления первого птенца. Продолжительность насиживания определяли по гнездам, найденным с неполной кладкой, а продолжительность выкармливания по датам вылупления первого птенца и ухода из гнезда последнего слетка.

Описание состояния оперения проводили по методике Носкова и Рымкевич (1977), где приве-

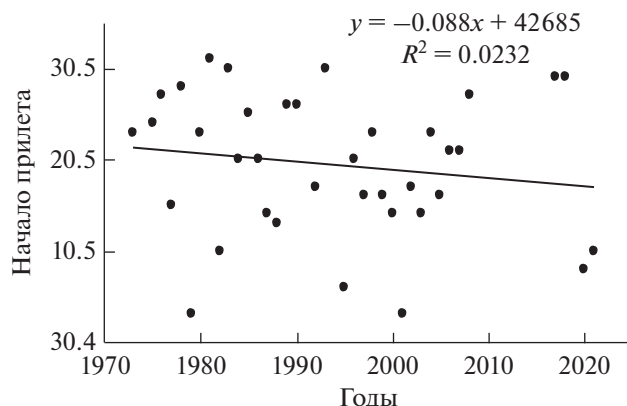


Рис. 1. Сроки начала прилета, линия тренда и ее уравнения.

дена полная схема расположения птерилий и их отделов. Анализ весьма растянутого процесса замены оперения требует его деления на ряд этапов — стадий (Блюменталь, Дольник, 1966). У юрка, при полной послебрачной линьке выделяются 11 стадий, при частичной постювенальной линьке — 7 стадий. Среднесезонные даты начала, окончания, длительности линьки в природе определяли по уравнениям регрессии (Pimm, 1976) программы Microsoft® Excel 2002.

Часть содержавшихся в летний период юрков (5 первогодков и 6 самцов старше года) осенью перевезли в лабораторию, где содержали птиц до следующего лета. У всех еженедельно определяли вес, жирность; 4 первогодка содержались в клетках с импульсными счетчиками прыжков и 2 — с регистраторами ночного беспокойства. Помещение лаборатории имело небольшие окна, поэтому в течение 10 ч в лаборатории горели электрические лампы. Когда в октябре длина дня за окном сократилась до 10С : 14Т и продолжала сокращаться дальше, фоторежим в клетках оставался без изменений до середины марта, т.е. до увеличения длины дня свыше 10 ч света.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Пространственное и биотопическое распределение.** В Западной Сибири юрок гнездится от южной границы таежной зоны до северной оконечности островных и пойменных лесов зоны лесотундры на  $67^\circ$ – $68.5^\circ$  с.ш. На полуострове Ямал наиболее северные точки гнездования — верховья рек Ядаяходаяха, Хадытаяха и левых притоков Щучьей (Данилов и др., 1984), по склону Полярного Урала вид проникает до верховьев р. Байдарата ( $68^\circ$  с.ш.). Здесь юрки населяют высокорослые ивняки и куртины ольхи. При этом они предпочитают те заросли, где растут отдельные деревья, а лесные участки на горных склонах были предпочтитель-

ней прибрежных лесов (Головатин, Пасхальный, 2005). Южнее юрки являются обычными обитателями лесов речных долин, где выбирают смешанные негустые древостои из ольхи, березы, ели. Лиственничные леса пользуются меньшим успехом, лиственничных редколесий юрки, видимо, избегают, т.к. в лиственничниках лесотундрового стационара Харп (окрестности г. Лабытнанги) в течение многих лет эпизодически гнездились не более одной пары (Данилов и др., 1984).

**Плотность гнездования** зависит от биотопа и в некоторых может быть высокой. Значительное количество сведений по плотности юрков в разных типах местообитаний Полярного Урала приводят Головатин и Пасхальный (2005): от  $1.4 \pm 0.4$  пары/км<sup>2</sup> в зарослях высокорослых кустарников до  $35.4 \pm 4.2$  пары/км<sup>2</sup> в лесах паркового типа,  $41.6 \pm 5.5$  пары/км<sup>2</sup> в лесах горных склонов, локально —  $52 \pm 14.4$ . В долине р. Собь на участке смешанного леса “137 км” в 1977 г. юрки гнездились с плотностью 51 пары/км<sup>2</sup>, у станции Красный камень (141 км) в 2002 и 2003 гг. было 16.3–33.3 пары/км<sup>2</sup> (Рыжановский, Пасхальный, 2007).

На Южном Ямале, в пойменном лесу р. Хадытаяха, в разные годы ( $n = 8$ ) юрки гнездились с плотностью 28.6–35.7, в среднем  $33.0 \pm 1.3$  пары/км<sup>2</sup> (Рябицев, 1993). В долине среднего течения р. Щучья в 1973 г. плотность гнездования была 10 и 20 пары/км<sup>2</sup> (Кучерук и др., 1975). На стационаре Октябрьский в 1978–1983 гг. регистрировали от 36.4 до 81.8 пары/км<sup>2</sup>, в 2002–2004 гг. 42.1–73.6 пары/км<sup>2</sup>, средняя плотность за 8-летний период —  $62.8 \pm 5.7$  пары/км<sup>2</sup>. На границе лесотундры и северной тайги, на территории стационара “Войкар”, средняя за 15 лет наблюдений плотность была  $22.6 \pm 3.0$  пары/км<sup>2</sup>, локально в пойменном лесу было до  $96.8 \pm 14.9$  пары/км<sup>2</sup> (Головатин, Пасхальный, 2005). В северной и средней тайге Обь-Енисейского междуречья плотность гнездования юрков обычно не выше, чем в лесотундре: 46–56 особей/км<sup>2</sup> (Вартапетов, 1998), и ниже, чем в северной тайге западного склона Приполярного Урала —  $60 \pm 5.8$  пары/км<sup>2</sup> (Шутов, 1990).

**Весенняя миграция.** На широте Полярного круга прилет всегда начинался в мае, между 3.05–29.05. Средняя дата прилета первых юрков в течение 38 лет — 19.05. Начинается прилет при продолжительности светового дня не менее 17 ч 40 мин (начало мая), но чаще при 20 и более часов света. По сведениям Пасхального (2002), юрок относится к видам, которые в 1986–2002 гг. стали появляться раньше, чем в предшествующие 15 лет (1970–1985 гг.). Сдвиг средней даты прибытия в район г. Лабытнанги составил 5 дней: 21.05 и 16.05 соответственно. Но в последние 5 лет наблюдений (2016–2021 гг.) прилет на территорию сада Аркти-

**Таблица 1.** Соотношение полов в сетях и ловушке в период прилета в разные годы

Пол	Год									
	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1986	1987	1988	1989
Самец	90	125	30	35	83	24	127	38	36	38
Самка	65	55	15	17	67	21	81	24	20	21

ческого стационара УрО РАН начинался между 8.05–29.05, в среднем 18.05 (Штро, личные сообщения). Таким образом, устойчивого смещения начала прилета на более ранние даты в связи с глобальным потеплением нет, тренд смещения с учетом последних дат не достоверен (рис. 1).

Появление первых юрков наблюдали за 1–3 дня до основного майского потепления, во время которого начинают прилет большинство видов воробьиных лесотундры. Среднесуточная температура воздуха в день встречи первой в сезон птицы колебалась от  $-3.2^{\circ}$  до  $10.3^{\circ}$  С, в среднем  $-2.4^{\circ}$ С ( $n = 34$ ). В период анализируемого временного ряда (1971–2020) наблюдается не достоверное повышение температуры воздуха в первый день прилета юрков).

Период пролета юрков на север по результатам отловов сетями (1977–1983 гг.) и ловушкой (1987–1989 гг.) продолжался 11–36, в среднем 21.6 сут. Поскольку птицы мигрировали лесной полосой, в нижней части которой в 1978–1982 гг. на постоянной позиции стояла линия сетей длиной 50–70 м, было рассчитано общее число юрков, которые должны быть пойманы 100-метровой линией за период прилета. Максимальное их число, 275 юрков, должны быть пойманы в 1978 г., в последующие 1979–1982 гг. должны попасть в сети 73, 50, 65, 67 птиц соответственно. Следует отметить, что весна 1978 г. отличалась поздним, дружным и массовым прилетом многих лесных и кустарниковых воробьиных: в пересчете на 100 м сетей весной поймано 4107 воробьиных птиц против 512–715 птиц в последующие годы. Юрки в 1978 г., возможно, были увлечены на север волной массовой миграции чечеток, на долю которых пришлось 69% численности потока. В последующие годы чечетки были малочисленны, количество пролетающих юрков снизилось и держалось на одном уровне.

