

ISSN 1026-3470

Номер 1

Январь - Февраль 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 1, 2023

---

---

## БИОХИМИЯ

Тиреоидные и половые стероидные гормоны у неполовозрелой и раносозревающей кумжи *Salmo trutta*

*Е. В. Ганжа, Е. Д. Павлов, М. А. Ручьев, Д. С. Павлов* 3

---

## ГЕНЕТИКА

Генетическая дивергенция близкородственных видов *Oxytropis strobilacea*, *Oxytropis adamsiana*, *Oxytropis vassilczenkoi* ряда *Strobilacei* секции *Orobia* (Fabaceae) Азиатской России

*А. Б. Холина, Е. В. Артюкова, В. В. Якубов, М. Г. Хорева, О. А. Мочалова, Д. В. Санданов, И. Ю. Селютина* 11

---

## МИКРОБИОЛОГИЯ

Анализ геномов двух бактериобионтов лишайников, *Lichenibacterium ramalinae* и *Lichenibacterium minor*: факторы вирулентности и адаптации

*Т. А. Панкратов* 22

---

## БОТАНИКА

Развитие и архитектура корневища *Nepeta transiliensis* (Lamiaceae)

*В. А. Черемушкина, А. Ю. Асташенков, Е. К. Комаревцева, А. А. Гусева* 32

---

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Регуляция активности декарбоксилирующих малатдегидрогеназ в листьях кукурузы при адаптивной реакции на солевой стресс

*А. Т. Епринцев, М. О. Гатауллина* 43

---

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Влияние пробиотика “Субтилис-С” на содержание лактоферрина в крови и эпидермальном секрете кормящих дискуссов

*Г. И. Пронина, О. В. Саная, А. О. Ревякин* 52

Перспективы использования биолюминесцентного ферментативного анализа для выявления физической нагрузки спортивных лошадей

*Л. В. Степанова, О. В. Колесник, О. А. Коленчукова, А. С. Федотова, А. В. Коломейцев, А. В. Макаров, В. А. Кратасюк* 58

---

## ЭКОЛОГИЯ

Репродуктивный успех *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó на северном пределе ареала

*И. А. Кириллова, Д. В. Кириллов* 68

Лесные биогеоценозы в ареале бурых лесных почв Западного Кавказа

*Т. С. Улигова, Н. Л. Цепкова, И. Б. Рапопорт, О. Н. Горобцова, Ф. В. Гедгафова, Р. Х. Темботов* 80

Изменение профиля полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов и дибензофуранов в процессе биоаккумуляции в яйцах кур на свободном выгуле

*А. Д. Кудрявцева, А. А. Шелепчиков, Е. Я. Мир-Кадырова, Е. С. Бродский* 93

Пространственно-временная синхронность динамики численности красной полевки (*Myodes rutilus* Pall.) на европейском севере России

*А. В. Бобрецов, А. А. Калинин, Л. Я. Сабурова, А. В. Сивков* 103

---

---

# Contents

---

---

No. 1, 2023

---

---

## Biochemistry

- Thyroid and Sex Steroid Hormones of Immature and Precocious Brown Trout *Salmo trutta*  
*E. V. Ganzha, E. D. Pavlov, M. A. Ruchiev, and D. S. Pavlov* 3
- 

## Genetics

- Genetic Divergence of Closely Related Species *Oxytropis strobilacea*, *Oxytropis adamsiana* and *Oxytropis vassilczenkoi* (Series *Strobilacei* Section *Orobia* Family Fabaceae) from Asian Russia  
*A. B. Kholina, E. V. Artyukova, V. V. Yakubov, M. G. Khoreva, O. A. Mochalova, D. V. Sandanov, and I. Yu. Selyutina* 11
- 

## Microbiology

- Genome Analysis of Two Lichen Bacteriobionts, *Lichenibacterium ramalinae* and *Lichenibacterium minor*: Factors of Virulence and Adaptation  
*T. A. Pankratov* 22
- 

## Botany

- Development and Architecture of the *Nepeta transiliensis* (Lamiaceae) Rhizome  
*V. A. Cheryomushkina, A. Yu. Astashenkov, E. K. Komarevtseva, and A. A. Guseva* 32
- 

## Plant Physiology

- Regulation of the Activity of Decarboxylating Malate Dehydrogenases in Corn Leaves during an Adaptive Response to Salt Stress  
*A. T. Epintsev and M. O. Gataullina* 43
- 

## Animal and Human Physiology

- The Effect of the Probiotic “Subtilis-C” on the Lactoferrin Content in the Blood and Epidermal Secretions of “Feeding” Discus Fish  
*G. I. Pronina, O. V. Sanaya, and A. O. Revyakin* 52
- The Prospects for Using Bioluminescent Enzymatic Analysis to Reveal the Exercise Capacity of Sports Horses  
*L. V. Stepanova, O. V. Kolesnik, O. A. Kolenchukova, A. S. Fedotova, A. V. Kolomeytsev, A. V. Makarov, and V. A. Kratasyuk* 58
- 

## Ecology

- Reproductive Success of *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó at the Northern Border of Its Distribution Range  
*I. A. Kirillova, D. V. Kirillov* 68
- Forest Biogeocoenoses in the Area of Brown Forest Soils of the Western Caucasus  
*T. S. Uligova, N. L. Tsepikova, I. B. Rapoport, O. N. Gorobitsova, F. V. Gedgafova, and R. Kh. Tembotov* 80
- Transformation of the Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxin and Dibenzofuran Congener Profile during Bioaccumulation in Free-Range Chicken Eggs  
*A. D. Kudryavtseva, A. A. Shelepchikov, E. Ya. Mir-Kadyrova, and E. S. Brodsky* 93
- Spatially Temporal Synchrony of the Population Dynamics of the Northern Red-Backed Vole (*Myodes rutilus* Pall.) in Northern European Russia  
*A. V. Bobretsov, A. A. Kalinin, L. Ya. Saburova, and A. V. Sivkov* 103
- 
-

УДК 597.574.32

## ТИРЕОИДНЫЕ И ПОЛОВЫЕ СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ У НЕПОЛОВОЗРЕЛОЙ И РАНОСОЗРЕВАЮЩЕЙ КУМЖИ *Salmo trutta*

© 2023 г. Е. В. Ганжа<sup>\*, @</sup>, Е. Д. Павлов<sup>\*</sup>, М. А. Ручьёв<sup>\*, \*\*</sup>, Д. С. Павлов<sup>\*</sup>

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

<sup>\*\*</sup>Карельский научный центр РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

<sup>@</sup>E-mail: evganzha@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принята к публикации 08.07.2022 г.

Определено содержание тиреоидных и половых стероидных гормонов в крови у неполовозрелой и половозрелой кумжи *Salmo trutta* на завершающем этапе формирования раносозревающих особей (возраст 1+, 2+) в популяции. В р. Алатсоя (Карелия) период формирования раносозревающих самцов в разные годы различается, рыбы могут достигать половой зрелости в возрасте 1+ или в 2+. Неполовозрелая и половозрелая кумжа в возрасте 1+ и 2+ не различается по содержанию свободного и общего трийодтиронина и свободного тироксина. Неполовозрелые самки и самцы в возрасте 1+ и 2+ также не различаются по уровню половых стероидных гормонов. В отличие от неполовозрелой кумжи раносозревающие самцы в возрасте 2+ характеризуются повышенным содержанием тестостерона и пониженным уровнем эстрадиола-17β в крови. Установлено, что завершающий этап формирования раносозревающих особей в популяции характеризуется слабым вовлечением щитовидной железы в процесс созревания самцов и значительным снижением (в 4 раза) скорости превращения тестостерона в эстрадиол-17β в их крови. Указанное превращение у всех исследованных самок и самцов кумжи связано с их длиной тела — скорость образования эстрадиола-17β у рыб повышается по мере увеличения длины тела.

**Ключевые слова:** кумжа *Salmo trutta*, тиреоидные гормоны, половые стероидные гормоны, половое созревание, раносозревающие рыбы, жизненная стратегия

**DOI:** 10.31857/S1026347023010055, **EDN:** IKREAO

Различия в сроках достижения половой зрелости рыб определяются комплексом экзогенных факторов и способностью вида адаптироваться в динамических условиях среды. Кумжа *Salmo trutta*, обычно достигающая половой зрелости к 3–4 годам (Hart, 1973; Христофоров, Мурза, 1990), может созревать и раньше этого срока. Этот вид обитает как в крупных, так и малых реках, характеризующихся разнообразным гидрологическим режимом и химическим составом воды (Кузищин, 1997; Jonsson *et al.*, 2001; Шустов и др., 2013; Nuusko *et al.*, 2018; Павлов и др., 2021). При благоприятных условиях обитания, сопряжённых с быстрым ростом, кумжа в Финноскандии может достигнуть половой зрелости уже в возрасте 1+...2+ (Мурза, Христофоров, 1984; Кузищин, 1997, 2010; Пономарева и др., 2006; Nuusko *et al.*, 2018; Павлов Д.С. и др., 2019; Павлов Е.Д. и др., 2020). Ответом особи на изменение факторов среды является модификация её эндокринной регуляции, которая, в свою очередь, влияет на сроки достижения половой зрелости. Тиреоидные гормоны у рыб в онтогенезе регулируют энергетический обмен в орга-

низме и через гормон роста участвуют в ростовых процессах (Cyr, Eales, 1996; Dolomatov *et al.*, 2013; Deal, Volkoff, 2020), а половые стероидные гормоны участвуют в развитии репродуктивной системы (Amenyogbe *et al.*, 2020; Tenugu *et al.*, 2021). Количественное содержание указанных гормонов в крови может отражать те изменения, которые наблюдаются у молоди при формировании траектории развития, связанной с ранним созреванием.

Популяции кумжи в малых реках Карелии малочисленны, а доля раносозревающих особей, как правило, невелика. В р. Алатсоя раносозревающие самцы встречаются чаще, чем в популяциях других малых рек Карелии (Павлов Д.С. и др., 2019; Павлов Е.Д. и др., 2020). Достаточность выборки по раносозревающим самцам в р. Алатсоя позволяет оценить гормональные изменения, возникающие у рыб при ускоренном половом созревании. Мы не обнаружили информации о том, как соотносятся разные сроки созревания с уровнем тиреоидных и половых стероидных гормонов в популяции кумжи.

Цель работы — сравнить содержание тиреоидных и половых стероидных гормонов у поло-

возрелой и неполовозрелой кумжи в возрасте 1+ и 2+.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на рыбах, отловленных в реке Алатсоя, относящейся к бассейну Ладожского озера. Длина реки составляет 14 км, а ее истоком является оз. Алатунлампи (<http://textual.ru/gvr>). Река впадает в р. Янисйоки, на которой выше и ниже места впадения расположены две плотины. Нижняя плотина блокирует возврат половозрелой кумжи из Ладожского озера на нерест в р. Алатсоя, а верхняя — блокирует миграцию кумжи на нагул в оз. Янисъярви. В реках бассейнов Ладожского озера, включая Алатсоя, часть молоди кумжи смолтифицируется, выбирая проходную жизненную стратегию (Павлов Д.С. и др., 2019). Смолтификация и покатная миграция кумжи в северной части ареала, как правило, происходит в апреле—мае (Rasmussen, 1986; Bohlin *et al.*, 1994). Период проведения работ был выбран такой, когда смолты (под термином “смолт” понимается особь, совершающая покатные миграции независимо от конечного пункта этих миграций — река, озеро, море (Jones *et al.*, 2015; Huusko *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2019)) кумжи в исследованных реках отсутствуют.

Неполовозрелых особей и раносозревающих самцов кумжи отлавливали электроловом Fa-2 (Норвегия) (разрешение № 115 от 4 июля 2019 г.) с 10:00 по 12:00 в течение 2-х дней (29 и 30 августа 2019 г.). В прилове также присутствовали сеголетки (0+) и производители кумжи старшего возраста ( $\geq 3$ ). Таких рыб возвращали обратно в реку. В течение часа после поимки годовиков и двухлеток кумжи перевозили в лабораторию в аэрируемом баке, объемом 100 л (плотность посадки  $\leq 300$  экз./м<sup>3</sup>). Перевозку осуществляли в воде из реки, в которой отлавливали рыб.

В течение 3-х ч после поимки (с 13:00 по 16:00) у рыб прижизненно отбирали кровь из хвостовой вены за анальным плавником шприцом объемом 1 мл. Объем пробы в зависимости от размера особи варьировал от 50 до 150 мкл. Затем кровь отстаивали при комнатной температуре в течение 40–60 мин, полученную сыворотку центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин. Сыворотку в индивидуальных пробирках этикетировали и замораживали при  $-18^{\circ}\text{C}$ . При определении концентрации гормонов сыворотку размораживали и разбавляли в 5 раз фосфатным буферным раствором (0.01 М, pH 7.4) (“Sigma-Aldrich”, ФПГ). Методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-наборов производства DRG (ФПГ) на приборе Mindray MR 96A (КНП) в разбавленной сыворотке (индивидуальная проба) определяли концентрации общих тестостерона и эстрадиола-17 $\beta$ , обще-

го трийодтиронина ( $T_3$ ) и свободных трийодтиронина ( $FT_3$ ) тироксина ( $FT_4$ ), не связанных с белками сыворотки крови. Большая часть  $T_3$  и  $T_4$  в крови связана с белками сыворотки, а оставшаяся доля ( $<1\%$ ), т.е.  $FT_3$  и  $FT_4$  — являются биологически активными фракциями гормонов. При этом концентрация  $FT_4$  является наиболее объективным критерием оценки функциональной активности щитовидной железы (Dolomatov *et al.*, 2013). Именно поэтому мы взяли за основу определение концентраций свободных фракций тиреоидных гормонов. Рассчитывали показатель  $Ts/E$  (Ганжа, Павлов, 2019) и долю  $FT_3$  относительно  $T_3$  ( $FT_3/T_3$ ) (Eales, Shostak, 1985). Каждую пробу сыворотки крови исследовали на содержание каждого гормона в 2-х повторностях. Сравнительный анализ концентраций гормонов в сыворотке крови рыб, относящихся к разным экспериментальным группам, выполнен по абсолютным значениям.

После отбора крови у рыб измеряли стандартную длину ( $L$ ) и массу тела ( $W$ ), определяли пол (по морфологическому строению и цвету половых желёз при вскрытии). У неполовозрелых рыб яичники имели желтоватый цвет и утолщение в краниальной и медиальной части; семенники имели вид тонких полупрозрачных или сероватых тяжей без утолщений. Принадлежность к раносозревающим самцам определяли по размеру и цвету гонад. У неполовозрелых рыб в возрасте 1+ и 2+ яичники и семенники находились на II стадии зрелости. У раносозревающих самцов семенники были крупнее, имели выраженный беловатый цвет и находились на IV стадии зрелости. Гистологический анализ показал, что в семенниках раносозревающей кумжи присутствуют немногочисленные сперматозоиды, которые располагаются в просветах семенных канальцев, формирующихся между цистами с половыми клетками более раннего состояния (сперматоцитами и сперматидами). Раносозревающие самки не обнаружены, то есть весь материал по раносозревающим особям представлен самцами.

Для определения возраста кумжи отбирали несколько десятков чешуй выше боковой линии между задним краем спинного плавника и началом анального (Кузишин и др., 1999). Возраст определяли по числу годовых колец на чешуе с целевой центральной зоной, не имеющей признаков регенерации и повреждения (Чугунова, 1959). У каждой особи просматривали  $\geq 10$  чешуй.

Статистическая обработка материала выполнена по индивидуальным значениям с использованием  $t$ -критерия Стьюдента,  $U$ -критерия Манна–Уитни, корреляции Спирмена. Нормальность распределения выборок оценивали по одновыборочному критерию Колмогорова–Смирнова.

**Таблица 1.** Длина (*L*) и масса (*W*) тела кумжи р. Алатоя в возрасте 1+ и 2+

Пол, возраст	<i>L</i> , см	<i>W</i> , г	<i>n</i> , экз.
Неполовозрелые			
♀, 1+	$12.6 \pm 0.20$	$20.0 \pm 1.03$	22
	11.1–14.3	13.9–29.9	
♂, 1+	$12.5 \pm 0.20$	$19.5 \pm 0.91$	17
	10.8–13.6	11.7–25.4	
♀, 2+	$17.1 \pm 0.26$	$50.4 \pm 2.52$	21
	14.8–20.8	31.3–89.4	
♂, 2+	$17.2 \pm 0.50$	$51.8 \pm 4.77$	4
	15.8–18.2	37.5–57.5	
Половозрелые			
р. ♂, 1+	12.9	22.0	1
р. ♂, 2+	$17.4 \pm 0.35$	$60.2 \pm 4.26$	11
	15.6–19.8	40.5–88.9	

Примечание. Здесь и далее над чертой –  $M \pm m$ , под чертой – min–max, *n* – число особей в группе; р. ♂ – раносозревающие самцы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Характеристика исследованных рыб.** Были отловлены неполовозрелые самки и самцы кумжи в возрасте 1+ и 2+ и раносозревающие самцы тех же возрастных групп (табл. 1). Самок в возрасте 1+ и 2+ было несколько больше, чем самцов. Пойман только один раносозревающий самец в возрасте 1+. Половозрелые раносозревающие самцы составляли 73% самцов в возрасте 2+. Половой диморфизм по длине и массе тела у рыб одного и того же возраста не выявлен (*t*-критерий Стьюдента:  $p > 0.05$ ).

**Содержание тиреоидных и половых стероидных гормонов.** *U*-критерий Манна-Уитни показал, что уровень тиреоидных гормонов ( $T_3$ ,  $FT_3$ ,  $FT_4$ ) и доля свободного трийодтиронина от его общей фракции ( $FT_3/T_3$ ) не связаны ( $p > 0.05$ ) с возрастом и полом исследованных рыб. Эти показатели у кумжи незначительно меняются у годовиков и двухлеток, отловленных в конце лета (табл. 2).

Концентрация половых стероидных гормонов у неполовозрелых особей (самки в возрасте 1+ и 2+, самцы в возрасте 1+), остается на близком уровне (рис. 1). У раносозревающих самцов по сравнению с остальными особями уровень тестостерона повышается почти в 2.5 раза, а эстрадиола-17β, напротив, в два раза снижается. Из-за количественных изменений концентраций половых стероидных гормонов у раносозревающих самцов величина  $Ts/E$  возрастает в ~4 раза.

Уровень тестостерона у одного раносозревающего самца в возрасте 1+ составлял 3.4 нг/мл. У четырех неполовозрелых самцов в возрасте 2+ средние значения концентраций  $Ts$  составляли

$6.5 \pm 1.85$  (4.1–11.9) нг/мл,  $E$  –  $0.46 \pm 0.023$  (0.40–0.51) нг/мл, а показателя  $Ts/E$  –  $14.9 \pm 5.13$  (8.1–30.1).

Корреляционный анализ показал, что у самок и самцов кумжи в возрасте 1+ и 2+ наблюдается отрицательная связь величины показателя  $Ts/E$  от длины тела рыб –  $r_s$  варьирует в пределах от –0.64 до –0.88. Максимальная зависимость выявлена у раносозревающих самцов в возрасте 2+, а минимальная – у самок того же возраста.

У самок и самцов неполовозрелой кумжи в возрасте 1+ и 2+ обнаружена корреляционная связь концентраций тестостерона с эстрадиолом-17β (табл. 3). У раносозревающих самцов она не выявлена. В возрасте 1+ как у неполовозрелых у самок, так и у самцов наблюдается связь концентраций половых стероидных и тиреоидных гормонов. При этом у самок содержание половых стероидных гормонов связано с общим трийодтиронином, а у самцов – с его свободной формой. В возрасте 2+ у неполовозрелых самок выявлена связь этих гормонов со свободным трийодтиронином, а у раносозревающих самцов таких зависимостей не обнаружено ( $p > 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют, что самцы кумжи в р. Алатоя в 2019 г. преимущественно (73%) созрели в возрасте 2+. Обнаружен только один самец, созревший в возрасте 1+ (5.5%). Ранее в 2015 г. к возрасту 1+ созрели 38% самцов, а в возрасте 2+ не было поймано ни одного самца. Следовательно, у кумжи р. Алатоя сроки достижения половой зрелости год от года в

**Таблица 2.** Содержание тиреоидных гормонов и их соотношение у самок и самцов кумжи *Salmo trutta* в возрасте 1+ и 2+ из р. Алатсоя

Пол, возраст	T <sub>3</sub> , нг/мл	FT <sub>3</sub> , пг/мл	FT <sub>4</sub> , нг/дл	FT <sub>3</sub> /T <sub>3</sub> , %
Неполовозрелые				
♀, 1+	$11.1 \pm 0.94$ 5.4–26.2	$7.9 \pm 0.46$ 3.2–12.7	$0.98 \pm 0.140$ 0.35–1.57	$0.09 \pm 0.012$ 0.03–0.24
♂, 1+	$11.1 \pm 0.87$ 6.4–19.5	$8.8 \pm 0.57$ 4.5–14.9	$1.01 \pm 0.152$ 0.20–1.82	$0.09 \pm 0.010$ 0.03–0.18
♀, 2+	$10.4 \pm 0.86$ 4.5–15.7	$9.3 \pm 0.86$ 4.5–15.7	$0.82 \pm 0.100$ 0.27–1.60	$0.09 \pm 0.008$ 0.05–0.14
♂, 2+	$9.4 \pm 2.27$ 5.3–13.1	$10.6 \pm 1.65$ 7.6–15.2	$0.35 \pm 0.05$ 0.24–0.47	0.08
Половозрелые				
p. ♂, 1+	10.4	7.7	1.30	0.07
p. ♂, 2+	$11.5 \pm 2.40$ 8.2–25.8	$10.5 \pm 1.05$ 7.5–16.9	$0.86 \pm 0.113$ 0.36–1.29	$0.10 \pm 0.014$ 0.04–0.14

Примечание. Здесь и далее T<sub>3</sub> – трийодтиронин, FT<sub>3</sub> – свободный трийодтиронин, FT<sub>4</sub> – свободный тироксин, FT<sub>3</sub>/T<sub>3</sub> – доля свободного от общего трийодтиронина.

**Таблица 3.** Корреляционная связь концентраций половых стероидных и тиреоидных гормонов у кумжи *Salmo trutta* в возрасте 1+ и 2+ из р. Алатсоя

	♀, 1+		♂, 1+		♀, 2+	
	Ts	T <sub>3</sub>	Ts	FT <sub>3</sub>	Ts	FT <sub>3</sub>
Ts		0.60 (0.004)		0.51 (0.024)		0.58 (<0.001)
E	0.60 (0.004)	0.53 (0.023)	0.80 (<0.001)	0.63 (0.009)	0.47 (0.001)	0.34 (0.043)

Примечание. Перед скобками коэффициент корреляции Спирмена,  $r_s$ ; в скобках – уровень значимости ( $p$ ). Ts – тестостерон, E – эстрадиол-17β.

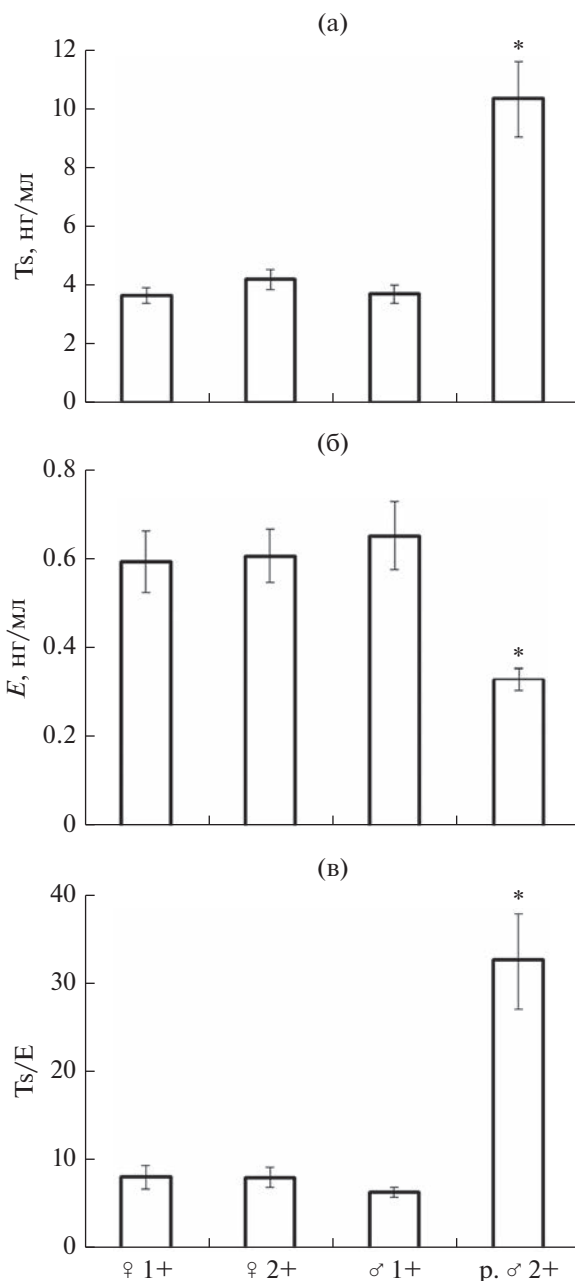
значительной степени изменчивы. Известно, что стимулом к раннему созреванию лососевых является комплекс благоприятных факторов, сложившихся в речной системе или в отдельных ее участках (Bohlin *et al.*, 1994; Fleming, 1996; Кузищин, 1997; Metcalfe, 1998; Morgan, Metcalfe, 2001; Jonsson, Jonsson, 2011). Река Алатсоя, как и другие малые реки Карелии в течение года подвержена значительным колебаниям температуры и уровня воды (Шустов и др., 2013). Вероятно, в разные годы различаются и условия питания рыб в реке, что может влиять на их численность и обуславливает модификацию темпов роста и сроков созревания кумжи. Известно (Кузищин, 2010), что в ручье Воробьев (Северная Карелия) в холодные годы и/или при высокой плотности молоди кумжи формирование раносозревающих самцов и самок в поколении может значительно снижаться. На различия в питании в р. Алатсоя может указывать разница в темпах роста у кумжи сходного возраста

в 2015 и 2019 гг. В 2019 г. неполовозрелые самцы кумжи в возрасте 1+ имели достоверно ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p < 0.05$ ) меньшую длину и массу тела, чем неполовозрелые самцы и раносозревающие самцы того же возраста в 2015 г. (табл. 4). Следовательно, темпы роста кумжи в р. Алатсоя в период с 2018 по 2019 гг. могли быть ниже, чем в период с 2014 по 2015 гг. По-видимому, именно снижение темпов роста у кумжи в период 2018–2019 гг. привело к удлинению сроков созревания (на один год) большей части самцов в популяции. В малочисленных популяциях кумже свойственна очень высокая степень изменчивости морфологических признаков, выражающаяся в выработке практически в каждом водоёме специфических черт (Пономарева и др., 2014). Наши результаты свидетельствуют, что и в пределах одного водоема в разные годы происходят заметные изменения в структуре популяции.

Раносозревающие самцы кумжи р. Алатся в 2015 г. имели высокий темп роста в первое лето жизни, а со второго года различия в темпах роста между ними и неполовозрелыми самками и самцами сходного возраста сглаживались (Павлов и др., 2020). Данные 2019 г. согласуются с полученными ранее — мы не обнаружили значимых различий в длине и массе тела между раносозревающими самцами в возрасте 2+ и неполовозрелыми особями того же возраста.

В 2019 г. самки и самцы кумжи в возрасте 1+ и 2+ не имели значимых различий в концентрациях тиреоидных гормонов и их соотношении. Корреляционных зависимостей концентраций тиреоидных гормонов с длиной, массой, возрастом и достижением половой зрелости рыб также не выявлено. Полученные результаты указывают на низкую функциональную активность щитовидной железы на завершающем этапе формирования раносозревающих особей. На примере осетровых (сем. *Acipenseridae*) показано, что у неполовозрелых рыб уровни тиреоидных гормонов коррелируют с температурой, питанием и ростом, а у половозрелых особей в период нереста — связаны со зрелостью их гонад (Dettlaff, Davydova, 1979; Plohman *et al.*, 2002; Falahatkar, 2015). Вероятно, у кумжи наблюдается похожая связь синтеза тиреоидных гормонов со средой обитания. В связи с тем, что в целом на кумжу р. Алатся оказывают влияние сходные факторы, то и неполовозрелые особи, имеющие возрастные и половые различия, имеют близкий тиреоидный статус. Раносозревающие самцы, по-видимому, еще не вступили в нерестовый период, сопряженный с модификацией концентраций тиреоидных гормонов, поэтому они не отличаются от неполовозрелой молодежи по уровню этих гормонов. В 2015 г. у кумжи в возрасте 1+ также не были выявлены различия по уровню  $T_3$ , но отмечены по концентрации общего  $T_4$  между раносозревающими самцами и пестрятками в возрасте 1+ (Павлов и др., 2019). Мы предполагаем, что основная регуляторная роль щитовидной железы в процессе формирования раннего полового созревания осуществляется еще у сеголетков и сопряжена с ускоренным ростом будущих раносозревающих особей, который наблюдается в течение первого лета их жизни (Павлов и др., 2020). Проверка этой гипотезы требует дополнительных исследований.

Как показали результаты работ в 2015 (Павлов и др., 2019) и 2019 гг. содержание тестостерона и эстрадиола-17 $\beta$  у неполовозрелых самок и самцов не различается. Вероятно, на ранних стадиях гаметогенеза (II стадия зрелости гонад) синтез половых стероидных гормонов умеренный, а половой диморфизм по концентрациям эстрогенов и андрогенов еще не реализуется. На примере красного барабана *Sciaenops ocellatus* показано, что поло-



**Рис. 1.** Содержание тестостерона (а), эстрадиола-17 $\beta$  (б) и показателя их отношения (в) у самок и самцов кумжи *Salmo trutta* в возрасте 1+ и 2+ из р. Алатся. (|) — ошибка средней; \* указывает на достоверные (*U*-критерий Манна–Уитни:  $p < 0.01$ ) различия относительно других групп; p. ♂ 2+ — раносозревающие самцы в возрасте 2+.

вой диморфизм по эстрадиолу-17 $\beta$  не проявляется раньше начала вителлогенеза у самок (III стадия зрелости гонад), а по тестостерону — не раньше начала спермиогенеза (IV–V стадия зрелости гонад) у самцов (Kucherka *et al.*, 2006). У раносозревающих самцов в 2015 и 2019 г. несмотря на различия в сроках достижения половой зрелости отмечены



**Таблица 4.** Длина (*L*) и масса (*W*) тела самцов кумжи р. Алатсоя в возрасте 1+ в 2015 г. (Павлов и др., 2019)

	<i>L</i> , см	<i>W</i> , г	<i>n</i> , экз.
Неполовозрелые	$12.8 \pm 0.28$ 10.8–15.3	$22.4 \pm 1.57$ 13.4–38.9	21
Половозрелые Раносозревающие	$13.5 \pm 0.17$ 12.4–14.5	$29.0 \pm 1.31$ 19.6–37.4	13

сходные изменения в гормональном статусе – повышение уровня тестостерона и снижение эстрадиола-17β к нересту, что приводит к росту показателя Тс/Е. Величина этого показателя указывает на снижение образования эстрадиола-17β из тестостерона у раносозревающих самцов по сравнению с неполовозрелыми особями. У раносозревающих самцов в возрасте 2+ (2019 г.) содержание тестостерона и эстрадиола-17β в крови превышает (*U*-критерий Манна–Уитни:  $p = 0.023$  и  $p = 0.001$ , соответственно) таковое у раносозревающих самцов в возрасте 1+ (2015 г.). У раносозревающих самцов старшего возраста (2+) отмечено и увеличение уровня трийодтиронина (*U*-критерий Манна–Уитни:  $p = 0.003$ ). Следовательно, для роста и достижения полового созревания раносозревающей кумже старшего возраста, имеющей большую длину и массу тела, требуется синтезировать большее количество половых стероидных гормонов и трийодтиронина.

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о вовлечении половых стероидных гормонов в процессы роста и созревания кумжи. У всех исследованных в 2019 г. групп кумжи (неполовозрелой кумжи в возрасте 1+ и 2+ и половозрелых самцов в возрасте 2+) выявлено наличие обратной связи средней и высокой силы превращения тестостерона в эстрадиол-17β (по показателю Тс/Е) с длиной тела особей. Это согласуется с тем, что факторы различной природы, влияющие на рост рыб, принимают участие и в регуляции их стероидогенеза (Tenugu *et al.*, 2021). По всей видимости, именно связь длины тела и соотношения тестостерона с эстрадиолом-17β формирует половой диморфизм в сроках достижения половой зрелости – как правило самцы кумжи созревают раньше самок (Кузицин, 2010; Jonsson, Jonsson, 2011; Ferguson, 2019).

Таким образом, в популяции кумжи р. Алатсоя период достижения половой зрелости в поколениях разных лет различается. Формирование раносозревающих особей может происходить как в возрасте 1+, так и в 2+. В 2019 г. 73% самцов достигли половой зрелости в возрасте 2+, оставшиеся самцы этого возраста созревают позднее. Не выявлено различий по содержанию свободного и общего трийодтиронина и свободного тирок-

сина у неполовозрелой кумжи в возрасте 1+ и 2+ и раносозревающих самцов в возрасте 2+. Это указывает на низкую функциональную активность щитовидной железы на завершающем этапе формирования раносозревающих особей в популяции. По сравнению с неполовозрелой кумжей раносозревающие самцы в возрасте 2+ характеризуются повышенным содержанием тестостерона и пониженным уровнем эстрадиола-17β в крови. При сравнении результатов за 2015 и 2019 гг. показано, что самцы, достигшие половой зрелости в возрасте 2+, имеют более высокий уровень половых стероидных гормонов и общего трийодтиронина, чем самцы, созревшие на год раньше.

**Благодарности.** Авторы признательны Д.А. Ручёву (ООО “Янисъярви”) за содействие и помощь в проведении исследований; А.Г. Бушу за определение возраста кумжи.

**Финансирование.** Сбор материала осуществлен при финансовой поддержке гранта РНФ (14-14-00015), анализ материала и подготовка статьи – при финансовой поддержке гранта РНФ (19-14-00015-П).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ганжа Е.В., Павлов Е.Д. Суточная динамика тиреоидных и половых стероидных гормонов в крови молоди радужной форели // Биология внутренних вод. 2019. № 3. С. 80–83.
- Государственный водный реестр. <http://textual.ru/gvr>.
- Кузицин К.В. Особенности формирования внутривидовой разнокачественности у кумжи *Salmo trutta* L. Белого моря: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ. 1997.
- Кузицин К.В. Формирование и адаптивное значение внутривидового экологического разнообразия лососёвых рыб (семейство Salmonidae): Дис. докт. биол. наук. М.: МГУ. 2010.
- Кузицин К.В., Савваитова К.А., Груздева М.А. Структура чешуи как критерий дифференциации локальных популяций микижи *Parasalmo mykiss* из рек западной Камчатки и Северной Америки // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 6. С. 809–818. <https://doi.org/10.1134/S0042875218050168>
- Мурза И.Г., Христофоров О.Л. Динамика полового созревания и некоторые закономерности формирова-

- ния сложной структуры популяций кумжи *Salmo trutta* L. из водоемов побережья Кандалакшского залива Белого моря // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. 1984. Вып. 220. С. 41–86.
- Павлов Д.С., Ганжа Е.В., Немова Н.Н., Павлов Е.Д., Веселов А.Е., Ручьев М.А. Уровень тиреоидных и половых стероидных гормонов у кумжи *Salmo trutta* // Биол. внутр. вод. 2019. № 2. С. 87–92. <https://doi.org/10.1134/S0320965219020116>
- Павлов Е.Д., Буш А.Г., Костин В.В., Павлов Д.С. Рост и раннее половое созревание кумжи *Salmo trutta* р. Алатсоя (Республика Карелия) // Биол. внутр. вод. 2020. № 6. С. 584–591. <https://doi.org/10.31857/S0320965220060145>
- Павлов Е.Д., Ганжа Е.В., Павлов Д.С. Различия содержания ионов в крови у кумжи *Salmo trutta* из двух близкорасположенных рек до смолтификации // Известия РАН. Серия биологическая. 2021. № 6. С. 594–601. <https://doi.org/31857/S1026347021060147>
- Пономарева М.В., Пономарева Е.В., Кузищин К.В. Экологические особенности полового созревания кумжи (*Salmo trutta* L.) // Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий: Матер. III междунар. конф. Оренбург. 25–27 мая 2006 г. Оренбург. 2006. С. 255–257.
- Пономарева Е.В., Кузищин К.В., Волков А.А., Гордеева Н.В., Пономарева М.В., Шубина Е.А. Структура и генетическое разнообразие малых популяций кумжи *Salmo trutta* Кандалакшского залива Белого моря // Вопр. ихтиологии. 2014. Т. 54. № 1. С. 43–56. <https://doi.org/10.7868/S0042875214010093>
- Христофоров О.Л., Мурза И.Г. Половое созревание и структура популяции кумжи реки Поной // Биол. ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Европейского Севера: Тез. докл. Сыктывкар. 1990. С. 37.
- Чугунова Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М.: Изд-во АН СССР. 1959. 164 с.
- Шустов Ю.А., Тыркин И.А., Шуров И.Л., Ивантер Д.Э., Белякова Е.Н. Биологические особенности молоди лососевых рыб в реках Карелии и Кольского п-ва. Петрозаводск: ПетрГУ, 2013. 74 с.
- Amenyogbe E., Chen G., Wang Z., Lu X., Lin M., Lin A.Y. A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish // Intern. J. Endocr. V. 2020. P. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/5386193>
- Bohlin T., Dellefors C., Faremo U. Probability of first sexual maturation of male parr in wild sea-run brown trout (*Salmo trutta*) depends on condition factor 1 yr in advance // Can. J. Fish. and Aquat. Sci. 1994. V. 51. P. 1920. <https://doi.org/10.1111/faf.12396>
- Cyr D.G., Eales J.G. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish // Rev. Fish Biology Fisheries. 1996. V. 6. № 2. P. 165–200. <https://doi.org/10.1007/BF00182342>
- Deal C.K., Volkoff H. The role of the thyroid axis in fish // Front. Endocrin. V. 11. 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.596585>
- Dettlaff T.A., Davydova S.I. Differential sensitivity of cells of follicular epithelium and oocytes in the stellate sturgeon to unfavorable conditions, and correlating influence of triiodothyronine // Gen Comp Endocrinol 1979. V. 39. № 2. P. 236–243. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(79\)90228-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90228-4)
- Dolomatov S.I., Kubyshkin A.V., Kutia S.A., Zukow W. Role of thyroid hormones in fishes // J. Health Sciences. 2013. V. 3. № 9. P. 279–296.
- Eales J.G., Shostak S. Free T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> in relation to total hormone, free hormone indices, and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr // General and comparative endocrinology. 1985. V. 58. № 2. P. 291–302. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(85\)90345-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90345-4)
- Falahatkar B. Endocrine changes during the previtellogenic stage of the great sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758) // J. Appl. Ichthyol. 2015. V. 31. № 5. P. 830–838. <https://doi.org/10.1111/jai.12813>
- Ferguson A., Reed T.E., Cross T.F., McGinnity P., Prodöhl P.A. Anatomy, potamodromy and residency in brown trout *Salmo trutta*: the role of genes and the environment // J. Fish Biol. 2019. P. 1. <https://doi.org/10.1111/jfb.14005>
- Fleming I.A. Reproductive strategies of Atlantic salmon: Ecology and evolution // Rev.: Fish Biol. Fish. 1996. V. 6. P. 379.
- Hart J.L. Pacific fishes of Canada // Bull. Fish. Res. Board Can. 1973. V. 180.
- Huusko A., Vainikka A., Syrjänen J.T., Orell P., Louhi P., Vehanen T. Life-history of the adfluvial brown trout (*Salmo trutta* L.) in Eastern Fennoscandia // Brown Trout: Biology, Ecology and Management. 2018. P. 267. <https://doi.org/10.1002/9781119268352.ch12>
- Jones D.A., Bergman E., Greenberg L., Jonsson B. Food availability in spring affects smolting in brown trout (*Salmo trutta*) // Canadian J. Fisheries and Aquatic Sciences. 2015. V. 72. P. 1694–1699.
- Jonsson B., Jonsson N. Ecology of atlantic salmon and brown trout: habitat as a template for life histories // Fish Fisheries Ser. 2011. V. 33. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1189-1>
- Jonsson B., Jonsson N., Brodtkorb E., Ingebrigtsen P.-J. Life-history traits of Brown Trout vary with the size of small streams // Functional Ecology. 2001. V. 15. № 3. P. 310–317. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2001.00528.x>
- Kucherka W., Thomas P., Khan I.A. Sex differences in circulating steroid hormone levels in the red drum, *Sciaenops ocellatus* L // Aquaculture Research. 2006. V. 37. № 14. P. 1464–1472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01583.x>
- Metcalfe N.A. The interaction between behavior and physiology in determining life history patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Can. J. Fish. and Aquat. Sci. 1998. V. 55. P. 93–103. <https://doi.org/10.1139/D98-005>
- Morgan I.J., Metcalfe N.B. Deferred costs of compensatory growth after autumnal food shortage in juvenile salmon // Proceedings of the Royal Society of London Series B-

- Biological Sciences. 2001. V. 268. 295–301.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1365>
- Plohman J.C., Dick T.A., Eales J.G.* Thyroid of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: Hormone levels in blood and tissues // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2002. V. 125. № 1. P. 47–55.  
<https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7733>
- Rasmussen G.* The population dynamics of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to year-class size // *Polskie Archiwum Hydrobiologii.* 1986. V. 33. P. 489–508.
- Tenugu S., Pranoty A., Mamta S.-K., Senthilkumaran B.* Development and organisation of gonadal steroidogenesis in bony fishes – A review // *Aquaculture and Fisheries.* 2021. V. 6. № 3. P. 223–246.  
<https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.09.004>

## Thyroid and Sex Steroid Hormones in Immature and Precocious Brown Trout *Salmo trutta*

E. V. Ganzha<sup>1, #</sup>, E. D. Pavlov<sup>1</sup>, M. A. Ruchiev<sup>1, 2</sup>, and D. S. Pavlov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya st., Petrozavodsk, 185910 Russia*

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

The content of thyroid and sex steroid hormones in the blood of immature and precocious trout *Salmo trutta* at the final stage of the formation of early maturing fishes (age 1+, 2+) in the population was determined. The formation period of early maturing males varies in different years in Alatsoya River (Karelia). Fish can reach sexual maturity at the age of 1+ or 2+. Immature and precocious trout at the age of 1+ and 2+ do not differ in the free and total triiodothyronine and free thyroxine content. Immature females and males aged 1+ and 2+ also do not differ in the level of sex steroid hormones. In contrast to immature brown trout, precocious males aged 2+ are characterized by an increased content of testosterone and a reduced level of estradiol-17 $\beta$  in the blood. It has been established that the final stage of the formation of early maturing fishes in the population is characterized by a weak involvement of the thyroid gland in the maturation process of males. Also, it was shown that the rate of conversion of testosterone to estradiol-17 $\beta$  in their blood was a significant decrease (4 times). This transformation in all studied females and males of brown trout is associated with their body length. The rate of formation of estradiol-17 $\beta$  in fish was increased with increasing of body length.

**Keywords:** brown trout *Salmo trutta*, thyroid hormones, sex steroid hormones, maturity, precocious fish, life strategy

УДК 575.22:582.736

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ *Oxytropis strobilacea*, *Oxytropis adamsiana*, *Oxytropis vassilczenkoi* РЯДА *Strobilacei* СЕКЦИИ *Orobia* (Fabaceae) АЗИАТСКОЙ РОССИИ

© 2023 г. А. Б. Холина<sup>\*,@</sup>, Е. В. Артюкова<sup>\*</sup>, В. В. Якубов<sup>\*</sup>, М. Г. Хорева<sup>\*\*</sup>, О. А. Мочалова<sup>\*\*</sup>, Д. В. Санданов<sup>\*\*\*</sup>, И. Ю. Селютина<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии  
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690022 Россия

<sup>\*\*</sup> Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения РАН, Магадан, 685000 Россия

<sup>\*\*\*</sup> Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

<sup>\*\*\*\*</sup> Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090 Россия

@E-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Генетическое разнообразие и дивергенция близкородственных видов *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* ряда *Strobilacei* секции *Orobia* (Fabaceae) Азиатской России изучены по данным нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлДНК, а также ITS рДНК. Большинство популяций характеризуются средним и высоким уровнем генетического разнообразия хлДНК (*h* варьирует от 0.600 до 1.000). Выявлено 65 хлоротипов, общих хлоротипов у таксонов не обнаружено, что подтверждает статус *O. vassilczenkoi* как самостоятельного вида. У *O. strobilacea* выявлены две филетические линии, что указывает на интенсивно идущие процессы диверсификации. Один из семи риботипов ITS обнаружен у трех видов, что обусловлено их общим происхождением и относительно недавней дивергенцией.

**Ключевые слова:** Fabaceae, *Oxytropis*, *Orobia*, генетическое разнообразие, дивергенция, хлоропластная ДНК, ITS

**DOI:** 10.31857/S1026347023010067, **EDN:** IKXFCQ

Секция *Orobia* Bunge, самая крупная секция рода *Oxytropis* DC., включает ~110 видов в Европе, Азии и Америке (Мальшев, 2008а). В Азиатской России секция представлена 75 видами и подвидами (Мальшев, 2012). Во “Флоре СССР” (Васильченко и др., 1948) секция *Orobia* разделена авторами на пять многовидовых рядов: *Sordidae* Vass., *Uralensis* Vass., *Ambiguae* Vass., *Longirostrae* Vass., *Songoricae* Vass. В 2005 г. Князев (Князев, 2005) на основе тщательной типификации и пересмотра видов, относящихся к ряду *Uralensis*, предложил внести изменения в систематику секции *Orobia*. С учетом комплекса морфологических признаков он выделил семь сибирских видов родства *O. uralensis* (L.) DC. (*O. adamsiana* (Trautv.) Jurtzev, *O. vassilczenkoi* Jurtzev, *O. ambigua* (Pall.) DC., *O. arctica* R. Br., *O. wolgodensis* Knjasev, *O. karga* Saposhn., *O. subnuntans* (Jurtz.) Jurtz.) и *O. strobilacea* Bunge, как типовой вид, в самостоятельный ряд – ser. *Strobilacei* Knjasev.

Среди представителей ряда *Strobilacei* *O. strobilacea* является наиболее широко распространен-

ным горно-степным видом – его ареал охватывает Северо-Восточный Казахстан, Южную Сибирь, Северную Монголию и Китайский Алтай (Мальшев, 2008а), вид распространен в островных степях Алтая, юга Красноярского края и Тувы, в степях Приангарья, Бурятии, Забайкалья, встречается на юге Дальнего Востока в бассейнах рек Зеи и Алдана (Павлова, 1989; Пешкова, 2001), северный предел ареала – около 56° с.ш. Это очень полиморфный вид, у которого варьируют такие морфологические признаки, как степень опушения, длина цветоносов, прицветников и др. Для *O. strobilacea* известны разные варианты числа хромосом  $2n = 16, 32, 48, 64$ , что может быть проявлением расовой дифференциации у вида с широким ареалом, а также при обитании в нескольких высотных поясах гор (Мальшев, 2008а, 2008б).

К северу ряд *Strobilacei* представлен двумя видами близкого родства: *O. adamsiana* – на Становом нагорье, Таймыре и в бассейне рек Лены (в нижнем течении), Яны и Индигирки; *O. vassilczenkoi* – восточнее р. Колымы на Чукотском п-

ове и Корякском нагорье (Юрцев, 1986; Павлова, 1989; Пешкова, 2001; Малышев, 2008а). Как самостоятельные виды *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* впервые описаны Юрцевым в 1959 г. (Юрцев, 1959), ранее их относили к *O. strobilacea*. *O. adamsiana* представляет аркто-гипоарктическую и высокогорную расу от *O. strobilacea*, это тетраплоид с  $2n = 32$  (многие места), а для популяции на хр. Удокан установлено  $2n = 48$  (Малышев, 2008а). Анадыро-чукотский эндемик *O. vassilczenkoi* ( $2n = 32$ ) тесно примыкает к *O. adamsiana*, но по ряду признаков существенно от него отличается и представляет собой наиболее обособившуюся арктическую расу родства *O. uralensis* (Юрцев, 1959, 1986; Малышев, 2008а). Однако существует мнение (Кожевников, 1980), что *O. vassilczenkoi* не является самостоятельным видом, а представляет собой подвид — *O. adamsiana* ssp. *vassilczenkoi* (Jurtz.) Ju. Kozhev. Фенетический анализ видов секции *Orobia* (Малышев, 2008б) показал относительную близость *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* и обособленность *O. strobilacea*. Так, на дендрограмме различий, построенной по данным анализа 47 качественных морфологических признаков, последний вид относился к ветви, значительно отдаленной от ветви с *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* (Малышев, 2008б).

Реконструкция филогенетических связей видов рода *Oxytropis*, среди которых были случайно выбранные одиночные образцы *O. strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi*, по данным секвенирования маркеров ядерного и хлоропластного геномов (Холина и др., 2016; Shavvon *et al.*, 2017) показала, что взаимоотношения видов даже на уровне секций не были разрешены.

Настоящая работа является продолжением изучения генетического разнообразия, популяционной структуры и оценке степени дивергенции близкородственных видов рода *Oxytropis* (Kholina *et al.*, 2018, 2021; Холина и др., 2019, 2020, 2021а, 2021б; Козыренко и др. 2020). Целью исследования является изучение генетического разнообразия и дивергенции видов *O. strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* ряда *Strobilacei* секции *Orobia* Азиатской России для уточнения таксономического статуса *O. vassilczenkoi*, а также реконструкция их филогенетических связей по данным изменчивости нуклеотидных последовательностей IGS *psbA-trnH* + *trnL-trnF* + *trnS-trnG* хпДНК и ITS рДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом служили 108 растений: *O. strobilacea* (55 образцов), *O. adamsiana* (16) и *O. vassilczenkoi* (37) из 16 природных местонахождений (табл. 1, рис. 1). Названия видов и секций приведены согласно обработке Малышева (2008а).

Методы выделения ДНК, амплификации и секвенирования IGS *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* приведены в наших предыдущих работах (Kholina *et al.*, 2018; Холина и др., 2021б). Регион ITS рДНК амплифицирован с праймерами ITS1 и ITS4 в реакционных условиях и температурном режиме, приведенных в работе (Mir *et al.*, 2010). Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей определяли на генетическом анализаторе ABI 3500 (“Applied Biosystems”, США) в ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Последовательности четырех регионов ДНК собирали и редактировали с помощью пакета программ Staden Package v1.5 (Bonfeld *et al.*, 1995), затем выравнивали в программе SeaView v4.7 (Gouy *et al.*, 2010).

Матрицу объединенных последовательностей трех IGS хпДНК использовали для расчета гаплотипического ( $h$ ) и нуклеотидного ( $\pi$ ) разнообразия (для популяций с числом образцов пять и более), степени дивергенции ( $D_{xy}$ ) между популяциями/видами на основе нуклеотидных замен, анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) с помощью пакетов программ Arlequin v3.5 (Excoffier, Lischer, 2010) и DnaSP v5 (Librado, Rozas, 2009). Статистическую значимость ( $P$ ) индексов фиксации ( $\Phi_{ST}$ ) оценивали на основе 1023 пермутаций. Гаплотипы хпДНК и ITS были идентифицированы в DnaSP v5.

Сеть гаплотипов строили в программе Network v5.0 (Bandelt *et al.*, 1999), кодируя каждую делецию/вставку, независимо от ее размера, как одно мутационное событие. Для гаплотипов хпДНК использован алгоритм медианного соединения (Median Joining, MJ), а для гаплотипов ITS — уменьшения медианы (Reduced Median, RM). В качестве внешней группы использовали полученные нами ранее для *O. glabra* (Lam.) DC. секции *Mesogaea* Bunge (Холина и др., 2018, 2021б) нуклеотидные последовательности *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG* хпДНК (номера доступа в GenBank LT856572, LT856585, LT856598 соответственно) и ITS рДНК (LR898464).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нуклеотидные последовательности IGS *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК 108 образцов изучаемых видов характеризуются низкой нуклеотидной изменчивостью и разной длиной вследствие присутствия коротких (4–10 нуклеотидов) инделей, моно- и динуклеотидных повторов. Длина объединенных последовательностей трех регионов после выравнивания составила 2440 сайтов. Выявлено 17 нуклеотидных замен, из них 12 информативны согласно методу максимальной экономии. Видоспецифичных молекулярных маркеров нет.