Существенных отличий в сроках прилета самцов и самок нет. За 10-летний период отлова на стационаре Октябрьский самцы появлялись на 1–3 сут раньше самок в течение 4 лет, в 1981 г. первой поймана самка, в остальные годы первые самцы и самки пойманы одновременно. Только в 1983 г. в первой и второй декадах с начала прилета соотношение полов было практически равным, в другие годы доминировали самцы (табл. 1). Суммарно, за все годы в две первые декады прилета пойманы 615 самцов и 384 самки. Доля самцов по

пятинеднекам: 61.2, 63.5, 61.2, 56.6%, доля самцов по годам: 54.5–71.4, в среднем 64.2% ( $n = 10$ ).

У самцов юрков по контрасту в окраске больших верхних кроющих второстепенных маховых весной и летом можно отделить первогодков от птиц старше года. Из 304 осмотренных за все годы периода прилета самцов с зарегистрированным возрастом, первогодков было 179 (58.9%). На небольшое преобладание первогодков в период весеннего пролета юрков через Куршскую косу указывает Паевский (2008). Он же приводит сведения о доминировании юрков старших возрастных групп в первые пятинедельки миграции. В Нижнем Приобье в первые 10 дней со дня начала прилета из 113 птиц было 57 самцов старше годовалого возраста (51.4%); во вторую декаду из 70 птиц старше года было 28 (40%), что совпадает с данными Паевского (2008).

Среди отловленных весной юрков периодически встречались самки с наседными пятнами, причем регистрировались они уже в первые дни прилета, в конце мая – начале июня, когда самцы только занимали гнездовые участки (Рыжановский, 2008). Это были птицы на второй (фаза яйцекладки) и на четвертой (фаза кормления птенцов) стадиях. Доля таких птиц могла быть значительной. В частности в 1988 г. из 18 самок юрка наседные пятна имели 8 птиц, в 1989 – 6 из 15, в 1981 г. – 4 из 12, в 1983 г. – 2 из 28, в 1986 г. – 2 из 83. В 1978, 1980, 1982 и 1987 таких птиц мы не ловили. Как правило, птицы с наседными пятнами попадали в сети и ловушку в составе стаи, где соотношение полов было почти равным. Например, 10 июня 1981 г. сетью поймана стайка из 8 юрков: 4 самца и 4 самки с пятнами 4-й стадии. В 1989 г. на третий день с начала прилета поймана стайка юрков, включавшая 14 самцов 10 самок, из которых 6 самок также имели наседные пятна 4-й стадии.

Отмечено совпадение сезонов наличия и отсутствия наседных пятен у чечеток (*Acanthis flammea*) и юрков, что более реально при климатических воздействиях, охватывающих большие площади (Рыжановский, Рябицев, 2021). Можно, также предположить, что птицы на первой-второй стадиях предпринимали попытку гнездования в северной тайге и в южной лесотундре, а на 4-й стадии – в средней тайге. Возможно, у юрков при неудачной попытке гнездования пары не распадаются, но мигрируют на север дальше.

Первая волна прилетающих птиц, судя по упитанности, включает особей с развитым миграционным состоянием. В первую декаду прилета упитанность 21 птицы (8.7%) оценена баллом “много”; среднежирных было 33.4%; остальные отнесены к тощим и маложирным. Во второй декаде доля хорошо упитанных юрков снизилась до 2.7%; доля среднежирных не изменилась (35.2%), а в последующие дни лета очень жирных птиц мы больше не ловили; доля среднежирных птиц в разные декады лета колебалась между 0 и 10% (Рыжановский, 2004).

**Занятие территорий и образование пар.** Самцы занимали участки, начиная с первой волны прилета. В 1980 г. местное население участка сформировалось за 21 день, в 1981 г. — за 10 дней, в 1982 г. — за 20 дней. Во всех случаях рассматриваются самцы, занявшие участки и отмеченные на них неоднократно. Предполагается, что это одни и те же птицы. В отдельные годы, как показали опыты Рябицева (1993) на северный предел ареала, в пойму Хадытаяхи, юрки прилетали в избытке: после отстрела пары освободившаяся территория занималась повторно, иногда через несколько минут, но в другие годы освободившиеся территории не занимались. Территорию могут занимать пары птиц, сформированные на пролете, (Рябицев, 1993) или при первой попытке гнездования, как предполагалось выше.

Юрок относится к видам со слабой территориальной привязанностью. От 17 гнездившихся в долине Хадытаяхи птиц Рябицев (1993) не получил возвратов. На Приполярный Урал вернулся 5 взрослых юрков из 97 (Шутов, 1989). В Шведской Лапландии вернулся 1 взрослый из 262; из 434 птенцов не вернулся ни один (Lindström, 1987). В долину Соби не вернулись ни один из 149 взрослых и 34 молодых юрков, на стационаре Октябрьский в последующие, после мечения годы, не пойманы ни один из 1175 взрослых, 52 молодых, 35 меченых в гнездах.

**Гнездование.** Юрки прилетают с достаточно развитыми гонадами, у самцов хорошо развит клоакальный выступ. В первую пятидневку с начала прилета у самцов, отстрелянных или погибших в сетях ( $n = 7$ ), гонады имели вес 315–429 мг, в среднем  $382 \pm 16.5$  мг; во вторую пятидневку 270–460, в среднем  $351 \pm 26.0$  ( $n = 8$ ), в четвертую пятидневку семенник одного самца весил 470 мг. Клоакальные выступы максимальных размеров наблюдались у птиц, пойманных из стай в четвертую пятидневку (10 из 23), т.е. самцы, прилетающие в хвосте миграционного потока, к гнездованию готовы в максимальной степени. Юрок относится к видам, которые по прилете в Субарктику не нуждаются фотостимуляции полярным днем. Самцы из первой волны прилета, помещенные в условия короткого дня (14С : 10Т), начали линьку в те же

сроки, что и самцы, жившие при полярном дне в вольере, т.е. дополнительное пребывание в гнездовом районе для полового созревания этим птицам не нужно (Рыжановский, 2001).

Основной период начала яйцекладки в контрольных гнездах приходился на вторую половину июня и продолжался 8–20 сут, в среднем  $10.6 \pm 1.5$  ( $n = 8$ ), а сезон яйцекладки, от первого до последнего яйца, длился 15–25 сут, в среднем  $17.6 \pm 1.2$  ( $n = 8$ ). В 1978–1982 гг. яйцекладка начиналась через 9–26 сут, в среднем, через  $19.1 \pm 2.4$  сут ( $n = 6$ ) после устойчивого перехода среднесуточной температуры через  $0^\circ$ , при  $4.5$ – $22.8^\circ\text{C}$ , в среднем  $10.9 \pm 1.1^\circ\text{C}$  ( $n = 6$ ). От занятия самцом гнездового участка до появления в гнезде на участке первого яйца прошло 14 и 19 сут. Из 68 гнезд с полными кладками в 1 было 2 яйца, в 1 – 3 яйца, в 6 по 4 яйца, в 27 – по 5, в 28 – по 6, в 5 – по 7 яиц. Средняя величина кладки –  $5.39 \pm 0.12$ . Не достоверно больше кладка юрков в Карелии –  $5.59 \pm 0.19$  (Зимин, 1988).

Насиживает только самка. Судя по растянутости вылупления в некоторых гнездах, устойчивое насиживание может начаться после откладки второго–третьего яйца при кладке из 6 яиц, чаще – с предпоследнего яйца, но иногда (Рябицев, Шубенкин, 1980) с первого. От первого яйца до вылупления последнего птенца прошло 17–21 сут, в среднем  $18.5 \pm 0.4$  ( $n = 6$ ), от последнего яйца до первого птенца – 8–14 сут, в среднем  $11.0 \pm 0.7$  ( $n = 9$ ). Последний период является периодом собственно насиживания, фактически это период насиживания последнего яйца в условиях сформировавшегося ритма. Самцы кормят насиживающих самок, но последние способны высидеть и выкормить птенцов в одиночку. Самка, утратившая самца, насиживала кладку в течение 16 сут от последнего яйца, затем одна выкормила птенцов (Рябицев, Шубенкин, 1980; Рябицев и др.1980). Кладку с погибшими эмбрионами самка насиживала 20 сут, до прекращения наблюдений (Данилов и др., 1984).

Обычные сроки вылупления птенцов: первая–начало второй декады июля. Вылупление чаще растянуто на сутки ( $n = 9$ ), в одном гнезде оно растянулось на 3 сут, в другом – на 4 сут. Потревоженные птенцы выскакивали из гнезда на 9-й день, не умея летать, не потревоженные покидали гнезда через 10–12 сут, в среднем через  $11.5 \pm 0.4$  ( $n = 12$ ) после вылупления. К 12-суточному возрасту, слетки были в состоянии отлететь от гнезда, в зависимости от высоты его расположения, на 10–20 и более метров. Способность к активному полету приобретают к 18–20-суточному возрасту, выводки распадаются по достижению 25–30-суточного возраста слетков.

В гнездах, находившихся под наблюдением от начала яйцекладки до вылета птенцов, общая

Таблица 2. Схема линек юрка

Птерилии, отделы птерилий	Постювенальная линька стадии							Послебрачная линька стадии										
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Головная		□	■	■	■	□					□	□	■	■	■	■	■	■
Брюшная	□	■	■	■	■	■	■				□	■	■	■	■	■	■	■
Спинная	□	□	■	■	■	■	□				□	■	■	■	■	■	■	■
Плечевая	□	□	■	■	■	□					□	■	■	■	■	■	■	□
Бедренная		□	■	■	■	□				□	■	■	■	■	■	■	■	□
Голенная		□	■	■	■	□					□	■	■	■	■	■	■	□
Анальная		□	■	■	□							■	■	■	■	■	■	■
Рулевые										□	□	■	■	■	■	■	□	
В.К.Х.		□	■	■	■	□						■	■	■	■	■	■	□
Н.К.Х.			□	■	■	□				□	■	■	■	■	■	■	■	□
1-ст. Маховые							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
2-ст. Маховые													■	■	■	■	■	■
3-ст. Маховые												□	■	■	■	■	□	
Б.В.К.П.М.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
С.В.К.П.М.											□	□	■	■	□			
Б.В.К.В.М.			□	■	□						□	■	■	■	■	□		
С.В.К.В.М.			□	■	□						□	□	■	■	■	□	□	
М.В.К.В.М.		□	■	□									■	■	■	■	■	□
В.к. проп.	■	■	■	□									■	■	■	■		
К. К.															□	■		
М. Ал.															□	■	■	
К. Ал.		□	□	□										□	□	■		
В.К.К.	□	□	□										□	■	■	■		
Н.К.К.	□	□	□	□									□	■	■	■		
Б.Н.К.П.М.														■	■	■		
С.Н.К.П.М.														■	■	■		
Б.Н.К.В.М.																■	■	
С.Н.К.В.М.			□	■	□									■	■	■		
Н.К.Т.М.				□	□										■	■		
Аптерии		□	■	■									■	■	■	■		

Обозначения: ■ – перья отдела линяют у всех осмотренных птиц, □ – перья отдела линяют у части осмотренных птиц.  
 Полные названия отделов птерилий: В.К.Х. – верхние кроющие хвоста; Н.К.Х. – нижние кроющие хвоста; Б.В.К.П.М. – большие верхние кроющие первостепенных маховых; С.В.К.П.М. – средние верхние кроющие первостепенных маховых; Б.В.К.В.М. – большие верхние кроющие второстепенных маховых; С.В.К.В.М. – средние верхние кроющие второстепенных маховых; М.В.К.В.М. – малые верхние кроющие второстепенных маховых; В. К. проп. – верхние кроющие пропатагиальной складки; К.К. – карпальное кроющее; М. Ал. – маховые крылышка; К. Ал. – кроющие крылышка; В.К.К. – верхние кроющие кисти; Н.К.К. – нижние кроющие кисти; Б.Н.К.П.М. – большие нижние кроющие первостепенных маховых; С.Н.К.П.М. – средние нижние кроющие первостепенных маховых; Б.Н.К.В.М. – большие нижние кроющие второстепенных маховых; С.Н.К.В.М. – средние нижние кроющие второстепенных маховых; Н.К.Т.М. – нижние кроющие третьестепенных маховых.

**Таблица 3.** Возраст начала и длительность постювенальной линьки при разных фотопериодических условиях

Фотопериод	Возраст начала линьки, сут		Длительность линьки, сут	
	<i>N</i>	$\frac{Lim}{M \pm m}$	<i>N</i>	$\frac{Lim}{M \pm m}$
КФП 16С : 8Т сокращающийся на 6 мин/сутки до 12С:12Т	7	$\frac{20-26}{23.0 \pm 0.9}$	7	$\frac{40-48}{43.2 \pm 1.9}$
ЕФП 24С : 0Т до середины июля сокращающийся позднее	4	$\frac{22-27}{22.6 \pm 1.3}$	4	$\frac{44-60}{53.0 \pm 3.9}$
ДФП 24С : 0Т до конца августа, естественный позднее	7	$\frac{25-34}{28.6 \pm 1.3}$	7	$\frac{59-70}{65.8 \pm 1.8}$

Обозначения: КФП – короткодневный фотопериод, ЕФП – естественный фотопериод, ДФП – длиннодневный фотопериод.

длительность гнездового периода пары была: 27, 27, 29 сут. От откладки первого, в сезон яйца до вылета последнего в сезон птенца прошло 39–61 сут, в среднем  $47.4 \pm 4.2$  (5 сезонов наблюдений).

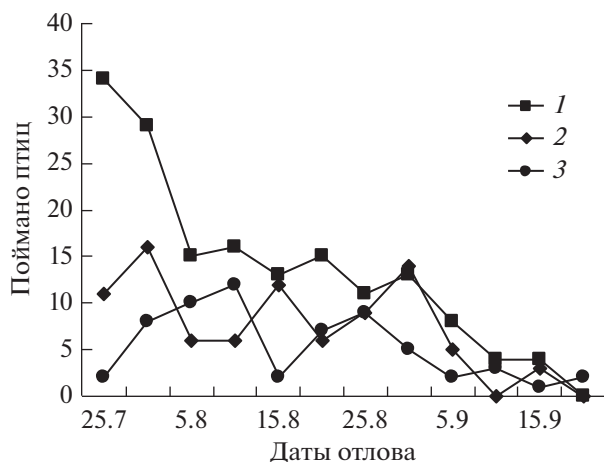
**Кочевки выводков.** Из 35 окольцованных в гнездах слетков юрков повторно, недалеко от гнезда, пойман один в возрасте 24 сут. В начале августа одной сетью были пойманы три птицы в возрасте 20–23 сут, явно из одного выводка. Через 17 сут две из них попались в сети недалеко от места первого отлова. Поскольку у мелких воробьиных к 30-суточному возрасту выводки обычно распадаются и покидают гнездовой район в процессе дисперсионного разлета, можно предположить, что у юрков часть особей в дисперсии не участвует. Но доля таких птиц незначительна, т.к. юрок – единственный вид из певчих нашего района, для которого в течение всех лет отлова было характерно преобладание во второй половине ле-

та взрослых особей (рис. 2). В долине Соби среди отловленных птиц доля взрослых составила 86%, на стационаре Октябрьский – 81.1%. Несомненно, большинство молодых юрков после распада выводков отлетают из лесотундры. Одновременно возрастает численность юрков в северной тайге Западной Сибири: от 53 особей/км<sup>2</sup> в первой половине лета (среднее по ландшафту) до 687 особей/км<sup>2</sup> во второй половине (Равкин, 1978). Поскольку местная популяция такой прирост обеспечить не может, есть основание считать, что здесь преобладают юрки более северного происхождения (Рогачева и др., 1983); в нисейской лесотундре также отмечали быструю откочевку выводков в южном направлении.

Но небольшая часть молодых юрков остается в зоне лесотундры, а возможно, и в районе вылупления, почти до начала миграции. За 5 лет отлова (1977–1981 гг.) в августе были окольцованы 52 особи, из которых 11 (21.1%) поймано повторно: семь птиц находились в контрольном районе от 1 до 6 сут и 4 птицы – 17–22 сут. Поведение этих юрков (не откочевавших из гнездового района) было типичным для северных воробьиных: сначала кратковременный дисперсионный разлет, затем длительная остановка на постювенальную линьку (Рыжановский, 1997).

Взрослые птицы, судя по повторным отловам, после распада выводков остаются в районе гнездовой территории до начала отлета. В частности, на стационаре Октябрьский в 1978 г. в августе–сентябре пойманы 10 птиц (7 самцов, 3 самки) из 108 (71 самец, 37 самок), окольцованных на площадке отлова месяцем раньше, в гнездовое время.