**Таблица 1.** Исследуемые популяции *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* и параметры генетического разнообразия по данным хпДНК

Местонахождение популяции (число образцов)	Координаты с.ш., в.д.	Код	Хлоротип	Разнообразие (стандартная ошибка)	
				гаплотипическое	нуклеотидное
<b><i>O. strobilacea</i></b>					
Республика Бурятия, Заиграевский р-н, окр. с. Заиграево (5)	N 51.87514°, E 108.24616°	STR1	U1–U3	0.800 (0.164)	0.0009 (0.0007)
Республика Бурятия, Еравнинский р-н, окр. с. Комсомольское (10)	N 52.478983°, E 111.086773°	STR2	U1–U7	0.867 (0.107)	0.0016 (0.0010)
Республика Бурятия, Курумканский р-н, окр. с. Майск (15)	N 54.61287°, E 110.77431°	STR3	U8–U18	0.952 (0.040)	0.0032 (0.0018)
Республика Бурятия, Курумканский р-н, Джергинский заповедник, урочище Укшаки (5)	N 55.203529°, E 111.448749°	STR4	U19–U23	1.000 (0.127)	0.0042 (0.0027)
Республика Бурятия, Тункинский р-н, окр. с. Торы (6)	N 51.76222°, E 102.95333°	STR5	U24–U26	0.600 (0.215)	0.0013 (0.0009)
Республика Бурятия, Тункинский р-н, окр. с. Монды (3)	N 51.69750°, E 100.86746°	STR6	U27–U29	–	–
Республика Бурятия, Тункинский р-н, окр. с. Зун-Мурино (11)	N 51.74499°, E 102.86646°	STR7	U26, U27, U30–U36	0.964 (0.051)	0.0025 (0.0015)
В целом для вида (55)				0.977 (0.009)	0.0049 (0.0025)
<b><i>O. adamsiana</i></b>					
Центральный Таймыр, горы Бырранга, у северного берега бух. Ледяная оз. Таймыр (1)	N 74.48824°, E 99.6955°	ADAM1	U37	–	–
Юго-Западный Таймыр, плато Путорана, окр. южной оконечности оз. Аян (3)	N 68.99894°, E 94.49041°	ADAM2	U37	–	–
Юго-Восточный Таймыр, среднее течение р. Фомич, северный берег оз. Бессточное (1)	N 71.67283°, E 108.30425°	ADAM3	U38	–	–
Юго-Восточный Таймыр, среднее течение р. Котуй в р-не устья р. Медвежья (1)	N 71.594564°, E 102.663249°	ADAM4	U39 (=H11*)	–	–
Республика Бурятия, Баунтовский р-н, окр. пос. Уакит, левый берег р. Уакит (10)	N 55.56461°, E 113.60958°	ADAM5	U40–U47	0.956 (0.059)	0.0047 (0.0027)
В целом для вида (16)				0.933 (0.048)	0.0056 (0.0030)
<b><i>O. vassilczenkoi</i></b>					
Магаданская обл., Сусуманский р-н, окр. Тал-Юряха, долина р. Аркагала (14)	N 63.33147°, E 146.66242°	VAS1	U48–U52	0.769 (0.083)	0.0005 (0.0004)
Магаданская обл., Северо-Эвенский р-н, долина р. Правые Имляки (1)	N 65.096498°, E 160.104725°	VAS2	U51 (=H46*)	–	–
Чукотка, Билибинский р-н, пойма р. Ярковеем (9)	N 66.93205°, E 167.00095°	VAS3	U51, U53–U57	0.917 (0.073)	0.0013 (0.0009)
Камчатский край, Олюторский р-н, Ветвейский хр. в окр. г. Сейнав (13)	N 61.00551°, E 166.04596°	VAS4	U58–U65	0.897 (0.067)	0.0017 (0.0010)
В целом для вида (37)				0.935 (0.021)	0.0039 (0.0021)

Примечание. \* хлоротипы, выявленные нами ранее (Холина и др., 2016), номера доступа нуклеотидных последовательностей IGS *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК в GenBank/ENA/EMBL-EBI: H11 – LN898575, LN898537, LN898649; H46 – LN898519, LN898531, LN898643 соответственно.



Рис. 1. Карта–схема с указанием места сбора растений видов *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* из 16 природных местонахождений. Код популяции см. табл. 1.

Все исследуемые популяции (с числом образцов пять и более) трех видов характеризуются высоким гаплотипическим ( $h$  изменяется от 0.600 до 1.000) и низким и средним нуклеотидным ( $\pi$  изменяется от 0.0005 до 0.0047) разнообразием, мономорфных популяций нет (табл. 1). Дивергенция нуклеотидных последовательностей ( $D_{xy}$ ) является одним из показателей степени генетической разобщенности популяций/видов. У *O. strobilacea* наибольшие значения  $D_{xy}$  определены между популяциями STR1 и STR2, с одной стороны, и всеми другими, с другой (табл. 2). У *O. adamsiana* наибольшие различия (0.00167) выявлены между популяциями ADAM1–ADAM3 и между ADAM2–ADAM3. У *O. vassilczenkoi* только популяция VAS4 значительно удалена (0.00205) от всех других, между которыми нуклеотидная дивергенция отсутствует (табл. 2). Согласно результатам AMOVA (табл. 3), у *O. strobilacea* и у *O. adamsiana* генетическая изменчивость распределена почти в равных долях между и внутри популяций, а у *O. vassilczenkoi* около 78% всей генетической изменчивости приходится на межпопуляционные различия. Нуклеотидная дивергенция между видами *O. strobilacea* и *O. adamsiana*, а также между *O. strobilacea* и *O. vassilczenkoi*

составила 0.00170 для каждой пары, а между *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* – 0.00091, но эти межвидовые значения  $D_{xy}$  соответствуют межпопуляционному уровню (табл. 2). Иерархический AMOVA (табл. 3) показал низкую межвидовую дифференциацию – менее 28% изменчивости приходится на межвидовые различия.

Анализ 108 последовательностей выявил 65 гаплотипов (хлоротипов) (U1–U65, табл. 1), последовательности которых депонированы в DDBJ/ENA/Genbank-INSDC под номерами OV260579–OV260641, OV260679–OV260741, OV260768–OV260830 для *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* соответственно. *O. strobilacea* принадлежит 36 хлоротипов (U1–U36), *O. adamsiana* – 11 (U37–U47), *O. vassilczenkoi* – 18 (U48–U65), общих хлоротипов у таксонов не обнаружено. В медианной сети генеалогических связей можно выделить три гаплогруппы (рис. 2а), которые расходятся от гипотетического хлоротипа (не обнаруженный в нашем исследовании или вымерший предковый) и разделены 7–10 мутационными шагами. Две гаплогруппы образуют хлоротипы *O. strobilacea*: гаплогруппа I – U1–U7 (популяции STR1 и STR2); гаплогруппа II – U8–U36 (STR3–STR7). Гаплогруппу III формируют



Таблица 2. Нуклеотидная дивергенция между популяциями видов *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* по данным хлДНК

Популяция	STR1	STR2	STR3	STR4	STR5	STR6	STR7	ADAM1	ADAM2	ADAM3	ADAM4	ADAM5	VAS1	VAS2	VAS3	VAS4
STR1	—	0.90 (0)	3.93 (3)	4.40 (3)	4.63 (3)	2.80 (2)	3.16 (2)	3.80 (3)	3.80 (3)	5.80 (5)	3.80 (3)	6.20 (5)	5.80 (5)	5.80 (5)	5.80 (5)	4.72 (3)
STR2	0.038	—	3.63 (3)	4.10 (3)	4.33 (3)	2.50 (2)	2.86 (2)	3.50 (3)	3.50 (3)	3.50 (3)	3.50 (3)	5.90(5)	5.50 (5)	5.50 (5)	5.50 (5)	4.42 (3)
STR3	0.164	0.152	—	0.71 (0)	0.97 (0)	1.13 (1)	0.77 (0)	2.13 (2)	2.13 (2)	4.33 (4)	2.13 (2)	4.53 (4)	4.13 (4)	4.13 (4)	4.13 (4)	3.06 (2)
STR4	0.184	0.171	0.030	—	—	1.60 (1)	1.24 (0)	2.60 (2)	2.60 (2)	4.00 (4)	2.60 (2)	5.00 (4)	4.60 (4)	4.60 (4)	4.60 (4)	3.52 (2)
STR5	0.193	0.181	0.040	0.060	—	1.83 (1)	1.43 (0)	2.83 (2)	2.83 (2)	4.83 (4)	2.13 (2)	5.23 (4)	4.83 (4)	4.83 (4)	4.83 (4)	3.76 (2)
STR6	0.117	0.104	0.047	0.067	0.077	—	0.36 (0)	1.00 (1)	1.00 (1)	3.00 (3)	1.00 (1)	3.00 (3)	3.00 (3)	3.00 (3)	3.00 (3)	1.92 (1)
STR7	0.132	0.120	0.032	0.052	0.061	0.015	—	1.36 (1)	1.64 (1)	3.36 (3)	1.36 (1)	3.76 (3)	3.36 (3)	3.36 (3)	3.36 (3)	2.29 (1)
ADAM1	0.159	0.147	0.089	0.109	0.119	0.042	0.057	—	3.60 (3)	4.00 (4)	0.00(0)	3.60 (3)	4.00 (4)	4.00 (4)	4.00 (4)	0.92 (0)
ADAM2	0.159	0.147	0.089	0.109	0.119	0.042	0.057	0.151	—	4.00 (4)	0.00 (0)	3.60 (3)	4.00 (4)	4.00 (4)	4.00 (4)	0.92 (0)
ADAM3	0.242	0.230	0.173	0.192	0.202	0.125	0.140	0.167	0.167	—	4.00 (4)	0.40 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	4.92 (4)
ADAM4	0.159	0.147	0.089	0.109	0.089	0.042	0.057	0.000	0.000	0.167	—	3.60 (3)	4.00 (4)	4.00 (4)	4.00 (4)	0.92 (0)
ADAM5	0.260	0.247	0.190	0.210	0.219	0.142	0.158	0.151	0.151	0.017	0.151	—	0.40 (0)	0.40 (0)	0.40 (0)	4.52 (3)
VAS1	0.242	0.230	0.173	0.192	0.202	0.125	0.140	0.167	0.167	0.000	0.167	0.017	—	0.00 (0)	0.00 (0)	4.92 (4)
VAS2	0.242	0.230	0.173	0.192	0.202	0.125	0.140	0.167	0.167	0.000	0.167	0.017	0.000	—	0.00 (0)	4.92 (4)
VAS3	0.242	0.230	0.173	0.192	0.202	0.125	0.140	0.167	0.167	0.000	0.167	0.017	0.000	0.000	—	4.92 (4)
VAS4	0.197	0.185	0.128	0.147	0.157	0.080	0.095	0.039	0.039	0.205	0.039	0.189	0.205	0.205	0.205	—

Примечание. Выше диагонали — среднее число нуклеотидных различий (число фиксированных различий), ниже диагонали — среднее число нуклеотидных замен на один сайт  $\times 10^{-2}$ . Код популяции см. табл. 1.



**Таблица 3.** Распределение генетической изменчивости (AMOVA) у видов *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* по данным хпДНК

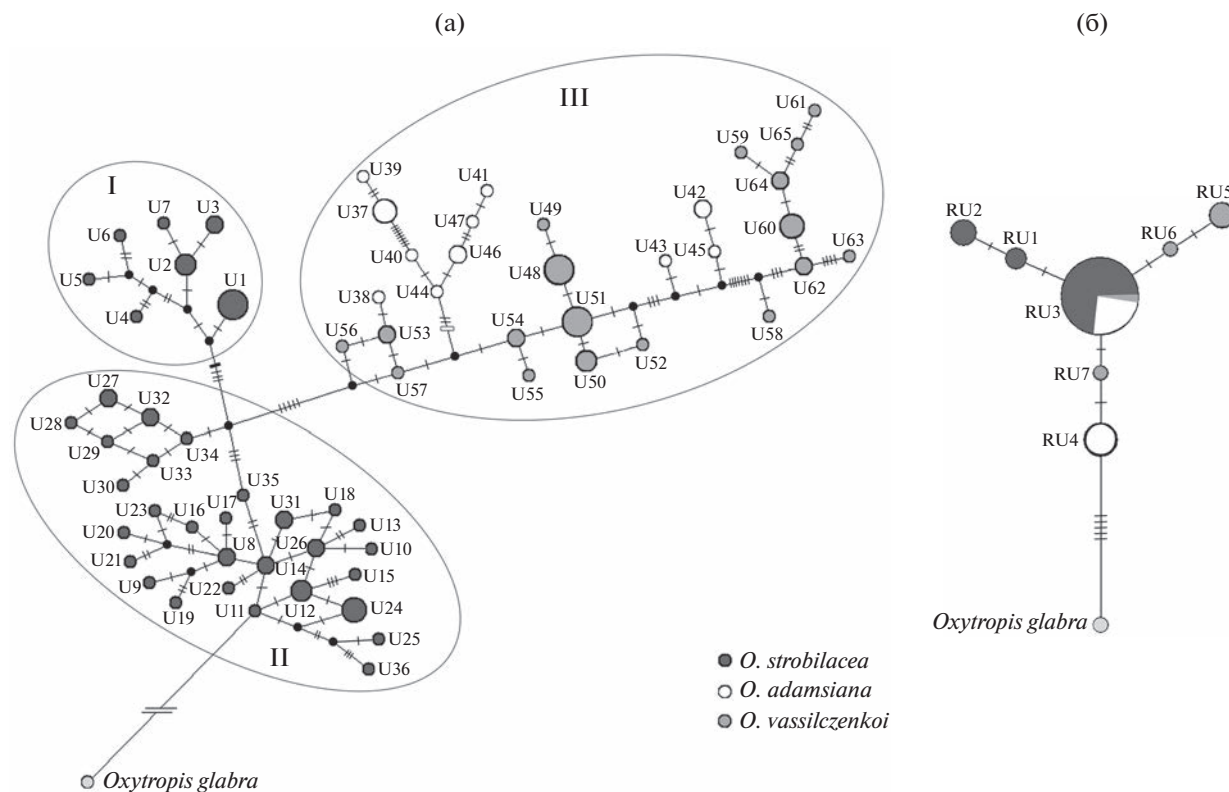
Источник дисперсии	Генетические различия (%) между		
	группами	популяциями внутри групп	особями в популяции
<b>Популяции видов <i>Oxytropis</i></b>			
Одна группа: (все популяции <i>O. strobilacea</i> )	—	54.35*	45.65
Одна группа: (все популяции <i>O. adamsiana</i> )	—	43.34**	56.66
Одна группа: (все популяции <i>O. vassilczenkoi</i> )	—	77.57*	22.43
Три группы: (все популяции <i>O. strobilacea</i> ), (все популяции <i>O. adamsiana</i> ), (все популяции <i>O. vassilczenkoi</i> )	27.50*	45.16*	27.33*
<b>Гаплогруппы, выявленные в Network анализе</b>			
Три группы: (I), (II), (III)	35.86*	37.64*	26.50*
Две группы: (I), (II)	47.34**	20.41*	32.25*
Две группы: (I), (III)	45.88**	36.87*	17.26*
Две группы: (I и II), (III)	27.09**	46.45*	26.46*
Две группы: (II), (III)	26.94**	43.43*	29.63*

Примечание. \*  $P < 0.0001$ ; \*\*  $0.0009 < P < 0.05$ . Уровень значимости определен на основе 1023 пермутаций.

все хлоротипы *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* (U37–U65), в которой их распределение не соответствует ни популяционной, ни таксономической принадлежности, что указывает на генетическую однородность данной группы (рис. 2а). В гаплогруппах I и II соседние хлоротипы связаны, в основном, 1–2 мутационными переходами, в то время как в гаплогруппе III некоторые хлоротипы удалены друг от друга на 4–8 мутационных шагов (рис. 2а). Наличие альтернативных связей (петлевые структуры в сети) между хлоротипами в гаплогруппах II и III (рис. 2а) не позволяет однозначно установить взаимоотношения между популяциями каждого из видов. Только гаплогруппа I, включающая хлоротипы U1–U7 популяций STR1 и STR2 *O. strobilacea*, имеет специфические маркеры: две замены – А в позициях 1468 и 2130 общей матрицы, у всех других G и T соответственно, и вставка четырех нуклеотидов (TTTA, позиции 257–260), отсутствующая у всех других. Иерархический AMOVA показал, что ~36% изменчивости обусловлено различиями между тремя гаплогруппами (табл. 3). Однако необходимо отметить, что генетические различия между гаплогруппой I и гаплогруппами II и III в 1.7 раза выше таковых между гаплогруппами II и III (табл. 3), что свидетельствует о значительной генетической обособленности гаплогруппы I.

Таким образом, филогенетический анализ генеалогических связей хлоротипов и выявленные специфические молекулярные маркеры показывают, что у трех близкородственных видов ряда *Strobilacei* секции *Orobia* рода *Oxytropis* существует три эволюционные ветви/линии хпДНК: 1) *O. strobilacea* (популяции STR1 и STR2); 2) *O. strobilacea* (популяции STR3–STR7); 3) *O. adamsiana*–*O. vassilczenkoi*.

Регион ITS рДНК амплифицирован у 71 образца: *O. strobilacea* (40 образцов), *O. adamsiana* (14) и *O. vassilczenkoi* (17), представляющих все выявленные в данной работе гаплотипы хпДНК. 19 образцов с внутригеномной изменчивостью были исключены из дальнейшего анализа. Нуклеотидные последовательности ITS 52 образцов характеризуются одинаковой длиной (603 п.н.) и низкой нуклеотидной изменчивостью: 597 сайтов были мономорфными и шесть вариabельными и информативными согласно методу максимальной экономии. Четыре замены (позиции 119, 122, 166, 227) обнаружено в ITS1 и две (позиции 466, 564) – в ITS2. Выявлено семь гаплотипов (риботипов), которые депонированы в DDBJ/ENA/Genbank-INS-DC под номерами доступа OV257425–OV257433. *O. strobilacea* принадлежат три риботипа (RU1–RU3), *O. adamsiana* – два риботипа (RU3 и RU4), *O. vassilczenkoi* – четыре риботипа (RU3, RU5–RU7). Риботип RU3 является общим для всех трех видов, он наиболее распространен у *O. strobilacea* (27 образцов), у *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* представлен в 9 и одном образцах соответственно. Медианная сеть генеалогических связей риботипов имеет звездчатую структуру (рис. 2б), в центре которой расположен риботип RU3, связанный одним мутационными переходами с другими риботипами (рис. 2б). Следует отметить, что у *O. strobilacea* риботип RU1 определен только в образцах популяции STR1, а RU2 – только в STR2.



**Рис. 2.** Филогенетические связи видов *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi*: (а) – генеалогическая сеть хлоротипов хпДНК (U1–U65), построенная с помощью MJ-метода. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки – гипотетические хлоротипы, поперечные тонкие пересекающие линии на ветвях – мутационные события, толстые черные и белые пересекающие линии – индели, вставки и делеции нуклеотидов соответственно. Сплошной линией обозначены гаплогруппы I–III. Мутации для *O. glabra*, используемого в качестве внешней группы, не указаны и не рассматриваются; (б) – генеалогическая сеть риботипов ITS рДНК (RU1–RU7), построенная с помощью RM-метода. Размер окружностей отражает частоту встречаемости риботипов, поперечные тонкие пересекающие линии на ветвях – мутационные события.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей IGS *psbA–trnH* + *trnL–trnF* + *trnS–trnG* хпДНК у *O. strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* выявил высокий уровень генетического разнообразия (табл. 1). Установленные высокие показатели генетической изменчивости для *O. strobilacea* (табл. 1) в целом характерны для полиморфных видов с обширным ареалом. Так, у обитающего на севере Китая *O. diversifolia* E. Peter (Wang *et al.*, 2021) по данным нуклеотидного полиморфизма пяти IGS хпДНК (*trnT–psbD*, *petN–psbM*, *trnS–trnG*, *psbE–petL* и интрона *rpl16*) также выявлено высокое генетическое разнообразие ( $h = 0.880$ ,  $\pi = 0.0006$ ). Близкие значения параметров генетического разнообразия имели широко распространенные виды *O. oxyphylla* (Pall.) DC. и *O. lanata* (Pall.) DC. (Холина и др., 2019), которые, как и изученные популяции *O. strobilacea* и высокополиморфная популяция ADAM5 *O. adamsiana*, находятся в Байкальской Сибири – одном из центров видообразования и разнообразия

рода *Oxytropis* (Малышев, Пешкова, 1984; Положий, 2003). Байкальский очаг видообразования характеризуется уникальностью и богатством видового состава флоры, что обусловлено орографией и особенностями климата данного региона (Малышев, Пешкова, 1984; Намзалов, 2009). Вероятно, установленный уровень полиморфизма популяций *O. strobilacea* и *O. adamsiana* может быть связан с разнообразием эколого-ценотических условий произрастания, а также с соответствием этих условий экологическим потребностям видов.

В то же время для анadyро-чукотского эндемика *O. vassilczenkoi*, обитающего, в основном, в арктических широтах, высокий уровень гаплотипического разнообразия (табл. 1) является не совсем обычным. Известно, что для эндемичных видов в целом характерен невысокий уровень полиморфизма. Так, у *O. neimonggolica* C.W. Chang & Y.Z. Zhao, узлокального эндемичного вида, произрастающего на севере Китая, по данным изменчивости пяти IGS хпДНК в популяциях  $h$  изменялось от 0.250 до 0.679 (Wang *et al.*, 2021). Что

касается арктических видов, для изученных нами ранее видов *Oxytropis* секции *Arctobia* (Холина и др., 2020) и *Gloeocephala* (Kholina et al., 2022) характерно наличие мономорфных или слабополиморфных популяций, с высокой степенью дивергенции, что в значительной степени объясняется историей формирования ареалов видов. При наступлении ледников популяции резко сокращали площади и эффективную численность (эффект “бутылочного горлышка”), а при реколонизации постледниковых территорий популяции восстанавливались из сохранившихся рефугиумов (эффект “основателя”).

Допустимо предположить, что неожиданно высокий для арктического эндемика уровень генного разнообразия *O. vassilczenkoi* отчасти обусловлен его происхождением от высокополиморфного *O. strobilacea* и сохранением анцестрального полиморфизма. Подобный уровень изменчивости, связанный с поддержанием анцестрального полиморфизма, был обнаружен нами ранее (Kholina et al., 2021) в популяциях реликтового эндемичного вида *O. triphylla* (Pall.) Pers. ( $h$  от 0.800 до 1.000), а также в реликтовых популяциях *Astragalus onobrychis* L. (Plenk et al., 2020), в которых гаплотипическое разнообразие по данным полиморфизма *atp1-H*, *ucf1* и интрона *rpL16* хпДНК изменялось от 0.833 до 1.000. Кроме того, разнообразие гаплотипов в популяциях *O. vassilczenkoi*, особенно в популяции VAS4 (восемь гаплотипов в выборке из 13 растений, табл. 1), может указывать на существование рефугиумов на данной территории во время колебаний климата. Наконец, определенный вклад может вносить система размножения видов *Oxytropis* (половой тип репродукции и перекрестное опыление) и обмен генами между существующими популяциями.

Отсутствие нуклеотидной дивергенции между популяциями *O. vassilczenkoi* из Магаданской области (VAS1, VAS2) и с Чукотки (VAS3) указывает на то, что эти локальности являются частями одной региональной метапопуляции, между которыми происходит интенсивный обмен генами. Популяция VAS4 из Олюторского р-на Камчатского края значительно дивергирована от трех других ( $D_{XY} = 0.00205$ , табл. 2), и значения дивергенции даже превышают межвидовые ( $D_{XY} = 0.00091$ , 0.00170, табл. 2). Подобные высокие значения нуклеотидной дивергенции были определены между популяциями *O. ochotensis* Bunge из Магаданской области и Камчатки ( $D_{XY} = 0.00167$ ), расстояние между которыми было около 800 км, а также между филетическими линиями хпДНК *O. ruthenica* Vass. ( $D_{XY}$  от 0.00188 до 0.00206) (Козыренко и др., 2020). Высокий уровень межпопуляционной дивергенции у *O. vassilczenkoi* (77.57%, табл. 3) связан, вероятнее всего, именно с изолированным положением популяции VAS4. Это отражено и в

медианной сети генеалогических связей хлоротипов (рис. 2а), в которой группа хлоротипов популяции VAS4 (U58–U65) занимает терминальную позицию на ветви, формирующей гаплогруппу III. Следует отметить, что только в популяции VAS4 были обнаружены риботипы RU6 и RU7 ITS рДНК, отсутствующие в остальных изученных популяциях.

Показатели нуклеотидной дивергенции между популяциями *O. strobilacea* (табл. 2) в ряде случаев также превышают межвидовые значения, что указывает на активное протекание микроэволюционных процессов у данного вида. Об этом свидетельствует и формирование двух филетических линий хпДНК (рис. 2а), у одной из которых присутствуют специфические маркеры. Наличие у *O. strobilacea* двух обособленных филетических линий, уровень дифференциации между которыми превышает таковой между *O. strobilacea* и двумя остальными видами (табл. 3), достаточно неожиданно, учитывая компактное географическое расположение популяций *O. strobilacea* в Прибайкалье (рис. 1). Подобная диверсификация может быть обусловлена, в значительной мере, сложной топографией региона. Влияние топографии, как одного из ведущих факторов видообразования у растений, неоднократно было отмечено ранее (Blanco-Pastor et al., 2019; Mahmoudi Shamsabad et al., 2019) и нами (Kholina et al., 2018) для *O. glandulosa* Turcz. – узколокального эндемика, обитающего на восточном побережье оз. Байкал. У *O. glandulosa* были обнаружены две дивергентные филетические линии, каждая из которых имела специфические маркеры, что позволило нам предположить наличие криптического вида. Помимо влияния рельефа и изоляции популяций, определенный вклад в формирование филетических линий *O. glandulosa* внесло наличие хромосомных рас у этого вида, что характерно и для *O. strobilacea* ( $2n = 16, 32, 48$  и  $64$ ) (Малышев, 2008а). Внутривидовая дивергенция, приводящая к появлению четко обособленных филетических линий, выявлена нами и для других видов *Oxytropis*: *O. ruthenica* (Козыренко и др., 2020), *O. anadyrensis*, *O. borealis* и *O. middendorffii* секции *Gloeocephala* (Kholina et al., 2022). По данным нуклеотидного полиморфизма пяти IGS хпДНК (Wang et al., 2021) у *Oxytropis leptophylla* (Pall.) DC., обитающего на севере Китая, выявлены две филетические линии, которые в генеалогической сети гаплотипов разделены 18 мутационными шагами, а на филогенетическом древе формируют разные обособленные ветви.

Невысокий уровень дифференциации, установленный между тремя близкими видами ряда *Strobilacei* (табл. 3), характерен и для других близкородственных видов *Oxytropis*, например, для пяти видов секции *Orobia* (35.2%) (Козыренко и др., 2020). Между близкими видами *Potentilla vulgarica* Juz. и *P. evermanniana* Fisch. ex Ledeb. по

данным нуклеотидного полиморфизма IGS *ndhC-trnV* и *psbA-trnH* (Schanzer *et al.*, 2020) генетические различия составляют 16.18% от общей изменчивости, а для четырех близких видов *Indigofera* L., обитающих в Восточной Азии, по данным *ndhJ-trnF* и *trnD-trnT* (Zhao *et al.*, 2017) на межвидовые различия приходится только 7.56% изменчивости, при этом у видов есть общие гаплотипы.

Что касается изменчивости ITS рДНК у трех видов ряда *Strobilacei*, всего обнаружено семь риботипов и из них один общий для всех, в сравнении с данными хпДНК – 65 хлоротипов и общих нет (рис. 2а, 2б). Подобная картина встречается у других видов растений (Hou *et al.*, 2017; Blanco-Pastor *et al.*, 2019; Козыренко и др., 2020). Так, для пяти видов рода *Dendrobium* Sw. было выявлено 34 хлоротипа по данным нуклеотидного полиморфизма IGS *accD-psaI*, *trnC-pepN* и *rps15-yef1* хпДНК и 25 риботипов ITS, из последних два наиболее распространенных были общими для разных видов (Hou *et al.*, 2017). Авторы объясняют наличие общих риботипов проявлением анцестрального полиморфизма предкового вида или существующим потоком генов, а также гибридизацией. В случае с видами ряда *Strobilacei* допустимо предположить вероятность гибридизации между *O. strobilacea* и *O. adamsiana* в зоне их симпатрии, однако по данным хпДНК эти виды генетически обособлены. Что касается *O. vassilczenkoi*, с учетом современного распространения видов, гибридизация между ним и остальными двумя видами маловероятна. Поэтому наличие общего риботипа у трех видов ряда *Strobilacei* в большей мере может быть связано именно с полиморфизмом предковой формы, быстрой адаптивной радиацией и неполным расхождением генеалогических линий. Ранее, при изучении шести видов *Oxytropis*, относящихся к трем разным под родам *Phacoxytropis*, *Tragacanthoxytropis* и *Oxytropis* рода *Oxytropis* (Холина и др., 2021б), нами было выявлено наличие у них общего риботипа. Это может быть обусловлено их общим происхождением и относительно недавней быстрой радиацией, отмеченной для рода *Oxytropis* (Shavvon *et al.*, 2017). Быстрая радиация видов в ряде случаев может сопровождаться быстрой изоляцией, как показано для видов *Indigofera* (Zhao *et al.*, 2017). На неполное расхождение филетических линий *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* указывает и распределение хлоротипов, не соответствующее их таксономической принадлежности (гаплогруппа III, рис. 2а), как это было выявлено нами ранее для четырех видов *Oxytropis* секции *Polyadena* (Холина и др., 2021а), а также для трех видов комплекса *Acanthophyllum squarrosum* (Mahmoudi Shamsabad *et al.*, 2019) и для 12 видов *Potentilla* (Schanzer *et al.*, 2020).

Формирование филогенетических связей под взаимным влиянием разных эволюционных процессов приводит к появлению сложной картины

взаимоотношений видов *Oxytropis* ряда *Strobilacei* секции *Orobia*, как проявления сетчатой эволюции, свойственной данному роду. Подобная картина была отмечена нами и во взаимоотношениях видов *Oxytropis* других секций (Холина и др., 2016, 2021а; Kholina *et al.*, 2021).

\* \* \*

В изученных популяциях *O. strobilacea*, *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* ряда *Strobilacei* секции *Orobia* Азиатской России выявлен высокий уровень гаплотипического разнообразия, уровень нуклеотидного разнообразия варьирует от низкого до среднего. Наличие двух филетических линий *O. strobilacea* указывает на интенсивно идущие процессы диверсификации. Виды *O. adamsiana* и *O. vassilczenkoi* генетически обособлены от *O. strobilacea*, образуют единый генетический комплекс вследствие общего происхождения и неполного расхождения генеалогических линий, при этом отсутствие общих хлоротипов подтверждает статус *O. vassilczenkoi* как самостоятельного вида.

Авторы выражают благодарность И.Н. Поспелову и Е.Б. Поспеловой за предоставление образцов *O. adamsiana* с п-ова Таймыр.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильченко И.Т., Федченко Б.А., Шишкин Б.К. Род *Oxytropis* // Флора СССР. М.–Л.: Изд. АН СССР. 1948. Т. 13. С. 1–229.
- Князев М.С. Заметки по систематике и хорологии видов *Oxytropis* на Урале. V. Секция *Orobia* // Ботан. журн. 2005. Т. 90. № 3. С. 415–423.
- Кожевников Ю.П. Соотношение видов сосудистых растений северной тайги и лесотундры в средней части бассейна р. Анадырь // Ботан. журн. 1980. Т. 65. № 3. С. 361–367.
- Козыренко М.М., Холина А.Б., Артюкова Е.В., Колдаева М.Н., Якубов В.В., Прокопенко С.В. Молекулярно-филогенетическая характеристика эндемичных дальневосточных близкородственных видов секции *Orobia* рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Генетика. 2020. Т. 56. № 4. С. 421–432. <https://doi.org/10.1134/S1022795420040043>
- Мальшев Л.И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России // Turczaninowia. 2008а. Т. 11. № 4. С. 5–141.
- Мальшев Л.И. Фенетика и хорология остролодок секции *Orobia* Bunge (род *Oxytropis* DC., Fabaceae) в Азиатской России // Растительный мир Азиатской России. 2008б. № 1. С. 3–9.
- Мальшев Л.И. Род *Oxytropis* DC. // Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 237–248.
- Мальшев Л.И., Пешкова Г.А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск: Наука, 1984. 364 с.

- Намзалов Б.Б. Байкальский фитогеографический узел как новейший центр эндемизма Внутренней Азии // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16. № 4. С. 563–571. <https://doi.org/10.1134/S1995425509040079>
- Павлова Н.С. Остролодочник – *Oxytropis* DC. // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Л.: Наука, 1989. Т. 4. С. 236–280.
- Пешкова Г.А. Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири / Новосибирск, 2001. 192 с.
- Положий А.В. К вопросу о происхождении и эволюции рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Ботан. журн. 2003. Т. 88. № 10. С. 55–59.
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В., Андриянова Е.А. Филогенетические взаимоотношения видов *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* и *Phacoxytropis* (Fabaceae) Азиатской России на основе анализа нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хлоропластного генома // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 895–909. <https://doi.org/10.1134/S1022795416060065>
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В. Современное состояние популяций эндемичных видов *Oxytropis* Байкальской Сибири и их филогенетические связи по данным секвенирования маркеров хлоропластной ДНК // Генетика. 2018. Т. 54. № 7. С. 795–806. <https://doi.org/10.1134/S1022795418070050>
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В. Дивергенция видов *Oxytropis* секции *Verticillares* (Fabaceae) степной флоры Байкальской Сибири на основе анализа хлоропластной ДНК // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 665–674. <https://doi.org/10.1134/S0016675819060055>
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Якубов В.В., Хорева М.Г., Андриянова Е.А., Мочалова О.А. Филогенетические отношения видов *Oxytropis* секции *Arctobia* северо-востока Азии по данным секвенирования межгенных спейсеров хлоропластного и ITS ядерного геномов // Генетика. 2020. Т. 56. № 12. С. 1386–1397. <https://doi.org/10.1134/S1022795420120091>
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Позднякова Т.Э. Изменчивость хлоропластной ДНК видов *Oxytropis* секции *Polyadena* (Fabaceae) Азиатской России: популяционный анализ и филогенетические связи // Изв. РАН. Сер. биол. 2021а. № 1. С. 19–29. <https://doi.org/10.1134/S1062359021010076>
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Колдаева М.Н., Санданов Д.В., Селютина И.Ю. Филогенетические связи видов Азиатской России подродов *Phacoxytropis* и *Tragacanthoxytropis* рода *Oxytropis* на основе полиморфизма маркеров хлоропластного и ядерного геномов // Генетика. 2021б. Т. 57. № 9. С. 1039–1053. <https://doi.org/10.31857/S0016675821090058>
- Юрцев Б.А. Материалы к систематике арктических остролодочников // Ботанические материалы Гербария БИН им. В.Л. Комарова АН СССР. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1959. Т. XIX. С. 233–273.
- Юрцев Б.А. *Oxytropis* DC. // Арктическая флора СССР. Л.: Наука, 1986. Вып. 9. Ч. 2. С. 61–146.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
- Blanco-Pastor J.L., Fernández-Mazuecos M., Coello A.J., Pastor J., Vargas P. Topography explains the distribution of genetic diversity in one of the most fragile European hotspots // Divers. Distrib. 2019. V. 25. P. 74–89. <https://doi.org/10.1111/ddi.12836>
- Bonfeld J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite v3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. 2010. V. 10. P. 564–567.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Hou B., Luo J., Zhang Y., Niu Zh., Xue Q., Ding X. Iteration expansion and regional evolution: phylogeography of *Dendrobium officinale* and four related taxa in southern China // Sci. Rep. 2017. V. 7. 43525. 13 p. <https://doi.org/10.1038/srep43525>
- Kholina A., Kozыренко M., Artyukova E., Sandanov D., Selyutina I., Chimitov D. Plastid DNA variation of the endemic species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae) // Turk. J. Bot. 2018. V. 42. P. 38–50. <https://doi.org/10.3906/bot-1706-11>
- Kholina A., Kozыренко M., Artyukova E., Sandanov D., Selyutina I. Genetic diversity of *Oxytropis* section *Xerobia* (Fabaceae) in one of the centres of speciation // Genetica. 2021. V. 149. № 2. P. 89–101. <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00115-9>
- Kholina A., Kozыренко M., Artyukova E., Yakubov V., Khoreva M., Andrianova E., Mochalova O., Sandanov D. Phylogenetic relationships of *Oxytropis* section *Gloecephala* from Northeast Asia based on sequencing of the intergenic spacers of cpDNA and ITS nrDNA // Genetica. 2022. V. 150. P. 117–128. <https://doi.org/10.1007/s10709-022-00152-y>
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
- Mahmoudi Shamsabad M., Assadi M., Parducci L. Phylogeography and population genetics of *Acanthophyllum squarrosum* complex (Caryophyllaceae) in the Irano-Turanian region // Syst. Biodivers. 2019. V. 17. № 4. P. 412–421. <https://doi.org/10.1080/14772000.2019.1590476>
- Mir B.A., Koul S., Kumar A., Kaul M.K., Soodan A.S., Raina S.N. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA in *Withania somnifera* (Linn.) Dunal // Indian J. Biotechnol. 2010. V. 9. P. 325–328.
- Plenk K., Willner W., Demina O.N., Höhn M., Kuzemko A., Vassilev K., Kropf M. Phylogeographic evidence for long-term persistence of the Eurasian steppe plant *As-tragalus onobrychis* in the Pannonian region (eastern Central Europe) // Flora. 2020. V. 264. 151555. 10 p. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151555>

- Schanzer I.A., Fedorova A.V., Shelepova O.V., Suleymanova G.F. Molecular phylogeny and phylogeography of *Potentilla multifida* L. agg. (Rosaceae) in Northern Eurasia with special focus on two rare and critically endangered endemic species, *P. vulgarica* and *P. eversmanniana* // Plants. 2020. V. 9. 1798. 29 p. <https://doi.org/10.3390/plants9121798>
- Shavvon R.S., Kazempour-Osaloo S., Maassoumi A.A., Moharrek F., Karaman Erkul S., Lemmon A., Lemmon E.M., Michalak I., Muellner-Riehl A.N., Favre A. Increasing phylogenetic support for explosively radiating taxa: The promise of high-throughput sequencing for *Oxytropis* (Fabaceae) // J. Syst. Evol. 2017. V. 55. № 4. P. 385–404. <https://doi.org/10.1111/jse.12269>
- Wang H., Liu P.-L., Li J., Yang H., Li Q., Chang Zh.-Y. Why more leaflets? The role of natural selection in shaping the spatial pattern of leaf-shape variation in *Oxytropis diversifolia* (Fabaceae) and two close relatives // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. Article 681962. 17 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.681962>
- Zhao X.-L., Gao X.-F., Zhu Zh.-M., Gao Y.-D., Xu B. The demographic response of a deciduous shrub (the *Indigofera bungeana* complex, Fabaceae) to the Pleistocene climate changes in East Asia // Sci. Rep. 2017. V. 7. 697. 13 p. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00613-x>

## Genetic Divergence of Closely Related Species *Oxytropis strobilacea*, *Oxytropis adamsiana* and *Oxytropis vassilczenkoi* (Series *Strobilacei* of the Section *Orobia* Fabaceae) from Asian Russia

A. B. Kholina<sup>1,\*</sup>, E. V. Artyukova<sup>1</sup>, V. V. Yakubov<sup>1</sup>, M. G. Khoreva<sup>2</sup>, O. A. Mochalova<sup>2</sup>, D. V. Sandanov<sup>3</sup>, and I. Yu. Selyutina<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, RAS, Stoletiya str., 159, Vladivostok, 690022 Russia

<sup>2</sup> Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the RAS, Portovaya str., 18, Magadan, 685000 Russia

<sup>3</sup> Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, RAS, Sakhyanovoi str., 6, Ulan-Ude, 670047 Russia

<sup>4</sup> Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch, RAS, Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090 Russia  
\*e-mail: kholina@biosoil.ru

The genetic diversity and divergence of closely related species *Oxytropis strobilacea*, *O. adamsiana*, and *O. vassilczenkoi* series *Strobilacei* of the section *Orobia* (Fabaceae) from Asian Russia were studied using the data of nucleotide polymorphism of the *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *trnS-trnG* intergenic spacers of cpDNA, as well as the ITS nrDNA. Most populations are characterized by an average and high level of chloroplast genetic diversity ( $h$  varies from 0.600 to 1.000). 65 chlorotypes were identified, no shared chlorotypes were found in taxa, and that confirms the status of *O. vassilczenkoi* as a separate species. Two phyletic lineages were found for *O. strobilacea* that indicates an intensively proceeding diversification process. Among the seven identified ITS ribotypes, one ribotype was shared for all three species, probably, due to their common origin and relatively recent divergence.

**Keywords:** Fabaceae, *Oxytropis*, *Orobia*, genetic diversity, divergence, chloroplast DNA, ITS

УДК 579.262:57.022

## АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДВУХ БАКТЕРИОБИОНТОВ ЛИШАЙНИКОВ, *Lichenibacterium ramalinae* и *Lichenibacterium minor*: ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АДАПТАЦИИ

© 2023 г. Т. А. Панкратов®

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ “Биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

®E-mail: tpankratov@gmail.com

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

Успешные инвазия и адаптация бактерий в лишайниковый симбиоз требует вовлечения ряда физиологических механизмов, которые регулируют взаимодействия между бактериобионтами, микобионтами и альгобионтами и обеспечивают оптимизацию роста и развития таллома. Для выявления таких факторов был проведен анализ геномов двух бактериобионтов лишайников *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor*. Традиционные для ризобий гены нодуляции *nod* не обнаружены. Высказано предположение о выполнении сходной функции белком TIGR02302. Обнаружены гены, кодирующие белки, связанные с реализацией программ планктонного и биопленочного фенотипа – флагеллины и пилины. Эти гены имеют высокий уровень сходства с генами бактерий – симбионтов растений. В геномах исследованных бактерий обнаружены генетические детерминанты факторов вирулентности – белков инвазии локуса *B*, *integration host factor* (IHF), сенсорных гистидин киназ, белков рецепции и транспорта сидерофоров, монооксигеназы синтеза антибиотиков (*Abm*). Перечисленные гены имеют сходство с таковыми у организмов, образующих ассоциации разной степени связанности с растениями. Полученные данные позволили укрепить ранее высказанное предположение о приоритетной ассоциации бактерий семейства *Lichenibacteriaceae* с зелеными водорослями лишайников.

**Ключевые слова:** *Lichenibacterium*, факторы нодуляции, вирулентность, гистидин киназы, сидерофобы, лишайники

**DOI:** 10.31857/S1026347023010092, **EDN:** IMPHJF

В эволюции симбиозов важными факторами коадаптации партнеров являются специфические факторы взаимодействия клеток организмов друг с другом. При формировании бактериально-растительных и грибо-бактериальных симбиозов основными факторами коадаптации являются ферменты, белковые комплексы, полисахариды и жирные кислоты, которые определяют морфологические и физиологические изменения в клеточных стенках, плазматической мембране и цитоплазме клеток партнерских организмов. Эти же факторы могут определять вирулентность патогенных микроорганизмов. Особенностью лишайниковых симбиозов является многокомпонентный состав сообщества. Таллом лишайника – это миниатюрная экосистема, в которой мутуализм и паразитизм, а также комменсализм и другие формы сосуществования могут проявляться на различных уровнях взаимодействия участников симбиоза.

Геномные и эколого-таксономические исследования последнего десятилетия позволили об-

наружить в составе лишайниковых симбиозов специфические группы микроорганизмов, адаптированных к обитанию в их талломах. Это в корне изменило представление о лишайниках как о бинарах, сформированных микобионтом и фотобионтом. Лишайники оказались резервуаром грибов и водорослей широкого таксономического и экологического спектра: от примитивных зигомицетовых до совершенных базидиомицетовых грибов; от традиционных водорослей *Asteroloris* sp. и *Trebouxia* sp. до представителей различных порядков зеленых водорослей; от мутуалов до паразитов; от стимулирующих рост растений бактерий до микроорганизмов, солибилизирующих нерастворимые в воде минералы.

Бактериобионты лишайников представлены специфичной для конкретного рода или вида лишайника обособленной группой, доминантами в которой являются представители порядков *Hypomicrobiales*, *Rhodospirillales*, *Acidobacteriales* (Hodkinson et al., 2012; Lee et al., 2014; Erlacher et al., 2015), представители филумов *Planctomyce-*



tes, Verrucomicrobia и, сравнительно недавно, опубликованы данные о присутствии в лишайниках пока некультивируемых бактерий новой филогенетической группы *candidatus "Eremiobacterota"* (Noh *et al.*, 2020, 2021).

Наличие узкого и специфичного для каждого из родов лишайников набора бактериальных компонентов позволяет предположить наличие факторов, отбирающих те или иные группы бактерий в лишайниковый симбиоз. Адаптация бактерий в лишайниковом симбиозе зависит от степени реализации их функциональных возможностей: фиксации атмосферного азота, углекислого газа, участия в защите микробиома лишайника от патогенов и стрессовых факторов среды. Важным аспектом жизнедеятельности является также способность выживать в кислой среде под давлением антибиотиков, синтезируемых микобиотом (лишайниковых кислот).

В этой связи, анализ геномных данных отдельных облигатных бактериобионтов может внести ясность в проблему адаптации бактерий в талломах лишайников и понять механизмы их выживания и успешной реализации генетической программы. В данной работе была поставлена задача проанализировать генетические детерминанты, потенциально определяющие характер инвазии двух облигатных бактериобионтов лишайников, *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor* в таллом лишайника и факторов, способствующих их выживанию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Штаммы RmlP001<sup>T</sup> и RmlP026<sup>T</sup> рода *Lichenibacterium* выделены ранее (Pankratov *et al.*, 2020) из отмытых от эпифитной микрофлоры гомогенатов лишайника *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и охарактеризованы как два новых вида – *L. ramalinae* и *L. minor*. Талломы лишайника были собраны со стволов березы (*Betula pubescens* Ehrh.) на территории Беломорской биологической станции МГУ им. М.В. Ломоносова (66.549970, 33.113218) в 2016 г.

**Анализ геномов.** Аннотированные в GenBank геномные сборки анализировали с использованием программ Unipro UGENE 38.1 (Okonechnikov *et al.*, 2012) и BIOEDIT v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Выравнивание амнокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма MUSCLE в программе MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Филогенетический анализ и построение деревьев осуществляли с использованием программ MEGA X, Unipro UGENE 38.1, сервиса IQ Tree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (Trifinopoulos *et al.*, 2016) и FigTree 1.4.4 с использованием конкатенированных аминокислотных последовательностей целевых белков. Для поиска

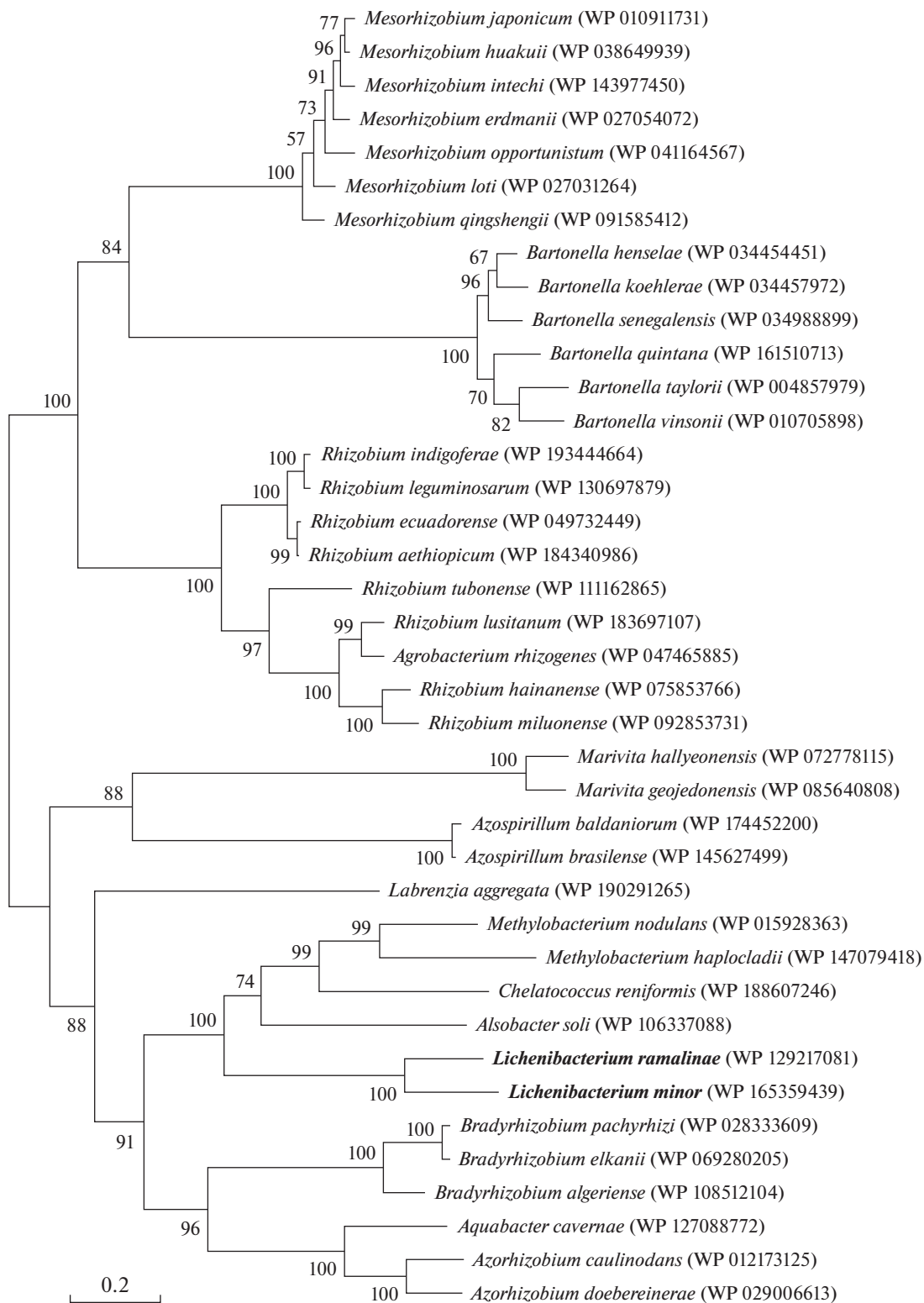
ортологических генов использовали базу данных COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>) (Tatusov *et al.*, 1997).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Белки систем нодуляции.** В ходе анализа геномов двух видов *Lichenibacterium* белки, близкие по первичной структуре под белкам бактерий группы 'rhizobia' обнаружены не были. Таким образом, следует исключить вероятность присутствия сходного с ризобияльными бактериями механизма инвазии в хозяйский организм. Несмотря на то, что группы генов *nod* в геномах изученных бактерий отсутствуют, у *L. ramalinae* был обнаружен ген, кодирующий белок TIGR02302 (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A068SVH1>). У мутантов *Azorhizobium caulinodans*, нокаутированных по этому гену, была показана утрата способности к инфицированию хозяйского растения и чрезмерной продукции экзополисахарида (Sato *et al.*, 2016). Этот же белок найден у *Brucella suis*, паразита, вызывающего бруцеллез свиней и *Sinorhizobium meliloti*, мутуалистической бактерии люцерны. Белки этого типа обладают высоким генетическим полиморфизмом, так как даже у одного вида, например *Bartonella quintana* (патоген, вызывающий окопную лихорадку), доля нуклеотидных замен может возрасти до уровня 2.5%. Потенциально, белки этого типа могут рассматриваться как факторы инвазии в лишайниковый таллом. Эволюционный филогенетический анализ белков TIGR02302 у *L. ramalinae* и *L. minor* показал (рис. 1), что у обоих штаммов этот ген формирует отдельный кластер в пределах ветви, в которую входят как выделенные из небиологических субстратов бактерии *Chelatococcus reniformis*, *Alsobacter soli* (Gu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018), так и эпифит растений *Methylobacterium haplocladii* (Tani, Sahin, 2013) или клубеньковые симбионты *Methylobacterium nodulans* (Jourand *et al.*, 2004). Учитывая, что среди аннотированных в базе NCBI последовательностей этого гена, большая часть ассоциирована с эпифитными бактериями или бактериями симбионтами растений, мы можем предположить, что бактерии *Lichenibacterium* в лишайниках потенциально могут быть ассоциированы с зелеными водорослями, а не с грибами.

**Флагеллины и пилины.** Особенностью эндолихенобионтов *L. ramalinae* и *L. minor* является наличие у них клеточного цикла развития. На ранних этапах роста культуры их клетки подвижны за счёт жгутика. Позднее они утрачивают жгутик и переходят к пленочному или колониальному росту. Такие особенности жизненного цикла предполагают наличие белков, участвующих в формировании жгутика и контроле его активности – флагеллинов, а также белков фиксации на твердой поверхности – пилинов. Большая часть генов белков





**Рис. 1.** Эволюционный анализ филогении гена TIGR02302 методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones *et al.* w/freq. Показано дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием (-36249.81). Процент деревьев, в которых соответствующие таксоны кластеризуются вместе, показан рядом с ветвями. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, а затем выбора топологии с наибольшим значением логарифмического правдоподобия. Дерево нарисовано в масштабе, длина ветвей измеряется в количестве замен на сайт. В данном анализе участвовали 39 аминокислотных последовательностей. Всего в окончательном наборе данных было 1052 позиции.