**Линька.** В годовом цикле юрков одна линька, протекающая в гнездовом районе: постювенальная у молодых и послебрачная у взрослых. Постювенальная линька частичная, охватывает контурное оперение, большую часть кроющих крыла, пуховые



**Рис. 2.** Количество самцов (1), самок (2), молодых (3) юрков, пойманных сетями и ловушками на стационарах Соби и Октябрьский за 5-дневку в конце лета–осенью в 1976–1982 гг.

перья на аптериях, делится на 7 этапов-стадий. У всех пойманных на средних стадиях линьки юрков ( $n = 20$ ) и выкормленных в неволе при естественном освещении ( $n = 4$ ) на крыле зарегистрирована линька части (проксимальных) больших, всех средних и малых верхних кроющих второстепенных маховых, верхних и нижних кроющих пропатагиальной складки, кисти, средние нижних кроющих второстепенных маховых; большинство птиц заменяли средние верхние кроющие первостепенных маховых и нижние кроющие третьестепенных маховых (табл. 2). Для юрков Кольского полуострова Гагинская (1990) указывает линьку средних верхних кроющих первостепенных маховых, не обнаруженную нами у птиц, пойманных в природе и у вольерных птиц. Возможно, полнота постювенальной линьки юрков в западной части ареала больше, чем в восточной.

Полнота линьки юрков ( $n = 7$ ), выкормленных и передержанных до начала сентября в лаборатории стационара Октябрьский при фотопериоде 24С : 0Т была не больше, чем в природе. Юрки ( $n = 7$ ), выкормленные при 16С : 8Т и передержанные при сокращающемся дне (на 30 мин за 5 дней) полноту линьки несколько сократили: заменили только 17–20-е большие верхние кроющие второстепенных маховых против 12–20-го при длинном дне.

В Ленинградской области юрки из ранних выводов начинали линьку в возрасте 30–35 сут, на Кольском полуострове – в 20–25 сут (Гагинская, 1990). Юрки из Нижнего Приобья, выкормленные в разных фотопериодических условиях, начинали ее в разном возрасте (табл. 3). Отличия достоверны между птицами групп короткодневного и длиннодневного фотопериодов, т.е. возраст начала линьки у юрков зависит от длины дня (контролируется фотопериодом). Но возрастной интервал, в пределах которого начинается линька (14 дней), невелик по сравнению, например, с зябликом (*Fringilla coelebs*) (30 дней) или чечеткой (42 дня) (Носков, 1975, Носков, Смирнов, 1986; Рыжановский, Рябицев, 2021).

В связи со значительной полнотой линьки юрки в неволе линяли достаточно долго, не менее 40 сут при коротком дне, до 70 сут при длинном дне (табл. 3). При фотопериоде 24С : 0Т (до конца августа, естественный позднее) линька длилась достоверно дольше чем при 16С : 8Т (сокращающийся).

В 1977–1982 гг. не начавших линьку молодых птиц отлавливали между 26 июля–22 августа ( $n = 5$ ), в 2018 г. – 26–28 июля ( $n = 4$ ). В 1977–1982 гг. мы поймали 20 линяющих юрков между 1 августа–7 сентября на 1–4-й стадиях линьки, одна особь поймана 20 сентября на 5-й стадии. Юрков, заканчивающих и тем более закончивших линьку мы не ловили. Из лесотундры молодые юрки отлета-

ют в южном направлении до окончания линьки. Уравнение регрессии (Pimm, 1976), составленное по средним датам линьки, дает следующие результаты: начало – 9 августа, конец – 28 сентября, длительность – 51 сут, что совпадает с ходом линьки клеточных юрков при естественном дне. Сезон постювенальной линьки (сроки встречи молодых линяющих птиц) у юрков Нижнего Приобья продолжается около полутора месяцев, период линьки популяции северных птиц растянут на 2.5–3 мес. и совмещается с периодом миграции.

Послебрачная линька полная. Общая последовательность смены оперения приведена в табл. 2 и не отличается от таковой птиц Ленинградской области (Гагинская, 1990). Часть юрков, возможно значительная, совмещает линьку с размножением. От гнезд с 10–12-дневными птенцами пойманы два самца и три самки. Не приступил к смене оперения один самец, остальные птицы находились на 2-й стадии линьки. Начинающие линьку юрки, на 1–2-й стадиях отлавливались редко. Основная масса пойманных линяющих юрков находилась на 4–7-й и на 10–11-й стадиях. Способность к полету птицы никогда не теряют, но на 8–9-й стадиях, когда растут маховые вершины крыла и большинство второстепенных маховых, летные качества, несомненно, снижаются, поэтому птицы реже ловятся.

Сезон послебрачной линьки начинается в первой декаде июля, в ранневесенние годы, возможно, даже в конце июня (Рымкевич, Рыжановский, 1987) и заканчивается во второй декаде сентября. Юрков в старом оперении отлавливали до 28 июля 1977–4 августа 2018 гг. Первые линяющие птицы пойманы 17–28 июля ( $n = 4$ ), но все они имели продвинутую линьку (4–6 стадии), т.е. началась она на 5–15 дней раньше. Средняя вычисленная дата (Pimm, 1976) окончания линьки самцов – 7 сентября, самок – 11 сентября, средняя длительность линьки самцов – 63 сут, самок – 58 сут. Судя по этим данным, самки начинают линьку все же несколько позднее самцов, что не выявилось при отловах у гнезд; несколько позднее ее заканчивают, идет она более высокими темпами. Последнее связано с реакцией на сокращающийся день августа. Гагинская (1990) показала, что на Кольском полуострове юрки, начинающие линьку рано, заменяли оперение за 70–75 сут; поздно линяющие – за 55–60 сут.

Период вступления в послебрачную линьку на северном пределе ареала, на широте Полярного круга, растянут почти на месяц. На средних стадиях линьки птицы ловились такое же время. В частности, в 1978 г. на 7-й стадии самцы ловились в течении 25 дней, самки – в течении 31 дня. Самцы, содержащиеся с весны в вольере при естественном фотопериоде ( $n = 7$ ), т.е. не участвующие



в гнездовании, начали линьку в период с 25 июня по 20 июля, в среднем 10 июля; закончили линьку в первой половине сентября через 60–66 сут, в среднем через  $63.4 \pm 0.8$  сут. В данном случае сроки почти полностью совпали со сроками и темпами линьки самцов, участвующих в размножении.

**Осенняя миграция.** Отлет начинался в середине августа, продолжался свыше месяца, до третьей декады сентября. Даты последних отловов и встреч юрков на маршрутах на Полярном Урале и в пойме Нижней Оби – 16–21 сентября. Взрослые птицы, которых можно считать “местными”, (окольцованы в июне–июле) перестали отлавливаться повторно, т.е. включились в миграцию, между 16 августа–17 сентября. В этот же период на участке возрастало число не меченных юрков, заканчивающих линьку и в новом наряде. Предположительно, они гнездились севернее нашего района, т.е. являлись пролетными. Возможно, первые этапы миграции совершаются бросками с продолжительными остановками. В частности, в 1978 г. на участке в период с 29 августа по 2 сентября окольцованы 8 птиц на 10–11-й стадиях линьки, все они пойманы повторно через 2–16 дней, некоторые в новом оперении. Связанных с полом различий в сроках отлета, вероятно, нет, самки ловились до конца миграции. Молодые юрки, как уже говорилось выше, из лесотундры в массе уходят в первой половине августа. Оставшиеся отлетают одновременно с взрослыми птицами. В отличие от весенней миграции, когда юрки летят стаями, одновидовыми или совместно с чечетками, осенью стаи юрков очень редки, преобладают небольшие группы.

Осеннее миграционное состояние размножавшихся птиц начинает формироваться поздно. Для определения сроков появления южного направления активности в конусные клетки (Emlen, Emlen, 1966) помещали взрослых птиц, пойманных в третьей декаде августа ( $n = 12$ ) и в первой декаде сентября ( $n = 10$ ). В августе отмечено небольшое преобладание беспокойства в восточном и западном направлениях, в сентябре юрки начинают выбирать южное направление активности (Рыжановский, 2010). Жировые накопления у взрослых птиц также образуются весьма поздно. Из 28 юрков, пойманных в третьей декаде августа запасы жира, оцениваемые как “средние”, имела одна особь; в первой декаде сентября все 24 птицы были тощими или маложирными, во второй декаде сентября средние запасы жира имели 3 птицы (16.6%) из 18 осмотренных.

У молодых юрков, вероятно, существует два периода проявления южного направления активности: 1 – кратковременный у большинства птиц, на начальных этапах послегнездовых кочевок, во время которых основная часть лесотундровых юрков переселяется в тайгу, 2 – длительный у

всех, с началом формирования миграционного состояния. Интересно также, что во второй декаде августа, в период откочевки в тайгу, среди 12 пойманных юрков 3 имели средние запасы жира, т.е. сформировался еще один компонент миграционного состояния, но, вероятно, также кратковременный, до развития интенсивной линьки.

Юрки из нашего района летят на юг Западной Европы, о чем свидетельствуют данные кольцевания. В 1979 г. в середине июля на стационаре Октябрьский был пойман самец с югославским кольцом. Сведения о конкретном месте мечения не получены. Самка юрка, окольцованная 12.8.1980 на стационаре Октябрьский поймана 5.11.1980 в Италии:  $45^{\circ}45' N$ ,  $12^{\circ}35' E$ . Поскольку раньше начала сентября из нашего района она отлететь не должна, т.к. в день мечения находилась на 4-й стадии линьки, на весь миграционный путь птица потратила менее 2-х мес.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В Западной Сибири северная граница ареала юрка совпадает с северной границей пойменных лесов; лиственных, ивовых, ольховых лесков в котловинах озер и горных долинах. Плотность гнездования остается высокой, локально 50–100 пар/км<sup>2</sup>, вплоть до границы почти сплошного распространения прибрежных лесов и участков пойменных редколесий вдоль 67-й параллели. Местообитания, пригодные для гнездования юрков, имеются и севернее, например лесной остров значительных размеров в долине Ядаяходаяхи, но в 80-х годах эти птицы там гнездились нерегулярно и с низкой плотностью. Вероятно, непосредственно биотопические условия продвижения вида на север не ограничивают.

Данилов (1966) при анализе факторов, определяющих северные границы распространения птиц в Субарктике, пришел к выводу о решающем значении фенологических условий, т.е. летняя часть годового цикла вида должна вписываться в определенный лимит температур и сезонных явлений природы. Юрки прилетают в северную часть ареала при дневных положительных температурах (близких к 0°C), с началом активного таяния снега в лесу, и отлетают с началом фенологической осени при положительных, иногда весьма высоких, температурах. Отлет последних особей заканчивается после опадения листвы, но до первого снегопада. Общая продолжительность пребывания юрков в Нижнем Приобье, от регистрации первой весенней птицы до регистрации последней птицы в 80-е годы: 102–137 сут, в среднем 112.2 ( $n = 4$ ) сут, а средняя продолжительность безморозного периода на широте г. Салехарда – 94 сут. Юрки при сопоставлении средних дат начала массового прилета (третья декада мая) и завершения массового отлета (первая декада сентября) в

целом вписываются в безморозный период лесотундры. С учетом длительности безморозного периода на широте пос. Тамбей (Северный Ямал, 71° с.ш.) – 51 сут (Орлова, 1962), его сокращение составляет 7.8 сут/1° географической широты и в долине р. Ядаяходаяхи этот период длится около 85 сут. Отличия от широты Полярного круга кажутся незначительными, но в безморозный период вид уже не вписывается. Потепление последних десятилетий должно привести к более раннему началу прилета юрков в лесотундру, что и наблюдается в некоторые годы, но средние за 5 лет даты не изменились.

С другой стороны, прилетая в лесотундру с созревшими гонадами, птицы утрачивают стимулы к миграции и не должны стремиться расширить ареал за счет локальных редколесий в тундровой зоне. Фотопериодические условия южной тундры (полярный день на протяжении 1.5–2-х мес.) дальнейшее продвижение на север не стимулируют. Для начала гнездостроения и откладывания яиц юркам достаточно светового режима таежной зоны.

По моему мнению, у юрков нет адаптаций к условиям Субарктики. Это средне- и северо-таежный вид осваивающий лесотундру по мере ее потепления и загущения редколесий.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает глубокую признательность директору Арктического стационара УрО РАН В.Г. Штро за любезно предоставленные сведения о датах начала прилета юрков в окрестности г. Лабитнанги.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- Блюменталь Т.И., Дольник В.Р. Географические и внутрипопуляционные различия в сроках размножения, линьки и миграции у некоторых перелетных воробьиных птиц // Тр. Всесоюз. совещ. по внутривидовой изменчивости наземных позвоночных и микроэволюции. Свердловск: 1966. С. 319–332.
- Вартапетов Л.Г. Птицы северной тайги Западно-Сибирской равнины. Новосибирск: Наука, 1998. 327 с.
- Гагинская А.Р. Юрок – *Fringilla montifringilla* L. // Линька воробьиных птиц Северо-Запада СССР. Л.: ЛГУ, 1990. С. 208–212.
- Головатин М.Г., Пасхальный С.П. Птицы Полярного Урала. Екатеринбург: Изд-во Уральск. ун-та, 2005. 564 с.
- Данилов Н.Н. Пути приспособлений наземных позвоночных животных к условиям существования в Субарктике. Т. 2. Птицы. Свердловск: 1966. 140 с.
- Данилов Н.Н., Рыжановский В.Н., Рябицев В.К. Птицы Ямала. М.: Наука, 1984. 332 с.
- Зимин В.Б. Экология воробьиных птиц Северо-Запада СССР. Л.: Наука, 1988. 184 с.
- Кучерук В.В., Ковалевский Ю.В., Сурбанос А.Г. Изменение фауны птиц Южного Ямала за последние 100 лет // Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биологии. 1975. Т. 80. № 1. С. 52–64.
- Носков Г.А. Линька зяблика (*Fringilla coelebs*) // Зоол. журн. 1975. Т. 54. № 3. С. 413–425.
- Носков Г.А., Рымкевич Т.А. Методика изучения внутривидовой изменчивости у птиц // Методика исследования продуктивности и структуры видов в пределах их ареалов. Вильнюс: Моклас, 1977. Т. 1. С. 37–48.
- Носков Г.А., Смирнов Е.Н. Некоторые особенности фотопериодического контроля сроков и полноты постювенальной линьки обыкновенной чечетки // Актуальные проблемы орнитологии. М.: 1986. С. 69–75.
- Орлова В.В. Климат СССР. Вып. 4. Западная Сибирь // Л., Гидрометеиздат, 1962. 359 с.
- Паевский В.А. Демографическая структура и популяционная динамика певчих птиц. СПб.: М.: КМК, 2008. 235 с.
- Пасхальный С.П. Сроки прилета некоторых видов птиц в низовья Оби в 1970–2002 гг. // Многолетняя динамика численности птиц и млекопитающих в связи с глобальным изменением климата. Материалы международного симпозиума. Казань: “Новое знание” 2002. С. 151–156.
- Равкин Ю.С. Птицы лесной зоны Приобья. Новосибирск: Наука, 1978. 287 с.
- Рогачева Э.В., Равкин Е.С., Сыроечковский Е.Е., Кузнецова Е.А. Фауна и население птиц енисейской лесотундры // Животный мир енисейской лесотундры и природная зональность. М.: Наука, 1983. С. 14–47.
- Рыжановский В.Н. Экология послегнездового периода жизни воробьиных птиц Субарктики. Екатеринбург: Изд-во Урал ун-та, 1997. 288 с.
- Рыжановский В.Н. Гнездовой сезон как часть годового цикла воробьиных Субарктики // Гнездовая жизнь птиц. Пермь: Пермский гос. пед. ин-т, 2001. С. 3–22.
- Рыжановский В.Н. Масса тела и жировые резервы воробьиных птиц Нижнего Приобья // Рус. орнитол. журн. 2004. № 13. (271). С. 799–812.
- Рыжановский В.Н. О попытках гнездования некоторых видов вьюрковых на путях весенней миграции // Рус. орнитол. журн. 2008. № 17 (418). С. 731–733.
- Рыжановский В.Н. Формирование направления осенней миграции у некоторых воробьиных Нижнего Приобья // Рус. орнитол. журн. 2010. № 19 (564). С. 671–680.
- Рыжановский В.Н., Пасхальный С.П. Динамика населения птиц Нижнего Приобья в связи с потеплением климата // Научный вестник Ямало-Ненецкого автономного округа. Салехард: 2007. № 6 (50). Ч. 2. С. 58–74.
- Рыжановский В.Н., Рябицев В.К. Биология и экология чечетки (*Acanthis flammea sensu lato*, Passeriformes, Fringillidae) на Ямале и в Приобской лесотундре // Зоол. журн. 2021. Т. 100. № 2. С. 203–219.
- Рымкевич Т.А., Рыжановский В.Н. Линька птиц на Полярном Урале // Орнитология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. Т. 22. С. 84–95.
- Рябицев В.К. Территориальные отношения и динамика сообществ птиц в Субарктике. Екатеринбург: Наука, 1993. 296 с.