**Таблица 1.** Значения гомологии основных генов сборки пилинов *L. ramalinae* и *L. minor* в сравнении с филогенетическими соседями по генам, кодирующим компоненты пилинов

Номер аминокислотной последовательности в геноме	Белок	Гомологичные виды	Величина покрытия	Процент идентичности	Номер в базе GenBank
<b><i>Lichenibacterium minor</i></b>					
WP_129227699	PAP	<i>Bosea thiooxidans</i> (Skipper <i>et al.</i> , 2019)**	100%	51.41	WP_055728783
WP_129224958	PAP	<i>Methylobacterium pseudosasicola</i> (Madhaiyan, Poonguzhali, 2014)***!!	96%	52.74	WP_092042786
WP_129222914	Flp family type IVb pilin	<i>Rhizomicrobium palustre</i> (Ueki <i>et al.</i> , 2010)*	100%	50.00	WP_167081865
WP_129222940	Flp family type IVb pilin	<i>Limoniibacter endophyticus</i> (Li <i>et al.</i> , 2018)*	98%	66.67	WP_189488722
<b><i>Lichenibacterium ramalinae</i></b>					
WP_129217141	Flp family type IVb pilin	<i>Devosia crocina</i> (Verma <i>et al.</i> , 2009)‡	100%	62.26	WP_092425185
WP_129217142	Flp family type IVb pilin	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> (Urakami <i>et al.</i> , 1995)‡	100%	61.1	WP_015596543
WP_129221696	PAP	<i>Methylorubrum populi</i> (Van Aken <i>et al.</i> , 1995)‡	99%	57.03	WP_141950466
WP_129220976	PAP	<i>Methylobacterium pseudosasicola</i> (Madhaiyan, Poonguzhali, 2014)***!!	100%	51.49	WP_092042786
WP_129220479	PAP	<i>Methylobacterium variabile</i> (Gallego <i>et al.</i> , 2005)‡	98%	48.35	WP_157080794
WP_129217136	Flp PAP CpaB	<i>Methylobacterium oxalidis</i> (Tani <i>et al.</i> , 2012)!!	100%	50.18	WP_147024217

Примечание. PAP – белок сборки пилей; \* – корни растений; \*\* – патоген человека; \*\*\* – стимулируют рост растений; !! – эпифиты; ‡ – свободноживущие

сборки пилей исследованных бактерий имеют низкий уровень гомологии с большинством бактерий в пределах класса *Alphaproteobacteria* и только немногие имеют уровень гомологии более 50% (табл. 1).

Низкий уровень гомологии предполагает наличие новых семейств таких белков, что обусловлено селекцией в лишайниковых симбиозах и изоляцией представителей семейства *Lichenibacteriaceae* как отдельно эволюционирующей ветви порядка *Hyphomicrobiales*. Несмотря на тесную ассоциацию бактерий рода *Lichenibacterium* с лишайниками, их пилины имеют более выраженную гомологию с генами корневых симбионтов растений (Ueki *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018), эпифитных (Tani *et al.*, 2012; Madhaiyan, Poonguzhali, 2014) и выделенных из небиологических сред (Urakami *et al.*, 1995; Van Aken *et al.*, 1995; Gallego *et al.*, 2005) представителей класса *Alphaproteobacteria*. Единственный охарактеризованный на данный

момент представитель семейства *Lichenihabitantaceae* (кластера LAR1), *Lichenihabitans psoromatis*, изолированный из лишайника (Noh *et al.*, 2019), несмотря на сходство экологических ниш обитания, не имеет пилинов, а гены флагеллинов ограничены *motA* и тремя генами биосинтеза и экспорта (*fliO*, *fliQ*, *fliJ*).

У обоих видов *Lichenibacterium* присутствуют полные опероны, включающие все необходимые гены для сборки мотора и жгутика (*fliEFGIJKNPQR*; *flgABCDEFGHIJ*; *motA*). Недавно у *Caulobacter crescentus* показано наличие зависимости адгезии от активности комплекса белков, отвечающих за активное перемещение (Hug *et al.*, 2017). В частности, мутанты  $\Delta fliFG$ ,  $\Delta motA$ ,  $\Delta motB$  и  $\Delta fliL$  теряли способность эффективно прикрепляться к поверхности субстрата. Продукты экспрессии этих генов участвовали в механорецепции поверхности и запускали механизм сбрасывания жгутика и перехода к стационарному существова-

нию в виде биопленки на поверхности субстрата. Мутанты, у которых был нокаутирован ген *motA*, не были способны перейти от планктонной стадии к биопленочному фенотипу. Мы предполагаем, что *L. ramalinae* и *L. minor* обладают сходными механизмами формирования биопленочного фенотипа при внедрении клеток этих бактерий в талломы лишайников.

**Белки инвазии локуса В (IalB).** Эти белки ассоциированы с комплексом инвазии в эритроциты у *Bartonella bacilliformis*, эндопаразита семейства Bartonellaceae (Hyphomicrobiales). Ранее было показано (Coleman, Minnick, 2001), что нокаутированные по гену *ialB* бактерии утрачивали способность к адгезии и последующей инвазии в эритроциты. Гомологи этого белка были также обнаружены в бактериях родов *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, ассоциированных с корнями растений. Однако анализа их функции у этих бактерий в литературе найти не удалось. Интересно, что в работе Coleman и Minnick (2003) определение количества белка IalB с помощью SDS-PAGE и иммуноблоттинга показало наибольшее количество IalB в кислых условиях или при 20°C, в то время как при 37°C и в основных условиях синтезировалось наименьшее количество этого белка. Известно (Pankratov, 2012), что водные гомогенаты лишайников имеют pH менее 5.0, а оптимальные температуры для роста большинства бактериальных изолятов нетропических лишайников находятся в диапазоне от 15 до 25°C. В настоящее время эти белки обнаружены, согласно базе ортологичных генов COG, главным образом в группах Alphaproteobacteria (109 организмов) и Gammaproteobacteria (19 организмов) и Betaproteobacteria (1 организм). У бактерий *L. ramalinae* и *L. minor* эти белки могут потенциально использоваться для адаптации к кислой среде талломов.

**Integration host factor (IHF).** Эти белки обычны в прокариотах, так как участвуют в регуляции транскрипции, связывая ДНК и придавая ей специфическую структуру. У обоих видов *Lichenibacterium* они представлены двумя субъединицами,  $\alpha$  и  $\beta$ . Несмотря на то, что эти белки не участвуют напрямую, как например белки нодуляции или секреции, в ассоциации с хозяйским организмом, они способны регулировать ряд функций бактериальной клетки, связанной с вирулентностью, а также резистентностью к ряду факторов. Так, например, у *E. coli* IHF активирует экспрессию определенного набора генов, необходимых для выживания при чрезвычайно низких значениях pH (Bi, Zhang, 2014). Stonehouse и et al. (2008) показали, что инактивация *ihfA* и *ihfB*, генов, кодирующих субъединицы IHF, снижает уровни экспрессии двух основных факторов вирулентности *tcpA* и *ctx* и предотвращает выработку пилина *Vibrio cholerae*, регулируемого токсином, и холерного токсина. У *Lichenibacterium* наиболее близкими гомологами по

этим генам оказались *Rhabdaerophilum calidifontis*, а также представители родов *Camelimonas* и *Microvirga* с уровнем гомологии более 74%. Известно, что два вида рода *Camelimonas* выделены из плаценты и молока теплокровных животных, а среди видов рода *Microvirga* три являются симбионтами растений (Kämpfer et al., 2012; Rad et al., 2014; Zhang et al., 2015). *Rhabdaerophilum calidifontis* недавно выделен из осадков горячих источников и описан как представитель нового семейства *Rhabdaerophillaceae* в порядке *Hyphomicrobiales* (Ming et al., 2020).

**Другие факторы вирулентности.** К факторам вирулентности относят ряд белков, участвующих в рецепции сигналов хозяйского организма, рецепции и транспорте сидерофоров и ферменты синтеза антибиотиков.

**Сенсорные гистидин киназы.** В геномах обоих штаммов *Lichenibacterium* были найдены гены, кодирующие сенсорные гистидин киназы и гибридные сенсорные гистидин киназы и регуляторы отклика. Эти ферменты регулируют взаимодействие с хозяйским организмом путем контроля передачи сигнала двухкомпонентными системами (TCS) с последующим автофосфорилированием консервативного остатка гистидина в ответ на стимул. Ближайшими гомологами генов гистидин киназ исследуемых бактерий являются гены гистидин киназ родственных бактерий класса *Alphaproteobacteria*, для которых функции этих белков могут быть предсказаны только на основании имеющихся в литературе данных. Наиболее близкими гомологами оказались гистидиновые киназы бактерий, представляющих семейства *Beijerinckiaceae*, *Methylobacteriaceae* и *Lichenihabitantaceae* (рис. 2). Выявлены различия в составе и количестве ортологичных генов, кодирующих гистидин киназы, у *L. ramalinae* и *L. minor*. Так, например, в геноме *L. minor* найдены два ортологичных гена *kdpD*, в то время как у *L. ramalinae* эти гены не найдены (рис. 2г). KdpD в сочетании с KdpABC регулирует калиевый гомеостаз и вирулентность у различных видов бактерий (Dutta et al., 2021). Интересно, что гистидин киназы, содержащие домен HAMP (Histidine kinases, Adenylate cyclases, Methyl accepting proteins and Phosphatases), формируют изолированный кластер семейства *Lichenibacteriaceae* (рис. 2а, 2б), что может быть использовано как дополнительный инструмент в филогеномном анализе бактерий кластера LAR1 и *Hyphomicrobiales*. В целом, в геноме *L. ramalinae* содержится 18 аминокислотных последовательностей различных типов гистидин киназ, а в геноме *L. minor* – 26. Недавние результаты подтверждают участие гистидиновых киназ в бактериальных сенсорных системах, контролирующих концентрацию кислорода и окиси азота в среде роста (Gondim et al., 2022).

**Рецепция и транспорт сидерофоров.** TonB-зависимые транспортеры (TBDTs) это белки внешней

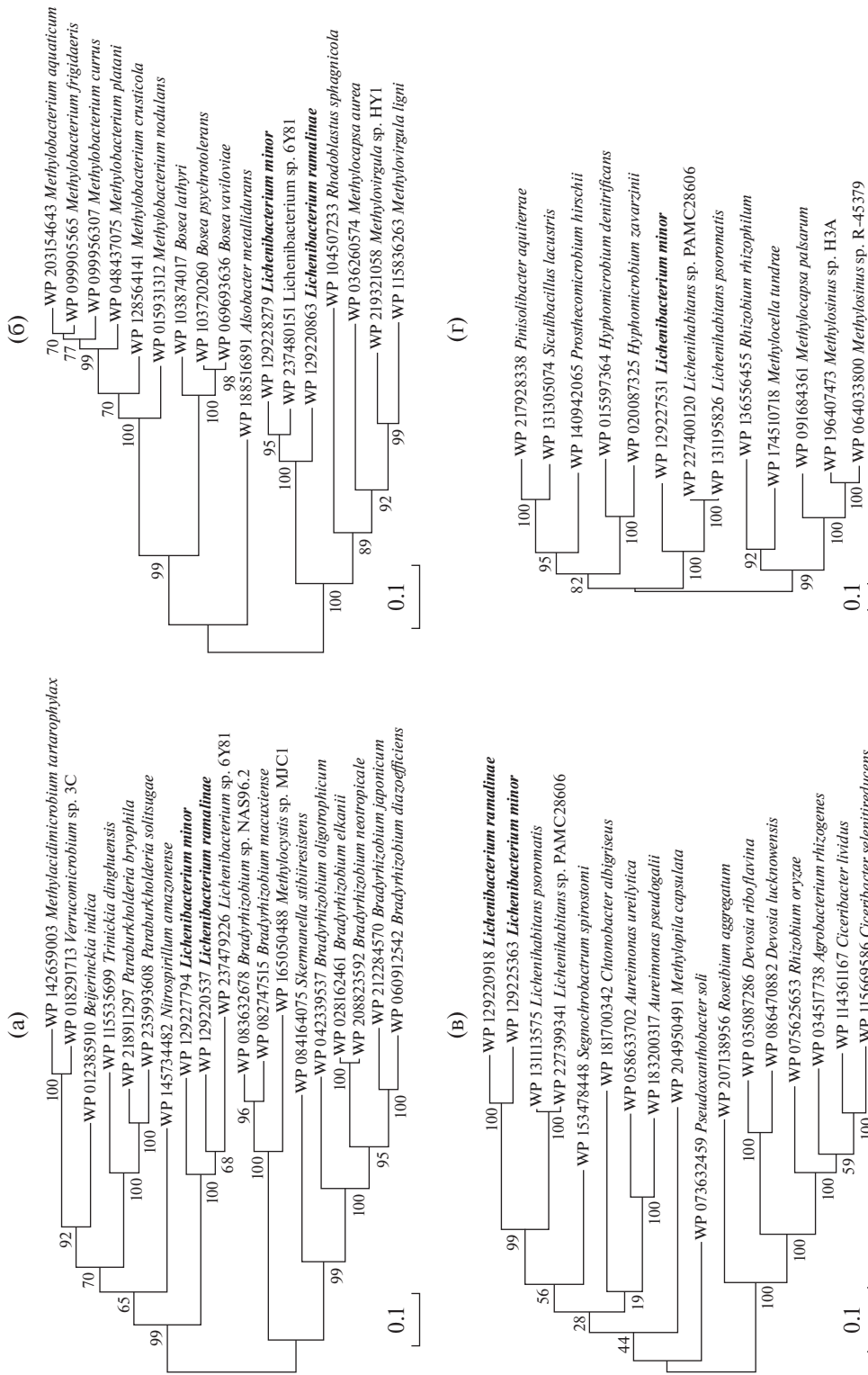


Рис. 2. Эволюционный анализ филогенеза генов, кодирующих НАМР-содержащие гистидиновые киназы (а, б), гибридные сенсорные киназы (в) и КдрD-содержащие гистидиновые киназы (г) методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones *et al.* w/freq. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматическим путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, а затем выбора топологии с наибольшим значением логарифмического правдоподобия.

**Таблица 2.** Значения гомологии генов монооксигеназы синтеза антибиотиков *L. ramalinae* и *L. minor* в сравнении с филогенетически родственными бактериями

Номер аминокислотной последовательности в геноме	Гомологичные виды	Величина покрытия, %	Процент идентичности	Номер гомолога в базе GenBank
<b><i>Lichenibacterium ramalinae</i></b>				
WP_129217131	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	99	92.66	WP_237477013
	<i>Lichenibacterium minor</i>	99	90.83	WP_129224161
	<i>Aureimonas altamirensis</i>	99	68.81	WP_232413559
	<i>Aureimonas ureilytica</i>	99	67.89	WP_058635188
	<i>Amorphus coralli</i>	98	66.67	WP_018698660
	<i>Skermanella aerolata</i>	100	65.45	WP_044429191
	<i>Rhodoligotrophos appendicifer</i>	99	65.14	WP_144293913
	<i>Methylobacterium oryzihabitans</i>	100	64.55	WP_127729087
WP_129217335	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	86.73	WP_237477124
	<i>Lichenibacterium minor</i>	100	84.69	WP_129222562
	<i>Lichenihabitans psoromatis</i>	100	63.27	WP_165492806
	<i>Sinorhizobium fredii</i> (PAB)	97	51.04	WP_012709011
WP_129219385	<i>Methylobacterium</i> sp. 275MFSha3.1 (PAB)	100	73.77	WP_091675833
	<i>Methylobacterium</i> sp. Leaf88	100	72.95	WP_056271413
	<i>Methylorubrum extorquens</i> (PAB)	100	70.49	WP_003598456
	<i>Methylobacterium oryzae</i> (PAB)	98	68.85	WP_043758477
WP_129224161	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	94.59	WP_237477013
	<i>Aureimonas altamirensis</i>	98	68.81	WP_232413559
	<i>Skermanella mucosa</i>	100	66.67	WP_202680322
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Tv2a-2 (PAB)	99	66.36	WP_024519766
<b><i>Lichenibacterium minor</i></b>				
WP_129225689	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	78.79	WP_237479053
	<i>Comamonas thiooxydans</i>	100	70.71	WP_034407119
	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	70.71	WP_149356526
	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (PAB)	100	67.68	WP_192177866
WP_129227845	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	87.37	WP_237477550
	<i>Aureimonas psamosilenae</i> (PAB)	100	64.21	WP_152046766
	<i>Gemmobacter straminiformis</i>	96	63.04	WP_185798974
	<i>Rhodobacter amnigenus</i>	96	60.87	WP_161762857
	<i>Deinococcus planocerae</i>	96	56.52	WP_102126279

Примечание. PAB – бактерии, ассоциированные с растениями

мембраны бактерий, которые связывают и переносят хелаты железа, называемые сидерофорами, а также витамин B12, комплексы никеля и углеводы. Процесс переноса требует энергии в виде протонной двигательной силы и комплекса из трех белков внутренней мембраны, TonB-EхbВ-EхbD, для передачи этой энергии на внешнюю мембрану. У обоих штаммов гены, кодирующие эти белки, найдены. TonB рецепторы оказались гомологичным

таковым у бактерий *Nitrobacter winogradskyi*, *Archangium violaceum*, *Cystobacter fuscus* с уровнем гомологии 45–50% и величиной Query Cover 97%. Наибольший уровень гомологии характерен для *Lichenihabitans psoromatis* – 57.64% при величине Query Cover 96%.

Моноксигеназа синтеза антибиотиков (Abm). У *L. ramalinae* обнаружено шесть паралоогов этого фермента, а у *L. minor* – пять.

Наиболее филогенетически близкими к генам Abm *Lichenibacterium* оказались гомологи *Lichenihabitans psoromatis* (величина сходства 64.29%) и *Rhizobium arenae* (53.12%). Некоторые ортологи, как например Abm WP\_129219385 *L. ramalinae*, имели высокое сходство с генами эпифитных *Methylobacterium*, выделенных с поверхности листьев различных растений (величина сходства 70–74%). У *L. minor* гомологами по гену abm оказываются симбиотические бактерии *Aureimonas psammosilene*, штаммы группы *Mezorhizobium*, патоген человека *Comamonas testosteroni*, а также свободноживущие *Hyphomicrobium zavarzinii* и *Skermanella mucosa* (табл 2).

Ферменты этого суперсемейства участвуют в синтезе поликетидных антибиотиков (Grocholski *et al.*, 2012). Недавно показана способность монооксигеназы регулировать инвазию патогенных грибов в ткани растений (Patkar, Naqvi, 2017). В частности, монооксигеназа служит эффекторным пептидом, способствующим последующей колонизации тканей. Интересно, что ортологи Abm паразитического грибка *Magnaporthe oryzae* были обнаружены только у нескольких видов симбиотических бактерий, что позволяет предположить, что патогенная линия приобрела Abm, вероятно, путем горизонтального переноса генов от ризосферных бактерий.

Известно, что наиболее эффективными защитными механизмами растений являются гормоны и гормоноподобные соединения, такие как салициловая кислота, жасмоновая кислота или этилен. Эти же соединения способны выделять и зеленые водоросли (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). Так например, Pichler *et al.* (2020) обнаружили, что индолилуксусная, индолилмасляная, абсцизовая, жасмоновая кислоты, гиббереллин A3 (GA3) и GA4 высвобождаются внеклеточно у водорослей рода *Trebouxia* и *Asterochloris* (фотобиотны лишайников). Показано, что Abm способны инактивировать жасмоновую кислоту, выделяемую растением в ответ на заражение патогенными грибами (Patkar, Naqvi, 2017). Наличие нескольких копий паралоогичных генов этого белка может быть индикатором их функциональности, что позволяет высказать предположение о наличии сходных с вышеприведенным механизмом инвазии *Lichenibacterium* в лишайниковый таллом.

Таким образом, анализ геномов двух бактериобионтов лишайников *L. ramalinae* и *L. minor* обнаружил генные детерминанты, обеспечивающие синтез факторов адгезии, белков пилинов и флагеллинов, способствующие фиксации клеток на грибном мицелии и на клеточных стенках водорослей. Наличие двух фенотипов — планктонного и пленочного позволяют бактериям рода *Lichenibacterium* мигрировать в формирующиеся подции лишайников и далее интегрироваться в

них, переходя в пленочный фенотип. Значения гомологии отдельных изученных генов, продукты экспрессии которых обеспечивают регуляцию интеграции, адаптации и выживания, позволяют дополнить нашу гипотезу (Pankratov *et al.*, 2022) о более тесной физиологической связи бактерий рода *Lichenibacterium* с зелеными водорослями, чем с грибами.

Номера доступа DDBJ/ENA/GenBank для последовательностей, проанализированных в этом исследовании, следующие: QYBC000000 (геном штамма RmlP001<sup>T</sup>) и QYBB000000 (геном штамма RmlP026<sup>T</sup>).

**Соблюдение этических стандартов.** Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа финансово поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание “Микробиология инновационных биотехнологий”, № 122040800164-6) и, частично, средствами гранта РФФИ (19-04-00297а).

**Благодарности.** Автор благодарит лихенолога, сотрудника кафедры экологии, ботаники и охраны природы Самарского национального исследовательского университета имени акад. С.П. Королева и Е.С. Корчикова за идентификацию лишайника.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bi H., Zhang Ch. Integration host factor is required for the induction of acid resistance in *Escherichia coli* // Curr. Microbiol. 2014. V. 69. P. 218–224. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0595-7>
- Coleman S.A., Minnick M.F. Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues // Microb. Pathog. 2003. V. 34. P. 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00005-6)
- Coleman S.A., Minnick M.F. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*IalB*) protein in human erythrocyte parasitism // Infect. Immun. 2001. V. 69(7). P. 4373–4381. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4373-4381.2001>
- Dutta A., Batish M., Parashar V. Structural basis of KdpD histidine kinase binding to the second messenger c-di-AMP // J Biol Chem. 2021. V. 296:100771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100771>
- Erlacher A., Cernava T., Cardinale M., Soh J., Sensen C.W., Grube M., Berg G. *Rhizobiales* as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. // Front. Microbiol. 2015. V 6: article 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00053>
- Gallego V., García M.T., Ventosa A. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from

- an aquatic environment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55(4). P. 1429–1433.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.63597-0>
- Gondim A.C.S., Guimarães W.G., Sousa E.H.S. Heme-based gas sensors in nature and their chemical and biotechnological applications // *BioChem.* 2022. V. 2. P. 43–63.  
<https://doi.org/10.3390/biochem2010004>
- Grocholski T., Oja T., Humphrey L., Mäntsälä P., Niemi J., Metsä-Ketelä M. Characterization of the two-component monooxygenase system AlnT/AlnH reveals early timing of quinone formation in alnumycin biosynthesis // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194(11). P. 2829–2836.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00228-12>
- Gu Z., Liu Y., Wang N., Jiao N., Shen L., Liu H., Zhou Y., Liu X., Li J., Liang J., Busse H.-J. *Chelatococcus reniformis* sp. nov., isolated from a glacier // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66(11). P. 4525–4529.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001384>
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp.* 1999. V. 41. P. 95–98.
- Hodkinson B.P., Gottel N.R., Schadt C.W., Lutzoni F. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14(1). P. 147–161.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02560.x>
- Hug I., Deshpande S., Sprecher K.S., Pfohl T., Jenal U. Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor // *Science.* 2017. V. 358. P. 531–534.  
<https://doi.org/10.1126/science.aan5353>
- Jourand Ph., Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B., de Lajudie Ph. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 2269–2273.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.02902-0>
- Kämpfer P., Scholz H.C., Lodders N., Loncaric I., Whatmore A.M., Busse H.-J. *Camelimonas abortus* sp. nov., isolated from placental tissue of cattle // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. P. 62. P. 1117–1120.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.034389-0>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee Y.M., Kim E.H., Lee H.K., Hong S.G. Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 10. P. 2711–2721.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1695-z>
- Li L., Osman G., Salam N., Mohamed O.A., Jiao J., Ma J., Asem M.D., Xiao M., Li W.-J. *Limoniibacter endophyticus* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from the roots of *Limonium otolepis* // *Arch. Microbiol.* 2018. V. 200. P. 663–670.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1472-0>
- Madhaiyan M., Poonguzhali S. *Methylobacterium pseudosaxicola* sp. nov. and *Methylobacterium phyllostachyos* sp. nov., isolated from bamboo leaf surfaces // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 2376–2384.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.057232-0>
- Ming Y.-Z., Liu L., Xian W.-D., Jiao J.-Y., Liu Z.-T., Li M.-M., Xiao M., Li W.-J. *Rhabdaerophilum calidifontis* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from a hot spring, and proposal of *Rhabdaerophilaceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70(4). P. 2298–2304.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004035>
- Noh H.J., Baek K., Hwang C.Y., Shin S.C., Hong S.G., Lee Y.M. *Lichenihabitans psoromatis* gen. nov., sp. nov., a member of a novel lineage (*Lichenihabitantaceae* fam. nov.) within the order of *Rhizobiales* isolated from Antarctic lichen // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 3837–3842.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003695>
- Noh H.J., Lee Y.M., Park C.H., Lee H.K., Cho J.C., Hong S.G. Microbiome in *Cladonia squamosa* is vertically stratified according to microclimatic conditions // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11:268.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00268>
- Noh H.J., Park Y., Hong S.G., Lee Y.M. Diversity and physiological characteristics of Antarctic lichens-associated bacteria // *Microorganisms.* 2021. V. 9(3):607.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030607>
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 1166–1167.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Pankratov T.A. *Acidobacteria* in microbial communities of the bog and tundra lichens // *Microbiology (Mikrobiologiya).* 2012. V. 81(1). P. 51–58.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261711060166>
- Pankratov T.A., Grouzdev D.S., Patutina E.O. et al. *Lichenibacterium ramalinae* gen. nov., sp. nov., *Lichenibacterium minor* sp. nov., the first endophytic, beta-carotene producing bacterial representatives from lichen thalli and the proposal of the new family *Lichenibacteriaceae* within the order *Rhizobiales* // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2020. V. 113(4). P. 477–489.  
<https://doi.org/10.1007/s10482-019-01357-6>
- Pankratov T.A., Nikitin P.A., Patutina E.O. Genome analysis of two lichen bacteriobionts, *Lichenibacterium ramalinae* and *Lichenibacterium minor*: toxin–antitoxin systems and secretion proteins // *Microbiology.* 2022. V. 91(2). P. 160–172.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261722020096>
- Patkar R.N., Naqvi N.I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13(6):e1006334.  
<https://doi.org/10.1111/jpy.13032>
- Pichler G., Stöggel W., Carniel F.C., Muggia L., Ametrano C.C., Holzinger A., Tretiaich M., Kranner I. Abundance and extracellular release of phytohormones in aero-terrestrial microalgae (*Trebouxiphyceae*, *Chlorophyta*) as a potential chemical signaling source // *J. Phycol.* 2020. V. 56(5). P. 1295–1307.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006334>
- Rad V., Simões-Araújo J.L., Leite J., Passos S.R., Martins L.M.V., Xavier G.R., Rumjanek N.G., Baldani J.I., Zilli J.A. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 725–730.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.053082-0>

- Sato S., Siarot L., Matsuoka J., Aono T., Oyaizu H. An *Azorhizobium caulinodans* ORS571 mutant with deletion of a gene encoding a TIGR02302 family protein overproduces exopolysaccharides and is defective in infection into plant host cells // *Soil Sci. Plant. Nutr.* 2016. V. 62(4). P. 392–398.  
https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1200954
- Skipper C., Ferrieri P., Cavert P. Bacteremia and central line infection caused by *Bosea thiooxidans*. *IDCases*. 2020. 19:e00676.  
https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00676
- Stonehouse E., Kovacicova G., Taylor R.K., Skorupski K. Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190(13). P. 4736–4748  
https://doi.org/10.1128/JB.00089-08
- Sun L., Liu H., Chen W., Huang K., Lyu W., Gao X. *Alsobacter soli* sp. nov., a novel bacterium isolated from paddy soil, emended description of the genus *Alsobacter* and description of the family *Alsobacteraceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 3902–3907.  
https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003088
- Tani A., Sahin N. *Methylobacterium haplocladii* sp. nov. and *Methylobacterium brachythecii* sp. nov., isolated from bryophytes. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 3287–3292.  
https://doi.org/10.1099/ijms.0.048215-0
- Tani A., Sahin N., Kimbara K. *Methylobacterium oxalidis* sp. nov., isolated from leaves of *Oxalis corniculata* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1647–1652.  
https://doi.org/10.1099/ijms.0.033019-0
- Tarakhovskaya E.R., Maslov Yu.I., Shishova M.F. Phytohormones in Algae // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2007. V. 54(2). P. 163–170.  
https://doi.org/10.1134/S1021443707020021
- Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. A genomic perspective on protein families // *Science*. 1997. V. 278(5338). P. 631–637.  
https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631
- Trifinopoulos J., Nguyen L.T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. P. 232–235.  
https://doi.org/10.1093/nar/gkw256
- Ueki A., Kodama Y., Kaku N., Shiromura T., Satoh A., Watanabe K., Ueki K. *Rhizomicrobium palustre* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative stalked bacterium in the class *Alphaproteobacteria* isolated from rice plant roots // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2010. V. 56(3). P. 193–203.  
https://doi.org/10.2323/jgam.56.193
- Urakami T., Sasaki J., Suzuki K-I., Komagata K. Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995. V. 45(3). P. 528–532.  
https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-528
- Van Aken B., Peres C.M., Doty S.L., Yoon J.M., Schnoor J.L. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra* DN34) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995. V. 54(4). P. 1191–1196.  
https://doi.org/10.1099/ijms.0.02796-0
- Verma M., Kumar M., Dadhwal M., Kaur J., Lal R. *Devosia albobilva* sp. nov. and *Devosia crocina* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59(4). P. 795–799.  
https://doi.org/10.1099/ijms.0.005447-0
- Zhang L., Song M., Cao Q., Wu Sh., Zhao Y., Huang Y.-W., Chen K., Li S.-P., Xia Z.-Y., Jiang J.-D. *Camelimonas fluminis* sp. nov., a cyhalothrin-degrading bacterium isolated from river water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 3109–3114.  
https://doi.org/10.1099/ijms.0.000384

## Genome Analysis of Two Lichen Bacteriobionts, *Lichenibacterium ramalinae* and *Lichenibacterium minor*: Factors of Virulence and Adaptation

T. A. Pankratov<sup>#</sup>

Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

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

Successful invasion and adaptation of bacteria into lichen symbiosis requires the involvement of a number of physiological mechanisms that regulate interactions between bacteriobionts, mycobionts and algobionts and ensure the optimization of thallus growth and development. The genomes of two lichen bacteriobionts *Lichenibacterium ramalinae* and *L. minor* were analysed to identify those factors. No nodulation genes traditional for rhizobia were found. TIGR02302 protein has been suggested to have a similar function. Genes encoding proteins associated with the implementation of planktonic and biofilm phenotypes – flagellins and pilins – have been found. These genes have a high level of similarity with the genes of plant symbiont bacteria. Genetic determinants of virulence factors such as locus B invasion proteins, Integration host factor (IHF), sensory histidine kinases, siderophore receptor and transport proteins and monooxygenase of antibiotic synthesis (Abm) were found in the genomes of the studied bacteria. The listed genes have similarities with those in organisms forming associations of different degrees of association with plants. Based on the data obtained, the assumption of a priority association of bacteria of the *Lichenibacteriaceae* family with green lichen algae was suggested.

**Keywords:** *Lichenibacterium*, nodulation factors, virulence, histidine kinase, siderophores, lichens



УДК 581.412+575.826

## РАЗВИТИЕ И АРХИТЕКТУРА КОРНЕВИЩА *Nepeta transiliensis* (LAMIACEAE)

© 2023 г. В. А. Черемушкина\*, @, А. Ю. Асташенков\*, Е. К. Комаревцева\*, А. А. Гусева\*

\*Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН,  
ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090 Россия

@E-mail: astal@bk.ru

Поступила в редакцию 22.02.2022 г.

После доработки 18.04.2022 г.

Принята к публикации 18.04.2022 г.

Изучен онтогенез и структурная организация корневища у особей *Nepeta transiliensis* в высокогорных условиях Заилийского Алатау. Используя архитектурный подход к описанию растений, выделены основные конструкционные единицы – корневищные модули. Различное ветвление модулей приводит к построению отличимых корневищных осей. В корневищных осях углы расхождения боковых модулей от материнского отличаются, развитие модулей происходит из почек возобновления или из спящих почек. Совокупность корневищных осей образует разветвленный корневищный комплекс и приводит к формированию корневищных ярусов. В целом, корневище *N. transiliensis* относится к “промежуточному” типу, у которого сочетаются признаки геометрического и негеометрического корневища.

**Ключевые слова:** архитектура, корневищный модуль, корневищная ось, корневище, онтогенез, побегообразование, *Nepeta transiliensis*

**DOI:** 10.31857/S1026347023010031, **EDN:** IJBCJM

Подходы к анализу структуры растений основаны на исследовании характера нарастания и ветвления основных структурных единиц побеговой системы, их сочленения и пространственного расположения в теле растений (Серебряков, 1962; Troll, 1964; Hallé, Oldeman, 1970; Гагцук, 1974; Мазуренко, Хохряков, 1977; Серебрякова, 1977; Barthélémy, Caraglio, 2007). Уделяется особое внимание изучению модулей наземной сферы как травянистых, так древесных и полудревесных биоморф (Troll, Rauh, 1950; Bell, Adrian, 1991; Савиных, 2012; Колегова, Черемушкина, 2012; Cheryomushkina, Guseva, 2015; Vuissart *et al.*, 2018). Многие исследования иллюстрируют актуальность структурного анализа для отслеживания архитектурных вариаций и диверсификаций внутри различных групп растений (Guillaument, 1973; Cremers, 1975; Veillon, 1978; Barthélémy, Caraglio, 2007; Черемушкина, Таловская, 2019; Anest *et al.*, 2021), некоторые описывают эволюционные преобразования и сценарии структурного развития видов (Vester, 1999; Enriquez *et al.*, 2008). Однако остается без должного внимания изучение подземной структуры травянистых растений, в частности, корневища. Изучение основного паттерна формирования корневища представляет собой значительный прорыв в понимании взаимосвязи между его архитектурой и окружающей средой (Chomicki, 2013). Кроме этого, эволюция структу-

ры корневища плохо изучена несмотря на то, что это древний тип организации, который присущ многим ранним наземным растениям (Серебряков, Серебрякова, 1965; Chomicki, 2013). В настоящее время проведен архитектурный анализ корневища лишь у некоторых растений и показано, что определенные виды формируют различные типы корневища, которые определяются филлотаксисом, ограниченным/неограниченным ветвлением, структурой модулей, степенью и временем ветвления, углом расхождения боковых модулей относительно материнского. Помимо этого, выделяют различные типы корневищных систем – геометрические, негеометрические и промежуточные (Bell, 1979; Chomicki, 2013). Также обращают внимание на кривизну, скорость развития корневища и его топографию в субстрате (Серебрякова, 1971, Смирнова, Торопова, 1974; Bell, Tomlinson 1980; Keller, 1997; Черемушкина, 2004, Chomicki, 2013; Guseva, Cheryomushkina, 2020). Установлено, что у каждого определенного вида корневище развивается согласно своему архитектурному дизайну и геометрии, а их разнообразие отражает эволюционные стратегии растений. Так, на примере видов рода *Agropyron* и *Pteridium* описаны линейные системы корневища, которые характерны для агрессивных сорняков (эксплерентный тип стратегии) и некоторых видов, обитающих в отсутствии конкуренции или в определенных сообществах. Ис-

пользование архитектурного подхода при изучении подземной структуры актуально для демографической оценки популяций, так как понимание паттернов ветвления особей дает возможность выявить их вегетативную мобильность, архитектурную систему клона и парциальных образований (Смирнова, 1974, 1987, Смирнова и др., 1976; Bell, 1979; Bell, Tomlinson; 1980; Восточно-европейские, 2004), а также морфофилогенетические связи близкородственных таксонов (Chomicki, 2013; Гусева, 2019; Astashenkov *et al.*, 2021).

Ранее нами были изучены жизненные формы и побегообразование высокогорных эндемиков видов рода *Nepeta* L. из различных ксерофитных районов Центральной Азии. Было установлено, что многие близкородственные группы из аридных местообитаний формируют стержнекорневые каудексовые биоморфы и имеют свои особенности развития (Astashenkov, 2015; Astashenkov *et al.*, 2017, 2019). Если способы построения многолетней основы (каудекса) у этих видов исследованы, и как показывают наши результаты, они достаточно хорошо предсказуемы, то остается до конца не выясненными механизмы формирования подземных структур корневищных растений этого рода в условиях высокогорий. Отсутствие общего понимания об организации и развитии многолетних осевых структур корневищных эндемичных видов подтолкнули нас провести детальный биоморфологический анализ гигро-мезофильного длиннокорневищного вида *Nepeta transiliensis* Rojark., который находится в близком родстве с ксерофильным видом *Nepeta mariae* Rojark. Биоморфа последнего отличается, она относится к каудексообразующей. Структурный анализ особей *N. transiliensis* позволит выявить механизмы адаптации вида к высокогорным условиям, а также установить морфологическое разнообразие и оценить степень диверсификации биоморф этих таксонов в процессе эволюции. Цель работы – изучение онтогенеза и структурной организации корневища особей *N. transiliensis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*N. transiliensis* – травянистый, длиннокорневищный многолетний высокогорный эндемик, произрастающий на хребте самой северной дуги Тянь–Шаня – Заилийском Алатау. При первоописании вида А.И. Пояркова (1953) указывает на его распространение только для западной части хребта. Позднее в материалах “Растения Центральной Азии” О.В. Чернева (1970) расширяет границы ареала на северо-восток до высокогорий долины р. Кунгес (Китай), однако при обработке семейства Lamiales во флоре Китая Li-Xi-wen, Ian C. Hedge (1994) *N. transiliensis* не приводят. Вид приурочен к горному альпийскому поясу, где обитает на щебнистых и каменистых склонах, ре-

же на каменистых плакорах, подошвах осыпей, в трещинах скал (Пояркова, 1953).

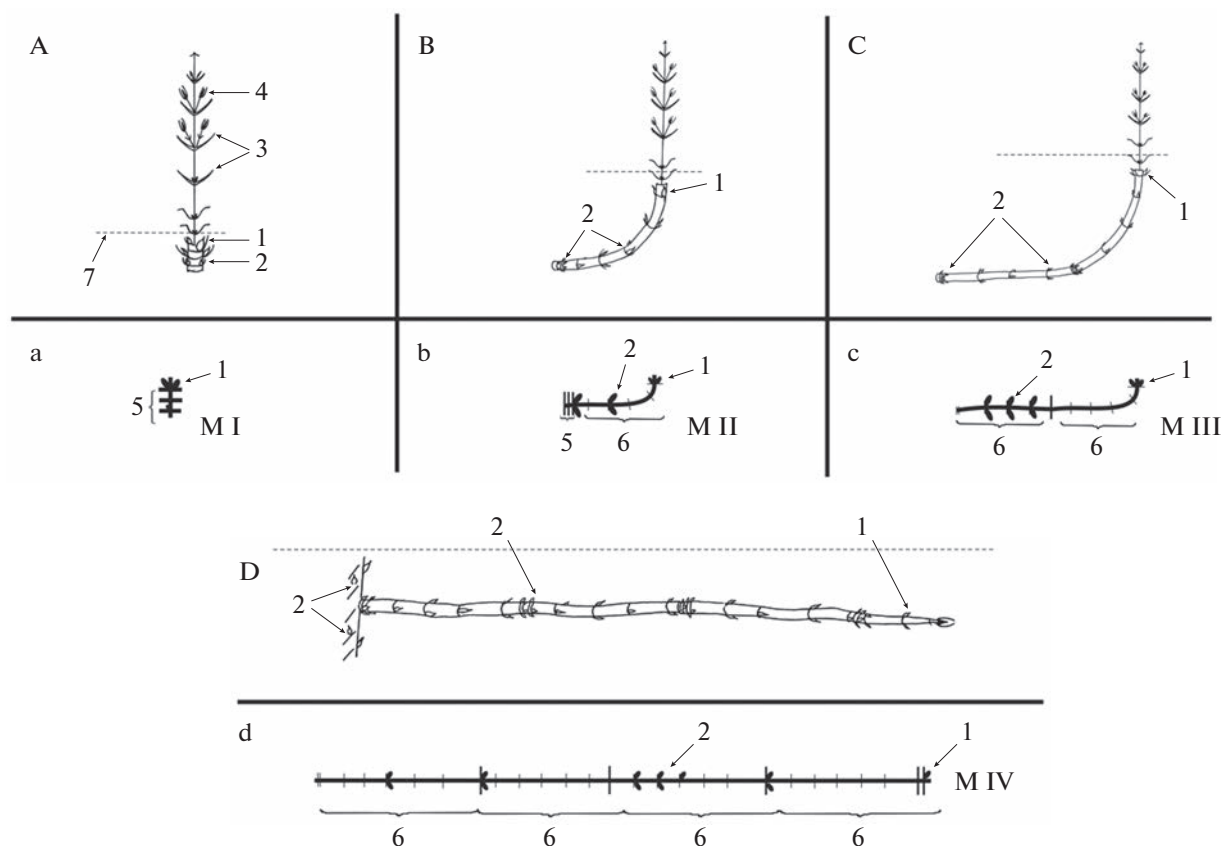
Материал для описания онтогенеза особей и архитектуры корневища собран на хр. Карач (восточная часть Заилийского Алатау, Казахстан (43°16'43.6" с.ш., 77°52'08.1" в.д., 2700 м над у. м.) в верховье р. Тургень в гигро-мезофитных условиях альпийского пояса в составе злаково-разнотравно-манжетковой луговой растительности на задернованной горно-луговой почве вдоль каменистого русла реки с включениями гальки. Было исследовано 250 экземпляров особей *N. transiliensis* разного онтогенетического состояния.

При изучении онтогенеза была использована общепринятая методика (Работнов, 1950; Смирнова и др., 1976; Gatsuk *et al.*, 1980; Smirnova *et al.*, 2002). При типизации побегов и их характеристике применяли понятия и термины, предложенные Е. Warming (1918), И.Г. Серебряковым (1962), Л.Е. Гатцук (1974), Е.Л. Нухимовским (1997) (рис. 1, А–Д).

В качестве элементарной структурной единицы корневища у особей *N. transiliensis* принят *корневищный модуль* (КМ). В нашей работе термин *корневищный модуль* используется для обозначения сохранившейся проксимальной подземной части побега (Chomicki, 2013). В течение всего онтогенеза у особей образуются корневищные модули, которые отличаются по: происхождению (из почек возобновления или из спящих почек), метамерной протяженности (укороченные, удлиненные); направлению роста (ортотропные, анизотропные, плагиотропные); временем их появления в онтогенезе и их топографии в теле растения (рис. 1, а–д). Последовательное симподиальное сочленение модулей приводит к формированию разветвленной *корневищной оси* (КО). Совокупность корневищных осей мы рассматриваем как разветвленный *корневищный комплекс*.

Для анализа структуры корневища у особей разного онтогенетического состояния использовали следующие признаки: длина модуля, число метамеров модуля, углы ветвления модуля, место и время возникновения модуля. Типы модулей названы по типам побегов, из которых они образованы (рис. 1, а–д).

Для характеристики типа корневища *N. transiliensis* использованы представления о его структурной организации и “геометрии” (Bell, 1979; Bell, Tomlinson, 1980; Chomicki, 2013) где: для “геометрического” корневища характерно сохранение углов расхождения между дочерними модулями относительно материнского, развитие модулей происходит из почек возобновления, в строго определенных и в ограниченном числе узлов; для “негеометрического” – угол расхождения дочерних модулей от материнского не постоянен, развитие модулей происходит из спящих почек



**Рис. 1.** Типы побегов и типы корневищных модулей *N. transiliensis*. Типы побегов: А – побег ортотропный моноциклический, В – побег анизотропный моноциклический, С – побег анизотропный дициклический, D – побег корневищный плагиотропный полициклический. Типы модулей: а – короткий ортотропный моноциклический, б – длинный анизотропный моноциклический, с – длинный анизотропный дициклический, d – длинный плагиотропный корневищный (ось полициклического корневищного побега). 1 – почки возобновления, 2 – спящая почка (их число указано произвольно), 3 – зеленый лист, 4 – боковой побег, 5 – укороченная часть с короткими метамерами, 6 – удлиненная часть с длинными метамерами, 7 – уровень субстрата.

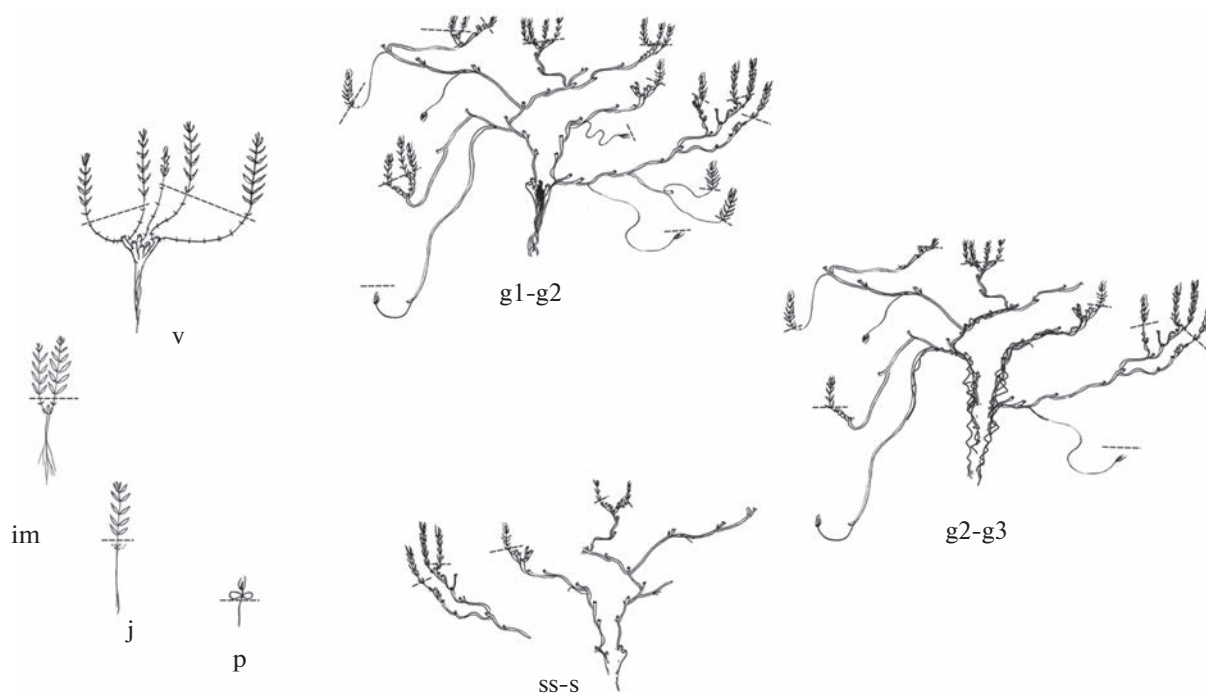
или из почек возобновления и спящих почек, развитие модулей может быть в любом количестве и из любого узла; для “промежуточного” – характерно сочетание признаков “геометрического” и “негеометрического” корневища.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Онтогенез.** На рис. 2 схематично изображен онтогенез особей *N. transiliensis*. Прорастание семян надземное. Проросток представляет собой удлиненный одноосный побег, на котором развиваются, помимо семядольных, настоящие зеленые листья в числе 2–3 пар. В год прорастания семян растения переходят в ювенильное состояние. Терминальная почка в течение вегетационного сезона успевает отделиться от 5 до 8 пар накрест-супротивно расположенных листьев. Высота побега не превышает 2.0–2.5 см. За счет контрактной деятельности главного корня базальная часть побега втягивается в субстрат. Гипокотиль

слабо выражен, главный корень ветвится до II порядка и достигает длины 4.0–4.5 см.

После вегетации побег отмирает до второго метамера, сохранившаяся часть побега становится первым звеном корневища. На второй год особи переходят в имматурное состояние. Растения ветвятся, образуется первичный куст, состоящий из двух супротивных побегов. Побеги возобновления разворачиваются из двух почек, расположенных в семядольном узле. Появившиеся побеги ортотропные, высотой не более 5.0 см. В их структуре четко выделяются три коротких метамера в проксимальной части с чешуевидными и переходными листьями и 7–8 длинных метамеров с настоящими зелеными листьями. В пазухах всех листьев закладываются почки. Почки возобновления формируются в узле третьего короткого метамера, остальные почки проксимальной части не реализуются и становятся спящими. Нередко почки в узлах зеленых листьев раскрываются, в результате формируются боковые побеги обога-



**Рис. 2.** Онтогенез особей *N. transiliensis*. тогенетические состояния: p – проросток, j – ювенильное, im – имматурное, v – виргинильное, g1 – молодое генеративное, g2 – зрелое генеративное, g3 – старое генеративное, ss – субсенильное, s – сенильное, прерывистая линия – уровень субстрата.

шения. В конце вегетации надземная часть побега отмирает. Сохранившаяся короткая ортотропная базальная часть входит в состав гипогеогенного корневища. Главный корень утолщается, достигает 10.0 см длины, ветвится до II порядка. Онтогенетическое состояние длится 1–2 года.

В виргинильное состояние особи переходят на 3–4 год и представляют собой первичный куст с 2–5 вегетативными побегами. В структуре особей различают два типа вегетативных побегов, они формируются из почек возобновления, сохранившихся на коротких остатках побегов предыдущего прироста. Побеги отличаются циклическостью и метамерной протяженностью: 1) моноциклический анизотропный (рис. 1, b); 2) дициклический анизотропный (рис. 1, c). Одна часть почек возобновления реализуется в первый тип побега, другая во второй.

Моноциклические анизотропные побеги развиваются из двух супротивных почек. Они имеют длинную геофильную часть (2.0–4.0 см), состоящую из 3-х коротких и 4–5 длинных метамеров с чешуевидными листьями. Вышележащие 1–2 метамера (на дуге побега) несут переходные листья. Как правило, почки возобновления закладываются в узлах 6–7 метамера. Надземная часть каждого побега ортотропная, разветвленная, образована 7–8 метамерами с зелеными листьями. Побеги обогащения слаборазвиты, они формируются из боковых почек каждого узла.

После вегетации ортотропная надземная часть отмирает, сохраняются длинные базальные части этих побегов, которые надстраивают корневище.

Дициклические анизотропные побеги развиваются одновременно с моноциклическими анизотропными побегами. Обычно разворачивается один побег возобновления. В первый год образуется плагитропная часть (длиной 5.0–7.0 см), состоящая из первых 3–4 коротких и 6–8 длинных метамеров. На второй год формируется надземная фотосинтезирующая часть побега высотой 3.0–5.0 см. Второй годичный прирост несет только длинные метамеры (9–10) с переходными и зелеными листьями. Почки возобновления становятся 1–2 почки, расположенные в узлах 6–7 длинного метамера второго годичного прироста. Остальные почки не реализуются и становятся спящими. После вегетации дициклического побега сохраняется его подземная часть, которая также участвует в построении корневища. Развитие дициклических побегов приводит к разрастанию материнской особи и увеличению ее диаметра (15.0–17.0 см). Главный и боковые корни проникают глубоко в почву, они занимают вертикальное положение среди камней, а их контрактильная деятельность приводит к глубокому погружению первичных структур особи. На поверхности удлиненных геофильных участков появляются тонкие придаточные корни. Длительность виргинильного состояния не превышает 3 лет.

Чаще всего особи зацветают на 5–6 год. Начиная с молодого генеративного состояния, у особей *N. transiliensis* формируется куртина. Куртина состоит из системы парциальных кустов и парциальных побегов, они соединены между собой коммуникационными корневищами и имеют связь с первичным кустом. В результате симподиального сочленения длинных проксимальных частей, растения разрастаются в диаметре (20.0–30.0 см). Побегообразование осуществляется из почек возобновления, расположенных на сохранившихся длинных геофильных частях от побегов. Почки возобновления реализуются в моно- и дициклические побеги, которые образуют систему парциальных побегов. На основе многолетнего коммуникационного корневища строится парциальный куст. Так, из почек возобновления последнего годичного прироста коммуникационного корневища разворачиваются ортотропные моноциклические побеги. После отмирания их надземной сферы сохраняются подземные короткие ортотропные части с почками возобновления. Многолетняя структура парциального куста образуется за счет развития серии ортотропных побегов из почек третьего короткого метамера.

В молодом генеративном состоянии начинается процесс партикуляции. Разрушение затрагивает первичные структуры корневища и базальную часть главного корня. Распад происходит по сердцевидным лучам и сопровождается обособлением проводящих пучков. Сосудистые пучки главного корня веретенообразно перекручены. Длительность состояния не превышает 3 года.

В зрелом генеративном состоянии особи некоторое время находятся в фазе куртина, затем переходят в фазу клона. В результате интенсивного побегообразования, особи увеличиваются в размерах, диаметр некоторых экземпляров может достигать 100.0 см.

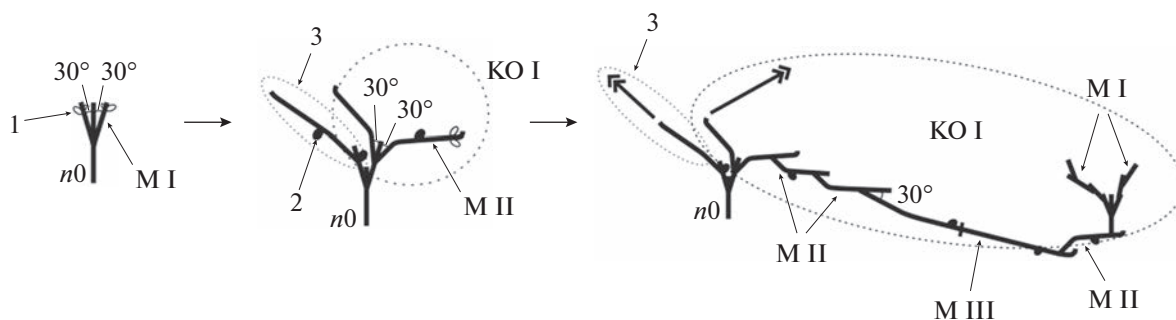
Находясь в фазе “куртина” у особей пробуждаются спящие почки, расположенные глубоко в почве (15–20 см) на многолетних участках корневища. Из спящих почек формируются типичные корневищные побеги, верхушечная почка таких побегов не реализуется в надземную фотосинтезирующую часть (Нухимовский, 1997). Корневищный побег может быть моно-, ди-, три- и полициклическим. Как правило, формируется полициклический побег (рис. 1, d). Он нарастает моноподиально в течение 4–5 лет, а его длина может достигать более 30 см. Ежегодный годичный прирост полициклического побега составляет 6–7 метамеров. Произрастая среди камней ось побега сильно изогнута. Почка возобновления находится в дистальной части последнего годичного прироста в узле 6–7 длинного метамера, остальные почки становятся спящими. Из-за глубокого расположения полициклического побега в субстрате из

почки возобновления формируется дициклический побег с фотосинтезирующей частью. Геофильная часть первого годичного прироста может достигать 15 см и состоять из 15–17 метамеров, она продолжает надстраивать ось длинного корневища. Верхушечная почка второго годичного прироста ориентирована ортотропно к поверхности субстрата. Почки возобновления закладываются в узлах 12–14 метамера, как правило, реализуется одна почка. В результате ее раскрытия формируется анизотропный моноциклический побег. Дальнейшее побегообразование осуществляется за счет развития анизотропных моноциклических побегов из одной/двух почек возобновления, расположенных в пазухах 6–7 метамера на сохранившихся частях предыдущих приростов. Развитие побегов с длинной геофильной частью приводит к дезинтеграции куста и формированию новых систем парциальных побегов, которые становятся основой для построения новых парциальных кустов. Парциальные кусты образуются за счет развития побегов, имеющих короткую ортотропную геофильную часть. Длительность жизни парциальных кустов не превышает 3 лет. Развитие различных побегов приводит к интенсивному ветвлению корневища и пространственному распределению его многолетних структур в толще субстрата.

В середине зрелого генеративного состояния в результате полной партикуляции происходит дезинтеграция куртины. Некроз приводит к партикуляции многолетней побеговой системы первичного куста и главного корня. Образуется диффузный распластаный клон, состоящий из системы неомоложенных парциальных кустов и парциальных побегов. Интенсивный некроз приводит к обособлению проводящих сосудов главного корня. Жизнеспособность каждого парциального образования поддерживается за счет отделившихся проводящих пучков и появлением на корневище эфемерных придаточных корней.

Неомоложенная система парциальных кустов продолжает свой частный онтогенез и переходит в старое генеративное состояние. В каждой партикуле из почек возобновления формируются моно-, дициклические анизотропные и моноциклические ортотропные побеги. Нередко из спящих почек развиваются как типичные корневищные побеги, так и побеги с фотосинтезирующей частью. Система парциальных побегов продолжает свое развитие: некоторые быстро стареют и отмирают; некоторые дают начало новым неомоложенным парциальным кустам.

В постгенеративном периоде в результате старения парциальных образований глубоко расположенные спящие почки отмирают. Побегообразование осуществляется за счет раскрытия почек возобновления, редко спящих почек, сохранившихся в поверхностном горизонте субстрата. В



**Рис. 3.** Развитие корневищной оси I типа M I, M II, M III — типы модулей (см. рис.1),  $n_0$  — модуль базовый, 1 — почка возобновления, 2 — нереализованная почка (спящая), 3 — растущая дочерняя корневищная ось KO I.

структуре партикулы различают только моноциклические анизотропные и ортотропные побеги возобновления. Дальнейший некроз многолетних структур приводит к многократной партикуляции. Этот процесс сопровождается появлением только неомоложенных парциальных образований следующего поколения, находящихся в субсильном или сильном онтогенетическое состояние. В конце онтогенеза формируются только одиночные побеги ювенильного или имматурного облика с короткими проксимальными частями.

**Архитектура корневища.** В течение онтогенеза особи в построении корневища участвуют различные корневищные модули, возникшие из почек возобновления и спящих почек. Нами описаны варианты построения корневищных осей.

**I тип корневищной оси.** Такой тип оси формируется у особей в первой половине онтогенеза. После вегетации и частичного отмирания первичного побега образуется корневищный модуль ( $n_0$ ), который становится базовым для построения двух одинаковых дочерних корневищных осей I типа (KO I) (рис. 3).

Первый корневищный модуль ветвится из почек семядольного узла по типу дихазия. Каждый дочерний модуль ( $n + 1$ ) дает начало самостоятельной корневищной оси, которая в течение ряда лет надстраивается длинными модулями (M II рис. 1, b). Угол расхождения модулей от материнского составляет  $30^\circ$ . Их последовательное развитие происходит в дистальной части предыдущего модуля из почек 6–7 метамера. Одновременно с этим из одной почки возобновления любой дочерней оси последовательно формируется длинный дициклический модуль (M III) (рис. 1, c). Угол его расхождения от предыдущего модуля также составляет  $30^\circ$ . После его развития он ветвится в дистальной части по типу монохазия/дихазия. В течение последующих лет вся дочерняя корневищная ось надстраивается M II и M III по типу монохазия/дихазия. В конце построения каждой дочерней оси образуется последовательная серия коротких ортотропных модулей (MI),

сочлененных по типу монохазия. Продолжительность развития KO I не превышает 7–8 лет.

Таким образом, в корневищной оси развитие модулей происходит последовательно из ограниченного числа почек, как правило, в определенном узле дистальной части модуля: короткий модуль ветвится в 3 междоузлии, длинный — 6–7. Угол расхождения модулей от материнского составляет  $30^\circ$ . Эти признаки в большей степени характеризуют “геометрический” тип корневища. Однако корневищная ось состоит из разнообразных модулей (коротких и длинных), их различного сочетания и способа ветвления (по типу монохазия/дихазия).

**II тип корневищной оси.** Такой тип оси формируется у особей в середине онтогенеза в структуре куртины и в системе парциальных кустов и побегов. В результате раскрытия спящей почки, расположенной на любом модуле KO I формируется типичный корневищный полициклический побег (рис. 1, d). Вся ось побега сохраняется под землей, такой побег мы рассматриваем как корневищный модуль M IV (рис. 1, d). Угол его расхождения от материнского модуля составляет  $60^\circ$ . Рост модуля плагиотропный, на его основе строится корневищная ось (KO II) (рис. 4). После полного развития модуля апикальная меристема отмирает, и корневищный модуль ветвится в дистальной части по типу монохазия. Замещающий модуль представляет собой дициклический модуль (M III) с большим числом метамеров, с углом расхождения от материнского  $30^\circ$ . Приближаясь к поверхности субстрата, монохазальная ось ветвится. Ветвление происходит обычно из 12 метамера дистальной части дициклического модуля в результате раскрытия двух супротивных почек. Появившиеся дочерние модули длинные (M II). Угол расхождения дочерних модулей от материнского  $30^\circ$ . Нередко ветвление модуля происходит из почек двух разных метамеров. Каждый дочерний модуль надстраивает свою ось по типу дихазия/монохазия модулями M III и M II. Новые боковые оси развиваются из спящих почек, расположен-



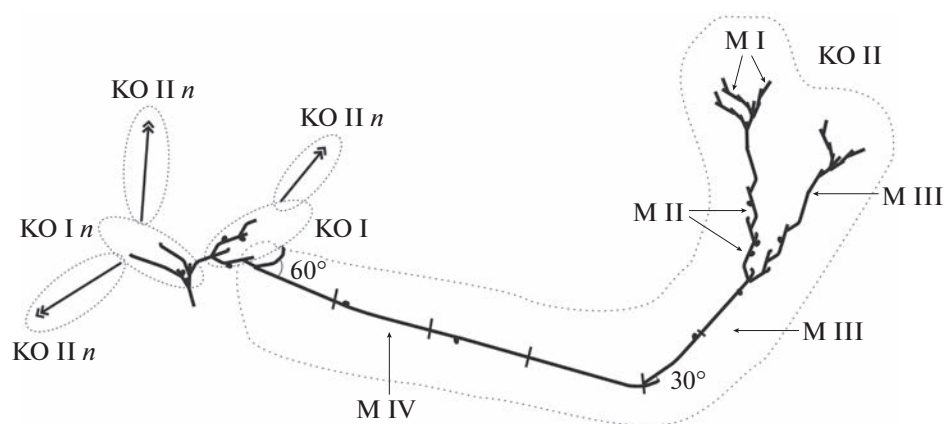


Рис. 4. Развитие корневищной оси II типа. М I, М II, М III, М IV – типы модулей (см. рис. 1), КО I – корневищная ось I типа, КО  $n$  – дочерние корневищные оси, КО II – корневищная ось II типа.

ных в медианной или проксимальной части любого модуля. Заканчивается рост любой дочерней оси короткими модулями (М I) по типу монохазия. Продолжительность дочерней КО II не превышает 10 лет.

Таким образом, корневищная ось состоит из длинных и коротких модулей. В корневищной оси модули сохраняют углы расхождения ( $60^\circ$  и  $30^\circ$ ). Формирование первого модуля происходит из спящей почки, а затем последовательно из ограниченного числа почек возобновления. Ветвление по монохазальному/дихазальному типу происходит в медианной или проксимальной части модуля.

**III тип корневищной оси.** Такой тип оси формируется в конце онтогенеза в структуре парциального куста и побега. В целом, механизм построения такой оси подобен механизму построения КО II. Отличие заключается в том, что основой для построения этой оси вместо типичного корневищного модуля выступает анизотропный моноциклический или дициклический модуль (образованный от побегов с фотосинтезирующей частью), возникший из спящей почки любой корневищной оси (КО  $n$ ) (рис. 5). Затем последовательное развитие М II и/или М III надстраивают ось корневища. Заканчивается ось, как и во всех случаях, симподиальной серией из модулей М I. Продолжительность жизни КО III не превышает 3–4 лет.

Исходя из особенностей строения различных типов осей, корневище *N. transiliensis* можно отнести к промежуточному типу. В целом у взрослых генеративных особей совокупность корневищных осей (КО I и КО II) формирует разветвленный *корневищный комплекс*. Корневищный комплекс в течение всего онтогенеза разрушается и надстраивается новыми корневищными осями по типу КО II. Стоит отметить, что у парциальных образований наблюдается частичная реитерация корневищных осей (в понимании Barthélemy,

Caraglio, 2007) посредством развития разных корневищных модулей.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно классификации Т.И. Серебряковой (1977), особи *N. transiliensis* развиваются по симподиальной длинно-побеговой модели побегообразования. Онтогенез сложный, полный, растения проходят следующие фазы развития: первичный побег → первичный куст → куртина → система

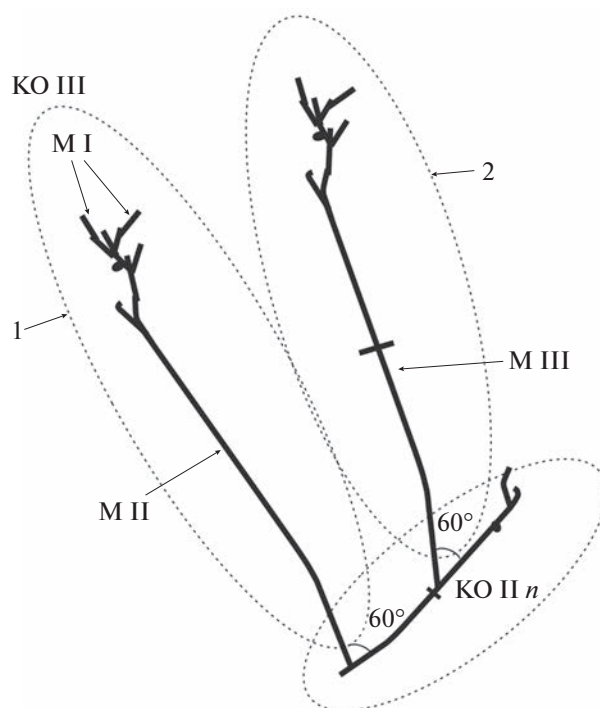


Рис. 5. Развитие корневищной оси III типа. М I, М II, М III – типы модулей (см. рис. 1), КО II  $n$  – любая корневищная ось II типа  $n$ -го порядка.

парциальных кустов и парциальных побегов → → парциальный куст → парциальный побег. Такой тип развития характерен для многих длиннокорневищных растений (Серебрякова, 1977; Жукова, 1995). В течение всего онтогенеза особей формируются различные типы удлиненных побегов, геофильные части которых, принимают участие в построение корневища. Произрастая на горных луговых задернованных почвах, у растений *N. transiliensis* в организации корневища участвуют различные по структуре корневищные модули: короткие ортотропные, длинные анизотропные, длинные плагиотропные.

Формирование модулей связано с реализацией разных почек (почек возобновления, спящих почек). Так, в корневище *N. transiliensis* нередко одна супротивная почка в узле дочернего модуля остается в покое, она реализуется с некоторым запозданием. В условиях высокогорья такой сдвиг во времени, с одной стороны, можно рассматривать как проявление резервного механизма восстановления дочерней оси в случае ее повреждения, с другой — как адаптационный механизм побегообразования. В любом случае для особей *N. transiliensis* развитие модулей из спящих почек приводит к отсроченной реитерации оси (Barthélémy, Caraglio, 2007), что следует рассматривать в качестве морфобиологической основы этого вида.

Корневищный комплекс *N. transiliensis* состоит из совокупности корневищных осей. Выявлено три типа корневищных осей. Анализ их структуры показал, что они состоят из длинных и коротких модулей, углы расхождения дочерних модулей от материнского сохраняются ( $60^\circ$  и  $30^\circ$ ), развитие модулей происходит из спящих почек, а затем последовательно из ограниченного числа почек возобновления. Из-за изменчивого ветвления (по монохазальному/дихазальному типу) и различного топографического положения модулей (в медианной или проксимальной части) рисунок корневища не предсказуем. Эти признаки в большей степени характеризуют “негеометрический” тип корневища. Подобное построение корневища отмечено у многих трав, произрастающих в сезонном и бессезонном климате в различных группах однодольных и двудольных растений (Смирнова, Торопова, 1974; Восточноевропейские, 1994; Восточно-европейские, 2004; Chomicki, 2013; Cheryomushkina, Guseva, 2015).

Различное симподиальное сочленение и ветвление модулей сопровождается дифференциацией разветвленных осей, их ярусным распределением и функциональной нагрузкой. Нижний ярус образуют длинные полициклические корневищные модули, которые обеспечивают подземное продвижение особи, а также являются опорными конструкциями для построения вышележащих структур. Увеличение угла расхождения до  $60^\circ$

связано с ростом спящей почки за счет увеличения числа зачаточных метамеров, что приводит к отклонению ее от материнской оси. Такой угол отхождения дает возможность будущему модулю отойти как можно дальше от материнской оси, что обеспечивает больший захват территории. Как правило, средний ярус образован дициклическими и моноциклическими анизотропными модулями, возникшими из почек возобновления под углом  $30^\circ$ . Несмотря на острый угол расхождения дочерних модулей от материнского, их длинные анизотропные части приводят к центробежному развитию корневищной оси в субстрате и захвату пространства. Размещение побеговых структур верхнего яруса определяют моноциклические ортотропные модули, выполняющие функции — удержания территории, фотосинтезирующую, репродуктивную. Ярусное распределение корневищных осей у особей *N. transiliensis* обеспечивает устойчивое развитие вида в гиетро-мезофитных высокогорных условиях Тянь-Шаня. Подобная ярусная организация отмечена у вегетативно подвижных многолетних и малолетних корневищных растений (Любарский, 1967; Смирнова, Торопова, 1974, Восточно-европейские, 2004).

В сравнении с некоторыми видами, в том числе из сем. Lamiaceae (*Dracocephalum ruyschiana* L., *Scutellaria alpina* L.) (Bell, 1979), корневище *N. transiliensis* стремится к соответствию Y-образного рисунка “по типу дихазия”. Однако, в целом, многолетняя основа корневищной оси *N. transiliensis* характеризуется линейным типом построения “по типу монохазия” (Bell, 1979), что характерно для растений с выраженными эксплерентными свойствами и для растений, произрастающих на песчаных дюнах (Bell, Tomlinson, 1980; Смирнова, 1987; Восточноевропейские, 1994; Восточно-европейские, 2004). Наши результаты показывают, что линейный тип развития оси у корневища *N. transiliensis*, может быть связан с влиянием высокогорных условий и сильной задернованностью почвы.

Подобное развитие многолетних структур нами отмечено у близкородственного вида *N. mariae*, произрастающего в ксерофильных условиях Таджикистана на плотном глинистом субстрате (Асташенков, Черемушкина, 2016). Особи этого вида формируют каудекс за счет симподиального развития только коротких ортотропных модулей (аналогичных M I, *N. transiliensis*). Основной паттерн построения многолетней оси происходит по типу монохазия (реже дихазия) в результате раскрытия только одной почки возобновления в короткой проксимальной части в узле 3 или 4 метамера предыдущего модуля. Супротивная и нижележащие почки становятся спящими. В отличие от *N. transiliensis*, у *N. mariae* угол расхождения дочернего модуля от материнского составляет  $10-15^\circ$ . Развитие новых боковых осей происходит из спящих почек. По-



жившейся из спящей почки модуль становится основой для построения новой оси по монохазальному типу следующего порядка. Исходя из этого, линейный тип построения осевых органов характерен не только для видов, произрастающих на задернованных почвах, но и у видов, растущих на твердых и плотных субстратах. При сравнении развития многолетних структур двух близкородственных видов наблюдаются схожие направления в паттерне ветвления модулей и построения многолетней структуры, однако основной рисунок подземной сферы *N. mariae* в отличие от *N. transiliensis* более предсказуем. Исходя из общих тенденций развития рода, возникшего в мезофитных районах Восточной Азии, и предковой формы (Буданцев, 1993), мы предполагаем, что диверсификация биоморф близкородственных таксонов могла проходить в ряду от мезофитных к ксерофитным местообитаниям с изменениями роста, длины и угла ветвления модулей (Astashenkov *et al.*, 2021). Изменение экологических условий в сторону уменьшения уровня увлажнения, вероятно, привели к трансформации длинного плагиотропного модуля с развернутым (тупым) углом ветвления к короткому ортотропному модулю с острым углом ветвления.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Онтогенез особи *N. transiliensis* полный, сложный. На начальных этапах онтогенеза особи представляют собой первичный куст, в середине онтогенеза происходит вегетативное размножение с образованием систем неомоложенных парциальных кустов и побегов. В побегообразовании принимают участие разные типы почек (почки возобновления, спящие почки) из которых формируются различные типы удлиненных побегов: ортотропный моноциклический, анизотропный моно-, дициклический, плагиотропный полициклический. Архитектурный подход выявил разнообразие корневищных модулей, развитие которых происходит из почек возобновления и спящих почек. Угол расхождения дочерних модулей от материнского при последовательном развитии составляет 30°, при отсроченном 60°.

В течение онтогенеза формируются три типа корневищных осей. В первой половине онтогенеза (первичный побег → первичный куст → куртина) развитие модулей происходит последовательно из ограниченного числа почек, как правило, в определенном узле дистальной части модуля. Корневищная ось состоит из коротких и длинных модулей и различного их сочетания, ветвление модулей происходит по типу монохазия/дихазия. Короткий модуль ветвится в 3 междоузлии, длинный в 6–7. В середине онтогенеза (куртина → система парциальных кустов и парциальных побегов) развитие модулей происходит из спящих почек и

почек возобновления. Модули формируются из ограниченного числа почек, ветвление модулей изменчивое (по монохазальному/дихазальному типу) и происходит в медианной или проксимальной частях модуля. Корневищная ось состоит из длинных и коротких модулей. В оси сохраняются углы отхождения модулей (60° и 30°). На завершающих фазах морфогенеза (парциальный куст → парциальный побег) развитие модулей происходит также из спящих почек и почек возобновления. Основой для построения оси вместо типичного корневищного модуля выступает анизотропный моноциклический или дициклический модуль, возникший из спящей почки. Любая корневищная ось заканчивается серией ортотропных коротких модулей. Совокупность корневищных осей формирует сложный разветвленный корневищный комплекс. Исходя из особенностей ветвления и способу построения, корневище *N. transiliensis* относится к “промежуточному” типу. Устойчивое развитие особей в гигро-мезофитных высокогорных условиях определяется многоярусной архитектурой корневища.

**Благодарности.** Авторы выражают особую признательность А.Н. Ивашенко за поддержку и помощь в организации и проведении полевых работ.

**Финансирование.** Работа выполнена по проекту Государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (AAAA-A21-121011290026-9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Асташенков А.Ю., Черемушкина В.А. Архитектурная модель *Nepeta mariae* (Lamiaceae) // Раст. мир Азии. Рос. 2016. № 4. С. 22–29.
- Буданцев А.Л. Триба *Nepeteae* Benth. семейства *Lamiaceae* Lindl. (систематика, география, возможности использования): Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб.: БИН РАН, 1993. 33 с.
- Восточноевропейские широколиственные леса / Ред. Смирнова О.В. М: Наука, 1994. 364 с.
- Восточно-европейские леса. История в голоцене и современность. Кн. 1 / Ред. Смирнова О.В. 2004. 479 с.
- Гатиук Л.Е. Геммаксилярные растения и система подчиненных единиц их побегового тела // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1974. Т. 79. Вып. 1. С. 100–113.
- Гусева А.А. Морфогенез видов рода *Scutellaria* L. и структура их ценопопуляций в Сибири”: Автореф. дис. канд. биол. наук. Новосибирск: ЦСБС СО РАН, 2019. 16 с.
- Жукова Л.А. Популяционная жизнь луговых растений. Йошкар-Ола: Ланар, 1995. 224 с.
- Колегова Е.Б., Черемушкина В.А. Структура побеговых систем видов рода *Thymus* (Lamiaceae) в Хакасии // Ботан. журн. 2012. Т. 97. № 2. С. 173–183.
- Любарский Е.Л. Экология вегетативного размножения высших растений. Казань: КГУ, 1967. 184 с.

- Мазуренко М.Т., Хохряков А.П. Структура и морфогенез кустарников. М.: Наука, 1977. 151 с.
- Нухимовский Е.Л. Основы биоморфологии высших растений. М.: Недра, Т.1. 1997. 630 с.
- Пояркова А.И. Новые виды котовника // Ботан. мат. герб. БИН АН СССР. 1953. Т. 15. С. 282–320.
- Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. БИН АН СССР. Сер. 3. Геоботаника. М.; Л.: Наука, 1950. 176 с.
- Савиных Н.П. Архитектура трав // Актуальные проблемы современной биоморфологии: Мат. II Всерос. школы-семинара. Киров: Радуга-Прес, 2012. 342–354.
- Серебряков И.Г. Экологическая морфология растений. М.: Высшая школа, 1962. 378 с.
- Серебряков И.Г., Серебрякова Т.И. О двух типах формирования корневищ у травянистых растений // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1965. Т. 70. Вып. 2. С. 67–81.
- Серебрякова Т.И. Морфогенез побегов и эволюция жизненных форм злаков. М.: Наука, 1971. 360 с.
- Серебрякова Т.И. Об основных “архитектурных моделях” травянистых многолетников и модусах их преобразования // Бюл. МОИП. Отд. Биол. 1977. Т. 82. Вып. 5. С. 112–128.
- Смирнова О.В. Особенности вегетативного размножения травянистых растений дубрав в связи с вопросом самоподдержания популяций // Возрастной состав популяций цветковых растений в связи с их онтогенезом / Ред. Уранов А.А. М.: МГПИ им. В.И. Ленина. 1974. С. 168–195.
- Смирнова О.В. Структура травянистого покрова широколиственных лесов М.: Наука, 1987. 206 с.
- Смирнова О.В., Торопова Н.А. О сходстве жизненных циклов и возрастного состава популяций некоторых длиннокорневищных растений // Возрастной состав популяций цветковых растений в связи с их онтогенезом / Ред. Уранов А.А. М.: МГПИ им. В.И. Ленина, 1974. С. 56–69.
- Смирнова О.В., Заугольнова Л.Б., Торопова Н.А. Фаликов Л.Д. Морфобиологическое разнообразие особей в пределах ценопопуляции // Ценопопуляции растений (основные понятия и структура) / Ред. Уранов А.А., Серебрякова Т.И. М.: Наука, 1976. С. 14–43.
- Черемушкина В.А. Биология Луков Евразии. Новосибирск: Наука, 2004. 279 с.
- Черемушкина В.А., Таловская Е.Б. Жизненные формы видов рода *Thymus* (Lamiaceae): архитектурный подход // Ботан. журн. 2019. Т.104. № 3. С. 377–390.
- Чернева О.В. Семейство Labiatae Juss. // Растения Центральной Азии. Л.: Наука, 1970. Вып. 5. С. 9–95.
- Anest A., Charles-Dominique T., Maurin O., Mullane M., Edelin C., Tomlinson K.W. Evolving the structure: climatic and developmental constraints on the evolution of plant architecture. A case study in Euphorbia // New Phytol. 2021. V. 231(3). P. 1278–1295.
- Astashenkov A.Yu. Morphological adaptation of *Nepeta pamirensis* Franch. (Lamiaceae) to the conditions of the Pamir mountains // Contem. Probl. of Ecol. 2015. V. 8. №. 5. P. 636–646.
- Astashenkov A.Yu., Cheryomushkina V.A., Grebenjuk A.V., Dzumanov S.D. Transformation of life forms and ontogenetic structure of *Nepeta pulchella* Pojark. coenopopulations in Acsy-Zhabaglinsky nature reserve // Contem. Probl. of Ecol. 2017. V. 10. № 6. P. 758–771.
- Astashenkov A.Yu., Cheryomushkina V.A., Myrzagalieva A.B., Medeubaeva B. Ontogenesis, estimation of coenopopulations state and component composition in *Nepeta densiflora* individuals of East Kazakhstan // Inter. J. Environ. Stud. 2019. V. 76. № 4. P. 634–647.
- Astashenkov A.Yu., Karpova E.A., Cheryomushkina V.A. Diversity patterns of life forms and phenolic profiles of endemic *Nepeta* plants along an aridity gradient of a high-mountain zone in Central Asia // Taiwan. 2021. V. 66(4). P. 541–556.
- Barthélémy D., Caraglio Y. Plant Architecture: A Dynamic, Multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny // Ann. Bot. 2007. № 99(3). P. 375–407.
- Bell A.D. The hexagonal branching pattern of rhizomes of *Alpinia speciosa* L. (Zingiberaceae) // Ann. Bot. 1979. № 43. P. 209–223.
- Bell A.D., Adrian D. Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology. London: Oxford University Press. 1991. 341 p.
- Bell A.D., Tomlinson P.B. Adaptive architecture in rhizomatous plants // Bot. Journ. Linnees Soc. 1980. V. 80. № 2. P. 125–160.
- Buissart F., Vennetier M., Delagrance S., Girard F., Caraglio Y., Sabatier S.A., Munson A.D., Nicolini E.A. The relative weight of ontogeny, topology and climate in the architectural development of three North American conifers // Ann. of Bot. Plants. 2018. V. 10. № 4. P. 1–17.
- Cheryomushkina V.A., Guseva A.A. Life forms of *Scutellaria supina* L. (Lamiaceae) // Contem. Probl. of Ecol. 2015. V. 8. № 5. P. 624–635.
- Chomicki G. Analysis of rhizome morphology of the Zingiberales in Payamino (Ecuador) reveals convergent evolution of two distinct architectural strategies // Acta Bot. Gallica: Botany Letters. 2013. V. 160. P. 239–254.
- Cremers G. Sur la présence de dix modèles d’architecture végétative chez les Euphorbes malgaches. Comptes Rendus de l’Académie des Sciences Série D: Sciences Naturelles. 1975. V. 281(21). P. 1575–1578
- Enriquez B., Leon L., Franciscus H., Vester M., Hallé F. The Architecture of phyllanthus acuminatus Vahl: a prelude to understanding the architectural evolution in the Phyllanthaceae // Adansonia. 2008. V. 30(1). P. 137–149.
- Gatsuk L.F., Smirnova O.V., Vorontzova I.T. et al. Age States of Plants of Various Growth Forms // A Review. J. Ecol. 1980. V. 68. № 4. P. 675–696.
- Guillaumet J.L. Formes et développement des “Pandanus” malgaches // Webbia. 1973. V. 28(2). P. 495–519.
- Guseva A.A., Cheryomushkina V.A. Features of the development of xylorhizomes in a dwarf shrub *Scutellaria mongolica* K. Sobol. // Plant diversity: status, trends, conservation concept / BIO Web of Conferences. 2020. V. 24. P. 26.

- Hallé F., Oldeman R.A.A.* Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. Paris: Masson. 1970. 178 p.
- Keller R.* Les divers modes de ramification de *Potamogeton pectinatus* L. (Potamogetonaceae) dans le Léman // *Adansonia*. 1997. Ser. 3. V. 19(1). P. 117–134.
- Li-Xi-wen, Ian C. Hedge* Family *Lamiaceae* // *Flora of China*. Beijing: Science press: Missouri bot. garden. 1994. V. 17. P. 165–166.
- Smirnova O.V., Palenova M.M., Komarov A.S.* Ontogeny of different life forms of plants and specific features of age and spatial structure of their populations // *Russ. J. Develop. Biol.* 2002. V. 33. № 1. P. 1–10.
- Troll W.* Die Infloreszenzen. Jena: Fischer Verlag. 1964. Bd. 1. 615 p.
- Troll W., Rauh W.* Das Erstarkungswachstum krautiger Dikotylen, mit besonderer Berücksichtigung der primären Verdickungsvorgänge. Bd. 1. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag OHG Press. 1950. 87 p.
- Veillon J.-M.* Architecture of the new caledonian species of *Araucaria* // *tropical trees as living systems cambridge* / Eds: *Tomlinson P.B., Zimmerman M.* Cambridge University Press. 1978. P. 233–245.
- Vester H.* Architectural diversification within the genus *Vismia* (Clusiaceae) in the amazonian rain forest (Aracaceae, Colombia) // *The Evolution of Plant Architecture* / Eds: *Kurmann M.H. Hensley A.R.* Kew: Royal Botanic Gardens, Kew. 1999. P. 147–158.
- Warming E.* Om Jødduløbere. Kgl. Danske vid. selskab. Biol. Skr. Ser. 8. II. № 6. Kjöbenhavn. 1918. P. 295–378.

## Development and Architecture of the *Nepeta transiliensis* (Lamiaceae) Rhizome

V. A. Cheryomushkina<sup>1, #</sup>, A. Yu. Astashenkov<sup>1</sup>, E. K. Komarevtseva<sup>1</sup>, and A. A. Guseva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>#</sup>e-mail: astal@bk.ru

The ontogeny and structural organization of the rhizome of *Nepeta transiliensis* individuals in the high-mountain conditions of the Zailiyskiy Alatau have been studied. Various types of buds (renewal buds, dormant buds) take part in shoot formation, from which various types of elongated shoots are formed. Using the architectural approach to the description of plants, the main structural units – rhizome modules – are identified. Different branching of modules leads to the construction of different rhizome axes. In the rhizomatous axes, the angles of departure of the lateral modules from the maternal one differ, the development of the modules occurs sequentially from the renewal buds or with a delay from the dormant buds. The set of rhizomatous axes forms a branched rhizome complex and leads to the formation of rhizome tiers. In general, the rhizome of *N. transiliensis* is of the “intermediate” type, which combines the features of a geometric and non-geometric rhizome.

**Keywords:** architecture, rhizome module, rhizome axis, rhizome, ontogenesis, shoot-formation, *Nepeta transiliensis*

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩИХ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ НА СОЛЕВОЙ СТРЕСС

© 2023 г. А. Т. Епринцев\*, @, М. О. Гатауллина\*

\*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Университетская пл., 1, Воронеж, 394018 Россия

@E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 03.11.2021 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 05.04.2022 г.

Исследовано влияние солевого стресса на активность декарбоксилирующих малатдегидрогеназ в листьях кукурузы при осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма к солевому стрессу. Показано, что избыточные концентрации NaCl вызывают увеличение ферментативной активности как НАД<sup>+</sup>-МЭ, так и НАДФ<sup>+</sup>-МЭ. Наибольший вклад в увеличение активности НАД<sup>+</sup>-МЭ вносит интенсификация экспрессии гена *nad-me2*, тогда как экспрессия *nad-me1* при засолении увеличивается в меньшей степени. Метил-специфичная ПЦР показала обратную зависимость между экспрессией *nad-me2* и степенью метилирования промотора данного гена, в то время как *nad-me1* и *nadf-me*, по-видимому, регулируются иными механизмами. Предполагается разная функциональная роль каждой изоформы исследуемых малик-энзимов в адаптивной реакции клеточного метаболизма.

**Ключевые слова:** *Zea mays* L., малик-энзим, засоление, изоферментный состав, транскрипция, метилирование, CpG-островки

**DOI:** 10.31857/S1026347023010043, **EDN:** IJBHED

Роль органических кислот очень важна при перестройке клеточного метаболизма к стрессовым условиям различной природы. Особое значение имеет малат – яблочная кислота, которая способна запасаться в вакуоли растительных клеток в значительных количествах, что обеспечивает ей специфическую функцию источника C<sub>4</sub>- и C<sub>3</sub>-органических веществ (Igamberdiev, Eprintsev, 2016). В условиях засоления доминирующую роль в адаптивном варианте перестройки метаболизма играет интенсификация цикла трикарбоновых кислот, что получило название “солевое дыхание” (Полевой, 1989; Eprintsev *et al.*, 2021).

Ранее была показана важная роль малатдегидрогеназной ферментной системы в регуляции и трансформации метаболизма яблочной кислоты. Особо хорошо изучено действие оксидоредуктаз – НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>-малатдегидрогеназ ((МДГ) КФ 1.1.1.37, КФ 1.1.1.82) в процессах энергизации катаболических и анаболических реакций. НАД<sup>+</sup>-зависимая малатдегидрогеназа оказывает сильное действие на функционирование цикла трикарбоновых кислот, и было установлено ее резкое активирование путем изменения экспрессии соответствующих генов и при этом выявлен эпигенетический механизм ее регуляции (Eprintsev *et al.*,

2021). Гораздо меньше работ посвящено роли декарбоксилирующих малатдегидрогеназ (НАД<sup>+</sup>-МЭ, КФ 1.1.1.39) и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой (НАДФ<sup>+</sup>-МЭ, КФ 1.1.1.40). Хотелось бы отметить важное значение обозначенных энзимов, обусловленное способностью ферментативно изменять углеродный скелет малата, в частности синтезировать пируват (Badia *et al.*, 2017).

Декарбоксилирующие малатдегидрогеназы включают в себя семейство белков с несколькими изоформами, расположенными в разных компартментах эукариотических клеток. Это ключевой фермент, регулирующий метаболизм малата. Кроме того, малик-энзимы широко присутствуют в митохондриях, хлоропластах и цитоплазме растений и участвуют в регуляции роста, развития растений и их реакции на стресс (Sun *et al.*, 2019; Eprintsev *et al.*, 2020b).

НАД<sup>+</sup>-зависимый малик-энзим (К.Ф. 1.1.1.39) использует в качестве кофермента НАД<sup>+</sup>/НАДН. Получение гомогенных препаратов НАД<sup>+</sup>-малик-энзимов позволило установить их отличие в таких важных характеристиках, как сродство к субстратам и в значениях pH-оптимумов (Епринцев, Гатауллина, 2021). Сообщается о регулирую-

шем влиянии ионов металлов, включая катионы натрия на активность различных малатдегидрогеназ (Weimberg, 1967; Emami *et al.*, 2016).

НАДФ<sup>+</sup>-зависимый малик-энзим служит источником углекислого газа для фотосинтеза в хлоропластах оболочки C<sub>4</sub>-растений и в цитозоле растений с САМ-метаболизмом, а также источником НАДФН и пирувата в цитозоле и пластидах различных тканей (Hill *et al.*, 1996).

В настоящее время имеется много доказательств участия малик-энзимов в адаптивных реакциях на различные стрессы (Chen *et al.*, 2019), однако регуляция активности данных ферментных систем на экспрессионном уровне практически не изучена.

Эпигенетический механизм регуляции характерен для ключевых энзимов цикла Кребса. Причем, этот способ регуляции ферментов ЦТК имел высокую эффективность (Aceituno *et al.*, 2008). Однако, наблюдается явный дефицит данных о возможном эпигенетическом механизме регуляции их функционирования. В связи с этим целью нашей работы было исследование динамики активности НАД<sup>+</sup>- и НАДФ<sup>+</sup>-малик-энзимов в листьях кукурузы в условиях солевого стресса, экспрессии генов, кодирующих данные ферменты, и изменения величины метильного статуса CpG-островков промоторов их генов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали листья 10-дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно при десятичасовом световом дне и интенсивности света 25 Вт/м<sup>2</sup> в климатической камере ("LabTech", Корея).

Группы растений без корневой системы инкубировали в растворе NaCl 24 ч. Концентрация солевого раствора хлорида натрия (NaCl) составляла 150 мМ. Контрольной группой являлись растения, помещенные в воду.

Первые образцы для исследования извлекали еще до начала инкубации (нулевой образец) из контрольной, и из опытной группы растений. Далее образцы отбирали из инкубационной среды через 1, 3, 6, 12 и 24 ч от начала эксперимента.

Получение митохондриальной и цитоплазматической форм осуществляли путем проведения дифференциального центрифугирования. Первоначально получали фракцию хлоропластов центрифугированием при 3000 г 8–10 мин. Митохондрии из цитозоля осаждали центрифугированием при 12000 г 20 мин, добавляя 0.1%-ный ТВИН-60 (Селиванова и др., 2014). В качестве маркерных ферментов для контроля уровня загрязнения использовали сукцинатдегидрогеназу, алкогольдегидрогеназу, а также концентрацию хлорофилла.

Изоформы малик-энзимов идентифицировали в 7%-ном полиакриламидном геле (Mayer *et al.*, 2015). Разделение исследуемых белков проводили в основной буферной системе (рН 8.3). Электрофорез белков осуществляли при температуре 2–4°C. Подавали постоянный электрический ток 1.5–2.5 мА на один карман пластинки геля (Гааль и др., 1982). Специфическое проявление малатдегидрогеназы осуществляли тетразолиевым методом. Для повышения специфичности метода и сведения до минимума возможности проявления оксидоредуцирующих малатдегидрогеназ гели проявляли при более низких значениях рН (рН 5.5 для НАД<sup>+</sup>-малик-энзима и 6.5 НАДФ<sup>+</sup>-малик-энзима). Гель инкубировали в темноте при 37°C в среде, содержащей 100 мМ Нерес-буфер; 2 мМ раствор малата натрия; 18 мг НАД<sup>+</sup>; 10 мг НСТ (предварительно растворенный в 0.5 мл этиленгликоля) и 0.6 мг ФМС.

Общую активность МЭ определяли в гомогенате по скорости окисления НАД(Ф)Н при 340 нм. Масса навески составляла 0.1 г листьев кукурузы. Среда спектрофотометрирования содержала 100 мМ Нерес-HCl, рН 6.5 для НАД<sup>+</sup>-малик-энзима и 7.0 для НАДФ<sup>+</sup>-малик-энзима; 1.5 мМ пируват, 0.15 мМ НАД(Ф)Н; 5 мМ MnCl<sub>2</sub>. Соотношение навески к среде спектрофотометрирования при гомогенизации составляло 1 : 10. Ферментативной единицей активности фермента считали количество энзима, которое превращало (обратная реакция) или образовывало (прямая реакция) 1 мкмоль НАД(Ф)Н за 1 мин при 25°C.

РНК из растений выделяли методом фенол-хлороформной экстракции (Chomczynski *et al.*, 1987).

Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV ("Евроген", Россия). Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей из GenBank, с помощью программы Primer-BLAST (табл. 1). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 ("Roche", Швеция) с красителем SybrGreen I ("Евроген"). Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* (Nicot *et al.*, 2005). В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением 2<sup>-ΔΔCt</sup>-метода (Livak, Schmittgen, 2001).

ДНК выделяли с помощью набора ПРОБА – ГС ("ДНК-Технология", Россия) согласно рекомендациям производителя. Для исследования изменения статуса метилирования CpG-динуклеотидов промоторов генов *nad-me1*, *nad-me2*, *nadf-me*, кодирующих декарбоксилирующие малатдегидрогеназы,

**Таблица 1.** Специфические праймеры к генам декарбоксилирующей малатдегидрогеназы

Ген	Прямой	Обратный
<i>nad-me1</i>	TGGGATTGGTTTAGGTGCC	GGTTCCTCGTGGCAGTATGAA
<i>nad-me2</i>	TTTTAGGAGCTGTACGGGCA	CTCCTCGCACTCTCAAAAAGC
<i>nadf-me:</i>	GCAAGAAGGTTTGGCTGGTG	GGTGAAGGGTGGGAAGATGG

была проведена модификация образцов ДНК (Hsieh, 1999).

Анализ промоторов исследуемых генов на наличие CpG-островков и подбор праймеров для МС-ПЦР осуществляли с помощью программы MethPrimer. Последовательности праймеров для проведения МС-ПЦР представлены в табл. 2.

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office). Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони) (Лакин, 1990). Дополнительно применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при  $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

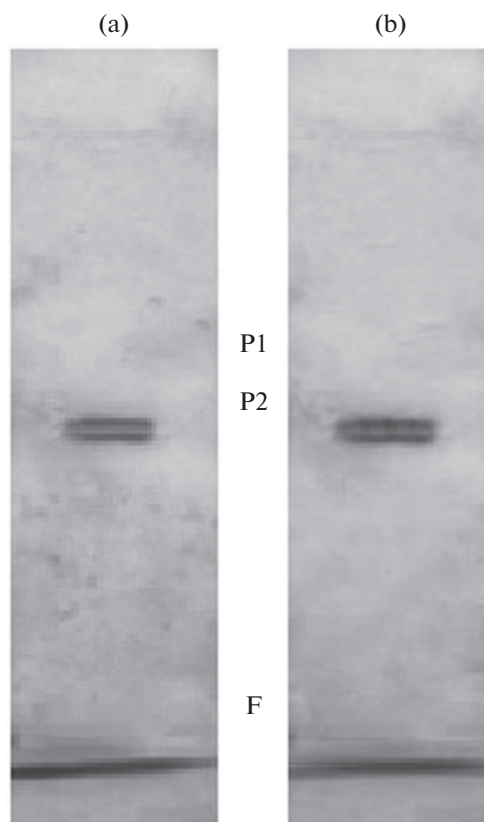
В листьях кукурузы активность малик-энзимов обнаружена преимущественно в митохондриях для НАД<sup>+</sup>-МЭ и в хлоропластах для НАДФ<sup>+</sup>-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы. С помощью дифференциального центрифугирования были получены исследуемые фракции митохондрий и хлоропластов и определена их степень перекрестного загрязнения по маркерным ферментам, которая составляла не более 3–8%. Анализ полученных данных свидетельствует о преимущественной локализации изучаемых энзимов в митохондриях (НАД-малик-энзим, 88%) и в хлоропластах (НАДФ-малик-энзим, 91%) (табл. 3).

Исследование изоферментного состава декарбоксилирующих малатдегидрогеназ было проведено в полиакриламидном геле. НАД<sup>+</sup>-зависимый малик-энзим в листьях кукурузы был представлен двумя изоферментами: первая изоформа характеризуется относительной электрофоретической подвижностью 0.44, а вторая – 0.49. Для НАДФ<sup>+</sup>-малик-энзима была обнаружена одна форма энзима с  $R_f = 0.1$  (рис. 1, 2). Следует обратить внимание, что изоферментный состав декарбоксилирующих малатдегидрогеназ в листьях

кукурузы являлся постоянным и не менялся в стрессовых условиях, вызванных засолением.

В условиях засоления активность НАД<sup>+</sup>-МЭ в кукурузе снижалась в течение первого часа, но затем возрастала и достигала максимального значения к 12 ч (рис. 3). Повышение активности изучаемого малик-энзима может указывать на его важное значение в перестройке клеточного метаболизма, обусловленного интенсификацией окислительных реакций в митохондриях (Davies, 1979).

Ранее в наших работах была показана роль ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот в осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма к стрессовым условиям и, в частности, к засолению. Так, цитратсинтаза, аконитатгидратаза и сукцинатдегидрогеназа резко увеличивали



**Рис. 1.** Электрофореграмма НАД<sup>+</sup>-МЭ из митохондриальной фракции листьев кукурузы в нормальных условиях (а) и в условиях солевого стресса (б) F – линия фронта, P1 и P2 – искомые белки.

**Таблица 2.** Праймеры к генам декарбоксилирующих малатдегидрогеназ для метилспецифичной ПЦР

Ген	Название	Последовательность	
<i>nad-me1</i>	I	Прямой М	TATTTTTTTTTTGGATTTAATCGG
		Обратный М	TACCACGAATCGTAAAAAATATCGTT
		Прямой U	TATTTTTTTTTTGGATTTAATTGG
		Обратный U	TACCACAAATCATAAAAAATATCA
	II	Прямой М	TTTTATTTTTTTGTTTTTATCGC
		Обратный М	TACCACGAATCGTAAAAAATATCGTT
		Прямой U	TTTTATTTTTTTGTTTTTATTGC
		Обратный U	TACCACAAATCATAAAAAATATCA
	III	Прямой М	TTAGGAGTTAGGGGTTTCGG
		Обратный М	TACCACGAATCGTAAAAAATATCGTT
		Прямой U	TTAGGAGTTAGGGGTTTTGG
		Обратный U	TACCACAAATCATAAAAAATATCA
<i>nad-me2</i>	I	Прямой	GTTTTTGATCGTTTTTTGTTTTAGC
		Обратный М	ACTAACAACТААСТАССТАС
		Прямой U	TGTTTTTGATTGTTTTTTGTTTTAGT
		Обратный U	ACTAACAACТААСТАССТАС
	II	Прямой М	TTTTTTTTTTTATAAATAAATCG
		Обратный М	ACTAACAACТААСТАССТАС
		Прямой U	TTTTTTTTTTTATAAATAAATG
		Обратный U	ACTAACAACТААСТАССТАС
	III	Прямой М	AGTGTATAAAGTAGTAGAACG
		Обратный М	ACTAACAACТААСТАССТАС
		Прямой U	AGTGTATAAAGTAGTAGAATG
		Обратный U	ACTAACAACТААСТАССТАС
<i>nadf-me</i>	I	Прямой М	TAGAGAGTCGAAAGTATTCGATACG
		Обратный М	CAAACAAAAACAACТТАААААСGAT
		Прямой U	AAAATAGAGAGTTGAAAGTATTTGATATGG
		Обратный U	CAAACAAAAACAACТТАААААСААТ
	II	Прямой М	TAAATAAAAAAATAGAGAGTCG
		Обратный М	CAAACAAAAACAACТТАААААСGAT
		Прямой U	TAAATAAAAAAATAGAGAGTAG
		Обратный U	CAAACAAAAACAACТТАААААСААТ
	III	Прямой М	GAGATAAAAAGGTTTAGTTCCG
		Обратный М	CAAACAAAAACAACТТАААААСGAT
		Прямой U	GAGATAAAAAGGTTTAGTTAG
		Обратный U	CAAACAAAAACAACТТАААААСААТ

Примечание. I, II, III – разные группы праймеров. Цитозин в каждой группе праймеров отличался по наличию метилирования (М) или его отсутствию (U).

**Таблица 3.** Распределение общей активности малик-энзимов по локализации

Локализация	НАД-МЭ		НАДФ-МЭ	
	общая активность Е/г сырой массы	% активности фермента от общего содержания	общая активность Е/г сырой массы	% активности фермента от общего содержания
Митохондрии	13.7 ± 0.07	88	0	0
Хлоропласты	0	0	15.6 ± 0.08	91
Цитоплазма	1.9 ± 0.01	12	1.5 ± 0.008	9

свою активность, что обеспечивало интенсификацию работы центрального звена энергетического обмена (Eprintsev *et al.*, 2017, 2018, 2020a). Следовательно, если учитывать митохондриальную локализацию НАД<sup>+</sup>-зависимого малик-энзима, то можно предполагать его участие в регуляции этого метаболического пути.

Динамика активности НАДФ<sup>+</sup>-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы в условиях солевого стресса имела куполообразную форму с максимумом на 12 ч экспозиции. Актив-

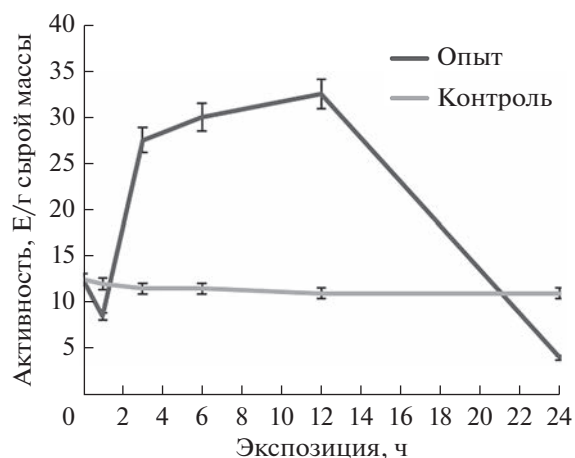
ность фермента возрастала более, чем в 4.5 раза в растениях, находящихся в условиях солевого стресса. Следует отметить, что величина активности оставалась высокой длительный промежуток времени и снижалась только к 24 ч экспозиции (рис. 4).

Регуляция скорости ферментативной реакции в стрессовых условиях может осуществляться посредством конформационных трансформаций белковой молекулы, либо изменением экспрессии генов, кодирующих данные ферменты. Проведенный поиск нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank для декарбоксилирующих МДГ показал, что НАД<sup>+</sup>-зависимые малик-энзимы представлены двумя изоферментами, кодируемыми ядерными генами. Ген НАД<sup>+</sup>-МЭ 1 расположен в хромосоме 5 (Gene ID: 100501486), имеет длину 6148 нуклеотидов и содержит в своем составе 19 экзонов. Ген НАД<sup>+</sup>-МЭ 2 расположен в хромосоме 5 (Gene ID: 100191942), имеет длину 9231 нуклеотид и содержит в своем составе 18 экзонов (Eprintsev *et al.*, 2020b).

НАДФ<sup>+</sup>-зависимый малик-энзим имеет в геноме кукурузы не менее 6 генов и 4 псевдогенов. Однако, для листьев кукурузы характерна только одна экспрессирующая хлоропластная форма гена, расположенного в хромосоме 3 (*nadf-me*, Gene



**Рис. 2.** Электрофоретическая подвижность НАДФ<sup>+</sup>-МЭ из хлоропластов листьев кукурузы в нормальных условиях (а) и в условиях солевого стресса (б). F – линия фронта, P – искомый белок.



**Рис. 3.** Общая активность НАДФ<sup>+</sup>-МЭ в листьях кукурузы при действии солевого стресса.



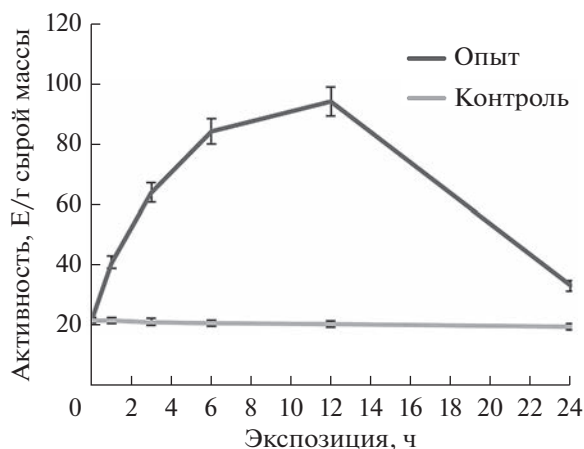


Рис. 4. Общая активность НАДФ<sup>+</sup>-МЭ в листьях кукурузы при действии солевого стресса.

ID: 542233), который имеет в составе 4925 нуклеотидов и содержит 20 экзонов.

Проведенный анализ уровня транскриптов генов, кодирующих исследуемые энзимы, выявил корреляцию с изменениями их ферментативной активности. Однако в варианте НАДФ<sup>+</sup>-зависимого малик-энзима наблюдалось, по-видимому, характерное разделение этапов адаптации. Наибольший вклад в общую активность декарбоксилирующих малатдегидрогеназ, вероятно, вносил изофермент малик-энзима 2, который кодируется геном *nad-me2*. Было установлено, что экспрессия этого гена, кодирующего данную изоформу, к 6 часу экспозиции увеличивается более, чем в 7 раз, в то время как увеличение экспрессии гена *nad-me1* было выражено в меньшей степени. При этом возрастание составляло 1.7 раза по сравнению с контролем (рис. 5). Стоит также отметить, что для первой изоформы (МЭ1) было характерно увеличение экспрессии в первый час солевого стресса. Анализ полученных данных позволяет заключить, что изменение функционирования генов является од-

ним из факторов регуляции активности НАДФ-малик-энзимов. Ранее было показано, что регуляция функционирования ключевых ферментов цикла Кребса в растениях, культивируемых в условиях солевого стресса, осуществлялась с помощью регуляции экспрессии генов исследуемых ферментов (Епринцев и др., 2021). Сообщается, что их активность коррелирует с так называемой индукцией “солевого дыхания”.

Исследование нуклеотидной последовательности промоторов генов, кодирующих малик-энзимы, показало, что в их составе содержатся CpG-островки. В составе промотора гена *nad-me1* и *nad-me* обнаружено по 2 островка размером 291 и 134 п.н. для НАДФ<sup>+</sup>-зависимого фермента и 142 и 430 для НАДФ<sup>+</sup>-зависимого. В промоторах генов *nad-me2* обнаружен один островок размером 312 нуклеотидов.