- Рябицев В.К., Шубенкин В.П. О длительности насиживания у юрка // Инф. мат-лы ИЭРиЖ. Свердловск. 1980. С. 80–81.
- Рябицев В.К., Головатин М.Г., Якимченко В.В. Территориальность воробьиных в условиях весеннего половодья и экспериментального изъятия самцов // Экологические аспекты поведения животных. Свердловск. 1980. С. 49–60.
- Шутов С.В. Территориальный консерватизм, дисперсия массовых видов воробьиных на Приполярном Урале и некоторые закономерности их широтных изменений // Экология. 1989. № 4. С. 69–74.
- Шутов С.В. Плотность гнездования массовых видов воробьиных (Passeriformes) на Приполярном Урале и некоторые закономерности ее пространственного изменения в поймах Южной Субарктики // Зоол. журн. 1990. Т. 69. № 5. С. 93–98.
- Emlen S.T., Emlen J.T. A technique for recording migratory orientation of captive birds // Auk. 1966. V. 83. P. 361–367.
- Lindström A. Breeding nomadism and site tenacity in the brambling, *Fringilla montifringilla* // Ornis. Fenn. 1987. V. 64. № 2. P. 50–56.
- Pimm S.L. Estimation of the duration of bird moult // Condor. 1976. V. 78. № 4. P. 550.

## Ecology of Brambling *Fringilla montifringilla* L. in the North of Western Siberia

V. N. Ryzhanovsky<sup>#, ##</sup>

*Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
8 Marta str., 202, Yekaterinburg, 620144 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: ryzhanovskiy@ya.ru*

<sup>##</sup>*e-mail: ryzhanovsky@ipae.uran.ru*

The features of the ecology of brambling at the northern limit of their range in the Priobskaya forest tundra are considered. The nesting density remains high, locally 50–100 pairs/km<sup>2</sup>, up to the boundary of the distribution of coastal forests and floodplain woodlands along the 67th parallel. Habitats suitable for nesting brambling are also available to the north, but birds are few in number. Biotopic conditions do not significantly limit the progress to the north. The brambling have no adaptations to Subarctic conditions. This is a medium- and north-taiga species that develops the forest tundra as it warms and thickens the woodlands.

*Keywords:* Forest tundra, brambling, habitat, ecology, reproduction, molt

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 576.895.133:595.133

СБРАСЫВАНИЕ ТОЛСТОГО СЛОЯ ГЛИКОКАЛИКСА  
У ЦИСТАКАНТОВ СКРЕБНЯ *Acanthocephalus tenuirostris*  
(ACHMEROV ET DOMBROWSKAJA – ACHMEROVA, 1941)

© 2023 г. Т. В. Давыденко\*, @, В. П. Никишин\*

\* Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук,  
Портовая улица, 18, Магадан, 685000 Россия

@E-mail: sasha17@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Проведено электронно-микроскопическое исследование покровов поздней акантеллы и цистаканта скребня *Acanthocephalus tenuirostris*, полученных в эксперименте. Для поздней акантеллы характерны двуслойная циста и признаки интенсивной секреции в поверхностной части тегумента. Для цистаканта характерны циста и толстый слой гликокаликса на поверхности тегумента, которые на всем своем протяжении вплотную прилегают друг к другу. В процессе препарирования некоторых цистакантов циста получила механическое повреждение; у этих цистакантов наблюдалось сбрасывание толстого слоя гликокаликса и связанной с ним цисты.

*Ключевые слова:* тегумент, гликокаликс, циста, скребень *Acanthocephalus tenuirostris*

DOI: 10.31857/S1026347023600103, EDN: EUUVQS

Акантоцефалы характеризуются ди- или трик-сенным циклом развития с включением обязательных промежуточного, окончательного и, у многих видов, необязательных одного или нескольких паратенических (резервуарных) хозяев. В организме промежуточного хозяина из проглоченного яйца выходит личинка-акантор, которая через несколько последовательных стадий акантеллы развивается в цистаканта — стадию, инвазионную для окончательного хозяина (Шульц, Гвоздев, 1970; Schmidt, 1985; и др.). В процессе развития акантелла претерпевает метаморфоз и окружается не клеточной цистой, формируемой паразитом (Nikishin, 1992); наличие цисты послужило основанием для введения термина “цистакант” (Шульц, Гвоздев, 1970). На поверхности поздней акантеллы в подавляющем большинстве случаев откладывается более или менее толстый слой гликокаликса, после чего паразит считается сформированным цистакантом (Никишин, 2018). Такой цистакант характеризуется полностью развитым хоботком, мышечной системой, другими внутренними органами, включая половые и, в сущности, представляет собой юную особь паразита.

Предполагается, что циста и гликокаликс обеспечивают защиту от негативной клеточной реакции хозяина (Никишин, 2018). Столь же мощный слой гликокаликса, также предположительно выполняющий защитную функцию, отме-

чен на поверхности некоторых скребней, инвазирующих паратенических хозяев (Skorobrekhova, Nikishin, 2011; Никишин, 2018). На примере скребней, паразитирующих в паратенических хозяевах, получены данные, свидетельствующие о сбрасывании гликокаликса, предположительно, по мере накопления антигенов, и его возможном последующем новообразовании (Скоробрехова, Никишин, 2023).

Проводя экспериментальные исследования органогенеза скребня *Acanthocephalus tenuirostris*, мы обнаружили явление сбрасывания гликокаликса у цистакантов. Ниже приводится описание этого феномена.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Скребень *Acanthocephalus tenuirostris* — широко распространенный паразит хариусов и многих других пресноводных рыб Дальнего Востока и Северо-Востока России, промежуточным хозяином которого является водяной ослик *Asellus hilgendorphi* (Атрашкевич и др., 2005). Осенью 2019 г. были проведены два эксперимента по моделированию жизненного цикла этого скребня. В каждом эксперименте подопытными были 40 водяных осликов, отловленных в р. Амутты (бассейн р. Буюнда правый приток р. Колыма). Самки скребня были извлечены из хариуса, отловленного

в р. Эльген (левом притоке р. Колыма). Заражение происходило путем бесконтрольного скармливания водяным осликам фрагментов самок скребня (по одной в каждом эксперименте) со зрелыми яйцами в течение суток. Через сутки водяные ослики были помещены в небольшие емкости с пресной водой и мхом рода *Calliergon*, которые содержались в термокамерах.

Первый эксперимент проходил при температуре 14–15°C. На 60-й день эксперимента при вскрытии четырех водяных осликов было получено 2 цистаканта и 18 акантелл разных размеров. Второй эксперимент проводился при температуре 20–22°C. На 60-й день эксперимента при вскрытии пяти водяных осликов было найдено 3 цистаканта и 15 акантелл разных размеров. На 65-й день было вскрыто 3 водяных ослика и найдены 1 цистакант и 9 акантелл разных размеров.

Полученные скребни были зафиксированы в 2% растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере, постфиксированы в 2% растворе тетраоксида осмия на 0.2 М фосфатном буфере, обезвожены в спиртах возрастающей концентрации (в процессе обезвоживания образцы контрастировали в 1% растворе уранилацетата на 70% спирте в течение 12 ч) и заключены в смесь Эпона и Аралдита.

Полутонкие и ультратонкие срезы были получены с помощью микротомов LKB-V (Швеция) и РТ-РС (США), соответственно. Полутонкие срезы окрашивали смесью метиленового синего и кристаллического фиолетового в соотношении 1 : 1 на 2.5% растворе бикарбоната натрия и исследовали с помощью светового микроскопа Olympus CX41 с использованием фотокамеры Olympus E-420. Ультратонкие срезы дополнительно контрастировали в 1% растворе уранилацетата на 70% спирте в течение 2 ч и исследовали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM1400PLUS и фотокамеры SIS Veleta. Полученные фотографии обрабатывали с помощью пакета программ CorelDRAW 18. Всего были исследованы 5 поздних акантелл и 6 цистакантов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поздние акантеллы окружены двуслойной цистой, толщиной 0.7 мкм (рис. 1а). Наружный слой цисты, толщиной 0.57 мкм, образован рыхло организованным материалом умеренной электронной плотности. В составе этого материала определяются аморфные скопления, везикулы, диаметром 33 нм, неясные структуры, напоминающие фрагменты микроворсинок, длиной 0.2 мкм и диаметром до 22 нм, и электронно-плотные гранулы. Внутренний слой цисты, толщиной 0.12 мкм, образован аморфным материалом высокой электронной

плотности, визуальным образом более плотно, чем наружный слой.

Поверхностная часть тегумента акантелл образована покровным комплексом без заметного слоя гликокаликса на его поверхности (рис. 1а). Покровный комплекс пронизан многочисленными инвагинатами наружной плазматической мембраны, открывающимися на его поверхности порами, диаметром 0.12 мкм. Инвагинаты расширены и их терминальные участки образуют везикулярный слой тегумента. Некоторые инвагинаты содержат небольшие скопления аморфного материала, сходного с материалом, образующим внутренний слой цисты, а также везикулы, по морфологии сходные с везикулами, обнаруженными в наружном слое цисты.

В толще тегумента наблюдаются светлые полости, достигающие в диаметре 2.2 мкм, с электронно-плотным содержимым неясной природы (рис. 1а). Похожие полости, но без плотного содержимого отмечаются вблизи слоя инвагинатов; в некоторых случаях полости и терминальные участки инвагинатов сливаются.

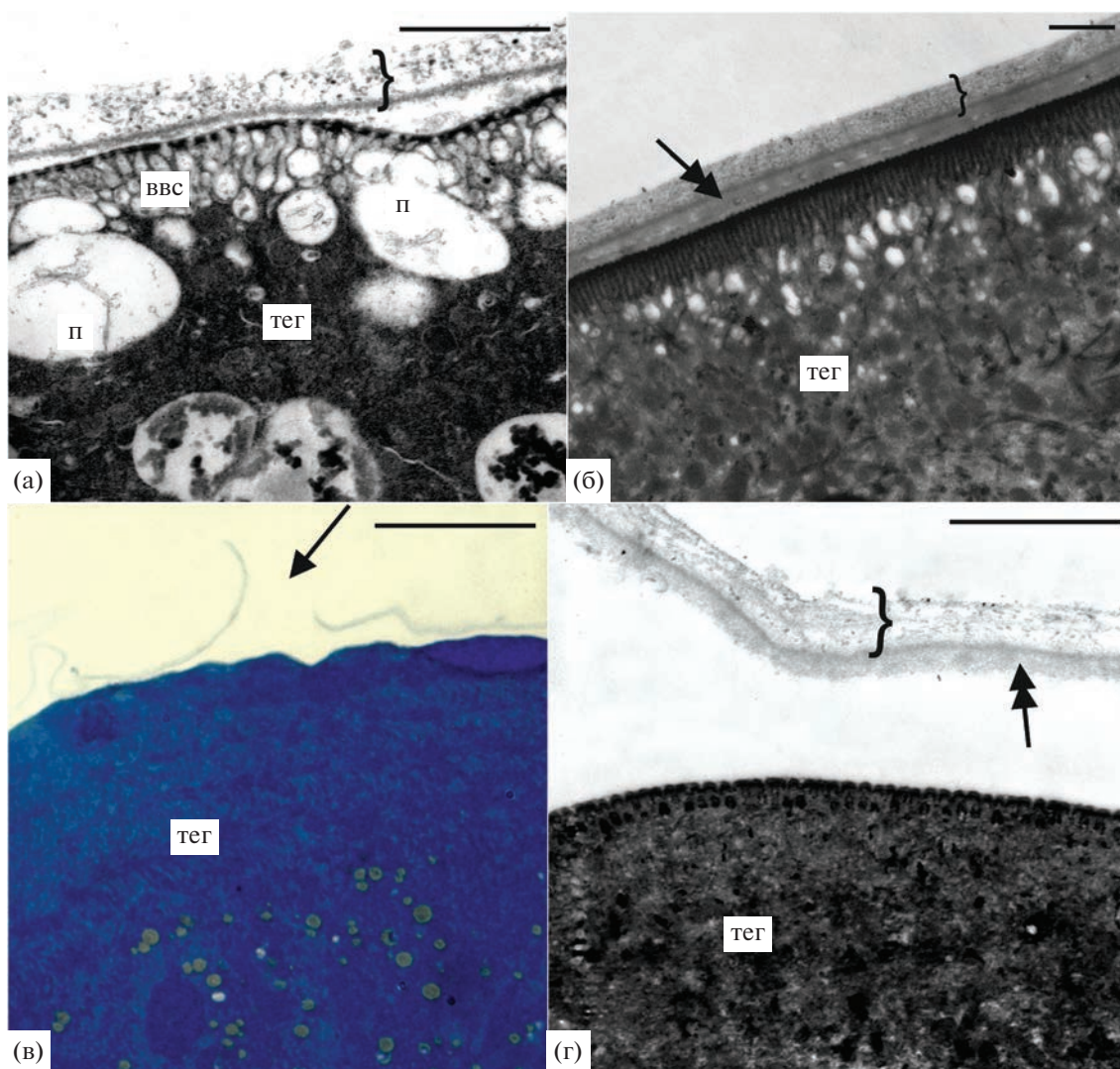
Поверхность трех исследованных цистакантов покрыта слоем гликокаликса, толщиной 0.3 мкм, образованным аморфным материалом умеренной электронной плотности, в котором наблюдаются мелкие светлые участки (рис. 1б). Вплотную к наружной поверхности гликокаликса примыкает двуслойная циста. В отличие от цисты, окружающей поздних акантелл, толщина цисты цистакантов не превышает 0.5 мкм, и составляющий ее материал организован заметно плотнее.

Инвагинаты наружной мембраны цистакантов приобретают форму ампул: на большем своем протяжении они сужены и придают радиальную исчерченность поперечно-полосатому слою тегумента, тогда как расширения их терминальных участков, образующих везикулярный слой тегумента, не превышают 0.32 мкм. Крупные светлые полости, содержащие электронно-плотный материал, описанные в тегументе поздних акантелл, в тегументе цистакантов не обнаружены.

У трех цистакантов целостность цисты была механически нарушена при препарировании гельминтов (рис. 1в, 1г). В этих случаях гликокаликс был отдален от тегумента на некоторое расстояние, но сохранял непрерывный контакт с цистой (рис. 1г). Другие изменения в строении тегумента этих цистакантов не обнаружены.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно существующим представлениям, циста, окружающая цистаканта, и толстый слой гликокаликса на его поверхности в числе прочих функций обеспечивают защиту паразита от негативного ответа промежуточного хозяина на инва-



**Рис. 1.** Поверхность тегумента. (а) – поздняя акантелла, (б–г) – цистаканты. ввс – выраженный везикулярный слой тегумента, п – светлые полости, тег – тегумент. Фигурной скобкой показана циста. Стрелкой с одинарным наконечником показан разрыв цисты, с двойным – толстый слой гликокаликса. Масштаб: а, г – 2 мкм; б – 1 мкм; в – 20 мкм.

зию (Lumsden, 1968; Никишин, 2004 и др.). При этом формирование цисты происходит в течение почти всего периода развития паразита в промежуточном хозяине вплоть до стадии цистаканта (Nikishin, 1992), тогда как образование гликокаликса представляет собой кратковременный процесс, который может рассматриваться как завершающий этап этого развития (Никишин, 2004). Такая очередность, вероятно, обусловлена тем, что обе структуры (и циста, и гликокаликс) формируются в результате секреторной деятельности тегумента, точнее, инвагинатов наружной цитоплазматической мембраны, образующих поперечно-полосатый слой тегумента (Никишин, 2004). Полученные результаты подтверждают этот вывод, и расширение инвагинатов у поздних акантелл может быть связано с их секреторной функцией. У ци-

стантов, уже сформировавших цисту и толстый слой гликокаликса, инвагинаты сужены, и поперечно-полосатый слой принимает “обычный” вид, характерный для взрослых скребней, инвазирующих окончательных хозяев.

Интерпретация крупных светлых полостей с содержимым высокой электронной плотности, обнаруженных в тегументе поздних акантелл, затруднительна. В имеющейся литературе аналогов этой находки не обнаружено. Создается впечатление, что эти полости мигрируют из глубины тегумента к поперечно-полосатому слою, в процессе миграции утрачивают содержимое и сливаются с расширенными инвагинатами наружной цитоплазматической мембраны. Косвенным аргументом в пользу этой версии является отсутствие подобных полостей в тегументе цистакантов, у которых циста



и гликокаликс сформированы полностью и секреторная активность тегумента снижена.