Наличие CpG-островков в промоторной области может говорить о возможном механизме регуляции интенсивности экспрессии исследуемых генов посредством изменения степени метилирования цитозинов в промоторах (Ступак, Вафина, 2021). Анализ полученных данных свидетельствует, что обнаружена обратная корреляция между экспрессией гена *nad-me2* и величиной метильного статуса цитозина CpG-островков промотора (рис. 6). Так, при повышении уровня относительных транскриптов с 3 по 12 ч экспозиции кукурузы в условиях солевого стресса степень метилирования промотора снизилась до 25%, что, по-нашему мнению, служило механизмом активации экспрессии гена *nad-me2*. Такое увеличение активности *nad-me2* приводило к интенсификации цикла трикарбоновых кислот, утилизирующего пируват через ацетил КоА (Igamberdiev, Vukova, 2018). Как видно из результатов, приведенных на рис. 5 и 6, для регуляции экспрессии генов *nad-me1* и *nad-me* (рис. 7) статус метилирования промоторов этих генов не имеет значения. По-видимому, уровень

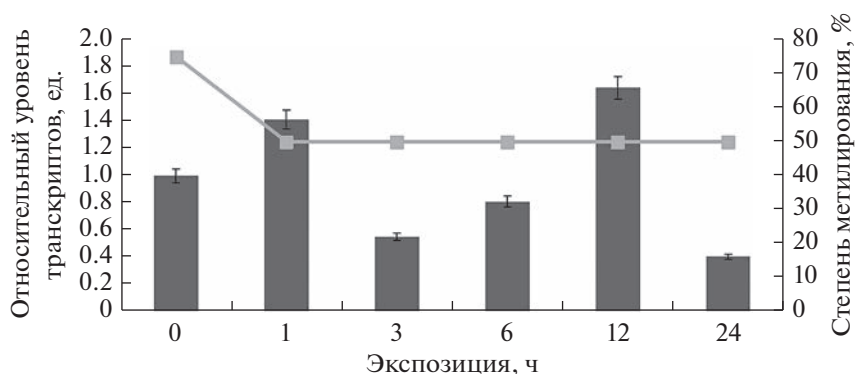


Рис. 5. Экспрессия *nad-me1* в листьях кукурузы в условиях засоления и степень метилирования CpG-островков.

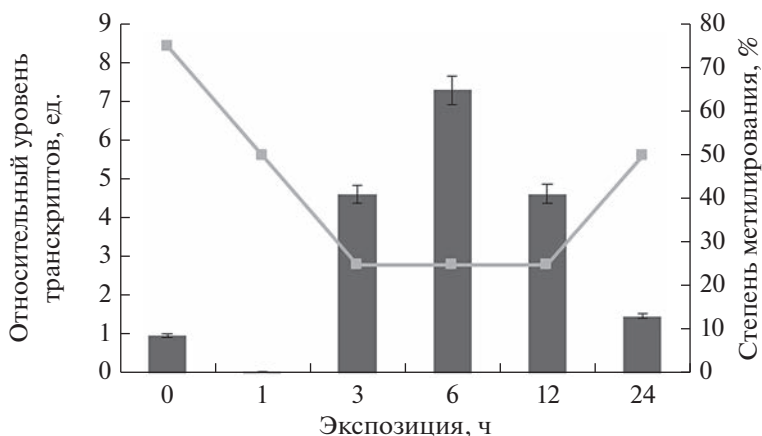


Рис. 6. Экспрессия *nad-me2* в листьях кукурузы в условиях засоления и степень метилирования CpG-островков.

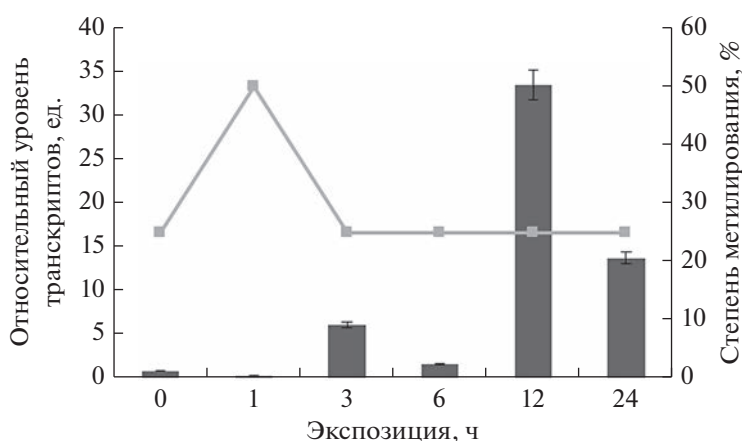


Рис. 7. Экспрессия *nadf-me* в листьях кукурузы в условиях засоления и степень метилирования CpG-островков.

концентрации транскриптов исследуемых генов определяется другими механизмами регуляции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение активности малик-энзима 1 в условиях засоления, по-видимому, необходимо клеточному метаболизму растения для поддержания равновесного уровня рН в митохондриях. Увеличение активности НАДФ<sup>+</sup>-зависимой декарбоксилирующей МДГ в условиях солевого стресса позволяет этому энзиму участвовать в компенсации ингибирования цикла Кальвина и таким образом избегать большого количества восстанавливающих эквивалентов, поставляя их для НАДФ<sup>+</sup>-галактозо-1-дегидрогеназы и рибоза-1-дегидрогеназы. Кроме того, принимать участие в обеспечении снижения интенсивности путей аскорбата-глутатиона и ослаблять повышенный синтез осмолитов, в частности, пролина.

Таким образом, в условиях солевого стресса изоферменты малик-энзимов могут участвовать в осуществлении адаптивных реакций, в основном, за счет продуцирования малата (МЭ2) или окислительно-восстановительных эквивалентов (МЭ1). Интересно отметить, что экспрессия гена *nad-me2*, сильно возрастающая при засолении, регулируется эпигенетическим механизмом, т.е. наблюдается обратно-пропорциональная зависимость между интенсивностью экспрессии и величиной статуса метилирования CpG-островков промотора гена. Эпигенетический способ регуляции *nad-me1* и *nadf-me* не обнаружен, что позволяет предположить другие молекулярные механизмы увеличения их экспрессии и активности соответствующих ферментов.

**Соблюдение этических стандартов.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.
- Епринцев А.Т., Гатауллина М.О. Кинетические свойства НАДФ<sup>+</sup>-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы из листьев кукурузы // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 54–58.
- Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Анохина Г.Б., Гатауллина М.О. Роль эпигенетических механизмов в регуляции активности 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при гипоксии // Физиология растений. 2021. Т. 68. № 2. С. 187–193.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк. 1990. 351 с.
- Полевой В.В. Физиология растений. Москва: Высшая школа. 1989. 464 с.
- Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т. Биохимические методы исследования ферментов гликолизатного цикла и ЦТК. Изд. дом Воронежского гос. унив-та 2014. 40 с.
- Ступак Е.Э., Вафина Г.Х. Метилирование ДНК в зародышах и проростках растений // Экобиотех. 2021. Т. 4. № 1. С. 1–5.
- Aceituno F.F., Moseyko N., Rhee S.Y., Gutiérrez R.A. The rules of gene expression in plants: organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana* // BMC genomics. 2008. V. 9. № 1. P. 1–14.
- Badia M.B., Mans R., Lis A.V., Tronconi M.A., Arias C.L., Maurino V.G., Andreo C.S., Drincovich M.F., Maris A.J.A., Gerrard Wheeler M.C. Specific *Arabidopsis thaliana* malic enzyme isoforms can provide anaplerotic pyruvate carboxylation function in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS J. 2017. V. 284. № 4. P. 654–665.
- Chen Q., Wang B., Ding H., Zhang J., Li S. The role of NA-DP-malic enzyme in plants under stress // Plant Sci. 2019. V. 281. P. 206–212.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
- Davies D.D. The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism // Ann. Rev. Plant Physiol. 1979. V. 30. № 1. P. 131–158.
- Emami P., Razi H., Dastfal M. Effect of salt stress on NA-DP-Malic enzyme activity, proline and ionic contents of durum wheat genotypes // Biol. Forum – An Intern. J. 2016. V. 8. № 2. P. 112–119.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychnina M.A., Igamberdiev A.U. Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions // J. Plant Physiol. 2017. V. 216. P. 197–201.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychnina M.A., Igamberdiev A.U. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light // Plant Science. 2018. V. 272. P. 157–163.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U. Regulation of expression of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize leaves via phytochrome // Plant Physiol. Biochem. 2020a. V. 146. P. 157–162.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Gataullina M.O., Igamberdiev A.U. Two forms of NAD-malic enzyme in maize leaves are regulated by light in opposite ways via promoter methylation // J. Plant Physiology. 2020b. V. 251. P. 153–193.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U. Effect of salt stress on the expression and promoter methylation of the genes encoding the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase and fumarase in maize // Intern. J. Mol. Sci. 2021.
- Hill S., Winning B., Jenner H., Knorpp C., Leaver C. Role of NAD<sup>+</sup>-dependent ‘malic’ enzyme and pyruvate dehydrogenase complex in leaf metabolism // Biochem. Soc. Transactions. 1996. V. 24. № 3. P. 743–746.
- Hsieh C.L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. P. 46–56.
- Igamberdiev A.U., Bykova N.V. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants // Free Rad. Biol. Med. 2018. V. 122. P. 74–85.
- Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants // Frontiers in Plant Science. 2016. V. 7. P. 1042.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
- Mayer B.F., Ali-Benali M.A., Demone J., Bertrand A., Charon J.B. Cold acclimation induces distinctive changes in the chromatin state and transcript levels of COR genes in *Cannabis sativa* varieties with contrasting cold acclimation capacities // Physiologia Plantarum. 2015. V. 155. № 3. P. 281–295.
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907–2914.
- Sun X., Han G., Meng Z., Lin L., Sui N. Roles of malic enzymes in plant development and stress responses // Plant signaling and behavior. 2019. V. 14. № 10. P. e1644596.
- Weimberg R. Effect of sodium chloride on the activity of a soluble malate dehydrogenase from pea seeds // J. Biological Chemistry. 1967. V. 242. № 12. P. 3000–3006.

## Regulation of the Activity of Decarboxylating Malate Dehydrogenases in Corn Leaves during an Adaptive Response to Salt Stress

A. T. Epintsev<sup>1, #</sup> and M. O. Gataullina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Voronezh State University",  
Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018 Russia

<sup>#</sup>e-mail: bc366@bio.vsu.ru

The effect of salt stress on the activity of decarboxylating malate dehydrogenases in maize leaves during the adaptive response of cellular metabolism to salt stress was studied. It was shown that excess NaCl concentrations cause an increase in the enzymatic activity of both NAD<sup>+</sup>-ME and NADP<sup>+</sup>-ME. The greatest contribution to the increase in the activity of NAD<sup>+</sup>-ME is made by the intensification of the expression of the *nad-me2* gene. At the same time, the expression of *nad-me1* under salinity increases to a lesser extent. Methyl-specific PCR showed an inverse relationship between the expression of *nad-me2* and the degree of methylation of the promoter of this gene, while *nad-me1* and *nadf-me*, apparently, are regulated by different mechanisms. A different functional role of each isoform of the studied malic enzymes in the adaptive response of cellular metabolism is assumed.

**Keywords:** *Zea mays* L., malic enzyme, salinity, isoenzyme composition, transcription, methylation, CpG islands

ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 591.1

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА “СУБТИЛИС-С” НА СОДЕРЖАНИЕ  
ЛАКТОФЕРРИНА В КРОВИ И ЭПИДЕРМАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ  
КОРМЯЩИХ ДИСКУСОВ

© 2023 г. Г. И. Пронина\*, @, О. В. Саная\*, А. О. Ревякин\*\*

\*Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия  
им. К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550 Россия

\*\*Испытательный центр “Фармоборона”, ул. Гагарина, 46А, Королев, Московская обл., 141074 Россия  
@E-mail: gidrobiont4@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

После доработки 21.11.2021 г.

Принята к публикации 04.12.2021 г.

Пробиотики модулируют иммунный ответ, вытесняют патогенные микроорганизмы из ЖКТ, увеличивают выживаемость личинок. Объектом исследования выбраны дискусы, выкармливающие потомство эпидермальным секретом схожим по набору компонентов с молоком млекопитающих. Лактоферрин обнаружен в крови и кожном секрете дискусов, он обладает антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противопаразитарной активностью. Добавление пробиотика “Субтилис-С” в рацион кормящих дискусов увеличивает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете родителей, а также способствует лучшей выживаемости личинок и мальков рыб.

**Ключевые слова:** пробиотики, иммунитет, рыба дискус, лактоферрин, эпидермальный секрет

**DOI:** 10.31857/S1026347023010109, **EDN:** IMUBSB

Одной из проблем аквакультуры является наличие патогенных микроорганизмов, распространение которых усиливается при интенсивных формах культивирования. В связи с этим важной задачей является поиск путей сохранения здоровья объектов аквакультуры и усиление иммунитета производителей и потомства.

Для усиления иммунитета целесообразно использовать пробиотики, модулирующие клеточный и гуморальный иммунный ответ (Possemiers *et al.*, 2011).

Пробиотические бактерии не представляют угрозы для экосистемы, улучшают иммунную систему организмов и являются антагонистами патогенных бактерий. Отмечено, что применение пробиотиков при нанесении на корма: коловраток, артемий и био пленку, состоящую из смеси диатомовых водорослей с преобладанием *Navicula phyllepta* (K., 1844) и бактерий семейства *Rhodobacterales*, выделенных из (V., 1833) способствует выживанию личинок (Sayes *et al.*, 2018).

Стимуляция врожденной иммунной системы личинок обыкновенного снука *Centropomus undecimalis* (B., 1792) пробиотиками рода *Bacillus* sp. обеспечивает быструю активацию антигенов, что улучшает выживаемость и устойчивость к патогенам. Большое значение в усилении врожденного

иммунитета имеет регуляция ферментов, которые позволяют организму справляться с клеточным стрессом (Tarniecki *et al.*, 2019).

В желудочно-кишечном тракте рыб содержится большое количество микроорганизмов, которые за долгую историю эволюции сформировали динамичную микроэкосистему. Бактериальные сообщества кишечника играют важную роль в иммунной защите и усвоении питательных веществ хозяина (Chevalier *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2019). В нормальных условиях существует динамический баланс между бактериями и рыбой, что позволяет поддерживать физиологическую функцию кишечного тракта рыбы (Vaperejее, Ray, 2017). Выживание кишечной микробиоты зависит от обеспечения организма рыб собственным питанием или от разложения источников пищи в кишечнике. Между тем, кишечная микробиота может выделять различные пищеварительные ферменты и синтезировать питательные вещества, такие как поливитамины. Эти продукты играют важную роль в переваривании, усвоении, росте и развитии рыбы (Zhang *et al.*, 2021).

Дискусы выбраны в качестве объекта исследований, так как они представляют интерес в эволюционном плане как модель передачи иммунных свойств от родителей потомству. Подобный

способ сохранения потомства путем вскармливания родителями секретом собственного тела, известен только у млекопитающих. Потомство дискусов, выращенное без вскармливания родителями, проявляет крайне низкую жизнестойкость (Satoh *et al.*, 2018).

Некоторые полезные компоненты эпидермального секрета дискусов, которые передаются личинкам, впоследствии малькам, аналогичны компонентам молока млекопитающих: иммуноглобулины, лектины, гормоны, ионы, аминокислоты и антитела. Многие из этих компонентов (пролактин, иммуноглобулины и специфические белки) значительно увеличиваются в каждом секрете во время размножения (Chong *et al.*, 2005; Khong *et al.*, 2009; Sylvain, Derome, 2017). Нами было сделано предположение, что по аналогии с молоком млекопитающих в эпидермальном секрете кормящих дискусов может содержаться лактоферрин, обладающий иммунными свойствами и являющийся ключевым фактором врожденного иммунитета млекопитающих (Legrand, Mazurier, 2010).

Лактоферрин осуществляет антимикробное действие двумя разными механизмами: захватывает свободное железо, необходимое для роста бактерий и разрушает липополисахариды мембран бактериальных клеток с помощью образовавшихся пероксидов под действием ионов трехвалентного железа лактоферрина (Bennett, Kokocinski, 2005). В присутствии лактоферрина активнее размножаются бактерии с низкой потребностью в железе, такие как *Lactobacillus sp.* и *Bifidobacteria sp.*, полезные для хозяина (Sherman *et al.*, 2004; Giansanti *et al.*, 2016).

Фунгицидное действие лактоферрина заключается в лизисе оболочки грибов (Fernandes, Carter, 2017). Противопаразитарная активность лактоферрина связана с нарушением усвоения железа некоторыми паразитами (Giansanti *et al.*, 2013).

Лактоферрин проявляет мощную противовирусную активность в отношении широкого ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Установлено, что лактоферрин связывает гемагглютинин вируса, предотвращая взаимодействие с клеткой; блокирует апоптоз, способствующий распространению вируса на поздних стадиях инфекции через взаимодействие с каспазой-3; блокирует сборку вируса (Зорина, 2020).

Показано, что лактоферрин способен как повышать, так и подавлять эндогенный воспалительный ответ. Лактоферрин действует на В-лимфоциты, которые являются хорошо известными презентаторами антигенов, обеспечивая их последующее взаимодействие с Т-клетками, что усиливает ответ антител, способствуя созреванию предшественников Т-клеток в компетентные Т-хелперы и диффе-

ренцировке незрелых В-клеток в эффективные антигенпрезентирующие клетки (Actor *et al.*, 2009; Legrand, Mazurier, 2010; Turin *et al.*, 2014).

Выявлено, что добавление в корм леща лактоферрина в дозе 100 мг/кг в течение одной недели активирует врожденный клеточный иммунитет, вызывая респираторный взрыв и естественную цитотоксическую активность фагоцитов (Esteban *et al.*, 2005).

Исследований по содержанию лактоферрина в эпидермальном секрете дискусов в доступной литературе нами не найдено.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение влияния вскармливания пробиотика “Субтилис-С” кормящим парам дискусов на содержание лактоферрина в их крови и эпидермальном секрете, а также на выживаемость личинок.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись кормящие дискусы *Symphysodon haraldi* (S, 1960) в возрасте 1.5–2 г. и их потомство в личиночной стадии в период вскармливания эпидермальным секретом.

Родительские пары дискусов содержали в 100-литровых аквариумах с аэрацией и фильтрацией по принципу аэрлифта, в нем рыбы нерестились на вертикальный субстрат и выкармливали личинку до перехода на самостоятельное питание в возрасте двух недель (рис. 1). Условия среды в аквариумах были на оптимальном уровне для нереста, выкармливания потомства, роста личинок и мальков дискусов. Температура воды составляла  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 6.0–6.2; фотопериод по 12 ч света и темноты, жесткость 1–2 ммоль/л.

Опытной группе (7 пар,  $n = 14$ ) в корм добавляли пробиотик “Субтилис-С” из расчета 1 г/кг корма. Контрольная группа дискусов (7 пар,  $n = 14$ ) получала корм без пробиотика. Кормление дискусов осуществляли личинками хирономид *Chironomus plumosus* (L., 1758) в дозе 2.5% от массы тела 1 раз в сутки. Кормление начинали сразу после отсаживания пар в отдельные нерестовые аквариумы. Длительность эксперимента составила 3 мес.

Выживаемость личинок определяли у каждой пары дискусов методом подсчета в момент выклева личинок и после снятия с родителей самостоятельно питающихся мальков.

Пробы эпидермального секрета у кормящих самцов и самок дискусов получали *in vivo* спонжем (рис. 2а), затем выдавливали в шприц (Chong *et al.*, 2006).

Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены прижизненно (рис. 2б) с гепарином на льду, затем переносили в пробирку.



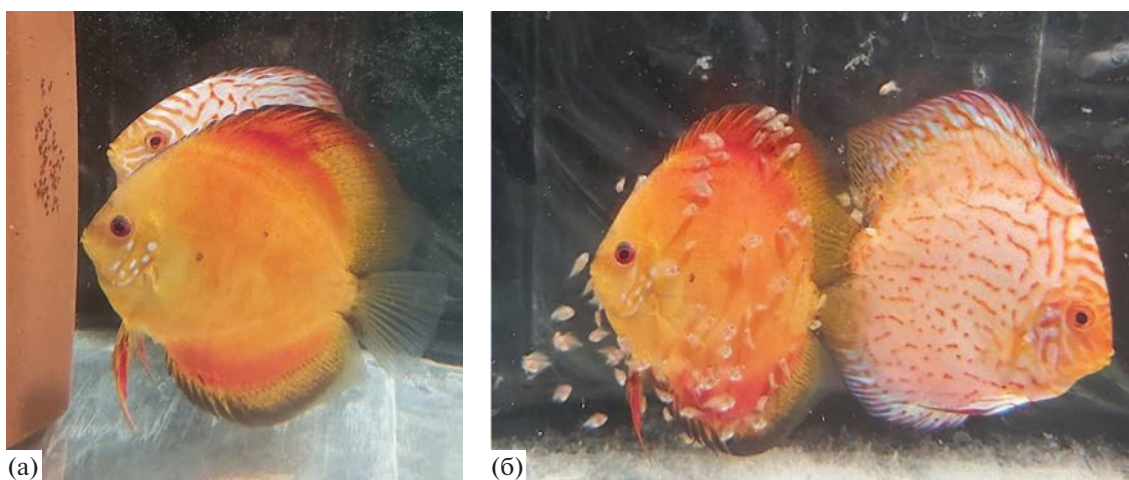


Рис. 1. Дискусы и их потомство. (а) – прикрепленная предличинка на столбе, (б) – кормящая малька пара дискусов.



Рис. 2. Отбор проб у дискусов. (а) – получение эпидермального секрета, (б) – взятие крови из хвостовой вены.

В течение 20 мин после сбора крови отделяли плазму центрифугированием 1500 об./мин при 4°C в течение 15 мин. Затем плазму переносили в свежую полипропиленовую пробирку и центрифуги-

ровали, чтобы избежать контаминацию лейкоцитами: 1500 об. при 4°C в течение 15 мин. Готовые образцы хранили при -70°C) в полипропиленовых пробирках.

**Таблица 1.** Размерно-весовые показатели родительских форм дискусов в опыте

Показатели	Контроль	Опыт
Масса тела в начале эксперимента, г	83.9 ± 3.6	83.8 ± 3.2
Длина тела (l), в начале эксперимента, см	10.5 ± 0.3	11.2 ± 0.2
Масса тела в конце эксперимента, г	89.7 ± 5.4	90.5 ± 6.2
Длина тела (l), в конце эксперимента, см	11.3 ± 0.5	11.6 ± 0.4

**Таблица 2.** Показатели жизнестойкости потомства дискусов за 3 месяца опыта

Показатели	Контроль	Опыт
Количество уничтоженных кладок, шт	24	11
Количество уничтоженных кладок, приходящихся на одну пару	3.3	1.6
Гибель пометов, шт	6	6
Выращено и высажено пометов, шт.	8	17
Количество выращенных личинок с одного помета, шт	52.3 ± 2.9	65.1 ± 3.4*

Примечание: \* – различия достоверны ( $P < 0.05$ ) для табл. 2 и 3.

Лактоферрин в плазме крови рыб определяли “сэндвич” методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовали набор Hbt human Lactoferrin ELISA.

Образцы и стандарты инкубировали в лунках микропланшета, покрытых антителами к лактоферрину. Биотинилированные антитела (трейсер) связывались с лактоферрином человека.

Конъюгат стрептавидин – пероксидаза связывался с трейсером. Конъюгат стрептавидин – пероксидаза реагирует с субстратом тетраметилбензидин (ТМБ). Ферментативную реакцию останавливали, добавляя щавелевую кислоту.

С помощью ИФА-спектрофотометра измеряли абсорбцию при 450 нм. Концентрация лактоферрина в образцах определяли по калибровочной кривой (стандарты и образцы анализировались одновременно). Калибровочную кривую получали путем построения графика зависимости оптической плотности от соответствующих концентраций известных стандартов (log).

Обработку данных проводили методом вариационной статистики по Стьюденту. Достоверными считали различия при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По массе тела рыбы достоверно не различались между собой (табл. 1). За период опыта (3 мес.) при-

рост массы дискусов в опытной группе составил 6.7 г, в контрольной – 5.8 г.

Результаты эксперимента показали, что добавление к рациону кормящих дискусов пробиотика “Субтилис-С” повышает выживаемость личинок (табл. 2), что указывает на усиление иммунитета потомства, очевидно за счет увеличения иммунных свойств кожного секрета родителей.

В результате применения пробиотиков уменьшается процент пар дискусов, уничтожающих кладки. Это, по-видимому, связано со снижением стрессовой реакции и оптимизацией микрофлоры кишечника рыб.

В группе кормящих дискусов, получавших пробиотик, отмечено увеличение содержания лактоферрина в эпидермальном секрете и снижение его в крови (табл. 3).

Можно предположить, что по аналогии с млекопитающими пробиотик усиливает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете.

Доказано благоприятное влияние пробиотиков на свойства грудного молока. В настоящее время сформулировано представление о том, что кишечная микробиота является, в сущности “виртуальным эндокринным органом”. Целый ряд бактерий вырабатывает гормоны и гормоноподобные вещества, например, глюкагонподобный пептид-1, пептид YY, грелин, лептин, а также биологически активные вещества со свойствами

**Таблица 3.** Содержание лактоферрина в крови и эпидермальном секрете кормящих дискусов, нг/мл

Показатели	Контроль	Опыт
Кровь	165.8 ± 25.9	91.0 ± 4.8*
Эпидермальным секрет	71.5 ± 13.7	113.0 ± 8.8*



нейромедиаторов. Пробиотики участвуют в синтезе и всасывании витаминов К, группы В, фолиевой и никотиновой кислот. Показано, что косвенно и через еще не известные механизмы микрофлора кишечника осуществляет контроль над гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (Попова и др., 2019).

Увеличение лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов очевидно способствует усилению иммунитета и выживаемости потомства. Свойства лактоферрина позволяют организму противостоять различным негативным воздействиям. Была показана протективная роль лактоферрина в отношении последствий токсического воздействия на ранние зародыши мышей бисфенола А (БФА), который является синтетическим экотоксикантом, способным негативно влиять на репродуктивную систему млекопитающих и эмбриональное развитие даже в низких дозах (Постникова и др., 2020).

Выявлено, что экзогенный лактоферрин способен ингибировать перекисное окисление липидов путем блокирования образования свободных гидроксильных радикалов и активировать ферменты антиоксидантной системы (Sandomirsky *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).

Таким образом, обнаружение в крови и эпидермальном секрете дискусов лактоферрина подтверждает эволюционное приспособление этих рыб к сохранению своего потомства. Добавление пробиотика "Субтилис-С" в рацион кормящих дискусов увеличивает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете родителей, что ведет к усилению иммунитета потомства. Это проявляется в лучшей выживаемости личинок и мальков рыб.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 20-316-90028).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зорина В.Н. Структура и ингибирующая активность лактоферрина по отношению к вирусу гриппа // *Инфекция и иммунитет*. 2020. № 10(1). С. 49–54.
- Постникова Л.А., Нониашвили Е.М., Паткин Е.Л. Действие лактоферрина на развитие ранних зародышей мышей, при внутриутробном воздействии бисфенола А // *Сб. научных трудов Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине*. Санкт-Петербург. Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. 2020. Ч. 2. С. 171–176.
- Попова Е.Н., Орлова А.С., Пономарев А.Б., Закревский В.В., Сергеев В.Н. *Микробиота*. М.: Медиа Сфера, 2019. Глава: Возможность пробиотической коррекции нарушений микрофлоры матери для профилактики возможных осложнений у ребенка. Влияние микрофлоры матери на формирование здоровья будущего ребенка С. 140–152.
- Actor J.K., Hwang S.A., Kruzel M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator // *Curr. Pharm. Des.*, 2009. № 15. P. 1956–1973.
- Banerjee G., Ray A.K. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism // *Symbiosis*. 2017. № 72(1). P. 1–11.
- Bennett R.M., Kokocinski T. Lactoferrin content of peripheral blood cells // *Br. J. Haematol.* 2005. № 39. P. 509–521.
- Chevalier C., Stojanovic O., Colin D.J., Suarez-Zamorano N., Tarallo V., Veyrat-Durebex C., Rigo D., Fabbiano S., Stevanovic A., Hagemann S., Montet S., Seimbille Y., Zamboni N., Hapfelmeier S., Trajkovski M. Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold // *Cell*. 2015. № 163(6). P. 1360–1374.
- Chong K., Joshi S., Jin L.T., Chong A. Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior // *Proteomics*. 2006. № 5. P. 2251–2258.
- Chong, K., Ying T.S., Foo J., Jin L.T., Chong A. Characterization of proteins in epidermal mucus of discus fish (*Symphysodon* spp.) during parental phase // *Aquaculture*, 2005. № 249. P. 469–476.
- Esteban M.A., Rodríguez A., Meseguer C., José A. Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilt-head seabream (*Sparus auratus* L.) // *Fish Shellfish Immunol.* 2005. № 18(2). P. 109–124.
- Fernandes K.E., Carter D.A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens // *Front Microbiol.* 2017. № 8. P.:1–6.
- Giansanti F., Leboffe L., D'Elia I., Antonini G. An update on the antifungal activities of Lactoferrin: new promising applications in diagnostic, therapeutics and biotechnology // *Anti-Infect. Agents*, 2013. № 11. P. 155–158.
- Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016. № 9(4). P. 1–15.
- Khong H.K., Kuah M.K., Jaya-Ram A., Shu-Chien A. C. Pro-lactin receptor mRNA is upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase // *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry Molecular Biology*. 2009. № 153. P. 18–28.
- Legrand D., Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity // *Biometals*. 2010. № 23. P. 365–376.
- Possemiers S., Bolca S., Verstraete W., Heyerick A. The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals // *Fitoterapia*. 2011. № 82(1). P. 53–66.
- Sandomirsky B.P., Galchemko S.E., Galchenko K.S. Antioxidative properties of lactoferrin from bovine colostrums before and after its lyophilization // *Cryoletters*. 2003. V. 24. P. 275–280.
- Satoh S., Tanoue H., Mohri M. Costs and benefits of biparental mucus provisioning in discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) // *Ichthyological Res.* 2018. № 65. P. 510–514.
- Sayes C., Leyton Y., Riquelme C. *Antibiotic Use in Animals*. L.: IntechOpen, 2018. Chapter 7: Probiotic Bacteria as

- an Healthy Alternative for Fish Aquaculture. P. 115–132.
- Sherman M.P., Bennett S.H., Hwang F.F., Yu C.* Neonatal small bowel epithelia: Enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG // *Biometals*. 2004. № 17. P. 285–289.
- Sylvain F., Derome N.* Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny // *Sci. Rep.* 2017. № 7(1). P. 52–63.
- Tarnecki A.M., Wafapoor M., Phillips R.N., Rhody N.R.* Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance // *Scientific Reports*. 2019. № 9. P. 1–11.
- Turin C.G., Zea A., Pezo A., Cruz K., Zegarra J., Bellomo S., Cam L., Llanos R., Castañeda A., Tucto L., Ochoa T.J.* Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis // *Biometals*. 2014. № 27(5). P. 1007–1016.
- Wang Y.Z., Xu C.L., An Z.H., Liu J.X., Feng J.* Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets // *Animal Feed Science and Technology*. 2008. V. 140. P. 326–336.
- Xiong J., Nie L., Chen J.* Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity // *Zool. Res.* 2019. № 40(2). P. 70–76.
- Zhang Y., Wen B., Meng L.-J., Gao J.-Z., Chen Z.-Zh.* Dynamic changes of gut microbiota of discus fish (*Symphysodon haraldi*) at different feeding stages // *Aquaculture*. 2021. V. 531. P. 1–9.

## The Effect of the Probiotic “Subtilis-C” on the Lactoferrin Content in the Blood and Epidermal Secretions of “Feeding” Discus Fish

G. I. Pronina<sup>1, #</sup>, O. V. Sanaya<sup>1</sup>, and A. O. Revyakin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya str., Moscow, 127550 Russia*

<sup>2</sup> *Pharmoborona Testing Center, Ltd., 46A Gagarina str., Korolev, Moscow Region, 141074 Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: gidrobiont4@yandex.ru*

Probiotics modulate the immune response, displace pathogenic microorganisms from the gastrointestinal tract, and increase the survival rate of larvae. The object of the study was selected discus feeding offspring with an epidermal secret similar in a set of components to mammalian milk. Lactoferrin is found in the blood and skin secretions of discus, it has antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic activity. The addition of the probiotic “Subtilis-C” to the diet of nursing discus increases the production of lactoferrin in the epidermal secretions of parents, and also contributes to better survival of larvae and fry of fish.

*Keywords:* probiotics, immunity, discus fish, lactoferrin, epidermal secret

**ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА**

УДК 577.32:798.2

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО  
ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОЙ  
НАГРУЗКИ СПОРТИВНЫХ ЛОШАДЕЙ**

© 2023 г. Л. В. Степанова\*<sup>@</sup>, О. В. Колесник\*\*, О. А. Коленчукова\*<sup>\*\*\*</sup>, А. С. Федотова\*\*\*\*<sup>\*\*\*</sup>,  
А. В. Коломейцев\*\*\*\*<sup>\*\*\*</sup>, А. В. Макаров\*\*\*<sup>\*\*\*</sup>, В. А. Кратасюк\*<sup>\*\*\*</sup>

\*ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

\*\*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение Институт биофизики СО РАН,  
ул. Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036 Россия

\*\*\*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение Научно-исследовательский институт  
медицинских проблем Севера, ул. Партизана Железняка, 3г, Красноярск, 660022 Россия

\*\*\*\*ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», пр. Мира, 90, Красноярск, 660049 Россия  
<sup>@</sup>E-mail: slyudmila@mail.ru

Поступила в редакцию 07.09.2021 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

Проведено биолюминесцентное тестирование слюны спортивных лошадей, отобранной до и после физических нагрузок, с использованием биферментной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой. Показано ингибирующее воздействие слюны на интенсивность свечения благодаря повышению pH слюны после мышечной работы. Понижение интегрального биолюминесцентного показателя при мышечной работе низкой интенсивности коррелировало с содержанием общего белка и глюкозы в сыворотке крови, повышение биолюминесцентного показателя при высокой интенсивности зависело от понижения креатинина или повышения АСТ и взаимосвязано с повышением частоты сердечных сокращений. Впервые показано, что ингибирование биолюминесцентного свечения может быть показателем функционального состояния лошади в тренинге, что может применяться в спортивном коневодстве для предупреждения перегрузок.

*Ключевые слова:* спортивные лошади, слюна, NADH:FMN-оксидоредуктаза, люцифераза, бактериальная биолюминесценция

**DOI:** 10.31857/S1026347023010110, **EDN:** IMZIGX

Конный спорт является очень популярным, но требующим постоянного контроля за состоянием лошади (Герман и др., 2019; Clémence, 2020). Комплексная оценка состояния физиологических систем характеризует общую тренированность организма лошади и служит основанием для дозировки и корректировки нагрузок при тренировке. Физиолого-клинические показатели (температура, частота пульса и дыханий) характеризуются большой динамичностью и являются объективными, простыми и легкодоступными методами исследования функционального состояния спортивных лошадей как во время покоя, так в процессе и после различной мышечной работы. Исследование частоты пульса, дыхания и гематологических показателей животного являются одним из важнейших методов ветеринарной клинической диагностики, позволяющей объективно судить о

функциональном состоянии и пригодности лошади к выполнению мышечной работы (Baevsky, Chernikova, 2017; L. de Mare *et al.*, 2017).

Однако в настоящее время официальные руководства, в том числе правила по конному спорту и пособия по иппологии, рекомендуют для оценки состояния организма спортивной лошади разноречивые нормативные данные или не дают никаких нормативов показателей для оценки состояния спортивной лошади, как во время покоя, так и после мышечной работы (Уоршг, 2009; Szarska *et al.*, 2015; Navas de Solis *et al.*, 2018; Герман и др., 2019). Это не позволяет считать их вполне надежными для использования в практике конного спорта. Поэтому проведение исследований о влиянии различных систем тренинга на

функциональное состояние спортивных лошадей является актуальным.

В настоящее время представляет интерес разработка и внедрение интегральных методов скрининг-тестирования спортивных лошадей. Использование неинвазивного метода, такой как тестирование слюны, имеет преимущества в простоте и безопасности использования (Покровская и др., 2011; Турлак, 2020).

К тому же, слюна – динамичная биологическая жидкость и функционально эквивалентна сыворотке крови, но с низкой концентрацией метаболитов по сравнению с уровнями в крови. Однако с развитием чувствительных методов тестирования низкая концентрация метаболитов в слюне не является ограничением (Вавилова и др., 2014; Турлак, 2020).

В настоящее время разработана биосенсорная биотехнология – биолюминесцентный метод с применением бактериальной ферментативной системы, который оказался эффективным в тестировании состояния организма (Esimbekova *et al.*, 2014; Kratasyuk, Esimbekova, 2015; Kratasyuk *et al.*, 2020). Изменение уровня свечения биолюминесцентной реакции при воздействии на нее слюны в малом количестве может выявить отклонения в организме спортивных лошадей как ответ на предельно допустимые нагрузки. Важной характеристикой биолюминесцентного тестирования слюны лошадей является неинвазивность, позволяющая безболезненно и быстро контролировать изменение состояния организма спортивных лошадей во время тренировок, что значимо для конного спорта.

Поэтому целью исследования явилось выявление возможности использования биолюминесцентного ферментативного биотеста в тестировании слюны лошадей для контроля физической нагрузки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись две группы спортивных лошадей: лошади траккененской породы (специализация “выездка”) ( $n = 21$ ) в возрасте 4–21 лет и рысаки ( $n = 20$ ) в возрасте 2–7 лет. Лошади траккененской породы (тракены) содержались в стандартных условиях учебно-спортивного комплекса коневодства Красноярского государственного аграрного университета (ФГБОУ ВО Красноярский ГАУ), рысаки – в ООО “СПХ “Мустанг” Емельяновского района Красноярского края. Тестирование каждой лошади, отбор проб ее слюны и крови проводили до и после тренировок с низкой, средней и высокой интенсивностями в подготовительный период к

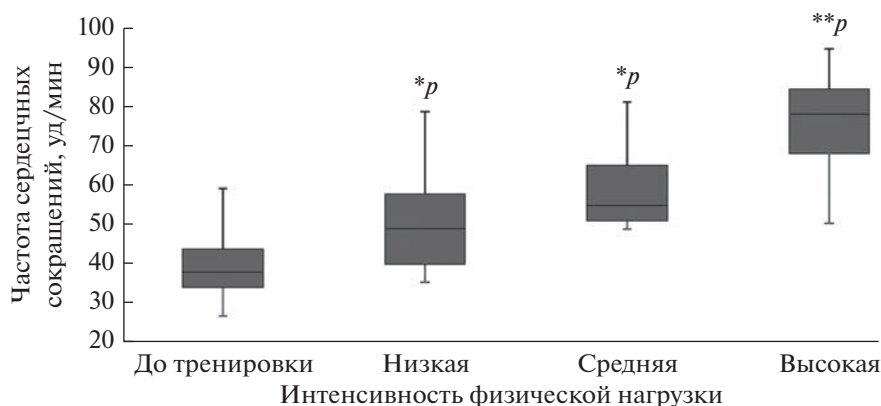
соревнованиям (февраль–июнь 2019–2021 гг.). Согласно тренировочной программе средняя интенсивность физической нагрузки отсутствовала для рысаков.

Физическая нагрузка низкой интенсивности включала тренировку лошади в течение часа, средней интенсивности – в течение полутора часов и высокой интенсивности – в течение двух часов на корде или под седлом. Программа тренировок включала в себя следующие этапы: на свободном поводу, в сборе на рыси с включением боковых элементов, сокращение и раздвижение аллюров и переходы из одного аллюра в другой, заминку на рыси на длинном поводу, шаг.

Отбор проб слюны в количестве 1.0–1.5 мл производили в одноразовые стерильные пластмассовые пробирки. Отбор проб до нагрузки проводили в утренние часы (до кормления). После физической нагрузки слюна лошадей образовывалась в достаточном количестве и отбиралась непосредственно по завершению тренировки. Отбор проб слюны никак не влиял на эмоциональное состояние лошадей.

Функциональные показатели организма лошадей определяли по количеству дыхательных движений (КДД) и частоте сердечных сокращений (ЧСС). КДД определяли визуально, оценку ЧСС проводили по электрокардиограмме (ЭКГ) на электрокардиографе ЭКЗТ-01-Р-Д “Монитор”, Россия) с использованием ферментативно-колориметрического метода с помощью полуавтоматического биохимического анализатора HumaLyzer 3000 (“Human GmbH”, Германия) с применением стандартизированных наборов Human Diagnostics Worldwide (“Human GmbH”, Германия). Биохимический анализ сыворотки крови проводили согласно стандартной общепринятой методике (Кондрахин и др., 2004), тестировали содержание общего белка (ОБ) (г/л), концентрации глюкозы (ммоль/л), мочевины (ммоль/л), креатинина (мкмоль/л), а также активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) (мкмоль/л с) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) (мкмоль/л с). Содержание ОБ исследовали как показатель нарушения питания; концентрацию креатинина – как показатель физической нагрузки и энергетического обмена мышечной ткани; концентрацию глюкозы – как основной показатель углеводного обмена и определения энергозатрат при физической работе лошадей; для определения работы почек, печени и общего состоянии мышц исследовали концентрацию мочевины; активности АЛТ и АСТ – это важные показатели состояния сердечной мышцы и мышц опорно-двигательного аппарата.

Биохимические показатели определяли спектрофотометрически по глюкозооксидазному методу,



**Рис. 1.** Изменения ЧСС с повышением интенсивности физических нагрузок для лошадей обеих групп. Примечание: \* $p$  – достоверность различий относительно значения “до тренировок” по критерию Вилкоксона, где \* $p$  –  $p < 0.05$ , \*\* $p$  –  $p < 0.001$ .

содержание ОБ – биуретовым методом, концентрацию мочевины – уреазным методом по реакции с фенолгипохлоритом, концентрацию креатинина – колориметрическим методом, основанным на реакции Яффе, активности АЛТ и АСТ – методом Райтмана-Френкеля.

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили после ее центрифугирования в течение 15 минут при частоте 5000 об./мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810 r (“Eppendorf”, Германия). Биолюминесцентное тестирование проводили на планшетном люминометре TriStar LB 941 (“Berthold Technologies”, Германия).

Концентрацию лактата (молочной кислоты) (моль/л) в образцах центрифугированной слюны измеряли фотометрическим методом в соответствии с реакцией Берга (Vorshchenskaya *et al.*, 2016) на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония).

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием комплекта реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ) (ИБФ СО РАН, Красноярск), который содержал лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов люциферазы EC 1.14.14.3 (0.4 мг/мл) из рекомбинантного штамма *E. coli* и NADH: FMN-оксидоредуктазы EC 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*) (0.18 ед. активности).

Реакционная смесь для биолюминесцентной реакции включала в себя 80 мкл 0.05 М калий – фосфатного буфера (pH 6.8–7), 5 мкл раствора КРАБ, 10 мкл 0.0025% раствора тетрадеканала (Merck, Германия), 50 мкл 0.4 мМ раствора NADH (Sigma, США), 10 мкл 0.5 мМ раствора FMN (Serva, Германия).

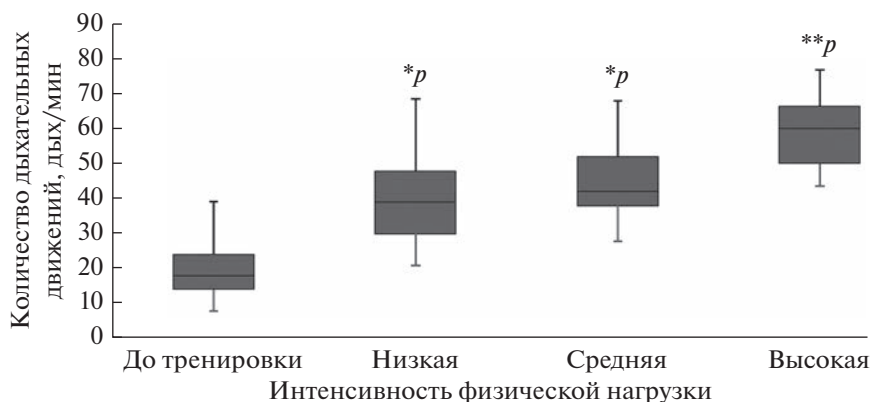
При проведении биолюминесцентного тестирования в ячейку планшета последовательно вносили реакционную смесь и регистрировали величину

максимальной интенсивности свечения (контрольное измерение). При экспериментальном измерении 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны, разведенной в буфере в 60 раз. Измерения интенсивности свечения проводили в 2-х повторностях. По отношению средних максимальных интенсивностей биолюминесценции экспериментального измерения ( $I$ ) к контрольному ( $I_0$ ) рассчитывали величину остаточного свечения ( $T$ , %).

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (“StatSoft Inc”, США) с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных разбросов ( $C_{25}$ – $C_{75}$  перцентили). Различия между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона, корреляционную связь – по ранговую критерию Спирмена. Уровень достоверной значимости  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты тестирования функционального состояния показали, что в состоянии покоя (до тренировок) показатели ЧСС и КДД лошадей находились в норме (Baevsky, Chernikova, 2017; Navas de Solis *et al.*, 2018) (рис. 1, 2). Известно, что оптимальными показателями спортивных лошадей в состоянии покоя (в утренние часы до кормления или до работы) принято считать ЧСС – 36 уд./мин (с колебаниями 32–42 уд./мин) и КДД – 13 дых./мин (с колебаниями 6–16 дых./мин) (Кабасова, Петрушко, 2018; Navas de Solis *et al.*, 2018). Выявлено, что медиана ЧСС одинакова для тракенов и рысаков, медиана КДД для рысаков выше по сравнению с тракенами (табл. 1). Различие в показателях КДД может быть обусловлено возрастом лошадей, т.е. количество дыхательных движений у молодых спортивных лошадей было выше по сравнению с



**Рис. 2.** Изменения КДД с повышением интенсивности физических нагрузок для лошадей обеих групп. Примечание: \*p – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где \*p – p < 0.05, \*\*p – p < 0.001.

возрастными в связи с меньшей подготовленностью молодых лошадей к физическим нагрузкам.

С повышением интенсивности мышечной работы величины ЧСС и КДД достоверно возрастали. При этом показатели ЧСС и КДД для рысаков были в 3–4 раза выше по сравнению с тракенами (табл. 1). Однако достоверного различия в показателях ЧСС и КДД между тракенами и рысаками не выявлено. Полученные результаты обеих групп по представленным показателям находились в пределах нормы (Кабасова, Петрушко, 2018). Повышение показателей с увеличением интенсивности мышечной работы свидетельствовало о преодолении физических нагрузок.

Результаты биохимического анализа сыворотки крови спортивных лошадей до тренировок и после мышечной работы показали, что значения большинства биохимических показателей крови были в пределах физиологической нормы (Баран и др., 2010; Андреева и др., 2012; Андрийчук и др.,

2016), кроме активности АСТ, которая была ниже нормы (табл. 2). Показано, что концентрация мочевины существенно не изменялась. Концентрация глюкозы и ОБ проявляли тенденция к возрастанию с повышением интенсивности физической нагрузки, что свидетельствовало о влиянии физических нагрузок на углеводный обмен (Жукова, 2014). Возрастающий белковый обмен свидетельствовал о хорошем питании, которое необходимо для усиления мышечной устойчивости лошадей к физическим нагрузкам (Баран и др., 2010).

Однако после нагрузки низкой интенсивности выявлено резкое повышение концентрации креатинина или активности АЛТ и понижение активности АСТ. С возрастанием интенсивности мышечной работы концентрация креатинина понижалась. Активности АЛТ и АСТ понижались при средней интенсивности и быстро возрастали при высокой интенсивности.

**Таблица 1.** Функциональные показатели спортивных лошадей до и после мышечной работы разной интенсивности. Результаты представлены в виде Ме [С25–С75]

Функциональный показатель лошадей		Интенсивность физической нагрузки			
		до тренировки	низкая	средняя	высокая
Тракены	ЧСС, уд/мин	40.5 [36.0–46.8]	47.0* [39.8–52.0]	58.0*** [51.0–60.0]	68.0** [62.0–76.0]
	КДД, дых/мин	17.0 [14.0–20.0]	36.0** [30.0–40.0]	42.0*** [38.0–52.0]	54.0** [49.0–63.0]
Рысаки	ЧСС, уд/мин	40.5 [31.5–50.8]	54.0* [45.3–61.0]		96.0*** [82.0–131.3]
	КДД, дых/мин	24.0 [15.8–24.0]	48.0*** [36.0–49.5]		64.5*** [55.5–70.5]

Примечание. \*p – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где \* – p < 0.001, \*\* – p < 0.0001, \*\*\* – p < 0.00001.

**Таблица 2.** Клинические показатели сыворотки крови спортивных лошадей до и после мышечной работы разной интенсивности. Результаты представлены в виде Ме [С25–С75]

Биохимический показатель	Интенсивность физической нагрузки				Физиологические нормы (Андрейчук и др., 2016)
	до тренировки	низкая	средняя	высокая	
Концентрация ОБ, г/л	62.6 [60.1–64.7]	62.5 [60.8–65.0]	63.6 [61.4–65.6]	66.3 [64.0–69.5]	57–79
Концентрация глюкозы, ммоль/л	4.6 [3.9–5.2]	3.0 [2.4–4.2]	4.5 [4.1–4.6]	4.5 [3.9–5.2]	3.5–6.3
Концентрация мочевины, ммоль/л	5.5 [5.1–6.2]	5.9 [5.0–7.0]	6.0 [4.8–6.7]	5.4 [4.6–6.7]	3.7–8.8
Концентрация креатинина, мкмоль/л	126.8 [108.0–139.0]	150.0 [137.0–161.8]	132.7 [106.1–155.4]	106.6 [99.2–139.9]	77–175
Концентрация АЛТ, мкмоль/л с	0.06 [0.03–0.05]	0.012 [0.006–0.02]	0.008 [0.008–0.02]	0.19 [0.1–0.2]	0.046–0.357
Концентрация АСТ, мкмоль/л с	0.79 [0.51–0.6]	0.38 [0.3–0.4]	0.18 [0.14–0.18]	1.23 [0.7–0.96]	1.972–4.879

Как известно, креатинин – это конечный продукт метаболизма креатина, который отвечает за функциональность мышечных волокон, поэтому количество производимого в организме креатинина зависело от количества мышечной массы и интенсивности физической нагрузки. Ферменты АСТ и АЛТ присутствуют в значительной степени в сердечной мышце и в мышцах опорно-двигательного аппарата, поэтому являются маркерами состояния кардиомиоцитов и миокарда в целом (Руатпучко *et al.*, 2021). Понижение концентрации креатинина и повышение активности ферментов после мышечной нагрузки низкой и высокой интенсивности свидетельствовало об их расходе организмом при максимальных мышечных работах. Однако стоит отметить, что изменения всех представленных показателей не превышали их физиологической нормы для лошадей, поэтому перегрузок организма не было.

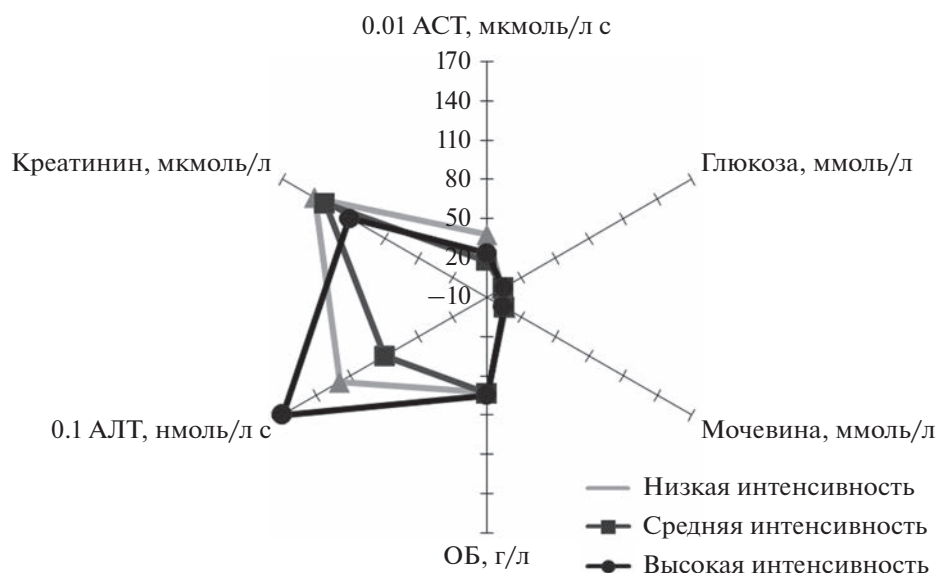
Выявлено, что реакции организма тракенов и рысаков на максимальную мышечную нагрузку проявляются по-разному и характеризуются различной величиной сдвигов клинических показателей (рис. 3, 4). Установлено, что содержание глюкозы, общего белка и мочевины не изменялись с повышением физической нагрузки как для тракенов, так и для рысаков показатели были одинаковые. Для рысаков выявлено достоверное повышение активности ферментов АСТ ( $p = 0.00008$ ) или АЛТ ( $p = 0.00008$ ) и достоверное понижение концентрации креатинина ( $p = 0.00008$ ) с возрастанием интенсивности физической нагрузки (рис. 4). Для тракенов концентрация креатина также достоверно понижалась с повышением физической

нагрузки ( $p = 0.01$ ) (рис. 3). Содержание фермента АЛТ повышалось при низкой или высокой интенсивности и понижалось при средней интенсивности. Активность фермента АСТ при высокой интенсивности была достоверно ниже показателя для низкой интенсивности ( $p = 0.007$ ) и выше – для средней интенсивности ( $p = 0.04$ ).

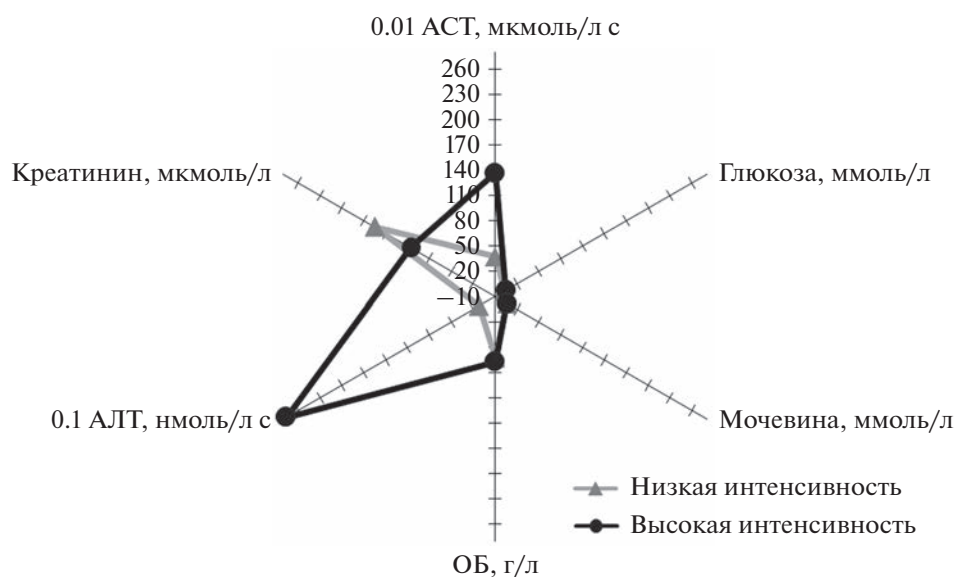
Выявлен высокий показатель активности АЛТ и АСТ для рысаков после мышечной работы высокой интенсивности на 10 нмоль/л·с (или 100 мкмоль/л с) по сравнению с тракенами. Это может быть обусловлено разной физической подготовкой лошадей. Молодые рысаки менее тренированные, чем возрастные тракены, поэтому активность ферментов при мышечной работе была больше. Достоверного различия между лошадьми обеих групп нет. Полученные результаты в обеих группах по всем показателям находятся в пределах нормы.

Таким образом, функциональные показатели лошадей и показатели биохимического анализа их сыворотки крови указывали на состояние организма, способного выполнять физические нагрузки малой и высокой интенсивности с максимальной мышечной работой.

Как известно, изменения в организме под влиянием физических нагрузок можно определять более доступным для анализа биосубстратом – слюной, состав которой может быстро меняться в ротовой полости в стремлении адаптироваться к меняющемуся состоянию организма (Вавилова и др., 2014; Турлак, 2020).



**Рис. 3.** Диаграмма изменения биохимических показателей сыворотки крови с повышением интенсивности физической нагрузки для тракенов.



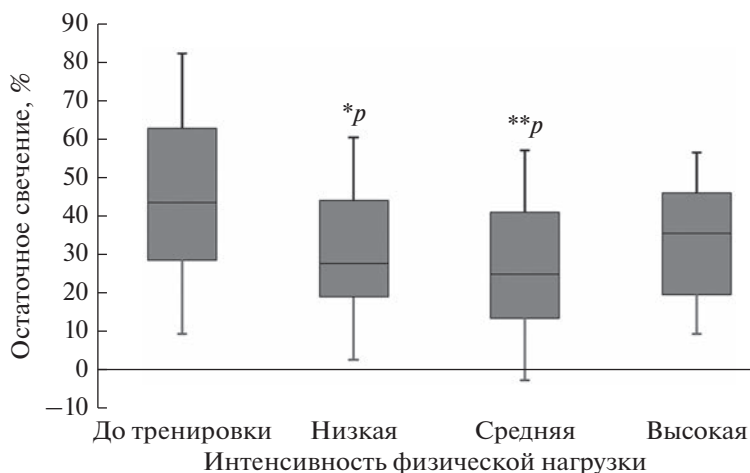
**Рис. 4.** Диаграмма изменения биохимических показателей сыворотки крови с повышением интенсивности физической нагрузки для рысаков.

Результаты проведенного нами биoluminesцентного тестирования слюны показали, что слюна лошадей после тренировок тушила интенсивность свечения по-разному (рис. 5, 6). Одинаково для обеих групп лошадей наблюдали тенденцию достоверного снижения остаточного свечения (или повышения тушения интенсивности свечения) от состояния покоя (до тренировки) до низкой или средней интенсивности физической нагрузки и повышение остаточного свечения (или уменьшения тушения интенсивности свечения) —

при высокой интенсивности. При этом слюна рысаков до тренировки на 10% сильнее тушила интенсивность свечения по сравнению со скакунами.

Представленный интегральный показатель указывал на общее изменение компонентного состава или свойств слюны лошадей во время мышечной работы. Для выявления изменений в слюне проанализирована чувствительность биoluminesцентной ферментативной системы.





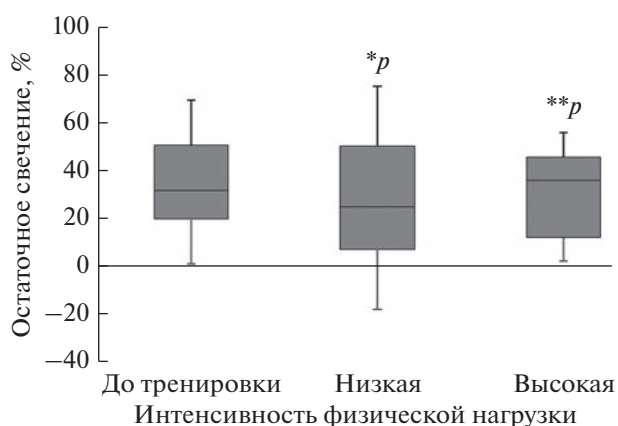
**Рис. 5.** Изменения остаточного свечения биолуминесцентной ферментативной системы с повышением интенсивности физических нагрузок для тракенов. Примечание: \**p* – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где \**p* – *p* < 0.05, \*\**p* – *p* < 0.001.

Известно, что используемая для тестирования слюны бактериальная ферментативная система имеет чувствительность к изменению pH и ионной силы между ионами Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в анализируемой среде (Bezrukikh *et al.*, 2014; Есимбекова и др., 2015). Определено, что pH слюны лошадей в состоянии покоя (до тренировки) был выше нормы в сторону кислотного показателя (норма pH 7.5 (Покровская и др., 2011)) и не изменялся с повышением интенсивности физической нагрузки, кроме нагрузки средней интенсивности (когда отсутствовала максимальная мышечная работа лошадей), где pH слюны было незначительно снижено (табл. 3). Представленные показатели pH были выше оптимального диапазона функционирования биолуминесцентной системы (pH 6.8–7.0 (Bezrukikh *et al.*, 2014)). Следовательно, pH слюны оказывало ингибирующий эффект на интенсивность свечения бактериальной ферментативной системы.

Ранее было определено, что содержание натрия и калия после физической нагрузки в сыворотке крови спортивных лошадей достоверно снижалось вследствие потери электролитов с потом и развития электролитного дисбаланса (Maksymovych, 2017). Однако изменения концентрации ионов натрия и калия в слюне лошадей достаточно малы (6–23 ммоль/л) и представленные показатели входили в чувствительный диапазон функционирования биолуминесцентной системы (Bezrukikh *et al.*, 2014). Следовательно, изменение ионной силы между ионами Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в слюне не могут оказывать влияние на чувствительность биолуминесцентной системы.

В виду того, что уровень лактата является важным параметром, определяющим физическую подготовку спортивного организма (Karatosun *et al.*,

2005), определение лактата в слюне представлялось значимым. Показано, что концентрация лактата в слюне лошадей недостоверно возрастала с повышением интенсивности физической нагрузки, кроме нагрузки средней интенсивности (когда отсутствовала максимальная мышечная работа лошадей), где концентрация лактата было незначительно понижена (табл. 3). Известно, что повышение лактата свидетельствует о недостаточном насыщении организма кислородом во время тренировок. Видимо, незначительный лактат-ацидоз вызывал нарушение кислотно-щелочного баланса в слюне (Скворцов и др., 2020). Однако анализ корреляционных взаимосвязей между величиной остаточного свечения и концентрацией



**Рис. 6.** Изменения остаточного свечения биолуминесцентной ферментативной системы с повышением интенсивности физических нагрузок для рысаков. Примечание: \**p* – достоверность различий относительно значения “до тренировки” по критерию Вилкоксона, где \**p* – *p* < 0.05, \*\**p* – *p* < 0.001.

**Таблица 3.** Физико-химические показатели слюны спортивных лошадей до и после мышечной работы разной интенсивности. Результаты представлены в виде Ме [С25–С75]

Физический и химический показатель	Интенсивность физической нагрузки			
	до тренировки	низкая	средняя	высокая
pH	7.7 [7.5–8.0]	8.0 [7.5–8.0]	7.0 [7.0–8.0]	8.0 [7.5–8.0]
Концентрация лактата, моль/л	4.9 [4.6–5.7]	5.2 [4.9–6.0]	4.5 [4.2–5.0]	5.4 [3.8–7.2]

лактата не показал зависимости. Следовательно, содержание лактата не влияло на ингибирующий эффект биоломинесцентного свечение бактериальной ферментативной системы.

Таким образом, влияние pH слюны на интегральный биоломинесцентный показатель следует рассматривать как индикатор стресса лошадей во время физической нагрузки.

Возможное влияние других биохимических показателей слюны на биоломинесцентное свечение планируется проанализировать в дальнейших исследованиях.

Предварительный анализ корреляционной взаимосвязи между величинами остаточного свечения и биохимическими показателями сыворотки крови показал, что для рысаков после нагрузки высокой интенсивности интегральный биоломинесцентный показатель связан с пониженным содержанием креатинина ( $r = -0.5$ ;  $p = 0.05$ ). Для тракенов интегральный биоломинесцентный показатель взаимосвязан с содержанием общего белка ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.05$ ) после нагрузки низкой интенсивности или с содержанием глюкозы – после средней интенсивности ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.05$ ) и повышением активности фермента АСТ – после высокой интенсивности ( $r = -0.8$ ;  $p = 0.05$ ). Кроме этого, интегральный биоломинесцентный показатель обеих групп после нагрузки высокой интенсивности связан с повышением ЧСС ( $r = -0.5$ ;  $p = 0.05$ ).

Следовательно, интегральный биоломинесцентный показатель при тестировании слюны может быть сопоставим с таким функциональным показателем как ЧСС для выявления мышечной работы высокой интенсивности. Изменение интегрального биоломинесцентного показателя в зависимости от выполняемой мышечной работы низкой или высокой интенсивности обусловлено изменением pH и может быть зависимо от биохимических показателей слюны, отвечающих за ферментативную активность в сердечной мышце и мышцах опорно-двигательного аппарата.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стандартные физиолого-клинические методы тестирования лошадей в тренировках с разной интенсивностью показали, что показатели функционального состояния лошадей находились в норме в соответствии с выполняемой мышечной работой низкой или высокой интенсивности. Используемый для тестирования слюны лошадей в тренинге биоломинесцентный ферментативный метод позволил выявить преодолеваемые организмом физические нагрузки по изменению интегрального биоломинесцентного показателя, т.е. снижение интенсивности свечения при мышечной работе низкой интенсивности и повышение интенсивности свечения – при высокой интенсивности. При этом изменение интенсивности свечения зависело от повышения pH слюны с возрастанием физической нагрузки. Изменение интегрального биоломинесцентного показателя коррелировало с физиолого-клиническими показателями, такими как повышенный показатель ЧСС при мышечной работе высокой интенсивности, пониженный показатель активности ферментов сердечной мышцы при мышечной работе низкой и повышенный показатель активности ферментов мышцы опорно-двигательного аппарата в сыворотке крови при мышечной работе высокой интенсивности. Таким образом, доказана возможность неинвазивного тестирования слюны спортивных лошадей для оценки воздействия физической нагрузки на организм лошади в тренинге. Полученные предварительные результаты позволяют определить физиологическое состояние лошадей при физических нагрузках различной интенсивности.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта (19-416-240001).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.Б., Карпенко Л.Ю., Бахта А.А. Белковый обмен у жеребых кобыл // Иппология и ветеринария. 2012. Т. 2. № 4. С. 11–14.
- Андрійчук А.В., Ткаченко Г.М., Ткачова И.В. Гематологические и биохимические изменения в крови выездковых лошадей под влиянием физических нагрузок // Известия КГТУ. 2016. № 43. С. 145–153.
- Баран В.П., Соболева Ю.Г., Жвикова Е.А. Биохимические и гематологические показатели спортивных лошадей // Ученые записки УО “Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины”. 2010. Т. 46. № 2. С. 7–9.
- Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Издательство БИНОМ, 2014. 312 с.
- Герман Ю.И., Горбуков М.А., Рудак А.Н., Садыков Е.В. Определение морфометрических, экстерьерно-конституциональных, биодинамических признаков лошадей верховых пород и их влияние на спортивную работоспособность. Ч. 1. Определение признаков, выявление имеющихся корреляций с результативностью испытаний по работоспособности // Коневодство и конный спорт. 2019. № 5. С. 37–40.
- Жукова И.А. Динамика физиологического состояния спортивных лошадей при физической нагрузке // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. 2014. № 2. С. 121–124.
- Есимбекова Е.Н., Лоншакова-Мукина В.И., Безруких А.Е., Кратасюк В.А. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа // Доклады Российской академии наук. 2015. Т. 461. № 4. С. 472–475.
- Кабасова И.А., Петрушко Н.П. Оценка функционального состояния и степени тренированности спортивных лошадей при применении различных систем тренинга // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. 2018. Т. 21. № 2. С. 306–312.
- Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. М.: Агропромиздат, 2004. 531 с.
- Покровская Е.С., Малев А.А., Гильмутдинов Р.Я. Методологические аспекты получения слюны у сельскохозяйственных животных // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2011. Т. 208. № 4. С. 95–99.
- Скворцов В.В., Скворцова Е.М., Бангаров Р.Ю. Лактатацидоз в практике врача – анестезиолога-реаниматолога // Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2020. Т. 17. № 3. С. 95–100.
- Сорокина Е.В., Зарубина А.П. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 6. С. 613–620.
- Турлак И.В. Слюна – основные направления исследования ее свойств // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 4. С. 154–164.
- Уоринг Д.Х. Поведение лошадей / Пер. с англ. Т. Реминовой, Ю. Халфиной. СПб.: ООО “ИКЦ”, 2009. 458 с.
- Baevsky R.M., Chernikova A.G. Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods // *Cardiometry*. 2017. № 10. P. 66–76.
- Bezrukikh A., Esimbekova E., Nemtseva E., Kratasyuk V., Shimomura O. Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH: FMN-oxidoreductase-luciferase // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. P. 5743–5747.
- Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineokii S.P. Spectrophotometric determination of lactic acid // *J. Analytical Chemistry*. 2016. V. 71. № 8. P. 755–758.
- Clémence L. Indicators of Horse Welfare: State-of-the-Art // *Animals*. 2020. V. 10. № 2. P. 294–301.
- Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O. Application of enzyme bioluminescence in ecology // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2014. V. 144. P. 67–109.
- Karatosun H., Cetin C., Baydar M.L. Blood and saliva lactate levels during recovery from supramaximal exercise // *Saudi Medical J*. 2005. V. 26. P. 1831–1842.
- Kratasyuk V., Esimbekova E. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2015. V. 18. № 10. P. 952–959.
- Kratasyuk V.A., Stepanova L.V., Ranjan R., Sutormin O.S., Pande S., Zhukova G.V., Miller O.M., Maznyak N.V., Kolenchukova O.A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion // *Luminescence*. 2020. V. 36. № 2. P. 384–390.
- L. de Mare, Boshuizen B., Plancke L., C. de Meeus, M. de Bruijn, Delesalle C. Standardized exercise tests in horses: current situation and future perspectives // *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2017. V. 86. № 2. P. 63–72.
- Maksymovych I.A. Exchange of electrolytes in sports horse for exercise // *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj*. 2017. V. 19. № 77. P. 100–104.
- Navas de Solis C., Sampson S.N., McKay T., Whitfield-Cargile C. Standardised exercise testing in 17 reining horses: Musculoskeletal, respiratory, cardiac and clinicopathological findings // *Equine Vet Educ*. 2018. V. 30. P. 262–267.
- Pyatnychko O., Zhyla M., Shkodyak N., Saliy O., Derkach M., Kalynovska L. The efficiency of the drug based on butaphosphane, B vitamins and L-carnitine in the treatment of horses // *Scien. Mess. of LNU of Veter. Med. and Biotech. Series: Veterinary Sciences*. 2021. V. 23. № 101. P. 31–37.
- Szarska E., Cywińska A., Ostaszewski P., Kowalska A. Effectiveness of training programmes used in two stables of thoroughbred race horses // *Polish J. Veterinary Sciences*. 2015. V. 17. № 4. P. 681–685.

## The Prospects for Using Bioluminescent Enzymatic Analysis to Reveal the Exercise Capacity of Sports Horses

L. V. Stepanova<sup>1, #</sup>, O. V. Kolesnik<sup>2</sup>, O. A. Kolenchukova<sup>1, 3</sup>, A. S. Fedotova<sup>4</sup>, A. V. Kolomeytsev<sup>1</sup>,  
A. V. Makarov<sup>3</sup>, and V. A. Kratasyuk<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biophysics, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Svobodnii pr., 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

<sup>2</sup> Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch of the RAS" Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the RAS, 50/50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

<sup>3</sup> Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", 3G, Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022 Russia

<sup>4</sup> Krasnoyarsk State Agrarian University, 90, Mira pr., Krasnoyarsk, 660049 Russia

#e-mail: slyudmila@mail.ru

Bioluminescent testing of saliva of sports horses, selected before and after physical exercise, was carried out using a coupled enzyme reaction catalyzed by NADH:FMN-oxidoreductase and bacterial luciferase. The inhibitory effect of saliva on the intensity of the light emission was shown, which depended on an increase in the pH of saliva after muscle work. A decrease in the integral bioluminescent index after low-intensity muscular work correlated with the content of total protein and glucose in the blood and an increase in the bioluminescent index at high intensity was due to a decrease in creatinine or an increase in aspartate aminotransferase and is correlated with an increase in heart rate. It has been shown for the first time that the inhibition of bioluminescence can be an indicator of the functional state of a horse in training, which can be used in sports horse breeding to prevent overloads.

*Keywords:* sport horses, saliva, NADH:FMN-oxidoreductase, luciferase, bacterial bioluminescence

УДК 582.594:581.16(470.13)

## РЕПРОДУКТИВНЫЙ УСПЕХ *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó НА СЕВЕРНОМ ПРЕДЕЛЕ АРЕАЛА

© 2023 г. И. А. Кириллова\*, @, Д. В. Кириллов\*

\*Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, Республика Коми, 167982 Россия  
@E-mail: kirillova\_orchid@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2021 г.

После доработки 02.03.2022 г.

Принята к публикации 02.03.2022 г.

Изучены структура популяций, морфометрические особенности растений и семян, плодозавязываемость и семенная продуктивность *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó (Orchidaceae) на территории Республики Коми, где вид находится на северном пределе своего ареала. По сравнению с более южными частями ареала вида, а также при продвижении на север Республики Коми выявлено уменьшение размеров семян и числа цветков в соцветии. Семенная продуктивность *D. fuchsii* в Республике Коми ниже, чем в более южных частях ареала: одна коробочка содержит, в среднем,  $2900 \pm 80$  семян, реальная семенная продуктивность растения составляет 24.8 тыс. семян. Несмотря на ухудшение некоторых показателей репродуктивного успеха, по сравнению с более южными частями ареала, вид образует здесь довольно крупные, хорошо возобновляющиеся популяции.

**Ключевые слова:** орхидные, северная граница ареала, морфометрия семян, плодозавязываемость, семенная продуктивность

DOI: 10.31857/S1026347023010079, EDN: IMBWSL

Orchidaceae Juss. — одно их крупнейших семейств покрытосеменных растений (Govaerts *et al.*, 2018), которое в настоящее время сталкивается с исключительным риском вымирания (Cribb *et al.*, 2003; Varman, Devadas, 2013). Несмотря на многочисленные усилия по сохранению орхидей, численность популяций этих видов продолжает сокращаться (Whigham, Willems, 2003; Kull, Hutchings, 2006; Swarts *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015). Редкость и уязвимость орхидей связана с особенностями их биологии, такими как уникальные репродуктивные стратегии, специфические взаимодействия с микоризными грибами и опылителями, специализированные требования к условиям среды обитания. Для эффективных природоохранных мероприятий необходимы сведения о биологии и экологии этих видов, решающее значение при этом имеет знание их репродуктивной биологии, где до сих пор остается много неясного. Для некоторых видов еще не выявлен показатель семенной продуктивности из-за сложности в подсчете огромного числа мельчайших пылевидных семян, содержащихся в одной коробочке (Proctor, Harder, 1994; Arditti, Ghani, 2000; Блинова, 2008), а для большинства видов орхидных умеренных широт вообще нет никаких сведений об их репродуктивных характеристиках (Блинова, 2009). Это делает актуальным изучение разных аспектов репродуктивного успеха орхидных, прежде всего

для выявления стратегий сохранения этих уязвимых растений в природе. Особенно актуальны такие работы на краю ареала, где популяции подвержены большому риску исчезновения.

В настоящей работе была исследована структура популяций и репродуктивный успех *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó на территории Республики Коми, где проходит северная граница распространения этого вида.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Dactylorhiza fuchsii* — евразийский вид. В Республике Коми довольно широко распространен, произрастает в разнообразных местообитаниях: в речных долинах на разнотравных и злаково-разнотравных лугах, травянистых бечевниках, в травяно-моховых сообществах, на ключевых болотах по береговым террасам и склонам; часто растет на водораздельных болотных массивах и в сфагновых сосновых и еловых лесах, встречается в смешанных и мелколиственных лесах с травяно-моховым покровом, реже — на выходах известняков (Кириллова, Кириллов, 2013). Вид размножается семенами (Вахрамеева, 2000). Опыляется насекомыми. В качестве опылителей отмечены представители Coleoptera, Diptera, Hymenoptera (Dafni, Woodell, 1986; Gutowski, 1990; Claessens, Kleynen,

2011), в Республике Коми — *Bombus pascuorum*, *Bombus jonellus* и *Bombus lucorum* (Филиппов, 2016). Вид характеризуется обманной стратегией опыления, но ряд исследователей (Dafni, Woodell, 1986; Vox *et al.*, 2008) предполагает наличие нектара. Возможно и самоопыление (Tałaj *et al.*, 2019). Эффективность опыления варьирует по ареалу вида от 10.6 до 80% (Вахрамеева, 2000; Claessens, Kleunen, 2011). В связи с сокращением численности *D. fuchsii* включен в Красные книги 25 регионов России (Вахрамеева и др., 2014), в том числе в приложение к Красной книге Республики Коми (2019), как вид, нуждающийся в биологическом надзоре.

Исследования проведены в 2010–2021 гг. на территории Республики Коми. Регион расположен на северо-востоке европейской части России. Протяженность его с юга на север составляет 785 км, с запада на восток — 695 км. По рельефу и геологическому строению восток территории относится к горному Уралу (Северный, Приполярный и Полярный Урал), а остальная часть — к Русской равнине (Тиманский кряж, Печорская низменность, Вычегодско-Мезенская равнина). Климат умеренно континентальный. Лето короткое и прохладное, зима длинная и холодная с устойчивым снежным покровом.

Изучено 19 ценопопуляций *D. fuchsii* (рис. 1), часть из них наблюдали в течение ряда лет. Исследованные популяции расположены в пределах Вычегодско-Мезенской равнины (ВМР) (ЦП 1–4), Южного Тимана (ЮТ) (ЦП 5–8), Северного (СУ) (ЦП 9–14) и Приполярного (ПУ) (ЦП 15–19) Урала. При изучении популяций использовали общепринятые в популяционной биологии методики с учетом специфики изучения редких видов (Злобин и др., 2013). Условные онтогенетические состояния растений выделены по ранее разработанным для данного вида ключам (Вахрамеева, 2000; Кириллова, Кириллов, 2013), с учетом особенностей онтогенеза орхидных на севере (Блинова, 1998). Выделяли следующие онтогенетические состояния: ювенильное (j), имматурное (im), взрослое вегетативное (v) (куда включали виргинильные и временно не цветущие генеративные растения, различить которые в природе очень сложно) и генеративное (g).

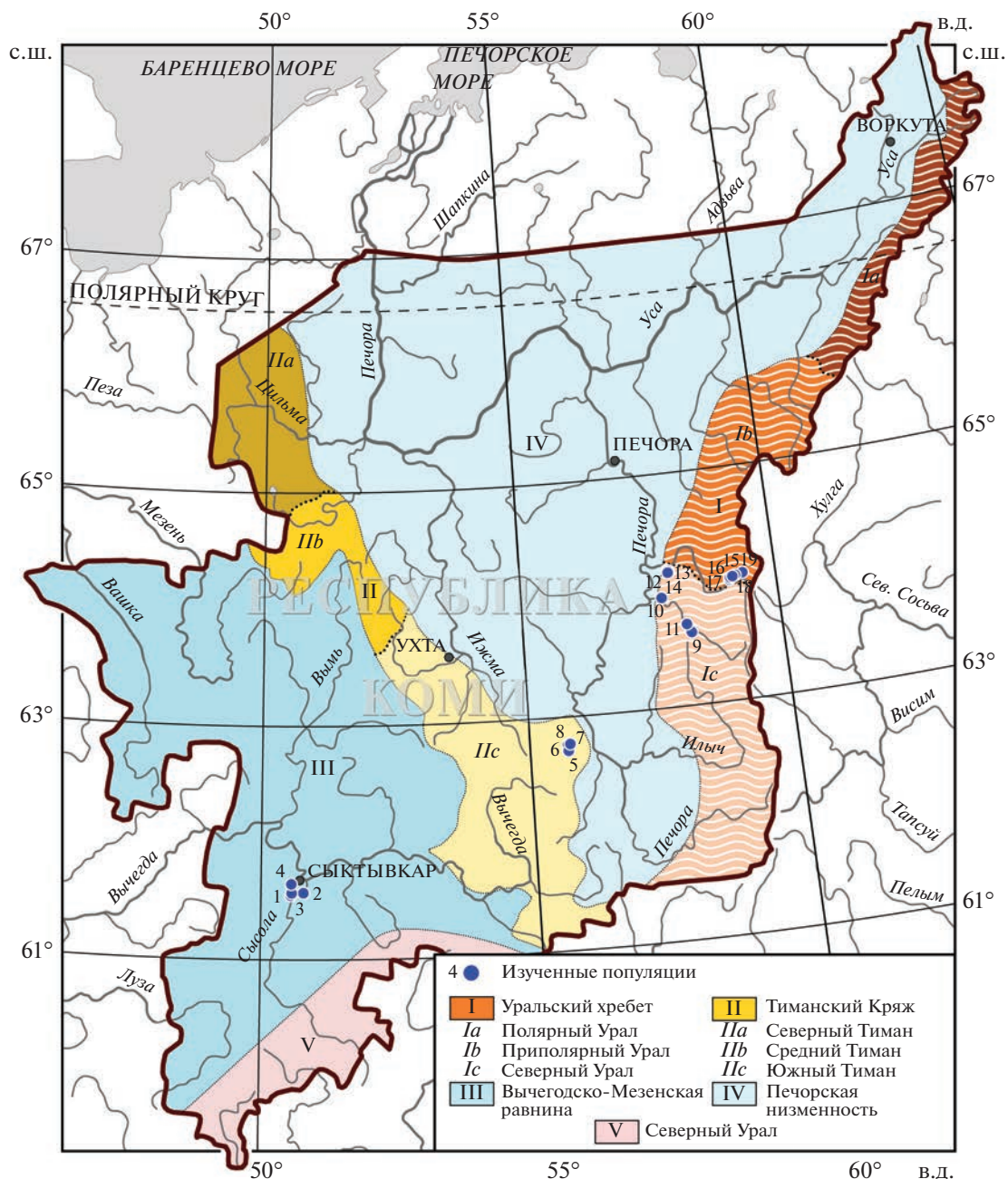
При изучении морфометрических особенностей растений в каждой популяции измерено по 30 генеративных особей. При исследовании генеративной сферы с каждого цветущего растения для измерений брали по два цветка из средней части соцветия, их фиксировали с помощью прозрачного скотча на картон, затем сканировали и проводили измерения в программе Gimp 2.8. В последующем данные усредняли и использовали как показатели размеров частей цветка для отдельного растения.

В августе подсчитывали количество завязавшихся плодов, определяли плодозавязываемость (как отношение числа плодов к числу цветков) и собирали коробочки со зрелыми семенами из центральной части соцветия до начала их раскрытия. Семена просматривали при увеличении 4.5× под световым микроскопом МСП-2 (ЛОМО, Россия) и фотографировали цифровой видеокамерой ТС-500 (ЛОМО, Россия). Измерения проводили в программе TourView (TourTek, Китай). Из каждой популяции в каждый год исследования анализировали по 40 семян. Измеряли среднюю длину и ширину семени и зародыша, отношение этих показателей друг к другу, объем семени и зародыша, долю воздушного пространства в семени (Arditti *et al.*, 1979; Healey *et al.*, 1980). Всего измерено 1210 семян.

Для определения качества семян взята смесь семян из коробочек, отобранных с разных растений в пределах одной популяции (не менее 600 семян с каждой популяции). Семена просматривали под микроскопом, неполноценными считали семена без нормально развитого зародыша. Подсчет числа семян в коробочках проведен с применением разработанной нами оригинальной методики абсолютного учета количества семян средствами программного пакета ImageJ 1.5 (Кириллова, Кириллов, 2015, 2017) на сканированном материале в автоматическом режиме (алгоритм Find Maxima) с ручной корректировкой. Для каждой популяции подсчитаны семена в пяти–шести коробочках из средней части соцветия (всего в 110 коробочках). Проведен учет следующих показателей: условно-потенциальная семенная продуктивность (УПСП) (число семян в коробочке × число цветков на растении (среднее для ЦП)); условно-реальная семенная продуктивность (УРСП) (число семян в коробочке × число цветков на растении (среднее для ЦП) × плодозавязываемость ЦП/100); реальная семенная продуктивность (РСП) (число полноценных семян в коробочке × число цветков на растении (среднее для ЦП) × плодозавязываемость ЦП/100); урожай семян (реальная семенная продуктивность особи × плотность генеративных растений на 1 м<sup>2</sup>).

Подготовительную обработку и анализ данных проводили в приложении Microsoft Office Excel 2010. В тексте и таблицах приведены среднее арифметическое ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $SD$ ). Проверку на нормальность распределения выборок значений морфометрических параметров растений и семян проводили с помощью  $W$ -теста Шапиро–Уилка. Для сравнения выборок использовали две группы методов: параметрические ( $t$ -критерий Стьюдента для выборок с нормальным распределением) и непараметрические (критерий Уилкоксона–Манна–Уитни для данных с отклонениями от нормального распре-





**Рис. 1.** Обследованные популяции *Dactylorhiza fuchsii* на территории Республики Коми: 1 – сосняк разнотравно-кустарничково-зеленомошный; 2 – березово-еловый разнотравно-зеленомошный лес; 3 – старая заросшая дорога в сосново-ольховом лесу; 4 – сосняк с березой разнотравно-чернично-зеленомошный; 5 – разнотравный бечевник (ЮЗ); 6 – разнотравный бечевник (СЗ); 7 – разнотравный луг; 8 – разнотравный бечевник (Ю); 9 – разнотравный бечевник; 10 – разнотравный бечевник; 11 – разнотравный бечевник; 12 – разнотравный бечевник; 13 – разнотравный бечевник; 14 – березово-еловый разнотравно-зеленомошный лес; 15 – разнотравный бечевник; 16 – мелкотравный бечевник; 17 – подножие склона; 18 – мелкотравный бечевник; 19 – разнотравно-моховый бечевник.

деления). Статистические расчеты выполнены с помощью среды R (v.3.4.2) (R Core Team, 2020).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Dactylorhiza fuchsii* образует в регионе довольно крупные популяции, численностью до несколь-

ких сотен растений. Онтогенетические спектры исследованных популяций – нормальные, полночленные, правосторонние. На юге региона в популяциях преобладают взрослые вегетативные особи, севернее – генеративные (рис. 2). Усредненный онтогенетический спектр *D. fuchsii* в регионе – 13.9:24.6:23.5:38 (j:im:v:g) отличается от



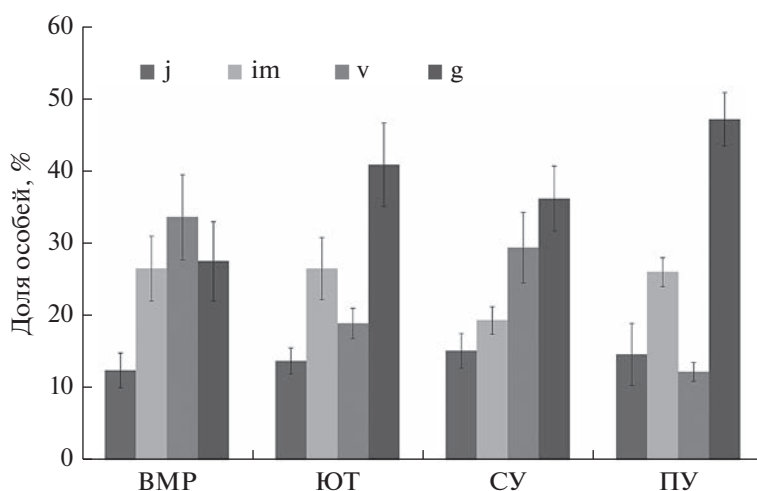


Рис. 2. Усреднённые онтогенетические спектры популяций *Dactylorhiza fuchsii* из разных частей Республики Коми: j – ювенильные особи, im – имматурные, v – взрослые вегетативные, g – генеративные.

базового спектра этого вида (15:19:38:28 (Вахрамеева, 2000)) повышенной долей генеративных растений. Почти в половине исследованных популяций (в 43%) отмечены поврежденные на стадии бутонизации генеративные растения, их доля варьирует от 2.3 до 100%, составляя, в среднем, 21.6%.

В результате проведенных исследований выявлено, что средняя высота *D. fuchsii* на территории Республики Коми составляет  $31.9 \pm 8.0$  см (минимальная – 13 см, максимальная – 64 см). На каждое растение приходится, в среднем,  $19 \pm 8.3$  (от 5 до 72) цветков. Соцветие  $5.5 \pm 2.0$  см длиной, прицветники –  $10.8 \pm 2.1$  мм. Наружные листочки околоцветника – ланцетные или широко ланцетные; верхний –  $8.5 \pm 0.9$  мм длиной, боковые  $8.9 \pm 0.93$  мм длиной. Губа цветка –  $8.4 \pm 0.9$  мм длиной и  $10.5 \pm 1.2$  мм шириной. Шпорец –  $5.6 \pm 1.0$  мм длиной и  $1.6 \pm 0.3$  мм толщиной. Для Центральной Европы приведено большее число цветков в соцветии этого вида – в среднем 23.7–28 шт. (Kindlmann, Jersakova, 2006; Sonkoly *et al.*, 2016). В Англии (Bateman, Rudall, 2006) губа цветка этого вида мельче – 6.3 мм длиной и 8.8 мм шириной, шпорец примерно такого же размера.

Морфометрические особенности *D. fuchsii* изучали в разных частях региона (табл. 1). Установлено, что по направлению к северу уменьшается высота растений, длина соцветий и число цветков. Например, на одно растение на Вычегодско-Мезенской равнине и Южном Тимане приходится в среднем 21 цветок, на Северном Урале – 18, на Приполярном Урале – 14.

Средняя плодозавязываемость вида в регионе – 46.4%. В Центральной Европе этот показатель составляет, по результатам разных исследователей, от 46–49% (Kindlmann, Jersakova, 2006) до 63.5

(Sonkoly *et al.*, 2016), в Центральной России (Тверская область) – 80.5–93.4% (Хомутовский, 2011).

Плодозавязываемость варьирует в исследованных популяциях от 11.6 до 74.5%, в зависимости от местообитания и года исследований (рис. 3). Этот показатель не связан с числом цветков в соцветии. Обнаружена достоверная положительная коррелятивная связь плодозавязываемости с температурой третьей декады июня ( $r = +0.52, p < 0.05$ ). Кроме того, на нее влияет и степень затенения. В открытых местообитаниях плодозавязываемость оказалась выше (в среднем 55.2%), чем в затененных лесных биотопах (35.8%). Исключением стала лишь популяция на лугу Южного Тимана (ЦП 7), обследованная в 2011 г., которая отличалась самым низким показателем (11.6%) из всех изученных популяций.

Семена *D. fuchsii* – песочного цвета, удлинённой формы (индекс семени – 4.2). Их средняя длина в регионе составляет  $0.70 \pm 0.12$  (0.34–1.04) мм, ширина –  $0.17 \pm 0.03$  (0.10–0.30) мм. Средний размер зародышей семян в Республике Коми –  $0.20 \pm 0.04 \times 0.12 \pm 0.02$  мм. Около 67% семени занимает воздушное пространство. Для Европы приведены чуть большие размеры семян этого вида –  $0.8–0.9 \times 0.15–0.20$  мм (Vojňanský, Fargašová, 2007; Talalaj *et al.*, 2019), для России –  $1.01 \times 0.15$  мм (Шибанова, Долгих, 2010) и  $0.98 \times 0.20$  мм (Никишина и др., 2007).

Размер семян *D. fuchsii* варьирует как между изученными популяциями, так и в одной и той же популяции на протяжении нескольких лет (табл. 2). Выявлено, что объем семян связан с объемом зародыша ( $r = +0.74$ , при  $p < 0.05$ ) и погодными условиями третьей декады июня ( $r = +0.56$ , при  $p < 0.05$ ) и третьей декады июля ( $r = +0.57$ , при  $p <$

**Таблица 1.** Морфометрические параметры генеративных особей *Dactylorhiza fuchsii* в разных частях Республики Коми

Признак	Вычегодско- Мезенская равнина	Южный Тиман	Северный Урал	Приполярный Урал
	<i>n</i> = 150	<i>n</i> = 270	<i>n</i> = 180	<i>n</i> = 140
Высота растения, см	38.81 ± 8.16	33.37 ± 6.41**	31.17 ± 4.82**	22.39 ± 3.88**
Длина соцветия, см	6.43 ± 2.10	5.43 ± 1.99**	5.45 ± 1.97	4.59 ± 1.22**
Число цветков, шт.	20.6 ± 7.5	20.8 ± 9.2	18.2 ± 8.4**	14.4 ± 4.3**
Длина губы, мм	8.74 ± 1.03	8.22 ± 0.83**	8.39 ± 0.72	
Длина верхнего лепестка наружного круга околоцветника, мм	8.92 ± 0.99	8.24 ± 0.76**	8.80 ± 0.83**	
Длина нижнего лепестка наружного круга околоцветника, мм	9.34 ± 1.02	8.71 ± 0.78**	9.40 ± 0.81**	
Длина шпорца, мм	6.40 ± 0.98	5.21 ± 0.65**	5.04 ± 0.76	
Ширина шпорца, мм	1.75 ± 0.27	1.57 ± 0.25**	1.62 ± 0.16	
Ширина губы, мм	10.83 ± 1.40	10.41 ± 1.06**	9.40 ± 1.14**	
Длина прицветника, мм	11.61 ± 2.38	10.18 ± 1.79**	11.26 ± 1.51**	
Длина завязи, мм	8.42 ± 1.41	7.41 ± 0.84**	8.01 ± 0.95**	

Примечание: \* – статистическая значимость отличий при  $p < 0.05$ ; \*\* – статистическая значимость отличий при  $p < 0.01$ .

< 0.05). Кроме того, размеры семян и зародышей уменьшаются в регионе по направлению к северу (табл. 3).

В одной коробочке *D. fuchsii* на территории Республики Коми содержится в среднем  $2900 \pm \pm 80$  семян. В более южных частях ареала вида этот показатель выше, так, для Средней России (Тверская область) он составляет  $5945 \pm 54$  шт. (Хомутовский, 2011), для Центральной Европы –  $5205 \pm 914$  шт. (Sonkoly *et al.*, 2016). Число семян в коробочке варьирует среди изученных популяций от 2027 до 3864 шт. (табл. 4). Обнаружена достоверная коррелятивная связь среднего числа семян в коробочке с числом цветков в популяции ( $r = +0.52$ , при  $p < 0.05$ ). Наибольшее количество семян в коробочке отмечено в ЦП 1 в 2021 г., когда наблюдалось и максимальное число цветков в соцветии – 26.2.

Часть семян в коробочках – неполноценная (не содержит нормально развитого зародыша), их доля варьирует в изученных популяциях от 0.7 до 32.1%, составляя в среднем 11.9%. Максимальный показатель отмечен в ЦП 2. Количество неполноценных семян зависит и от года исследования. Так, в ЦП 1 в разные годы наблюдений оно составляло от 0.7 до 24.5%. Обнаружена отрицательная достоверная коррелятивная связь между количеством неполноценных семян и плодозавязываемостью ( $r = -0.54$ , при  $p < 0.05$ ). В годы с низкой плодозавязываемостью отмечено больше неполноценных семян.

Среднее число полноценных семян в плоде *D. fuchsii* на территории Республики Коми составляет 2572 шт. В Тверской области этот показатель в два раза выше – 5837 шт. (Хомутовский, 2011). Условно-реальная семенная продуктивность растения (число семян на генеративное растение) составляет 27785 шт. В Центральной Европе этот показатель значительно выше – 87786 шт. (Sonkoly *et al.*, 2016).

Реальная семенная продуктивность генеративного растения *D. fuchsii* в регионе составляет 24795 семян. Минимальный показатель (7098 шт.) отмечен для ЦП 6, которая характеризуется наиболее суровыми условиями и находится на склоне северной экспозиции на Южном Тимане, максимальный (60666 шт.) – для ЦП 10.

Средний урожай семян *D. fuchsii* на территории Республики Коми – 36935 семян на  $1 \text{ м}^2$ , этот показатель значительно варьирует среди популяций – от 12.2 тыс. шт. (ЦП 17) до  $127.4 \text{ шт./м}^2$  (ЦП 10). Он определяется, наравне с эффективностью опыления и семенной продуктивностью, также плотностью генеративных растений на  $1 \text{ м}^2$ , которая составляет в исследованных популяциях от 0.6 до 3.2 особей на  $1 \text{ м}^2$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У растений обманная стратегия опыления является одной из эффективных репродуктивных стратегий (Cozzolino, Widmer, 2005; Jersáková *et al.*, 2006). Треть видов орхидных, в том числе и *Dacty-*

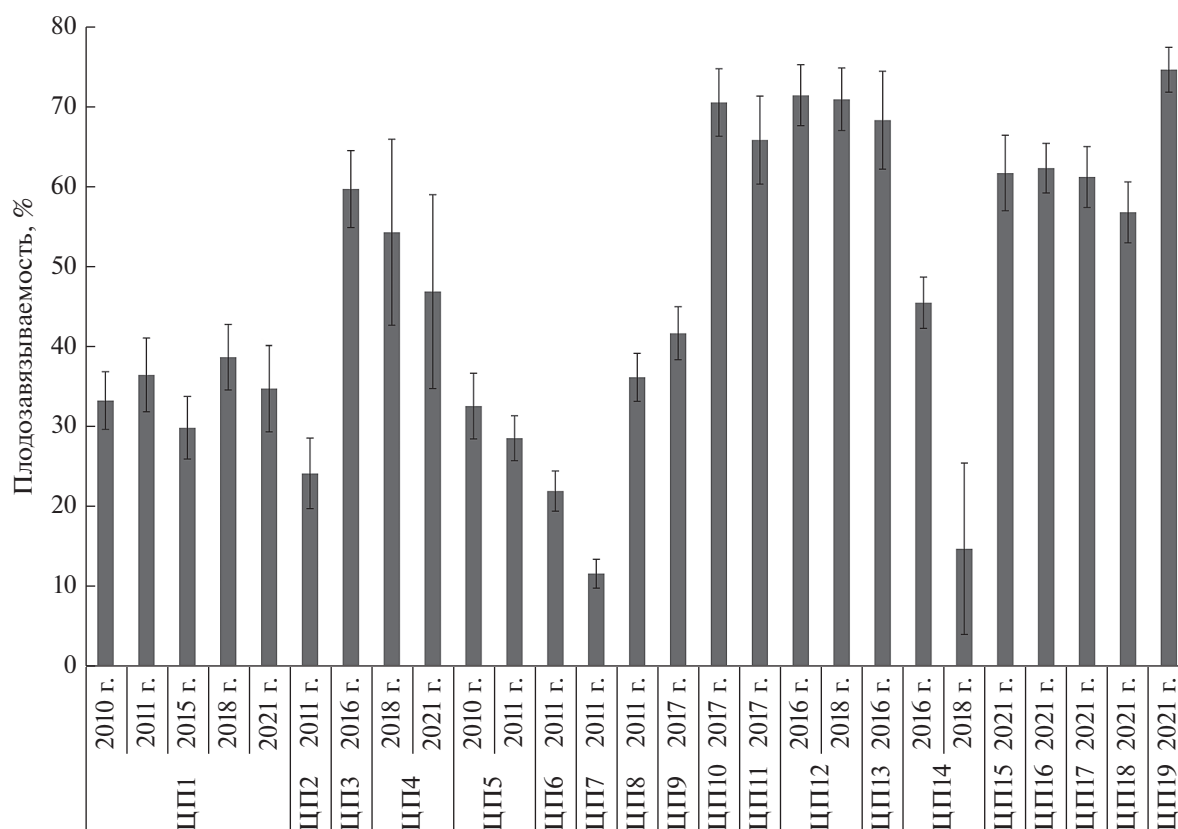


Рис. 3. Плодозавязываемость *Dactylorhiza fuchsii* в разных популяциях Республики Коми.

*lorhiza fuchsii*, характеризуются обманной стратегией опыления (Tremblay *et al.*, 2005) и полностью зависят от поведения опылителей. Насекомые учатся избегать “обманчивых” цветков безнектарных видов после нескольких посещений, видимо поэтому, большое соцветие не выгодно в данном случае. Выявленное уменьшение числа цветков в соцветии *D. fuchsii* на северной границе ареала, а также уменьшение количества цветков по территории региона в направлении севера, вероятно, связано с тем, что небольшое соцветие оптимально в данных условиях.

Размеры цветков этого вида не коррелируют с широтным расположением растений. По всей видимости, в данном случае идет приспособление к конкретным опылителям в каждом локальном участке.

В качестве метода количественной оценки репродуктивного успеха орхидных часто используют такой показатель как плодозавязываемость (“fruit set”) – доля цветков, образовавших плоды (Proctor, Harder, 1994; Neiland, Wilcock, 1998; Kindlmann, Jersáková, 2006). Выявлено, что средняя плодозавязываемость вида на северной границе ареала (46.4%) сопоставима с этим показателем в других частях ареала. Она не связана с числом цветков в соцветии, а зависит от температуры в период цве-

тения этого вида (третья декада июня). В хорошую погоду активность насекомых-опылителей выше.

На репродуктивный успех растений влияют различные факторы, одним из которых является свет. Обнаружено, что степень затенения оказывает воздействие на репродуктивный процесс растений, например, влияя на количество и активность опылителей (Alonso, Herrera, 2008; Kilkenny, Galloway, 2008), в том числе и у орхидных (Willems *et al.*, 2001; Shefferson *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2010; Abeli *et al.*, 2013; Кириллова, Кириллов, 2018, 2020а). В нашем исследовании также обнаружено, что плодозавязываемость *D. fuchsii* в более затененных местообитаниях (лесах) оказалась ниже (в среднем 35.8%), чем на открытых участках (55.2%).

Размеры семян *D. fuchsii* на северной границе ареала (0.70 × 0.17 мм) меньше, чем в более южных частях ареала этого вида. Они уменьшаются и по территории региона в направлении севера. Размеры семян (и зародышей) положительно связаны с температурой третьей декады июня и июля, то есть с теми периодами, когда растения опыляются (фаза цветения) и идет формирование семян (фаза плодоношения).

Одни исследователи (Широков и др., 2007) относят *D. fuchsii* к видам, образующим значитель-

Таблица 2. Морфометрическая характеристика семян *Dactylorhiza fuchsii* в Республике Коми

ЦП	Год	Семя			
		длина, мм $M \pm sd$	ширина, мм $M \pm sd$	индекс $M \pm sd$	Объем, $\times 10^{-3}$ мм <sup>3</sup>
1	2010	0.80 ± 0.11	0.19 ± 0.04	4.26 ± 0.91	8.26
	2011	0.89 ± 0.09	0.20 ± 0.03	4.47 ± 0.74	9.77
	2015	0.62 ± 0.12	0.17 ± 0.02	3.71 ± 0.63	4.89
	2017	0.88 ± 0.08	0.20 ± 0.04	4.63 ± 0.71	9.22
	2021	0.68 ± 0.08	0.17 ± 0.03	4.08 ± 0.68	5.39
2	2011	0.78 ± 0.07	0.17 ± 0.02	4.60 ± 0.74	6.15
3	2016	0.67 ± 0.13	0.14 ± 0.02	4.79 ± 0.74	3.71
4	2018	0.82 ± 0.08	0.15 ± 0.02	5.39 ± 0.63	5.08
	2021	0.63 ± 0.09	0.14 ± 0.02	4.44 ± 0.70	3.64
5	2010	0.70 ± 0.08	0.18 ± 0.02	4.03 ± 0.53	5.80
	2011	0.70 ± 0.13	0.18 ± 0.03	4.0 ± 0.96	5.99
6	2009	0.71 ± 0.14	0.18 ± 0.03	4.07 ± 0.94	6.12
	2010	0.81 ± 0.12	0.19 ± 0.03	4.42 ± 0.88	7.76
	2011	0.72 ± 0.09	0.18 ± 0.02	4.15 ± 0.71	5.89
7	2011	0.62 ± 0.12	0.18 ± 0.03	3.47 ± 0.75	5.75
8	2009	0.73 ± 0.11	0.19 ± 0.03	4.01 ± 0.75	6.87
	2010	0.74 ± 0.10	0.18 ± 0.02	4.24 ± 0.87	6.30
	2011	0.71 ± 0.12	0.17 ± 0.02	4.14 ± 0.77	5.68
9	2017	0.60 ± 0.06	0.16 ± 0.02	3.90 ± 0.57	3.93
10	2017	0.63 ± 0.08	0.17 ± 0.02	3.83 ± 0.65	4.76
11	2017	0.65 ± 0.07	0.17 ± 0.02	3.90 ± 0.66	4.93
12	2016	0.69 ± 0.09	0.16 ± 0.03	4.43 ± 0.87	4.72
	2018	0.71 ± 0.09	0.17 ± 0.02	4.31 ± 0.73	5.29
13	2016	0.67 ± 0.09	0.18 ± 0.02	3.84 ± 0.68	5.58
14	2016	0.65 ± 0.07	0.17 ± 0.02	3.91 ± 0.61	4.89
15	2021	0.58 ± 0.05	0.15 ± 0.02	3.95 ± 0.60	3.40
16	2021	0.61 ± 0.08	0.15 ± 0.02	4.05 ± 0.71	3.85
17	2021	0.66 ± 0.06	0.16 ± 0.02	4.32 ± 0.73	4.34
18	2021	0.62 ± 0.08	0.16 ± 0.02	3.94 ± 0.81	4.14

Таблица 2. Окончание

ЦП	Год	Зародыш				Доля воздушного пространства в семени, %
		длина, мм $M \pm sd$	ширина, мм $M \pm sd$	индекс $M \pm sd$	объем, $\times 10^{-3}$ мм <sup>3</sup>	
1	2010	0.23 ± 0.04	0.14 ± 0.02	1.74 ± 0.37	2.34	68.47
	2011	0.23 ± 0.04	0.14 ± 0.02	1.68 ± 0.19	2.48	73.95
	2015	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.71 ± 0.21	1.54	64.56
	2017	0.22 ± 0.04	0.14 ± 0.02	1.66 ± 0.18	2.30	71.92
	2021	0.22 ± 0.03	0.14 ± 0.02	1.55 ± 0.20	2.37	55.08
2	2011	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.03	1.73 ± 0.31	1.55	74.25
3	2016	0.17 ± 0.02	0.11 ± 0.01	1.51 ± 0.18	1.09	65.76
4	2018	0.18 ± 0.02	0.12 ± 0.01	1.58 ± 0.15	1.31	73.18
	2021	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.63 ± 0.16	1.51	56.05
5	2010	0.21 ± 0.03	0.13 ± 0.02	1.63 ± 0.26	1.91	66.48
	2011	0.22 ± 0.03	0.13 ± 0.02	1.71 ± 0.25	1.98	66.06
6	2009	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.65 ± 0.32	1.60	70.54
	2010	0.22 ± 0.03	0.14 ± 0.02	1.65 ± 0.23	2.33	67.81
	2011	0.23 ± 0.03	0.13 ± 0.02	1.78 ± 0.28	2.06	64.05
7	2011	0.19 ± 0.05	0.12 ± 0.04	1.69 ± 0.32	1.73	67.67
8	2009	0.21 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.78 ± 0.28	1.70	74.40
	2010	0.22 ± 0.02	0.14 ± 0.02	1.64 ± 0.21	2.25	63.54
	2011	0.21 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.76 ± 0.28	1.77	67.26
9	2017	0.17 ± 0.02	0.11 ± 0.02	1.53 ± 0.23	1.18	69.22
10	2017	0.16 ± 0.02	0.12 ± 0.02	1.41 ± 0.19	1.24	73.06
11	2017	0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.01	1.46 ± 0.15	1.24	73.53
12	2016	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.64 ± 0.23	1.55	63.61
	2018	0.20 ± 0.02	0.13 ± 0.01	1.53 ± 0.17	1.83	62.97
13	2016	0.21 ± 0.02	0.14 ± 0.02	1.45 ± 0.15	2.26	56.24
14	2016	0.20 ± 0.02	0.13 ± 0.02	1.52 ± 0.18	1.83	60.84
15	2021	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.01	1.61 ± 0.24	0.75	76.84
16	2021	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02	1.55 ± 0.24	0.86	76.20
17	2021	0.17 ± 0.03	0.11 ± 0.02	1.58 ± 0.18	1.16	71.66
18	2021	0.19 ± 0.03	0.13 ± 0.02	1.56 ± 0.22	1.69	57.60

**Таблица 3.** Морфометрическая характеристика семян *Dactylorhiza fuchsii* из разных частей Республики Коми

Признак	ВМР	ЮТ	СУ	ПУ
	$n = 360$	$n = 390$	$n = 300$	$n = 160$
Длина семени, мм	$0.75 \pm 0.14$	$0.72 \pm 0.12^{**}$	$0.66 \pm 0.08^{**}$	$0.62 \pm 0.07^{**}$
Ширина семени, мм	$0.17 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.03^{**}$	$0.17 \pm 0.02^{**}$	$0.15 \pm 0.02^{**}$
Длина зародыша, мм	$0.20 \pm 0.04$	$0.21 \pm 0.03^{**}$	$0.19 \pm 0.03^{**}$	$0.17 \pm 0.03^{**}$
Ширина зародыша, мм	$0.13 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.02^*$	$0.11 \pm 0.02^{**}$
Индекс семени	$4.49 \pm 0.85$	$4.07 \pm 0.83^{**}$	$4.02 \pm 0.72$	$4.07 \pm 0.72$
Индекс зародыша	$1.64 \pm 0.24$	$1.70 \pm 0.27^*$	$1.51 \pm 0.20^{**}$	$1.57 \pm 0.22^{**}$
Объем семени, $\times 10^{-3} \text{ мм}^3$	6.20	6.26*	4.87**	3.93**
Объем зародыша, $\times 10^{-3} \text{ мм}^3$	1.83	1.93**	1.59**	1.11**

Примечание: \* – статистическая значимость отличий при  $p < 0.05$ ; \*\* – статистическая значимость отличий при  $p < 0.01$ .