Необычной оказалась тесная связь толстого слоя гликокаликса и цисты у цистакантов. Предположение, что эта связь возникает вследствие значительного роста паразита, происходящего после формирования цисты, может быть поддержано только фактом “малого жизненного пространства” в полости тела водяного ослика в случаях высокой интенсивности инвазии; именно такие случаи наблюдались в эксперименте. Не исключая “механического” фактора, более привлекательной выглядит гипотеза о химическом сходстве материала гликокаликса и цисты, впервые высказанная на основании гистохимического изучения этих структур у метацеркарий трематод (Lumsden, 1968; Lumsden, 1975). В пользу этой гипотезы косвенно свидетельствует факт сохранения тесного контакта цисты и гликокаликса даже в случае отделения гликокаликса от тегумента.

Явление отделения гликокаликса от тегумента наблюдалось у ряда организмов, ведущих паразитический образ жизни. Биохимия этого процесса была описана у простейших (Zambrano-Vila *et al.*, 2002), шистосомул *Schistosoma mansoni* (Samuelson, Caulfield, 1982), в культуре эксцистированных церкарий *Fasciola hepatica* (Lammás, Duffus, 1983), церкарий *Trichobilharzia regenti* (Řimnáčová *et al.*, 2017) и в ряде других случаев. Биологический смысл этого явления заключается в уклонении от иммунного ответа хозяина (Zambrano-Vila *et al.*, 2002; Řimnáčová *et al.*, 2017 и др.) путем сбрасывания гликокаликса, подвергнувшегося или воздействию комплемента и антител (Samuelson, Caulfield, 1982; Da'dara, Krautz-Peterson, 2014 и др.) или инкубации при температуре 37°C (Lammás, Duffus, 1983). При этом в случаях трансформации церкарий в шистосомулы сбрасывание гликокаликса происходит вместе с наружной мембраной тегумента (Samuelson, Caulfield, 1982; Řimnáčová *et al.*, 2017). Однако морфология процесса утраты гликокаликса до недавнего времени не документировалась.

Электронно-микроскопически это явление впервые наблюдалось у скребня *Corynosoma strumosum*, инвазирующего обычных паратенических хозяев этого паразита: в экспериментальной инвазии толстошека Миддендорфа *Hadropareia middendorffii* на третьи сутки эксперимента и в естественной инвазии тихоокеанского белокорого палтуса *Hippoglossus stenolepis* (Скоробрехова, Никишин, 2023). В толстошеках на четырнадцатые сутки эксперимента все коринозомы были покрыты толстым слоем гликокаликса, что дало основания предположить его вторичное образование взамен утраченного, обогащенного результатами иммунного ответа хозяина. У коринозом в палтусе тегумент вместе с толстым слоем гликокаликса утрачивал и наружную мембрану, а на ее месте формирова-

лась новая мембрана (Скоробрехова, Никишин, 2023); подобный феномен ранее был продемонстрирован иммунологическими исследованиями трематод (Horak *et al.*, 1998).

В отличие от упомянутых случаев, касающихся скребней, паразитирующих в паратенических хозяевах, в настоящей работе впервые описаны случаи отделения гликокаликса от тегумента у цистакантов, паразитирующих в промежуточном хозяине. Второе отличие заключается в том, что у скребней в паратенических хозяевах отделение гликокаликса было вызвано, по всей видимости, естественными причинами, а в случаях с исследованными здесь цистакантами это явление могло быть спровоцировано нарушением целостности цисты.

Ранее мы предположили, что стратегия уклонения тканевых паразитов от иммунного ответа хозяина путем смены/обновления поверхностной части их организма носит общий характер (Скоробрехова, Никишин, 2023). Полученные здесь результаты не противоречат этому предположению, однако необходимы дальнейшие исследования распространения этого феномена среди других групп паразитических червей, например, цистицеркоидов цестод.

Исследования проведены в ходе выполнения государственного задания по теме: “Гельминты в биоценозах северо-восточной Азии: биоразнообразие, морфология и молекулярная филогенетика” (№ 1021060307693-0).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атрашкевич Г.И., Орловская О.М., Регель К.В., Михайлова Е.И., Поспехов В.В. Паразитические черви животных Тауйской губы // Биологическое разнообразие Тауйской губы Охотского моря. Отв. ред. Черешнев И.А. Владивосток: Дальнаука. 2005. С. 175–251.
- Никишин В.П. Цитоморфология скребней. М: ГЕОС, 2004. 234 с.
- Никишин В.П. Модификации гликокаликса скребней // Изв. РАН. Сер. биол. 2018. № 1. С. 42. <https://doi.org/10.7868/S000233291801006X>
- Скоробрехова Е.М., Никишин В.П. Феномен сбрасывания слоя гликокаликса у скребня *Corynosoma strumosum* (Rudolphi, 1802) Lühe, 1904 (Acanthocephala: Polymorphidae) в паратенических хозяевах в природе и эксперименте // Биология моря. 2023. Т. 49. № 1. С. 8–16.
- Шульц Р.С., Гвоздев Е.В. Основы общей гельминтологии. Том I. Морфология, систематика, филогения гельминтов. М.: Наука, 1970. 492 с.
- Da'dara A.A., Krautz-Peterson G. New insights into the reaction of *Schistosoma mansoni* cercaria to the human complement system // Parasitology Research. 2014. V. 113. P. 3685–3696. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4033-3>
- Horak P., Kovar L., Kolarova L., Nebesarova J. Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact //



- Parasitology. 1998. V. 116. P. 139–147.  
<https://doi.org/10.1017/s0031182097002059>
- Lammas D.A., Duffus W.P.H. The shedding of the outer glycocalyx of juvenile *Fasciola hepatica* // Veterinary Parasitol. 1983. V. 12. № 2. P. 165–178.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(83\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0304-4017(83)90005-5)
- Lumsden R.D. Ultrastructure of the metacercarial cyst of *Asocotyle chandleri* Lumsden, (1963) (Trematoda: Heterophyidae). Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 1968. V. 35. P. 212–219
- Lumsden R.D. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths // Exp. Parasitol. 1975. V. 37. № 2. P. 267.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4894\(75\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(75)90078-8)
- Nikishin V.P. Formation of the capsule around *Filicollis anatis* in its intermediate host // J. Parasitol. 1992. V. 78. № 1. P. 127.
- Řimnáčová J., Mikeš L., Turjanicová L., Bulantová J. Changes in surface glycosylation and glycocalyx shedding in *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) during the transformation of cercaria to schistosomulum // PLoS ONE 12 (3): e0173217. 2017.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173217>
- Samuelson J.C., Caulfield J.P. Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the schistosomula of *Schistosoma mansoni* // J. Cell Biol. 1982. V. 94. № 2. P. 363–369.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.94.2.363>
- Schmidt G.D. Development and life cycles. In: Biology of the Acanthocephala. Edited by D.W.T. Crompton, B.B. Nickol. Cambridge University Press. 1985. P. 273–305.
- Skorobrechova E.M., Nikishin V.P. Structure of capsule surrounding acanthocephalans *Corynosoma strumosum* in paratenic hosts of three species // Parasitology Research. 2011. V. 108. P. 467–475.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-010-2088-3>
- Zambrano-Vila S., Rosales-Borjas D., Carrero J.C., Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response // Trends in Parasitol. V. 18. № 6. P. 272–278.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02289-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02289-4)

## Shedding of a Thick Layer of Glycocalyx in Cystacanth of the Acanthocephalan *Acanthocephalus tenuirostris* (Achmerov et Dombrowskaja – Achmerova, 1941)

T. V. Davydenko<sup>1, #</sup> and V. P. Nikishin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biological Problems of the North, Portovaya str., 18, Magadan, 685000 Russia

<sup>#</sup>e-mail: sasha17@mail.ru

An electron microscopic study of the teguments of the late acanthella and the cystacanth acanthocephalan *Acanthocephalus tenuirostris* obtained in the experiment was carried out. The late acanthella is characterized by a bilayer cyst and signs of intense secretion in the surface part of the tegument. A cystacanth is characterized by a cyst and a thick layer of glycocalyx on the surface of the tegument, which are closely adjacent to each other along their entire length. During the preparation of some cystacanths, the cyst received mechanical damage; in these cystacanths, shedding of a thick layer of glycocalyx and associated cyst was observed.

**Keywords:** tegument, glycocalyx, cyst, acanthocephalan *Acanthocephalus tenuirostris*