**Таблица 4.** Семенная продуктивность *Dactylorhiza fuchsii* в Республике Коми

ЦП	Год	Число семян в плоде, шт.			Число полноценных семян в плоде, шт.	УПСП особи, шт.	УРСП особи, шт.	РСП особи шт.	Урожай семян, шт./м <sup>2</sup>
		среднее $M \pm m$	min	max					
1	2010	$2609 \pm 472$	1581	4303	2385	44875	14225	13002	–
	2011	$3179 \pm 291$	2089	4041	2400	69938	25877	19537	23249
	2021	$3864 \pm 354$	2845	5239	3698	101237	34016	32553	23764
2	2011	$2445 \pm 213$	1857	3177	1660	55502	13431	9120	27360
	2018	$3686 \pm 294$	2772	4302	3203	72246	42769	37167	–
4	2021	$2599 \pm 403$	1775	3823	2349	55099	26007	23510	–
	2010	$2027 \pm 168$	1692	2207	1845	32635	10606	9652	18242
5	2011	$3019 \pm 542$	1996	5349	2557	57663	16434	13920	44264
	2011	$2071 \pm 169$	1695	2643	1696	38521	8667	7098	29103
8	2011	$2550 \pm 220$	1876	3416	2162	52275	19394	16446	44405
9	2017	$3059 \pm 172$	2553	3608	2814	70357	29620	27251	65402
10	2017	$3716 \pm 367$	2395	4309	3289	95873	68549	60666	127398
11	2017	$3413 \pm 350$	2314	4419	3137	86359	56824	52221	–
12	2018	$2569 \pm 170$	2163	3177	2312	35455	25988	23390	30406
13	2016	$3176 \pm 416$	2037	4378	2991	64780	46383	43692	–
14	2016	$2762 \pm 245$	2260	3419	2566	38110	17607	16357	12595
15	2021	$3122 \pm 398$	2435	3816	2660	41839	26693	22743	31840
16	2021	$2829 \pm 132$	2408	3215	2670	42432	27114	25596	47352
17	2021	$2735 \pm 226$	2224	3571	2434	37193	22874	20358	12215
18	2021	$2726 \pm 121$	2399	3003	2606	39530	22611	21616	16428

ное (70–100%) количество полноценных семян, другие (Андропова, 2011) отмечают у него высокую долю беззародышевых семян (до 88%). В популяциях вида на северной границе ареала число неполноценных семян невелико – в среднем 11.9% (от 0.7 до 32.1%). Вероятно, оно связано с

недостаточностью опыления, так как выявлена отрицательная связь этого показателя с плодозавязываемостью.

Коробочка *D. fuchsii* на северной границе ареала содержит меньшее количество семян, чем в более южных его частях. Меньше здесь и другие показате-

тели семенной продуктивности. Эта закономерность описана и другими исследователями, многие виды демонстрируют спад семенной продуктивности с удалением от центра ареала (García *et al.*, 2000; Dogken, Eckert, 2001; Jump, Woodward, 2003), в том числе и орхидные, например *Epipactis atrorubens* (Кириллова, Кириллов, 2020б) и *Dactylorhiza incarnata* (Кириллова, Кириллов, 2021). На территории самого региона (в разных его частях) значительных колебаний числа семян в коробочке этого вида не отмечено.

Репродуктивный успех растений связан с их плодовитостью (количеством и качеством произведенных диаспор). В качестве меры его оценки на уровне особи используют такие показатели, как число цветков, плодов и семян, на уровне популяций — количество появившихся и закрепившихся молодых растений (Злобин и др., 2013). Во всех изученных нами популяциях *D. fuchsii* в регионе отмечены ювенильные растения, что свидетельствует о благоприятных условиях для семенного возобновления.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования показали, что на территории Республики Коми, где *D. fuchsii* находится на северной границе своего ареала, существуют дополнительные ограничения в воспроизводстве, по сравнению с более южными частями ареала — повреждение части генеративных растений заморозками, меньшее число цветков на растениях, уменьшение размеров семян и спад семенной продуктивности. В пределах региона по направлению к северу также выявлено уменьшение числа цветков и размеров семян, однако значительного колебания числа семян не отмечено. Несмотря на выявленные ограничения, довольно высокий показатель плодозавязываемости (46.4%), сопоставимый с этим показателем в других частях ареала, наличие во всех изученных популяциях молодых ювенильных растений и высокая численность популяций свидетельствуют о благоприятных условиях для семенного возобновления этого вида на исследуемой территории. Обнаружено, что на репродуктивный успех вида оказывают влияние температуры третьей декады июня (время цветения вида в регионе), а также конкретные условия фитоценоза, в частности — степень затенения.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Института биологии Коми НЦ УрО РАН (№ гос. регистрации 122040600026-9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андропова Е.В. Летальные аномалии строения и развития зародыша у *Dactylorhiza fuchsii* (Orchidaceae) //

Ботанический журнал. 2011. Т. 96. №. 7. С. 858–863.

Блинова И.В. Особенности онтогенеза некоторых корневых орхидных (Orchidaceae) Крайнего Севера // Ботанический журн. 1998. Т. 83. № 1. С. 85–94.

Блинова И.В. Особенности опыления орхидных в северных широтах // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2008. Т. 113. № 1. С. 39–47.

Блинова И.В. Оценка репродуктивного успеха орхидных за Полярным кругом // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2009. № 12. С. 76–83.

Вахрамеева М.Г. Род Пальчатокоренник // Биологическая флора Московской области. М.: Изд-во “Гриф и К”, 2000. Вып. 14. С. 55–86.

Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). М.: Т-во науч. изд. КМК, 2014. 437 с.

Злобин Ю.А., Скляр В.Г., Клименко А.А. Популяции редких видов растений: теоретические основы и методика изучения. Сумы: Университетская книга, 2013. 439 с.

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Особенности биологии, воспроизведение и структура ценопопуляций *Dactylorhiza fuchsii* s.l. (Orchidaceae) на северном пределе распространения // Ботанический журн. 2013. Т. 98. № 2. С. 75–90.

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Особенности репродуктивной биологии *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Orchidaceae) на северной границе ареала // Сиб. экол. журн. 2015. Т. 22. № 4. С. 617–629. <https://doi.org/10.15372/SEJ20150413>

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Репродуктивная биология *Platanthera bifolia* (L.) Rich. (Orchidaceae) на северной границе ареала (Республика Коми) // Вест. Томского гос. уни-та. Биология. 2017. № 38. С. 68–88. <https://doi.org/10.17223/19988591/38/4>

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Влияние условий освещения на репродуктивный успех *Cypripedium calceolus* L. (Orchidaceae, Liliopsida) // Поволжский экол. журн. 2018. № 3. С. 259–273. <https://doi.org/10.18500/1684-7318-2018-3-259-273>

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Влияние условий освещения на репродуктивный успех *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae) // Экология. 2020а. № 4. С. 311–315. <https://doi.org/10.31857/S0367059720040095>

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Семенная продуктивность *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (Orchidaceae, Liliopsida) на северной границе ареала // Поволжский экол. журн. 2020б. № 2. С. 191–208. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2020-2-191-208>

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae, Liliopsida) на северной границе ареала: структура популяций и семенная продуктивность // Поволжский экол. журн. 2021. № 3. С. 272–292. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2021-3-272-292>

Красная книга Республики Коми. Сыктывкар: Коми республиканская типография, 2019. 766 с.



- Никишина Т.В., Попов А.С., Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Широков А.И., Коломейцева Г.Л. Криоконсервация семян орхидей // Вест. Тверского гос. ун-в-та. Серия: Биология и экология. 2007. № 8(36). С. 38–43.
- Филиппов Н.И. К фауне шмелей (Hymenoptera, Apidae, *Bombus* latr.) таежной зоны Республики Коми // Вест. института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. 2016. Т. 3. С. 12–18.
- Хоматовский М.И. Эффективность опыления некоторых видов орхидных Валдайской возвышенности // Охрана и культивирование орхидей: материалы IX Международной научной конференции. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2011. С. 456–461.
- Шибанова Н.Л., Долгих Я.В. Морфометрическая характеристика семян и реальная семенная продуктивность редких видов орхидных Предуралья // Вест. Пермского университета. Серия: Биология. 2010. № 2. С. 4–6.
- Широков А.И., Крюков Л.А., Коломейцева Г.Л. Морфометрический анализ семян некоторых видов орхидных Нижегородской области // Вест. ТвГУ. Серия “Биология и экология”. 2007. Вып. 4. № 8(36). С. 205–208.
- Abeli T., Jäkäläniemi A., Wannas L., Mutikainen P., Tuomi J. Pollen limitation and fruiting failure related to canopy closure in *Calypso bulbosa* (Orchidaceae), a northern food-deceptive orchid with a single flower // Botanical J. Linnean Society. 2013. V. 171(4). P. 744–750. <https://doi.org/10.1111/boj.12014>
- Alonso C., Herrera C.M. Site-specific features affect pollination success of a gynodioecious understory shrub in a gender-specific mode // Ecoscience. 2008. V. 15(3). P. 358–365. <https://doi.org/10.2980/15-3-3115>
- Arditti J., Michaud J.D., Healey P.L. Morphometry of orchid seeds. I. Paphiopedilum and native California and related species of *Cypripedium* // Amer. J. Botany. 1979. V. 66(10). P. 1128–1137. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1979.tb06332.x>
- Arditti J., Ghani A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications // New Phytologist. 2000. V. 145. P. 367–421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00675.x>
- Barman D., Devadas R. Climate change on orchid population and conservation strategies: a review // J. Crop and Weed. 2013. V. 9(2). P. 1–12.
- Bateman R.M., Rudall P.J. Evolutionary and morphometric implications of morphological variation among flowers within an inflorescence: a case-study using European orchids // Annals of botany. 2006. V. 98(5). P. 975–993. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl191>
- Bojňanský V., Fargašová A. Atlas of seeds and fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian Mountains Region. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2007. 1046 p.
- Box M.S., Bateman R.M., Glover B.J., Rudall P.J. Floral ontogenetic evidence of repeated speciation via paedomorphosis in subtribe Orchidinae (Orchidaceae) // Bot J Linn Soc. 2008. V. 157. P. 429–454. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00794.x>
- Claessens J., Kleynen J. The flower of the European orchid: form and function. Voerendaal: Jean Claessens and Jacques Kleynen, 2011. 440 p.
- Cozzolino S., Widmer A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? // Trends in ecology and evolution. 2005. V. 20(9). P. 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>
- Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W., Barrett R.L. Orchid conservation: a global perspective // Orchid Conservation / Eds Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. Natural History Publications, 2003. P. 1–24.
- Dafni A., Woodell S.R. Stigmatic Exudate and the Pollination of *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó // Flora. 1986. V. 178(5). P. 343–350. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)31521-9](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)31521-9)
- Dorken M.E., Eckert C.G. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae) // J. Ecology. 2001. V. 89(3). P. 339–350.
- García D., Zamora R., Gómez J.M., Jordano P., Hódar J.A. Geographical variation in seed production, predation and abortion in *Juniperus communis* throughout its range in Europe // J. Ecology. 2000. V. 88(3). P. 436–446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00459.x>
- Govaerts R., Bernet P., Kratochvil K., Gerlach G., Carr G., Alrich P., Pridgeon A.M., Pfahl J., Campacci M.A., Holland Baptista D., Tigges H., Shaw J., Cribb P., George A., Kreutz K., Wood J. 2005–2018. World Checklist of Orchidaceae. Royal Botanic Gardens, Kew. URL: <http://apps.kew.org/wcps/> (Accessed 10 January 2018).
- Gutowski J.M. Pollination of the orchid *Dactylorhiza fuchsii* by longhorn beetles in primeval forests of Northeastern Poland // Biological Conservation. 1990. V. 51(4). P. 287–297. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(90\)90114-5](https://doi.org/10.1016/0006-3207(90)90114-5)
- Healey P.L., Michaud J.D., Arditti J. Morphometry of Orchid Seeds. III. Native California and Related Species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* and *Spiranthes* // American J. Botany. 1980. V. 67(4). P. 508–518. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1980.tb07678.x>
- Jersáková J., Johnson S.D., Kindlmann P. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids // Biological reviews. 2006. V. 81(2). P. 219–235. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006986>
- Jump A.S., Woodward F.I. Seed production and population density decline approaching the range edge of *Cirsium* species // New Phytologist. 2003. V. 160(2). P. 349–358. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00873.x>
- Kilkenny F.F., Galloway L.F. Reproductive success in varying light environments: direct and indirect effects of light on plants and pollinators // Oecologia. 2008. V. 155(2). P. 247–255. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0903-z>
- Kindlmann P., Jersáková J. Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids // Folia Geobotanica. 2006. V. 41(1). P. 47–60. <https://doi.org/10.1007/BF02805261>
- Kull T., Hutchings M.J. A comparative analysis of decline in the distribution ranges of orchid species in Estonia and the United Kingdom // Biological Conservation. 2006.

- V. 129. P. 31–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.046>
- Morales M., Ackerman J.D., Tremblay R.L. Morphological flexibility across an environmental gradient in the epiphytic orchid, *Tolumnia variegata*: complicating patterns of fitness // Botanical J. Linnean Society. 2010. V. 163(4). P. 431–446.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01064.x>
- Neiland M.R.M., Wilcock C.C. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae // American Journal of Botany. 1998. V. 85. P. 1657–1671.  
<https://doi.org/10.2307/2446499>
- Proctor H.C., Harder L.D. Pollen load, capsule weight, and seed production in three orchid species // Canadian J. Botany. 1994. V. 72(2). P. 249–255.  
<https://doi.org/10.1139/b94-033>
- R Core Team. R: *A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2020. Available at: <http://www.R-project.org> (accessed 17 December 2020).
- Shefferson R.P., Kull T., Tali K. Demographic response to shading and defoliation in two woodland orchids // Folia Geobotanica. 2006. V. 41(1). P. 95–106.  
<https://doi.org/10.1007/BF02805264>
- Sonkoly J.E., Vojtkó A., Török P., Illyés Z., Sramkó G., Tökölyi J., Molnár V.A. Higher seed number compensates for lower fruit-set of deceptive orchids // J. Ecology. 2016. V. 104(2). P. 343–351.  
<https://doi.org/10.1111/1365-2745.12511>
- Swartz N.D., Batty A.L., Hopper S., Dixon K. Does integrated conservation of terrestrial orchids work? // Lankasteriana. 2007. V. 7. P. 219–222.
- Tałałaj I., Kotowicz J., Brzosko E., Ostrowiecka B., Aleksandrowicz O., Wróblewska A. Spontaneous caudicle re-configuration in *Dactylorhiza fuchsii*: A new self-pollination mechanism for Orchideae // Plant Systematics and Evolution. 2019. V. 305(4). P. 269–280.  
<https://doi.org/10.1007/s00606-019-01570-w>
- Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification // Biological J. Linnean Society. 2005. V. 84(1). P. 1–54.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x>
- Wang H.H., Wonkka C.L., Treglia M.L., Grant W.E., Smeins F.E., Rogers W.E. Species distribution modelling for conservation of an endangered endemic orchid // AoB Plants. 2015. V. 7. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plv039>
- Whigham D.F., Willems J.H. Demographic studies and life-history strategies of temperate terrestrial orchids as a basis for conservation // Orchid Conservation / Eds Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. (Natural History Publications, 2003). P. 137–158.
- Willems J.H., Balounova Z., Kindlmann P. The effect of experimental shading on seed production and plant survival of *Spiranthes spiralis* (Orchidaceae) // Lindleyana. 2001. V. 16. P. 31–37.

## Reproductive Success of *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó at the Northern Border of Its Distribution Range

I. A. Kirillova<sup>1, #</sup> and D. V. Kirillov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology of Komi Scientific Centre, Ural Branch of the RAS, 28 Kommunisticheskaya str., Syktyvkar, 167982 Russia  
<sup>#</sup>e-mail: kirillova\_orchid@mail.ru

The paper presents data on the population structure, morphometric features of plants and seeds and some aspects of reproductive biology (fruit set, seed productivity) of *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó (Orchidaceae) on the northern border of its distribution area (the Komi Republic, northeast Russia). We found statistically significant decrease of seed size and flowers number per inflorescence from south to north within of the species distribution area. In the Komi Republic, the seed productivity of *Dactylorhiza fuchsii* was found to be lower than in the southern parts of its distribution area: one fruit contains an average of  $2900 \pm 80$  seeds, the average real seed productivity of the generative plant is 24800 seeds. Despite the declination of some reproductive success indicators, in the northern territories the species forms quite large, well-regenerating populations.

**Keywords:** orchids, northern border of the area, morphometry of seeds, fruit set, seed productivity

УДК 631.46:630\*182:595.1

## ЛЕСНЫЕ БИОГЕОЦЕНОЗЫ В АРЕАЛЕ БУРЫХ ЛЕСНЫХ ПОЧВ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

© 2023 г. Т. С. Улигова\*, Н. Л. Цепкова\*, И. Б. Рапопорт\*, О. Н. Горобцова\*,  
Ф. В. Гедгафова\*, Р. Х. Темботов\*.<sup>@</sup>

\*Институт экологии горных территорий им. А.К. Темботова РАН, Нальчик, 360051 Кабардино-Балкарская республика, Россия

<sup>@</sup>E-mail: [tembotov.rustam@mail.ru](mailto:tembotov.rustam@mail.ru)

Поступила в редакцию 28.05.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 02.12.2021 г.

Изучена растительность и бурая лесная почва разных типов лесов южного и северного макросклонов Главного Кавказского хребта, уделено особое внимание почвенной фауне (дождевые черви), микробной и ферментативной активности. Проведен сравнительный анализ основных компонентов лесных биогеоценозов (растительные сообщества, дождевые черви, микробная и ферментативная активность почвы) южного и северного макросклонов Главного Кавказского хребта, расположенных в Кавказском государственном природном биосферном заповеднике и памятниках природы “Гуамское ущелье” и “Массив самшита колхидского”. Дана оценка растительного разнообразия различных типов колхидских лесов южного и северного макросклонов. Установлено сходство структуры растительных сообществ, населения дождевых червей, их видового богатства, а также важнейших показателей биологической активности почвы южного и северного макросклонов. Показана тесная корреляционная связь показателей биологической активности бурой лесной почвы с разнообразием растительности и численностью дождевых червей.

*Ключевые слова:* биологическая активность, биоразнообразие, бурая лесная почва, дождевые черви, колхидские леса

DOI: 10.31857/S1026347023010134, EDN: INDNZM

В условиях современного глобального изменения климата и усиления влияния антропогенных факторов необходимы актуальные сведения о компонентах лесных биогеоценозов для осуществления мониторинга их состояния. В составе Кавказского государственного природного биосферного заповедника (КГПБЗ) сохранились лесные сообщества, уникальные по своему биологическому разнообразию и выполняемым экологическим функциям, что определяет возможность их использования в качестве эталонных биогеоценозов. Наблюдения за такими сообществами проводятся в рамках фундаментальной проблемы, связанной с оценкой состояния и динамики лесов, их биоразнообразия и получения новой информации о взаимосвязи их компонентов. Рассмотрению различных аспектов данной проблемы посвящены многочисленные публикации (Breemen, Fienzi, 1998; Bauhus J. *et al.*, 1998; Striganova *et al.*, 2001; Lavelle *et al.*, 2006; Добровольский, Чернов, 2011; Bernier, Gillet, 2012; Разнообразие и динамика..., 2012, 2013; Лукина и др., 2015, 2019). Опыт ранее проведенных нами исследований (Uligova *et al.*, 2017;

Uligova и др., 2019) выявил ведущую роль разнообразия растительности и почвенной мезофауны в формировании биологической активности почвы и обеспечении устойчивого функционирования биогеоценозов. Исследования заповедных колхидских лесов северного и южного макросклонов Западного Кавказа в ареале бурых лесных почв позволяют охарактеризовать их важнейшие компоненты (растительность, почвенная микро- и мезофауна, почва) и установить между ними возможные взаимосвязи.

Цель работы – оценить пространственную изменчивость биогеоценозов различных типов колхидских лесов Западного Кавказа – выявить структуру и эколого-биологическое состояние основных компонентов (растительные сообщества, дождевые черви, почвы и их микробная и ферментативная активность).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Район исследования** охватывает южный и северный макросклоны Главного Кавказского хребта (ГКХ) Западного Кавказа. Южный макросклон

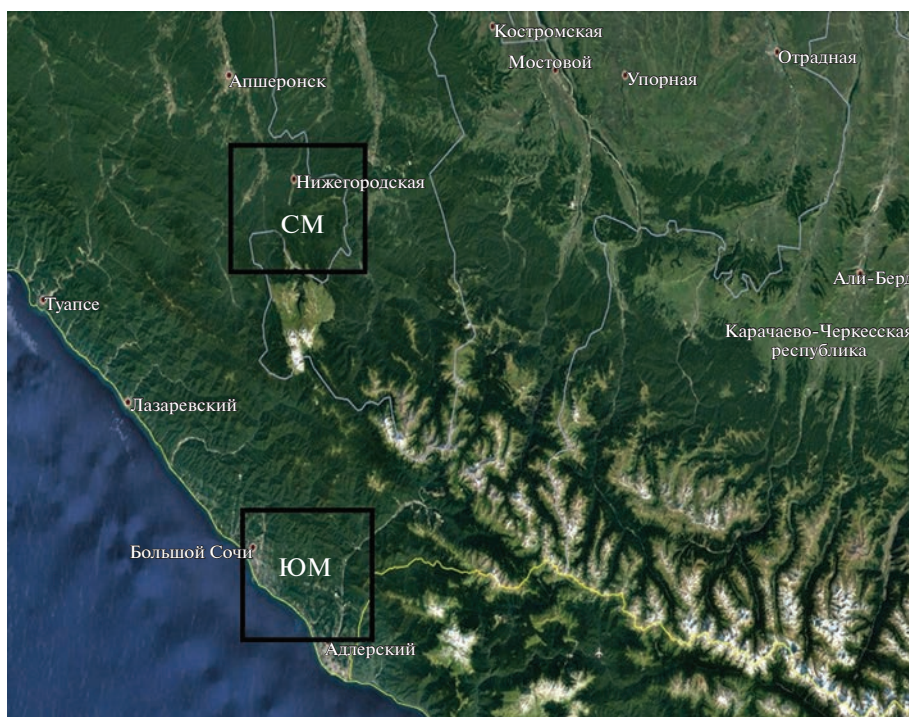


Рис. 1. Расположение исследуемых лесных биогеоценозов Западного Кавказа на южном (ЮМ) и северном (СМ) макросклонах Главного Кавказского Хребта.

представлен территорией Хостинской тисо-самшитовой рощи КГПБЗ (Сочинский район), северный — памятниками природы “Туапское ущелье” и “Массив самшита колхидского” в бассейне р. Цице (Майкопский район Республики Адыгея) (рис. 1). По территории этих памятников природы и бассейна р. Цице проходит северная граница ареалов представителей третичной флоры. В составе этих лесов присутствуют реликты, в том числе и третичного времени *Fagus orientalis* Lipsky, *Taxus baccata* L., *Vuxus colchica* Pojark., *Abies nordmanniana* (Steven) Spach, *Tilia begoniifolia* L., *Prunus laurocerasus* L., *Philadelphus caucasicus* Koehne, *Ruscus colchicus* Yeo, *Phyllitis scolopendrium* (L.). Рассматриваемые биогеоценозы южного и северного макросклонов относятся к различным типам колхидских лесов, сформировавшихся в ареале бурых лесных почв.

На южном макросклоне территория тисо-самшитовой рощи площадью около 300 га охватывает восточный склон горы Ахун на правом и левом берегу реки Хоста. Рельеф сформирован грядой верхнемеловых известняков, которую прорезает поперечное ущелье реки Хоста с крутыми отвесными стенами. Тисо-самшитовая роща до недавнего времени представляла собой участок третично-реликтового леса, сохранившегося с доисторических времен в зоне влажных субтропиков. Основными лесообразующими породами являлись реликты третичного периода — вечнозеленые *T. baccata* (Тахасеае) и *B. colchica* (Вухасеае). Однако элими-

нация *B. colchica* в результате инвазии самшитовой огневки — *Cydalima perspectalis* Walker (*Lepidoptera*, *Crambidae*) привела к существенным изменениям в составе растительных сообществ (Бибин, Ковалев, 2017). Субтропический климат южного макросклона отличается высокой влажностью (более 70% на возвышенных участках и до 90% в ущельях и балках), обилием осадков (среднегодовое количество составляет 1350 мм) и высокой среднегодовой температурой воздуха (14.5°C) (Лазук, 1960).

Лесная растительность в ареале бурых лесных почв на северном макросклоне представлена преимущественно букняками, пихтарниками, буково-пихтовыми лесами. Первый ярус наиболее часто образуют *F. orientalis* (реликт третичного периода), *Quercus robur* L., *Fraxinus excelsior* L.; в подлеске присутствуют кустарники *Corylus avellana* (L.) H. Karst., *Plex colchica* L., *R. colchicus*, *B. colchica*. На северном макросклоне ГКХ в пределах исследуемых территорий климат мягкий, умеренно-континентальный, влажный. Среднегодовая температура воздуха составляет 10.1°C, среднегодовое количество осадков 1020 мм, относительная влажность 68–80%. Для зимы характерно отсутствие устойчивого снежного покрова, безморозный период составляет в среднем 185–195 суток (<https://ru.climate-data.org/>).

**Объектами исследования** служили растительный покров, почвенная мезофауна (дождевые черви) и почвы (бурые лесные) лесных биогеоце-

нозов. В табл. 1 приведены исследуемые биогеоценозы южного (5 типов) и северного (6 типов) макросклонов, состав их древесно-кустарникового яруса и напочвенного покрова. Для комплексных исследований в 2018 и 2020 гг. были заложены 11 пробных площадок ( $30 \times 30 \text{ м}^2$ ). На южном макросклоне они расположены в пределах координат N 43.31688–43.53828; E 39.52561–39.87840; высота 32–118 м над ур. м., на северном – N 44.13426–44.22810; E 39.82575–40.03401; 447–897 м над ур. м. Для определения местоположения площадок использовали навигатор GPSMAP 60 CEX.

Бурые лесные почвы, широко распространенные в лесах Западного Кавказа, относятся к фациальному подтипу бурых лесных слабо ненасыщенных очень теплых средне- и многогумусных среднесуглинистых почв (Егоров и др., 1977). Различия климатических условий и почвообразующих пород на противоположных склонах ГКХ определяют особенности этого подтипа почв. На южном макросклоне сформировались бурые лесные (род остаточного-карбонатные) почвы на щебнистом элювии карбонатных сланцев и тяжелосуглинистом элювии осадочных пород, на северном – типичные бурые лесные почвы на щебнистом элювии осадочных и карстовых пород.

**Растительность.** При геоботанических описаниях визуально определяли сомкнутость крон древостоя, составляли его формулы, количество стволов на площадке принимали за 10 (Неронов, 2002). Если в сообществе имелся подлесок, отмечали его общее проективное покрытие (ОПП) и видовой состав. При описании живого напочвенного покрова (травяно-кустарничковый ярус) отмечали ОПП травостоя, составляли список видов, указывали долю проективного покрытия каждого вида. В состав этого яруса включали также травянистые и деревянистые лианы (сассапариль, плющи, жимолость и др.). Название растительного сообщества определялось доминирующим видом древостоя.

Биоразнообразия растений определяли их альфа-разнообразием, представленным средним числом видов на площадке (Мэгарран, 1992). Для характеристики биогеоценозов рассчитывали синэкологические индексы:  $\bar{H}_{\text{фит}}$  – фитоценологического биоразнообразия Шеннона (Shannon, 1948),  $e$  – выравненности Пиелу (Pielou, 1975),  $h_{\text{флор}}$  – флористического разнообразия Хартли (Hartley, 1928),  $C$  – доминирования Симпсона (Simpson, 1949). Индексы рассчитывали по формулам:

$$\bar{H}_{\text{фит}} = -\sum p_i \ln p_i, \text{ где}$$

$p_i$  – доля особей  $i$ -го вида, рассчитывают как отношение  $n_i/N$ ;  $n_i$  – проективное покрытие  $i$ -го вида,  $N$  – проективное покрытие всех видов на площадке;

$$e = \frac{\bar{H}_{\text{фит}}}{\ln S},$$

где  $S$  – число видов растений;

$$h_{\text{флор}} = \log_2 S,$$

$$C = \sum \left[ \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right].$$

Для сравнительной оценки биогеоценозов рассчитывали интегральный индекс их разнообразия ( $I_{\text{интегр}}$ , %) путем суммирования относительных значений упомянутых индексов (Андреев, 2002):

$$I_{\text{интегр}} = \frac{\bar{H}_{\text{фит}}}{\bar{H}_{\text{фит.макс}}} \times 100 + \frac{\bar{H}_{\text{фит}}}{\ln S} \times 100 + \frac{\log_2 S}{\log_2 S_{\text{макс}}} \times 100 - (1 - C) \times 100(\%).$$

**Дождевых червей** собирали из почвенных монолитов ( $25 \times 25 \text{ см}^2$ ) по методике Гилярова (1975). Видовую принадлежность дождевых червей определяли согласно Всеволодовой–Перель (1997). Встречаемость отдельных видов червей рассчитывали от общего числа исследуемых проб. Для характеристики дождевых червей использовали также синэкологические индексы ( $\bar{H}$  – Шеннона,  $C$  – Симпсона,  $e$  – Пиелу,  $h$  – Хартли). Рассчитывали интегральный индекс разнообразия дождевых червей по формуле А.В. Андреева (2002) аналогично таковому разнообразия растительности.

**Почва.** Образцы почвы каждого биоценоза отбирали из верхнего органоминерального слоя (0–20 см) (метод конверта, площадка  $100 \text{ м}^2$ ), из которых готовили смешанный образец (всего 11) (Казеев, Колесников, 2012). Растительную подстилку в анализ не включали.

В образцах почвы определяли содержание органического углерода ( $C_{\text{орг}}$ , %) по методу Тюрина в модификации Никитина и рН (почва : вода = 1 : 2.5) – потенциметрически (Аринюшкина, 1970). Определение плотности почвы в естественном сложении ( $\text{г/см}^3$ ) осуществляли методом Н.А. Качинского (Вадюнина, Корчагина, 1961). Для отбора почвы в ненарушенном состоянии использовали бур – цилиндр Качинского (объем  $39.4 \text{ см}^3$ ). Отобранный образец высушивали при температуре  $105^\circ\text{C}$  до постоянной массы. По отношению массы сухой почвы к объему бура рассчитывали плотность почвы в естественном сложении.

Скорость субстрат-индуцированного дыхания (СИД) почвы с внесением глюкозы ( $10 \text{ мг/г}$  почвы) определяли после кратковременной инкубации (4 ч,  $22^\circ\text{C}$ ), скорость базального дыхания (БД) – без внесения глюкозы, спустя 24 ч (Ананьева, 2003). СИД и БД почвы определяли титриметри-

**Таблица 1.** Состав древостоя, подлеска и напочвенного покрова исследуемых биогеоценозов Западного Кавказа (П – площадка; ОПП – общее проективное покрытие)

П, №	Биогеоценоз	Формула древостоя, сомкнутость крон	Подлесок (ОПП, %)	Напочвенный покров (ОПП, %; N – число видов)
<b>Южный макросклон</b>				
1	Липово-буковый с тисом ягодным и грабом обыкновенным	7Бк3Лп + Т + Г; 0.9	<i>Ilex colchica</i> , 1; <i>Sambucus nigra</i> , 1; <i>Prunus laurocerasus</i> , 1; <i>Ficus carica</i> , ед.; <i>Ailanthus altissima</i> , ед.	Колхидскоиглицевый (30; N9) ( <i>Ruscus colchicus</i> , 25; <i>Rubus anatolicus</i> , 3; <i>Smilax excelsa</i> , 1; <i>Hedera colchica</i> , 1; <i>Geranium robertianum</i> , ед. и др.).
2	Липово-ясенево-ежевичный	8Яс2Лп; 0.5	<i>Cornus australis</i> , 1; <i>Sambucus nigra</i> , 1.	Ежевичный с разнотравьем (95; N7) ( <i>R. anatolicus</i> , 70; <i>Ruscus colchicus</i> , 15; <i>Geranium robertianum</i> 7; <i>Calystegia syl- vatica</i> , 2; <i>Geum urbanum</i> , ед. и др.).
3.	Буково-вейниковый с тисом ягодным и грабом обыкновенным	10Бк + Т + Г; 0.9	<i>Ilex colchica</i> , 1.	Иглицево-вейниковый (45; N9) ( <i>Calamagrostis arundinacea</i> , 35; <i>Ruscus colchicus</i> , 5; <i>Epimedium colchicum</i> , 5 и др.).
4.	Кленово-буковый редкопокровный	9Бк1Кл; 1.0	<i>Prunus laurocerasus</i> , 35.	Колхидскоиглицевый (3; N4) ( <i>Ruscus colchicus</i> , 3; <i>Ilex colchica</i> , ед., <i>Hedera colchica</i> , ед., <i>Phyllitis scolopen- drium</i> , ед.).
5.	Тисово-буково-колхидскоиглицевый	6Бк4Т; 0.9	<i>Prunus laurocerasus</i> , 35.	Колхидскоиглицевый (50; N3) ( <i>Ruscus colchicus</i> , 50; <i>Phyllitis scolopen- drium</i> , ед., <i>Dryopteris filix-mas</i> , ед.).
<b>Северный макросклон</b>				
6.	Грабово-разнотравный с грушей обыкновенной, ясенем обыкновенным	10Г + Гр + Пх + Яс; 0.8	<i>Crataegus</i> sp., 3; <i>Cornus mas</i> , 2; <i>Corylus avellana</i> , 2; <i>Ligustrum vulgare</i> , ед.	Разнотравный (50; N25) ( <i>Lilium mon- adelphum</i> , 15; <i>Helleborus caucasicus</i> , 7; <i>Sanicula europaea</i> , 5; <i>Cyclamen coum</i> , 3 и др.).
7.	Ясенево-пихтово-буковый с кленом полевым, грабом обыкновенным, ясенем обыкновенным	6Бк2Яс2Пх + Кл + Г; 0.8	Отсутствует	Разнотравный (10; N 7) ( <i>Paris incom- pleta</i> , 4; <i>Helleborus caucasicus</i> , 7; <i>Cyclamen coum</i> , 3; <i>Arum maculatum</i> , 3; <i>Paeonia caucasica</i> , ед., <i>Galium odoratum</i> – ед. и др.).
8.	Грушево-буковый с грабом обыкновенным и ясенем обыкновенным	7Бк3Гр + Г + Яс; 0.9	<i>Corylus avellana</i> , 7; <i>Ligustrum vulgare</i> , ед.; <i>Sambucus nigra</i> , ед.; <i>Rosa majalis</i> , ед.	Разнотравный (30; N 17) ( <i>Sanicula europaea</i> , 15; <i>Fragaria vesca</i> , 7; <i>Cyclamen coum</i> , 1; <i>Viola reichenbachi- ana</i> , 3 и др.).
9.	Грабово-буковый с кленом полевым и пихтой Нордманна	8Бк2Г + Кл + Пх 0.9	<i>Crataegus</i> sp., ед.; <i>Ilex colchica</i> , ед.	Колхидскоплющевый (80; N 17) ( <i>Hedera colchica</i> , 70; <i>Rubus anatolicus</i> , 5; <i>Symphytum grandiflorum</i> , 5; <i>Carex remota</i> , ед., <i>Viola alba</i> , ед. и др.).
10.	Грабово-буковый	8Бк2Г; 0.8	<i>Cornus australis</i> , 1; <i>Sambucus nigra</i> , 1.	Разнотравный (35; N 12) ( <i>Fragaria viridis</i> , 5, <i>Galium odoratum</i> , 5; <i>Glechoma hederacea</i> , 5; <i>Hedera colchica</i> , 5; <i>Tamus communis</i> , 1 и др.).
11.	Буково-пихтово-колхидскоплющевый	6Пх4Бк; 0.8	<i>Ilex colchica</i> , 1.	Колхидскоплющевый с разнотра- вьем (70; N 5) ( <i>Hedera colchica</i> , 45; <i>Rubus anatolicus</i> , 20; <i>Polygonatum verti- cillatum</i> , 3 и др.).

Примечания: Бк – бук восточный; Лп – липа бегониелистная; Т – тис ягодный; Г – граб обыкновенный; Яс – ясень обыкновенный; Кл – клен полевой; Гр – груша обыкновенная; Пх – пихта Нордманна; ед. – единично.



ческим методом в предварительно инкубированных образцах (7 сут, 22°C, 60% полной влагоемкости). Содержание углерода микробной биомассы ( $C_{\text{мик}}$ ) рассчитывали по формуле:  $C_{\text{мик}}$  (мкг С/г почвы) = СИД (мкл  $\text{CO}_2$ /г почвы/ч)  $\times$  40.04 + 0.37 (Anderson, Domsch, 1978). Запас  $C_{\text{мик}}$  (г/м<sup>2</sup> почвы) в слое 20 см и площади 1 м<sup>2</sup> = 10000 см<sup>2</sup> определяли по формуле:  $C_{\text{мик}}$  (мкг С/г почвы)  $\times$  d (г/см<sup>3</sup>)  $\times$  V, где V – объем почвы в слое 20 см и площади 1 м<sup>2</sup> (Ананьева, 2003). Рассчитывали долю  $C_{\text{мик}}$  в  $C_{\text{орг}}$  (%).

Определяли ферментативную активность почвы, иллюстрирующую гидролитические (фосфатаза) и окислительно-восстановительные (каталаза) процессы. Эти ферменты определяли колориметрическим и газометрическим методами соответственно (Казеев, Колесников, 2012). Активность ферментов оценивали согласно шкале Гапонюк, Малахова (1985).

Для сравнения общего уровня биологической активности почв различных биогеоценозов рассчитывали интегральный показатель их эколого-биологического состояния (ИПЭБСП, %), который представляет собой сумму относительных величин пяти показателей (содержание  $C_{\text{орг}}$ , запас  $C_{\text{мик}}$ , скорость БД, активность каталазы и фосфатазы). Принцип расчета и суммирования относительных величин каждого показателя предложен итальянским ученым Д. Ацци (1959) и эффективно используется при оценке биологической активности почв (Казеев и др., 2004). Наибольшее значение каждого показателя принимают за 100%. Сумма относительных значений указанных показателей почвы является средним оценочным баллом:  $B_{\text{ср}} = (B_1 + B_2 + \dots + B_5)/N$ , где N = 5 – число показателей. Наибольший средний оценочный балл ( $B_{\text{ср. max}}$ ) принимают за 100%. Для почвы каждого биогеоценоза рассчитывали ИПЭБСП по формуле: ИПЭБСП =  $B_{\text{ср}}/B_{\text{ср. max}} \times 100\%$ .

Физико-химические и ферментативные показатели почвы определяли в трех повторностях, микробиологические – в пяти. Статистическая обработка полученных данных выполнена в программе “Statistica-10”. Рассчитывали средние величины, ошибку среднего, коэффициент пространственной вариации, коэффициент корреляции показателей биологической активности почвы с разнообразием растительности и численностью дождевых червей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Растительность.** Широколиственные и темнохвойные леса в ареале бурых лесных почв относят к колхидскому типу с общим числом видов в древостое, равном 10, в подлеске – 13, живом напочвенном покрове – 56 видов (табл. 1). В этих лесах наиболее часто доминирует *F. orientalis*. На пло-

щадках южного макросклона зафиксирован 31 вид растений, из них в древостое – 9, подлеске – 6, напочвенном покрове – 16 видов. Наряду с *F. orientalis* и *T. baccata*, встречаются *Carpinus betulus* L., *Acer campestre* L., *F. excelsior*. В липово-буковом биогеоценозе (площадка № 1) отмечены погибшие особи самшита колхидского (7% общего количества древостоя), а в липово-ясеновом биогеоценозе (площадка № 2) – уже 30–35%. В тисово-буковом лесу (площадка № 5) отмечено наименьшее количество видов растений (всего 6).

В лесах северного макросклона общее число видов достигает 57, в составе древостоя – 7, подлеске – 5, напочвенном покрове – 45. В древесно-кустарниковом ярусе в основном господствует *F. orientalis* при участии *C. betulus*, *A. campestre*, *A. nordmanniana*, *T. begoniifolia*, *F. excelsior*. Подлесок часто отсутствует (табл. 1). *A. nordmanniana* отмечена в трех лесных биогеоценозах. В буково-пихтовом лесу (площадка № 11) доминирует пихта, в подлеске – *I. colchica*, в травяно-кустарниковом ярусе – *Hedera colchica* и *Rubus anatolicus*. Наибольшим видовым разнообразием (33 вида) отличается грабово-разнотравный биогеоценоз (площадка № 6) с примесью *Pyrus communis* (L.), *A. nordmanniana*, *F. excelsior*, в подлеске – *Crataegus*, *C. avellana*, *Cornus mas* L. В разнотравном сообществе (25 видов) данного биогеоценоза, наряду с доминирующими видами, заметное участие принимают эндемичные реликты третичного периода, включенные в Красную книгу РФ (2008): *Dentaria quinquefolia* (M. Bieb.) Schmalh., *Cyclamen coum* Mill.

Лесные биогеоценозы на изученных склонах ГКХ имеют близкие величины альфа-разнообразия древостоя (3.4 и 3.7) и подлеска (3.0 и 3.4), но существенно различаются по напочвенному покрову: на северном макросклоне его альфа-разнообразие составляет 13.3, на южном – всего 5.8.

Индексы фитоценотического биоразнообразия Шеннона северного макросклона ( $2.54 \pm 0.24$ ) незначительно выше таковых южного ( $2.02 \pm 0.24$ ) (рис. 2). Сходную тенденцию демонстрируют индексы флористического разнообразия Хартли ( $4.15 \pm 0.35$ ;  $3.39 \pm 0.36$  соответственно). Значения индексов доминирования Симпсона выше на южном макросклоне, по сравнению с северным ( $-0.13 \pm 0.03$ ;  $-0.08 \pm 0.02$ ). Средние значения индекса выравненности Пиелу близки и составляют  $0.86 \pm 0.015$  и  $0.88 \pm 0.019$ , что с учетом их низкой пространственной вариабельности (3.5 и 4.7%) может свидетельствовать об однородных условиях формирования лесных биоценозов южного и северного склонов ГКХ. Коэффициент пространственной вариации индекса Шеннона и Хартли составляет 18–23%, а Симпсона – больше (44–54%).

Наибольший интегральный индекс растительного разнообразия ( $I_{\text{интегр}}$ ) оказался в грабово-раз-



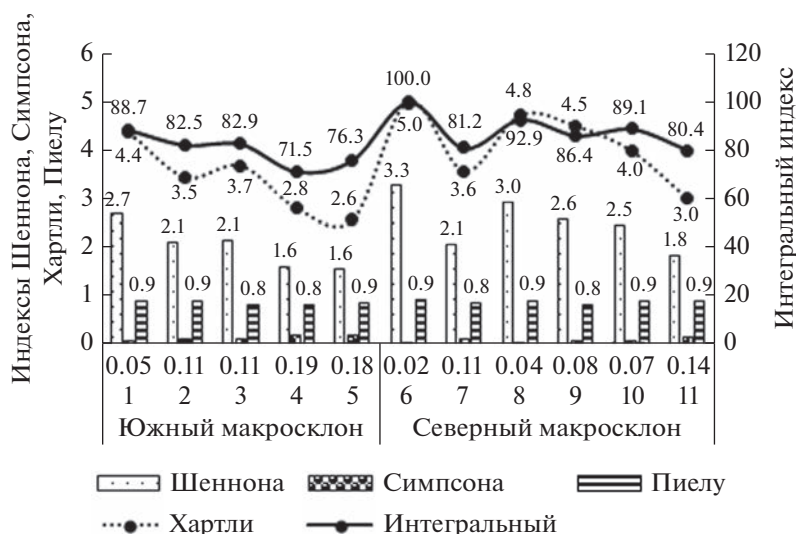


Рис. 2. Синэкологические и интегральные индексы разнообразия лесной растительности в ареале бурых лесных почв Западного Кавказа; названия биогеоценозов на южном (№ 1–5) и северном макросклонах (№ 6–11) – как в табл. 1.

нотравном биогеоценозе (площадка № 6), где отмечена наибольшая видовая насыщенность, индекс выравненности, фитоценологическое и флористическое разнообразие, но наименьший индекс доминирования (рис. 2). Значение  $I_{интегр}$  этого биогеоценоза принято за 100%. Интегральный индекс растительного разнообразия северного макросклона составляет в среднем  $88.3 \pm 3.3\%$ , а южного –  $80.4 \pm \pm 3.3\%$ , ( $CV = 8.4\%$  и  $8.2\%$ ), что свидетельствует о схожести их флористического состава. Близость флоры исследованных районов северного и южного макросклонов Западного Кавказа отмечали и другие авторы (Тимухин, Туниев, 2016).

**Дождевые черви.** В почвах исследованных площадок выявлено 9 видов дождевых червей, относящихся к семейству Lumbricidae: *Aporrectodea caliginosa trapezoides* (Dugés, 1828), *Aporrectodea jassyensis* (Michaelsen, 1891), *Dendrobaena attemsi* (Michaelsen, 1902), *Dendrobaena mariupolienis mariupolienis* Wyssotzky, 1898, *Dendrobaena tellermanica* Perel, 1966, *Dendrobaena schmidtii* (Michaelsen, 1907), *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886), *Eisenia fetida* (Savigni, 1826), *Helodrilus patriarchalis* (Rosa, 1893) (табл. 2).

Дождевые черви *A. jassyensis*, *D. attemsi*, *D. veneta*, *H. patriarchalis* встречаются в России только на Кавказе, 3 последние из них – преимущественно в западной его части. В составе этой фауны не менее 7 видов (78%) являются автохтонными. Это крымско-кавказские субэндемики, восточноевропейско-азиатский вид кавказского происхождения и представители наиболее древней средиземноморской фауны Кавказа. Космополитные виды составляют менее 22% фауны, что значительно меньше, чем в других районах Северного Кавказа (Гераськина, Шевченко, 2018; Rapoport, Тсеркова, 2019).

Наличие длительно разлагаемой подстилки в изученных лесах и теплый, влажный климат формируют разнообразие морфо-экологических групп дождевых червей. По видовому богатству преобладают собственно почвенные люмбрициды (4 вида). *D. schmidtii* – полимофный вид. Отмечены также подстилочные, почвенно-подстилочные виды и норники, большинство из которых являются первичными гумусообразователями. Полночленность экологического ряда дождевых червей хорошо согласуется с высокой гумусированностью бурых лесных почв.

В почвах южного макросклона выявлено 8 видов дождевых червей, что составляет 89% всего их количества (табл. 2). В пределах одного биогеоценоза зарегистрировано от 1-го до 5-ти видов. Наиболее часто встречаются *D. attemsi*, *A. jassyensis* и *D. schmidtii* (табл. 2). Мозаичность условий местообитаний тисо-самшитовой рощи (карстовые подстилающие породы, склоны разной экспозиции, отрицательные формы рельефа) обуславливает наличие разных по требованию к температуре и влажности видов дождевых червей. Так, влаголюбивые и теплолюбивые *D. veneta* и *H. patriarchalis* занимают депрессии и теневые склоны, а неморально-степные *A. c. trapezoides* и *D. tellermanica*, хорошо приспособленные к колебаниям гидротермического режима, встречаются в более инсолируемых биогеоценозах. По этой же причине разнообразен и состав доминантов – *D. schmidtii*, *D. veneta*, *D. attemsi*, *D. m. mariupolienis*. Однако ни один из этих видов не преобладает по численности более, чем в двух биогеоценозах.

На северном макросклоне выявлено 5 видов дождевых червей (табл. 2). На выделенных площадках встречаются от 1-го до 4-х видов, домини-

Таблица 2. Видовой состав, численность и биотопическое распределение дождевых червей в бурых лесных почвах Западного Кавказа

Биогеоценоз		<i>A. fassyensis</i>	<i>D. schmidti</i>	<i>D. m. martiprolens</i>	<i>D. attemsi</i>	<i>D. tellermanica</i>	<i>D. veneta</i>	<i>A. c. tarzoides</i>	<i>E. fetida</i>	<i>H. patritarchalis</i>
Южный макрокотон	1 липово-буковый	8 ± 2	–	–	4 ± 1	–	12 ± 3	4 ± 1	–	–
	2 липово-ясенево-ежевичный	–	8 ± 2	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	–	–	–	4 ± 1
	3 буково-вейниковый	5 ± 1	21 ± 4	–	11 ± 2	–	–	–	–	–
	4 кленово-буковый	–	12 ± 2	5 ± 1	12 ± 3	–	11 ± 3	–	–	–
	5 тисово-буковый	11 ± 3	5 ± 1	11 ± 3	5 ± 2	–	–	–	–	–
встречаемость, %		52	76	54	92	17	32	16	0	16
Северный макрокотон	6 грабово-разнотравный	96 ± 12	–	11 ± 3	–	–	–	–	–	–
	7 ясеневое-пихтово-буковый	48 ± 15	27 ± 5	11 ± 4	–	–	–	–	6 ± 2	–
	8 грушево-буковый	32 ± 9	32 ± 7	12 ± 4	–	–	–	–	–	–
	9 грабово-буковый	120 ± 35	12 ± 3	8 ± 2	–	4 ± 1	–	–	–	–
	10 грабово-буковый	32 ± 9	–	16 ± 5	–	11 ± 2	–	–	–	–
встречаемость, %		96	64	84	0	16	0	0	20	0
тип ареала		Ср	К-Кв	К-Кв	Ср	ВЕ-Аз	Ср	К	К	Ср
морфо-экологическая форма		СП	ПМ	Н	П	СП	ПП	СП	ПП	СП

Примечание. Жирным шрифтом отмечена численность доминирующих видов; хорологические группы: К – космополитные, Ср – средиземноморские, К-Кв – крымско-кавказские, ВА – восточноевро-азиатские; морфо-экологические группы: СП – собственно почвенные, ПП – почвенно-подстилочные, П – подстилочные, Н – норники, ПМ – полиморфные виды.

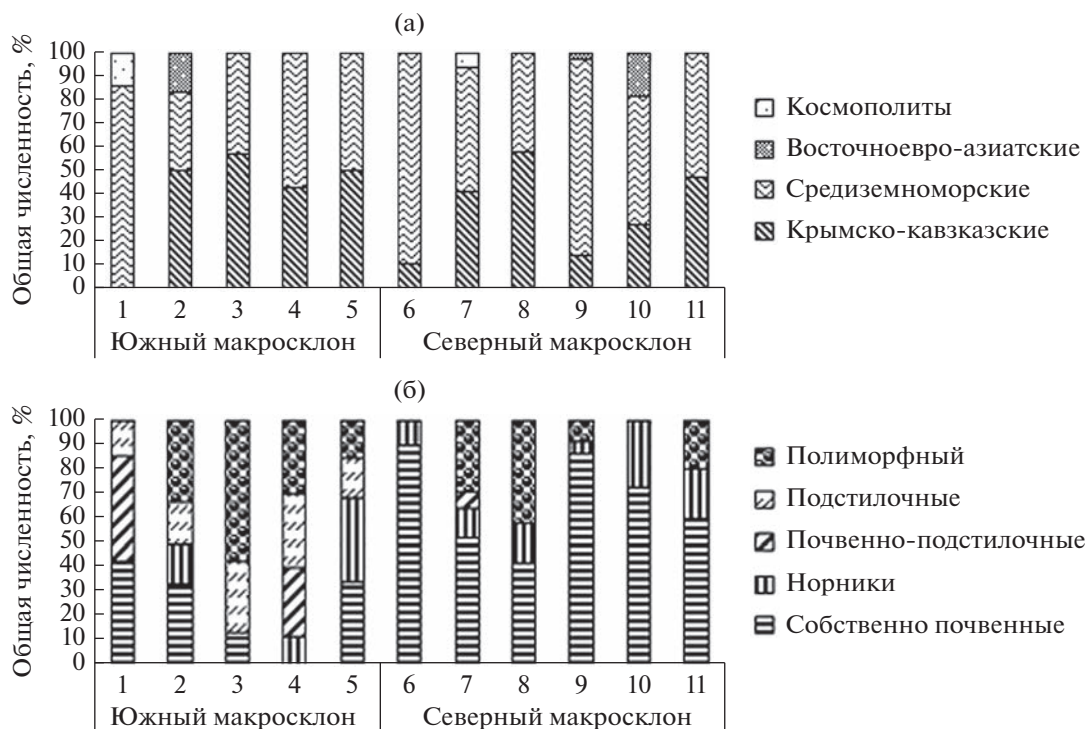


Рис. 3. Доля численности дождевых червей (%), относящихся к разным хорологическим (а) и морфо-экологическим (б) группам; названия биогееоценозов – как в табл. 1.

рует *A. jassyensis*. Необычно часто – более, чем в 80% проб, отмечен норник *D. m. mariupolienis*. Как известно, норники строят глубокие почвенные ходы, достигающие 7 м (Высоцкий, 1962), и регистрируются в верхнем почвенном слое при наиболее благоприятном сочетании температуры и влажности. Кроме того, на северном макросклоне зарегистрирован *E. fetida*, который экологически близок к *D. veneta* – виду, характерному для населения дождевых червей южного макросклона. На Северном Кавказе виды *D. veneta* и *E. fetida* встречаются вблизи водных источников или под корой валежника (Рапорорт, Тсеркова, 2019). Однако *E. fetida* – один из наименее холодостойких видов люмбрицид, встречающихся в России (Мещерякова, Берман, 2014), известен обширным высотным и широтным диапазоном распространения на Северном Кавказе (Рапорорт, 2013). Вид *D. veneta* встречается в основном в низкогорно-среднегорных ландшафтах Западного Кавказа, хотя холодостойкость его коконов близка таковой *D. veneta* (Greiner et al., 2011).

В хорологической структуре населения дождевых червей северного и южного макросклонов наиболее часто преобладают средиземноморские виды и крымско-кавказские субэндемики (рис. 3а).

Средиземноморские виды дождевых червей обитают в районах с умеренно влажным и теплым климатом, их присутствие характеризует условия

почвообразования бурых лесных почв. Наличие средиземноморских элементов во флоре и фауне Западного Кавказа отмечалось и ранее (Зернов, 2006; Юсупов, 2014 и др.) (рис. 3а).

В морфо-экологической структуре населения дождевых червей на северном макросклоне преобладают собственно почвенные виды, которые встречаются чаще, чем на южном (рис. 3б). Выше встречаемость норников. Эти группы хорошо приспособлены к выживанию в засушливый период в предгорно-среднегорных ландшафтах, где основная часть влаги расходуется на сток и испарение. На южном макросклоне больше распространены виды, питающиеся на поверхности почвы, в том числе – подстилочные люмбрициды. Считается, что подстилочные виды и норники – группы взаимозамещаемые (Перель, 1979), что хорошо заметно на наших выборках (рис. 3б).

Индексы биоразнообразия дождевых червей, их выравненности и фаунистического разнообразия достаточно высоки. Все рассчитанные нами индексы, за исключением такового доминирования, оказались выше на южном макросклоне и ниже – на северном (рис. 4).

На южном макросклоне синэкологические индексы, описывающие структуру населения дождевых червей (Пиелу и *I* интегр.), низковариабельны ( $CV = 4.9$  и  $7.9\%$  соответственно.), что характеризует ее слабую изменчивость (Лакин,

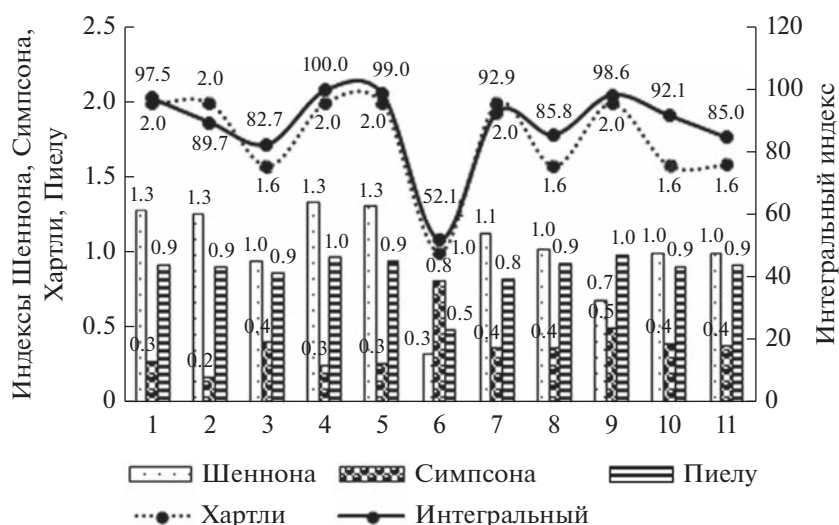


Рис. 4. Синэкологические индексы населения дождевых червей в бурых лесных почвах Западного Кавказа: разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона, выравненности Пиелу, индекс фаунистического разнообразия Хартли, интегральный индекс разнообразия; названия биогеоценозов – как в табл. 1.

1980), а индекс Симпсона ( $CV = 23.6\%$ ) – средне-вариабелен. На северном макросклоне пространственная вариабельность индексов  $I_{интегр}$  и  $\bar{H}$  средняя и сильная ( $CV = 19.7\%$  и  $35.5\%$ ). На северном макросклоне значение  $CV$  индекса Шеннона выше в 3.3 раза по сравнению с южным, Симпсона – в 1.4, Пиелу – в 4.3, Хартли – в 2.4,  $I_{интегр}$  – в 2.5, что, на наш взгляд, может свидетельствовать о высокой гетерогенности условий местообитаний дождевых червей. В грабово-разнотравном биогеоценозе (площадка № 6) индекс доминирования (Симпсона) был наибольшим, а биоразнообразия (Шеннона и Хартли), выравненности (Пиелу) и  $I_{интегр}$  – наименьшими (рис. 4). Население дождевых червей этого лесного биогеоценоза обитает в менее благоприятных условиях: карстовые породы выходят на поверхность по всему склону, что определяет небольшую мощность гумусового горизонта, и, как следствие, недостаток влаги, что косвенно подтверждается преобладанием граба в древесном пологе. Почвы, в которых произрастает граб, отличаются резким амплитудным гидротермическим режимом по сравнению с буковыми биогеоценозами (Нечаев, 1960).

**Бурые лесные почвы** широко представлены в лесах Западного Кавказа. Мощные средообразователи – *F. orientalis* и *A. nordmanniana* (наряду с напочвенным покровом, почвенной микро- и мезофауной) играют ведущую роль в регулировании обменных процессов в системе почва-растение (Зонн, 1950).

Верхний слой (0–20 см) бурой лесной остаточной-карбонатной почвы на южном макросклоне характеризуется слабокислой (в среднем  $pH$  6.22), а бурой лесной почвы на северном – нейтральной

реакцией ( $pH$  6.87) (табл. 3). Показано, что высокие значения  $pH$  характерны для почв, сформированных в условиях меньшего поступления влаги (Karmegam, Daniel, 2007). Исследуемые бурые лесные почвы характеризуются рыхлым сложением (плотность верхнего 20 см слоя  $0.8–1.1$  г/см<sup>3</sup>) и высоким содержанием  $C_{орг}$  на южном (в среднем 6.03%) и северном макросклонах (6.61%). Другие физико-химические показатели почвы разных биоценозов южного и северного макросклонов оказались в целом сходными.

Активность каталазы в большинстве исследуемых горных почв оказалась высокой (Гапонюк, Малахов, 1985), а фосфатазной – средней (табл. 3). Активность каталазы положительно коррелировала с  $pH$  почвы ( $r = 0.5$ ), а фосфатазы – отрицательно ( $r = -0.6$ ). Корреляция активности ферментов с  $C_{орг}$  оказалась слабой ( $r = 0.3–0.4$ ).

Содержание  $C_{мик}$  в почве разных биоценозов южного макросклона составило в верхнем 20-ти см слое в среднем 2009 мкг С/г, а северного – больше, 2740 мкг С/г (табл. 3). Следует отметить и большой запас  $C_{мик}$  в почвах северного макросклона (в 1.4 раза) по сравнению с южным. Отмечено, что содержание  $C_{мик}$  в почвах (слой 0–10 см) равнинных широколиственных лесов составляет в среднем 548 мкг С/г (Гавриленко и др., 2011), а в бурых лесных почвах Центрального Кавказа – 1200 мкг С/г (Горобцова и др., 2021).

Показатель  $C_{мик}/C_{орг}$  изученных лесных почв составил в среднем 3.75% на южном макросклоне и 4.6% – на северном (табл. 3). Следует отметить, что наибольшее значение этого показателя (7.0%) зафиксировано в грабово-разнотравном биогеоценозе (площадка № 6). В данном фитоценозе

**Таблица 3.** Физико-химические и биологические показатели бурых лесных почв (верхний 20 см слой) Западного Кавказа (среднее,  $M \pm$  ошибка среднего,  $m$ ), коэффициент пространственного варьирования ( $CV$ ) между исследуемыми биогеоценозами южного ( $n = 5$ ) и северного ( $n = 6$ ) макросклона

Показатели	Южный макросклон		Северный макросклон	
	$M \pm m$	$CV, \%$	$M \pm m$	$CV, \%$
pH (H <sub>2</sub> O)	6.22 ± 0.25	8.8	6.87 ± 0.36	12.7
Плотность, г/см <sup>3</sup>	0.97 ± 0.05	11.2	0.93 ± 0.04	11.6
C <sub>орг</sub> , %	6.03 ± 0.98	32.3	6.61 ± 0.87	29.5
Запас C <sub>орг</sub> , т/га	116 ± 18.5	32.0	121 ± 14.4	26.2
Фосфатаза, мг P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /100 г/ч	34.3 ± 7.3	42.4	37.7 ± 5.6	36.1
Каталаза, мл O <sub>2</sub> /г/мин	10.9 ± 0.9	18.9	9.43 ± 1.72	44.6
БД, мкг С-СО <sub>2</sub> /г/ч	25.6 ± 2.1	18.4	26.6 ± 2.5	23.5
СИД, мкг С-СО <sub>2</sub> /г/ч	90.8 ± 9.5	23.3	123.8 ± 16.9	33.3
C <sub>мик</sub> , мкг С/г почвы	2009 ± 209	23.3	2740 ± 373	33.3
Запас C <sub>мик</sub> , г/м <sup>2</sup>	383 ± 27.8	16.2	507 ± 70	33.9
C <sub>мик</sub> /C <sub>орг</sub> , %	3.75 ± 0.5	32.8	4.6 ± 0.7	37.7
ИПЭБСП, %	76 ± 3.7	9.8	76 ± 7.6	22.5

Примечание. ИПЭБСП, интегральный показатель эколого-биологического состояния почвы.

были отмечены наибольшее флористическое ( $h_{\text{флор}} = 5.0$ ) и фитоценотическое биоразнообразие ( $\bar{H}_{\text{фит}} = 3.3$ ), отражающие соответственно высокую видовую насыщенность и представленность (долевое участие) видов. Сообщество характеризуется также наибольшей выравненностью ( $e = 0.94$ ) при наименьшем индексе доминирования Симпсона ( $C = 0.025$ ) (рис. 2). Наименьшее значение  $C_{\text{мик}}/C_{\text{орг}}$  (1.9%) обнаружено в тисово-буковом биогеоценозе (южный макросклон, площадка № 5) с минимальным фитоценотическим и флористическим разнообразием (рис. 2).

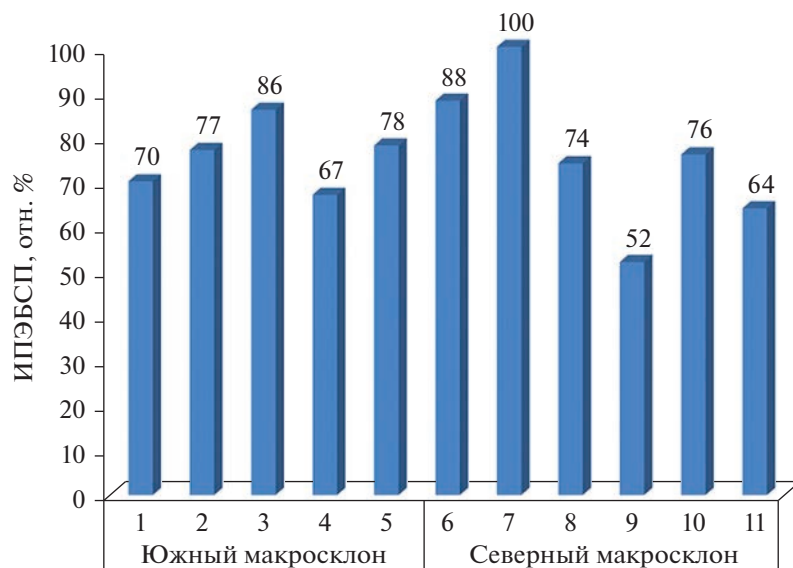
Показатель ИПЭБСП для почв южного и северного макросклонов составил в среднем 76%. Он был наибольшим (100%, рис. 5) в ясеневопихтово-буковом биогеоценозе на северном макросклоне (площадка № 7), в котором обнаружено высокое содержание C<sub>орг</sub> (8.29%) и C<sub>мик</sub> (3717 мкг С/г), скорость БД (36.5 мкг С-СО<sub>2</sub>/г/ч) и СИД (168 мкг С-СО<sub>2</sub>/г/ч), активность фосфатазы (59.7 мг P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100г/ч) и каталазы (12.9 мл O<sub>2</sub>/г/мин). Следует отметить, что такие растительные эдификаторы, как бук (*F. orientalis*) и пихта (*A. nordmanniana*) определяют высокое накопление органической массы и обогащенность элементами Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> и Fe<sup>+2</sup>. Опад этих растений подвергается медленной минерализации из-за высокого содержания полифенолов, в частности, танина (Adamczyk *et al.*, 2017) и обменного алюминия Al<sup>3+</sup>, которые токсичны для почвенной микробиоты (Langenbruch *et al.*, 2012). Кроме того, микробное разложение лигнина в опаде *A. nordmanniana* ингибируется и эфирными маслами (Rutigliano

*et al.*, 1998). В отличие от *F. orientalis* и *A. nordmanniana*, опад *F. excelsior* не содержит токсичных соединений, что объясняет более активную деятельность почвенных микроорганизмов в ясеневопихтово-буковом биогеоценозе (Oostrа *et al.*, 2006; Vesterdal *et al.*, 2008).

Высокий показатель ИПЭБСП (88%) отмечен также в почве грабово-разнотравного биогеоценоза (площадка № 6), в древесном ярусе которого присутствуют *C. betulus*, *P. communis*, *A. nordmanniana*, *F. excelsior* (рис. 5). В этом биогеоценозе выявлены наиболее высокие показатели флористического разнообразия (100%) при наименьшем фаунистическом (52%) и наибольшем индексе доминирования дождевых червей (0.8). В лесном биогеоценозе площадки № 6 (северный макросклон) обнаружено только 2 вида дождевых червей (доминант *A. jassyensis*, собственно почвенный вид и крупный норник *D. m. mariupolienis*). Показано, что видовая насыщенность растительного покрова буковых лесов тесно коррелирует с биологической активностью почвы, содержанием азота в подстилке и верхнем почвенном слое (Jacob *et al.*, 2010).

Наименьший ИПЭБСП (52%) отмечен в почве грабово-букового биогеоценоза (площадка № 9, рис. 5), для которого характерны наименьшие величины C<sub>орг</sub> (3.65%), скорости БД (17.9 мкг С-СО<sub>2</sub>/г/ч) и активности каталазы (3.9 мл O<sub>2</sub>/г/мин). Напочвенный покров данного биогеоценоза состоит в основном из *H. colchica* (70%) и имеет минимальный индекс выравненности и наибольший – доминирования. Опад *C. betulus* минерализуется быстрее, по сравнению с *F. orientalis* (Kooijman,





**Рис. 5.** Интегральные показатели эколого-биологического состояния (ИПЭБСП, отн. %) бурых лесных почв в биогеоценозах Западного Кавказа; названия биогеоценозов на южном (№ 1–5) и северном (№ 6–11) макросклонах – как в табл. 1.

Сammeraat, 2010), однако преобладание *F. orientalis* в древесном ярусе и бедный напочвенный покров обуславливают меньшую активность почвенной микробиоты. Мы предполагаем, что встречаемость дождевых червей собственно почвенного вида *D. tellermanica* при абсолютном доминировании в населении другого собственно почвенного вида *A. jassyensis* характеризует гидротермический режим почв как наиболее засушливый, что подтверждает участие *C. betulus* в древесном ярусе.

В исследованных биогеоценозах колхидских лесов установлена тесная связь ( $r = 0.5–0.85$ ) синэкологических (Шеннона, Хартли, Симпсона, Пиелу) и интегральных индексов разнообразия растительных сообществ с показателями микробной активности почвы (скорость СИД, Смик, Смик/Сорг). Установлена также корреляционная взаимосвязь численности дождевых червей с показателями активности почвенного микробиоценоза ( $r = 0.5–0.7$ ) и разнообразия растительных сообществ ( $r = 0.4–0.8$ ). Полученные данные могут иллюстрировать тесную взаимосвязь в функционировании основных компонентов биогеоценозов колхидских лесов Западного Кавказа (растительность, дождевые черви, почва).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены комплексные исследования разных компонентов колхидских биогеоценозов Западного Кавказа (растительность, дождевые черви, бурые лесные почвы). Особенность колхидского типа растительности связана с высоким видовым разнообразием, многоярусной вертикальной и горизонтальной структурой, наличием эндеми-

ков и реликтов, вечнозеленого подлеска и редкого травяного покрова. Флористический состав и слабая вариабельность его синэкологических индексов свидетельствуют о сходных условиях формирования лесных биогеоценозов на южном и северном макросклонах Главного Кавказского Хребта.

Видовой состав наиболее часто встречающихся видов дождевых червей на обоих макросклонах различается незначительно. Морфо-экологическая структура их населения и обилие средиземноморских видов характеризуют условия почвообразования бурых лесных почв, развитых в районе с умеренно влажным и теплым климатом и промывным типом водного режима.

Бурые лесные почвы исследованных биогеоценозов характеризуются рыхлым сложением, высоким содержанием органического углерода и высокой микробной активностью. Основные физико-химические и биологические показатели почв южного и северного макросклонов Главного Кавказского Хребта схожи. Установлена тесная корреляционная связь между физико-химическими и биологическими показателями бурых лесных почв разных биогеоценозов, синэкологическими и интегральными индексами разнообразия растительности и численностью дождевых червей. Полученные экспериментальные результаты этих фоновых территорий могут быть полезными при мониторинговых исследованиях других лесных биогеоценозов Западного Кавказа.

**Финансирование.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-04-00961 и 20-54-56030 Иран\_т.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.Д.* Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003. 223 с.
- Андреев А.В.* Оценка биоразнообразия, мониторинг и экосети. Кишинев. ВІОТІСА, 2002. 167 с.
- Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: МГУ, 1970. 487 с.
- Аци Д.* Сельскохозяйственная экология. М.: Агропромиздат, 1959. 479 с.
- Бибин А.Р., Ковалев В.В.* Опыт борьбы с самшитовой огневкой *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera Grambidae) на Северо-Западном Кавказе // Материалы VI Всерос. конф. с международным участием "Экология: рациональное природопользование и безопасность жизнедеятельности". Майкоп, 2017. 19–22 октября. С. 15–18.
- Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А.* Методы исследования физических свойств почв и грунтов. М.: Высшая школа, 1961. 345 с.
- Всеволодова–Перель Т.С.* Дождевые черви фауны России. М.: Наука, 1997. 102 с.
- Высоцкий Г.Н.* Дождевой червь: избранные сочинения. Т. 2. М.: Изд-во АН СССР. 1962. С. 19–28.
- Гавриленко Е.Г., Ананьева Н.Д., Макаров О.А.* Оценка качества почв разных экосистем (на примере Серпуховского и Подольского районов Московской области) // Почвоведение. 2013. № 12. С. 1505–1515.
- Гапонюк Э.И., Малахов С.В.* Комплексная система показателей экологического мониторинга почв // Тр. Всесоюз. совещ. Обнинск, июнь 1983. Л.: Гидрометеоздат, 1985. С. 3–10.
- Гераськина А.П., Шевченко Н.Е.* Биотопическая приуроченность дождевых червей в малонарушенных лесах Тебердинского биосферного заповедника // Лесоведение. 2018. № 6. С. 464–478.
- Гиляров М.С.* Учет крупных почвенных беспозвоночных (мезофауны) // Методы почвенно-зоологических исследований. М.: Наука, 1975. С. 12–29.
- Горобцова О.Н., Улигова Т.С., Гедгафова Ф.В., Темботов Р.Х., Хакунова Е.М.* Биологическая активность почв в поясе широколиственных лесов Центрального Кавказа // Лесоведение. 2021. № 1. С. 1–15.
- Добровольский Г.В., Чернов И.Ю.* (ред.). Роль почвы в формировании и сохранении биологического разнообразия. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. 273 с.
- Егоров В.В., Иванова Е.Н., Фридланд В.М.* Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 224 с.
- Зернов А.С.* Флора Северо-Западного Кавказа. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 664 с.
- Зонн С.В.* Горно-лесные почвы Северо-Западного Кавказа. М.–Л.: АН СССР, 1950. 336 с.
- Казеев К.Ш., Колесников С.И.* Биодиагностика почв: методология и методы исследований. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного Федерального ун-та, 2012. 258 с.
- Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф.* Биология почв Юга России. Ростов-на-Дону: Изд-во ЦВВР, 2004. 350 с.
- Климатические данные городов по всему миру. 2015. <https://doi.org/climate-data.org/>
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 855 с.
- Лазук П.Д.* Типы леса хостинской заповедной роши // Труды Кавказского государственного заповедника. 1960. Вып. 6. С. 66–86.
- Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 293 с.
- Лукина Н.В., Исаев А.С., Крышень А.М., Онучин А.А., Сиринов А.А., Гагарин Ю.Н., Барталев С.А.* Приоритетные направления развития лесной науки как основы устойчивого управления лесами // Лесоведение. 2015. № 4. С. 243–254.
- Лукина Н.В., Орлова М.А., Бахмет О.Н., Тихонова Е.В., Тебенькова Д.Н., Казакова А.И., Крышень А.М., Горнов А.В., Смирнов В.Э., Шашков М.П., Ершов В.В., Князева С.В.* Влияние растительности на характеристики лесных почв Республики Карелия // Почвоведение. 2019. № 7. С. 827–842.
- Мещерякова Е.Н., Берман Д.И.* Устойчивость к отрицательным температурам и географическое распространение дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae, Moniligastridae) // Зоологический журн. 2014. Т. 93(1). С. 53–64. <https://doi.org/10.7868/S0044513414010127>
- Мэгарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 182 с.
- Неронов В.В.* Полевая практика по геоботанике в средней полосе Европейской России. М.: Изд-во Центра охраны дикой природы, 2002. 140 с.
- Нечаев Ю.А.* Лесные богатства Кабардино-Балкарии. Нальчик: Эльбрус, 1960. 143 с.
- Перель Т.С.* Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. М.: Наука, 1979. 275 с.
- Разнообразие и динамика лесных экосистем России // Исаев А.С. (ред.). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012/ 2013. Кн. 1. 461 с. / Кн. 2. 478 с.
- Рапопорт И.Б.* Высотное распределение дождевых червей (*Oligochaeta*, Lumbricidae) в центральной части Северного Кавказа // Зоологический журн. 2013. Т. 92(1). С. 3–10.
- Тимухин И.Н., Туниев Б.С.* О границах Бело-Лабинского, Туапсе-Адлерского и Абхазского флористических районов Кавказа. Вест. Удмуртского Университета. 2016. Т. 26. Вып. 2. С. 91–97.
- Улигова Т.С., Гедгафова Ф.В., Горобцова О.Н., Цепкова Н.Л., Рапопорт И.Б., Темботов Р.Х., Хакунова Е.М.* Луговые биогеоценозы субальпийского пояса Кабардино-Балкарского государственного высокогорного заповедника (Центральный Кавказ) // Nature Conservation Research. Заповедная наука. 2019. Т. 4 С. 29–47. <https://doi.org/10.24189/ncr.2019.012>
- Юсупов З.М.* К фауне муравьев (Hymenoptera, Formicidae) Тебердинского государственного природного биосферного заповедника // Вест. АГУ. 2014. Вып. 4(147). С. 58–62.
- Adamczyk B., Simon J., Kitunen V., Adamczyk S., Smolander A.* Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes: Old paradigms versus recent advances // Chemistry Open. 2017. V. 6(5). P. 610–614.
- Anderson J.P.E., Domsch K.H.* A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // Soil Biol. Biochem. 1978. V. 10(3). P. 215–221.



- Bauhus J., Pare D., Cote L.* Effects of tree species, stand age and soil type on soil microbial biomass and its activity in a southern boreal forest // *Soil Biology and Biochemistry*. 1998. V. 30(8–9). P. 1077–1089.
- Bernier N., Gillet F.* Structural relationships among vegetation, soil fauna and humus form in subalpine forest ecosystem: a hierarchical multiple factor analysis (HMFA) // *Pedobiologia*. 2012. V. 55(6). P. 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2012.06.004>
- Breeman N., Fienzi A.C.* Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications // *Biogeochemistry*. 1998. V. 42. P. 1–19.
- Jacob M., Viedenz K., Polle A., Thomas F.M.* Leaf litter decomposition in temperate deciduous forest stands with a decreasing fraction of beech (*Fagus sylvatica*) // *Oecologia*. 2010. V. 164: P.1083–1094. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1699-9>
- Hartley R.V.L.* Transmission of information // *Bell System Technical J.* 1928. V. 7(3). P. 535–563. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1928.tb01236.x>
- Greiner H.G., Stonehouse A.M.T., Tiegs S.D.* Cold tolerance among composting earthworm species to evaluate invasion potential // *Amer. Midland Naturalist*. 2011. V. 166. P. 349–357.
- Karmegam N., Daniel T.* Effect of physico-chemical parameters on earthworm abundance: a quantitative approach // *J. Appl. Sci. Res.* 2007. V. 3(11). P. 1369–1376.
- Kooijman A.M., Cammeraat E.* Biological control of beech and hornbeam affects species richness via changes in the organic layer, pH and soil moisture characteristics // *Functional Ecology*. 2010. V. 24(2). P. 469–477.
- Langenbruch Ch., Helfrich M., Flessa H.* Effects of beech (*Fagus sylvatica*), ash (*Fraxinus excelsior*) and lime (*Tilia spec.*) on soil chemical properties in a mixed deciduous forest // *Plant and Soil*. 2012. V. 352. P. 389–403.
- Lavelle P., Bignell D., Lepage M., Wölters V., Roger P., Ineson P., Heal O.W., Dhillon S.* Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers // *Eur. J. Soil Biology*. 2006. V. 33. P. 159–193.
- Oostra S., Majdi H., Olsson M.* Impact of tree species on soil carbon stocks and soil acidity in southern Sweden // *Scandinavian J. Forest Res.* 2006. V. 21. P. 364–371.
- Pielou E.C.* *Ecological Diversity*. N.Y.: John Wiley and Sons, 1975. 165 p.
- Rapoport I.B., Tsepkova N.L.* Earthworm Populations (Oligochaeta, Lumbricidae) in the Basin of the Middle Reaches of the Bol'shaya Laba River (Northwestern Caucasus, Buffer Zone of Caucasian Nature Reserve) // *Biology Bulletin*. 2019. 46(9). P. 12–29.
- Rutigliano F., Alfani A., Bellini L. et al.* Nutrient dynamics in decaying leaves of *Fagus sylvatica* L. and needles of *Abies alba* Mill // *Biology and Fertility of Soils*. 1998. V. 27. P. 119–126. <https://doi.org/10.1007/s003740050409>
- Shannon C.E.* A Mathematical Theory of Communication // *Bell System Tech. J.* 1948. V. 27(3). P. 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Simpson E.H.* Measurement of diversity // *Nature*. 1949. V. 163. 688 p. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Striganova B.R., Emets V.M., Starodubtseva E.A., Emets N.S.* The recent trend of the biodiversity dynamic of biotic communities in forest-steppe oak forests // *Biology Bulletin*. 2001. V. 28(5). P. 508–516. <https://doi.org/10.1023/A:1016752429044>
- Uligova T.S., Gorobtsova O.N., Tsepkova N.L., Rapoport I.B., Gedgafova F.V., Tembotov R.Kh.* Ecological and biological studies in the haplic chernozems pacnic soils area in the Central Caucasus (Kabardino-Balkaria) // *Biological Communications*. 2017. V. 62(4). P. 244–255. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.403>
- Vesterdal L., Schmidt I., Callesen I., Nilsson L., Gundersen P.* Carbon and nitrogen in forest floor and mineral soil under six common European tree species // *For Ecol Manage* 255. 2008. P. 35–48.

## Forest Biogeocenoses in the Area of Brown Forest Soils of the Western Caucasus

T. S. Uligova<sup>1</sup>, N. L. Tsepkova<sup>1</sup>, I. B. Rapoport<sup>1</sup>, O. N. Gorobtsova<sup>1</sup>,  
F. V. Gedgafova<sup>1</sup>, and R. Kh. Tembotov<sup>1, #</sup>

<sup>1</sup> *Tembotov Institute of Ecology of Mountain Territories of RAS, I. Armand street, 37-a, Nalchik, 360051 Kabardino-Balkar Republic, Russia*

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

Vegetation and brown forest soil of different types of forests of the southern and northern macroslopes of the Main Caucasian Ridge were studied, special attention was paid to soil fauna (earthworms), microbial and enzymatic activity. A comparative analysis of the main components of forest biogeocenoses (plant communities, earthworms, microbial and enzymatic activity of the soil) of the southern and northern macroslopes of the Main Caucasian Ridge located in the Caucasian State Natural Biosphere Reserve and natural monuments “Guam Gorge” and “Colchian boxwood Massif” was carried out. The assessment of the plant diversity of various types of colchian forests of the southern and northern macroslopes is given. The similarity of the structure of plant communities, the population of earthworms, their species richness, as well as the most important indicators of the biological activity of the soil of the southern and northern macroslopes has been established. A close correlation between the indicators of biological activity of brown forest soil with the diversity of vegetation and the number of earthworms is shown.

*Keywords:* biological activity, biodiversity, brown forest soil, earthworms, colchian forests

УДК 574.2

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ ДИБЕНЗО-*n*-ДИОКСИНОВ И ДИБЕНЗОФУРАНОВ В ПРОЦЕССЕ БИОАККУМУЛЯЦИИ В ЯЙЦАХ КУР НА СВОБОДНОМ ВЫГУЛЕ

© 2023 г. А. Д. Кудрявцева\*, @, А. А. Шелепчиков\*, Е. Я. Мир-Кадырова\*, Е. С. Бродский\*

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

@E-mail: a.kudryavtseva@sevin.ru

Поступила в редакцию 03.12.2021 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Проведено сравнение профилей ПХДД/Ф в яйцах кур на свободном выгуле и соответствующих почвах в частных хозяйствах Вьетнама. Основным направлением изменения профиля конгенов ПХДД/Ф в процессе бионакопления в яйцах является относительное увеличение вкладов низкохлорированных конгенов и снижение вклада ОХДД. Различия в профиле гексахлорированных конгенов в яйцах и почве могут свидетельствовать о дополнительных источниках поступления ПХДД/Ф в яйца помимо почвы.

**Ключевые слова:** ПХДД/Ф, диоксины, источники загрязнения, куры на свободном выгуле, профиль конгенов, бионакопление

**DOI:** 10.31857/S1026347023010080, **EDN:** IMFQJZ

Полихлорированные дибензо-*n*-диоксины и дибензофураны (ПХДД/Ф) представляют собой высокотоксичные ксенобиотики, обнаруживаемые в окружающей среде в следовых количествах в виде сложной смеси большого числа индивидуальных соединений (конгенов). Они в основном образуются в качестве побочных продуктов в разнообразных промышленных и термических процессах (Baker, Hites, 2000; Fiedler, 2003; Shields *et al.*, 2015). При этом для разных источников загрязнения характерен разный состав и профиль конгенов. Одной из задач в индикации и мониторинге загрязнения окружающей среды диоксинами является идентификация источников их поступления в окружающую среду и биологические объекты.

В отличие от образцов абиотических компонентов окружающей среды биологические образцы отражают биодоступную часть общего загрязнения, поэтому для адекватной оценки непосредственного воздействия загрязнения на животный мир и нагрузки на организм необходимо определение содержания ПХДД/Ф в тканях животных (De Solla, 2015). Однако поскольку метаболизм и накопление ПХДД/Ф в организмах животных является видо-, ткане- и конгенер-специфичным (Petreas *et al.*, 1991; De Vries, Kwakkel, Kijlstra, 2006; Piskorska-Pliszczynska *et al.*, 2014; Assefa *et al.*, 2019) происходит трансформация исходного профиля ПХДД/Ф. В частности, в биологических

пробах как правило накапливаются преимущественно 2,3,7,8-замещенные конгенеры, в большей степени низкохлорированные (Wonn, 1998).

В качестве биоиндикатора загрязнения окружающей среды стойкими органическими загрязнителями, в том числе диоксинами, могут использоваться яйца кур на свободном выгуле. так как это широко распространенный продукт питания; отбор и транспортировка яиц значительно проще по сравнению с другими биологическими материалами; достаточно высокое содержание в них липидов облегчает определение липофильных веществ; куры употребляют значительное количество почвенных частиц, а также почвенных животных (DiGangi, Petrлік, 2005). Другим преимуществом использования куриных яиц является то, что помимо оценки загрязнения окружающей среды этот объект, являясь непосредственным продуктом питания человека, позволяет также оценить риски для здоровья населения. Основным путем поступления диоксинов в яйца считается потребление курами частичек загрязненной почвы, по разным оценкам потребление почвы составляет от 2 до 10% от их общего рациона (McKone, 1994; Lovett *et al.*, 1998). Ранее была показана статистически значимая связь содержания ПХДД/Ф в яйцах кур на свободном выгуле и соответствующих почвах (Kudryavtseva *et al.*, 2020), однако корреляционный анализ концентраций отдельных конгенов не дает полного представления о

соотношении профилей ПХДД/Ф в яйцах и почвах. Кроме того, почва может являться не единственным источником ПХДД/Ф для кур.

Целью настоящей работы является оценка изменения профиля ПХДД/Ф в процессе биоаккумуляции в яйцах кур на свободном выгуле по сравнению с исходным профилем в почве и возможности выявления источников ПХДД/Ф. Исследование проводили на территории Вьетнама, диоксиновое загрязнение которого представляет собой сочетание текущей эмиссии и поступления ПХДД/Ф в окружающую среду в ходе широкомасштабного распыления гербицидов в ходе военных действий в 1961–1971 гг. Всестороннее обсуждение уровней и последствий загрязнения территории Вьетнама диоксинами приведено в других работах (Фешин и др., 2008; Бродский и др., 2009; Окружающая среда и здоровье человека в загрязненных диоксинами регионах Вьетнама, 2011; Кудрявцева и др., 2015; Sycheva *et al.*, 2016).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Яйца кур на свободном выгуле и поверхностный слой почвы с участков, доступных курам для освоения, были отобраны в 36 частных хозяйствах из различных районов Вьетнама от г. Ханой на севере до провинции Донгнай на юге, включая “горячую точку” вблизи авиабазы Бьенхоа, где во время войны проводили заправку самолетов Оранжевым Агентом. В двух хозяйствах также были отобраны пробы золы от сжигания бытовых отходов.

Яйца были сварены вкрутую, заморожены, очищены от скорлупы и лиофилизированы. В пробы вносили смесь  $^{13}\text{C}_{12}$ -меченых ПХДД/Ф и экстрагировали методом проточной экстракции смесью гексана и этанола в соотношении 1 : 1 при температуре 78°C. Очистку и фракционирование экстрактов проводили последовательно на угольной колонке (AX-21 Anderson Development Co.), многослойной колонке ( $\text{K}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 44%-ная  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 40%-ная  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 30%-ная  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ ) и колонке с оксидом алюминия.

Почву сушили, измельчали, пропускали через сито с диаметром отверстий 0.25 мм. В пробы почвы и золы также добавляли  $^{13}\text{C}_{12}$ -меченые стандарты и экстрагировали методом проточной экстракции смесью толуола и ацетона в соотношении 9:1 при температуре 98°C. Очистку и фракционирование экстрактов проводили последовательно на многослойной колонке ( $\text{K}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 44%-ная  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 40%-ная  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 30%-ная  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ ), угольной колонке (AX-21 Anderson Development Co.) и колонке с оксидом алюминия.

После очистки в экстракты вносили изотопно-меченые стандарты для контроля степени извлечения и концентрировали до 5–7 мкл. Все стандарты были приобретены у фирмы “Welligt Agilent Technology 7890” (США), соединенном с масс-спектрометром высокого разрешения “Waters Autospec Premier” (Великобритания). Данные по содержанию ПХДД/Ф в изученных образцах и расчет средних коэффициентов бионакопления приведены в работе (Kudryavtseva *et al.*, 2020).

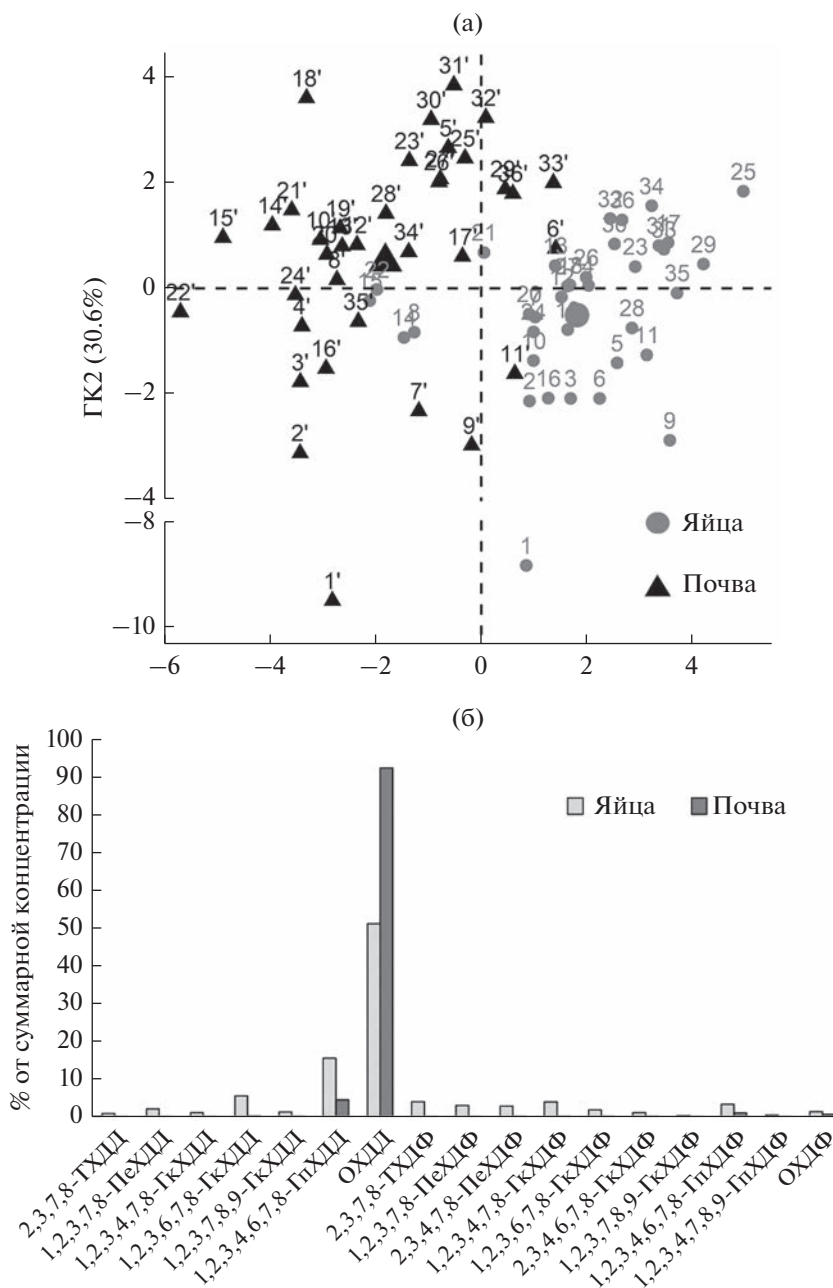
Анализ методом главных компонент производили с помощью языка программирования R в среде RStudio (R Core Team, 2018). Концентрации индивидуальных 2,3,7,8-замещенных конгенов ПХДД/Ф нормировали к их суммарной концентрации. Поскольку такая нормализация делает набор данных закрытым, в обоих случаях использовали log-ratio преобразование (Aitchison, 1986; Bonn, 1998; Ross *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010; Grenacre, 2018).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ методом главных компонент профилей ПХДД/Ф по всем 2,3,7,8-замещенным конгенерам четко разделяет профили ПХДД/Ф в почвах и яйцах (рис. 1а), что показывает изменение исходного почвенного профиля в результате конгенер-специфичного бионакопления. Таким образом, подтверждается предположение, что прямое сравнение профиля конгенов в яйцах с профилями первичных источников не всегда корректно (Megson, Dack, 2011). Кроме того, обращают на себя внимание точки 1 и 1', соответствующие пробам из сильно загрязненной “горячей точки” вблизи аэродрома Бьенхоа (район Быулонг), с чрезвычайно высоким вкладом 2,3,7,8-ТХДД, далеко отстоящие от основной массы точек.

Интерпретация факторных нагрузок главных компонент (ГК) затруднена из-за специфики трансформации данных, однако общее направление изменения профиля можно установить сравнением профилей в точках, наиболее близких по распределению к центроидам для яиц и почв. Так, сравнение профилей ПХДД/Ф в яйцах и почве из хозяйства в районе Туйфонг в провинции Нинь-хуан (точки 12 и 12') показывает, что при переходе от почв к яйцам кур на свободном выгуле происходит снижение относительного вклада ОХДД и повышение вклада остальных конгенов, главным образом низкохлорированных, что обусловлено прежде всего различиями в коэффициентах бионакопления между конгенерами с разными степенями хлорирования (рис. 1б).

Следует также отметить, что наблюдаются некоторые различия в расположении пар точек яйца–почва из разных хозяйств. Эти различия могут быть обусловлены следующими факторами:



**Рис. 1.** Плоскость двух первых главных компонент для профилей ПХДД/Ф в яйцах кур на свободном выгуле и соответствующих почвах по 17-ти 2,3,7,8-замещенным ПХДД/Ф (а); основное направление изменения профиля ПХДД/Ф при поступлении из почвы в яйца кур на свободном выгуле на примере хозяйства в районе Туйфонг в провинции Ниньхуан (б) (соответствует точкам 12 и 12' на рис. 1а).

- 1) различием в уровне загрязнения почвы и конгенерном составе ПХДД/Ф между участками;
- 2) неоднородностью загрязнения почвы внутри участка;
- 3) различиями в свойствах почв между участками;
- 4) наличием дополнительных источников ПХДД/Ф, доступных для кур;

- 5) различием в условиях содержания кур, таких как площадь участков и количество особей в стаде (Kijlstra *et al.*, 2007);
- 6) различиями в кормовом поведении между породами (Andersson, *et al.*, 2001; Schütz, Jensen, 2001);
- 7) индивидуальными особенностями отдельных особей.

Поскольку при отборе проб не фиксировали породу кур и условия содержания, за исключением наличия доступа к свободному выгулу, влияние последних трех факторов в настоящем исследовании не рассматривается. Что касается свойств почв, то предполагается, что биодоступность ПХДД/Ф в почвах зависит преимущественно от содержания в них пирогенного углеродистого вещества, тогда как содержание аморфного органического вещества и глинистых частиц не оказывает существенного влияния (Yuan *et al.*, 2021).

Как правило, основным источником ПХДД/Ф в яйцах кур на свободном выгуле является почва, однако помимо почвы ПХДД/Ф могут поступать в организм кур также из дополнительного корма, почвенных животных, золы от сжигания на участке бытовых отходов, материалов загонов для кур, в частности древесины, обработанной пентахлорфенолом или другими фунгицидами (Piskorska-Pliszczynska *et al.*, 2016). Наличие таких дополнительных источников ПХДД/Ф может быть выявлено путем анализа сдвига распределения конгенов ПХДД/Ф внутри групп с одной степенью хлорирования в яйцах относительно аналогичного распределения в соответствующих почвах. Поскольку различия в физико-химической устойчивости между конгенерами с одинаковой степенью хлорирования (например, все ГкХДД/Ф) меньше, чем различия между группами конгенов с разными степенями хлорирования (Hagenmaier, Lindig, She, 1994), в работе Мэгсона и Дэка (Megson, Dack, 2011) было проведено сравнение профилей ГкХДД/Ф (концентрацию каждого гексахлорированного конгенера нормировали на суммарную концентрацию всех гексахлорированных конгенов) в яйцах кур на свободном выгуле и почвах, показавшее более близкое сходство профилей в яйцах и почвах по сравнению с анализом полного профиля 2,3,7,8-замещенных конгенов. При этом в яйцах наблюдался систематический сдвиг с увеличением относительного вклада 1,2,3,6,7,8-ГкХДД и уменьшением вклада 1,2,3,7,8,9-ГкХДД по сравнению с почвами. Обнаруженный сдвиг, очевидно, связан с различиями в коэффициентах бионакопления, которые даже между конгенерами с одной степенью хлорирования могут различаться более чем в два раза (Pirard, De Pauw, 2006; Kudryavtseva *et al.*, 2020). Однако на диаграммах, построенных на основе данных из лабораторного эксперимента Петреас с соавт. (Petreas *et al.*, 1991), в котором куры получали корм с добавлением загрязненной диоксидами почвы, сдвига в сторону увеличения вклада 1,2,3,6,7,8-ГкХДД в яйцах не наблюдается (рис. 2а). При этом на диаграммах, построенных на основе данных исследования Хенрикссона с соавт. (Henriksson *et al.*, 2017) по изучению бионакопления ПХДД/Ф в дождевых червях, как правило, тоже наблюдается отчетливый сдвиг в сторону 1,2,3,6,7,8-ГкХДД в

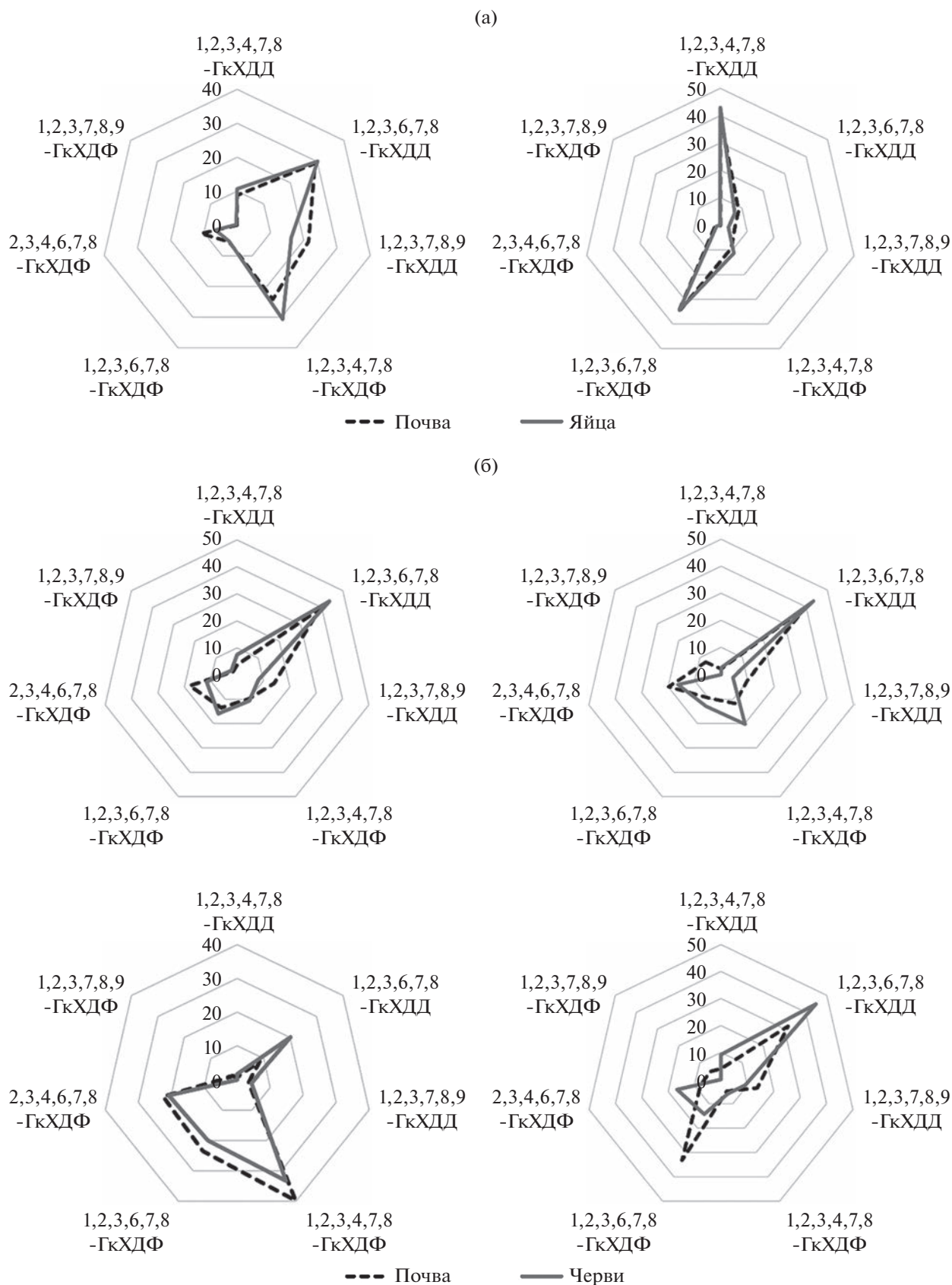
профиле ГкХДД/Ф в червях относительно профиля в почвах (рис. 2б). Вероятно, обнаруживаемый в натуральных исследованиях сдвиг в профиле ГкХДД/Ф в яйцах кур на свободном выгуле (как и различия в коэффициентах бионакопления) обусловлен поступлением ПХДД/Ф в яйца при употреблении курами червей и других почвенных животных. В настоящем исследовании также, как правило, наблюдается сдвиг профиля ГкХДД/Ф в яйцах относительно профиля в почвах в сторону 1,2,3,6,7,8-ГкХДД (рис. 3).

Однако в некоторых исследованных нами хозяйствах наблюдается сдвиг профиля, не соответствующий соотношению коэффициентов бионакопления, что может свидетельствовать как о повышенной мозаичности загрязнения почвы ПХДД/Ф на исследуемых участках, так и о наличии дополнительного поступления ПХДД/Ф из других источников помимо почвы и почвенных животных. Так, было обнаружено несколько хозяйств, в яйцах из которых наблюдался сдвиг профиля ГкХДД/Ф в сторону некоторых фуранов (рис. 4а).

Чтобы установить источник дополнительного поступления ПХДД/Ф в яйца на данных участках было проведено сравнение с профилями известных источников. На рис. 4б приведены профили ГкХДД/Ф некоторых известных источников ПХДД/Ф, рассчитанные по литературным данным. Доминирование 1,2,3,4,7,8-ГкХДФ в профиле гексахлорированных конгенов характерно для технических смесей ПХБ, 1,2,3,6,7,8-ГкХДД — для ПХФ. В профиле открытого сжигания доминируют 2,3,4,6,7,8-ГкХДФ, 1,2,3,6,7,8-ГкХДФ и 1,2,3,4,7,8-ГкХДФ. По-видимому, в исследуемых участках наиболее вероятным дополнительным источником поступления ПХДД/Ф в яйца кур (помимо почвы) является зола от открытого сжигания бытовых отходов, хотя нельзя полностью исключить и влияние ПХБ-содержащих смесей.

Возможность поступления ПХДД/Ф в организм кур из золы подтверждается сравнением профилей гексахлорированных конгенов в яйцах, почве и золе из двух хозяйств, на территории которых были отобраны пробы золы от сжигания бытовых отходов (Хоан, Бьенхоа, Донгнай и Танфонг, Бьенхоа, Донгнай). Так, в хозяйстве Хоан профиль в яйцах сдвинут по фуранам аналогично профилю в золе (рис. 5), что свидетельствует о том, что зола является дополнительным источником ПХДД/Ф для кур на данном участке. В хозяйстве в округе Танфонг такого сдвига не наблюдается (рис. 5) — здесь профиль в яйцах более близок профилю в почвах, следовательно, в данном случае явного вклада золы не наблюдается.

Анализ лепестковых диаграмм относительных вкладов конгенов с одной степенью хлорирования в индивидуальных пробах в пределах одного хозяйства также позволяет сделать вывод о разли-



**Рис. 2.** Профили гексахлорированных конгенов диоксинов и фуранов в яйцах кур и почве, рассчитанные по данным лабораторного эксперимента *Petreas et al.* (1991) (а); профили гексахлорированных конгенов диоксинов и фуранов в дождевых червях и соответствующих почвах, рассчитанные по данным *Henriksson et al.* (2017) (б).

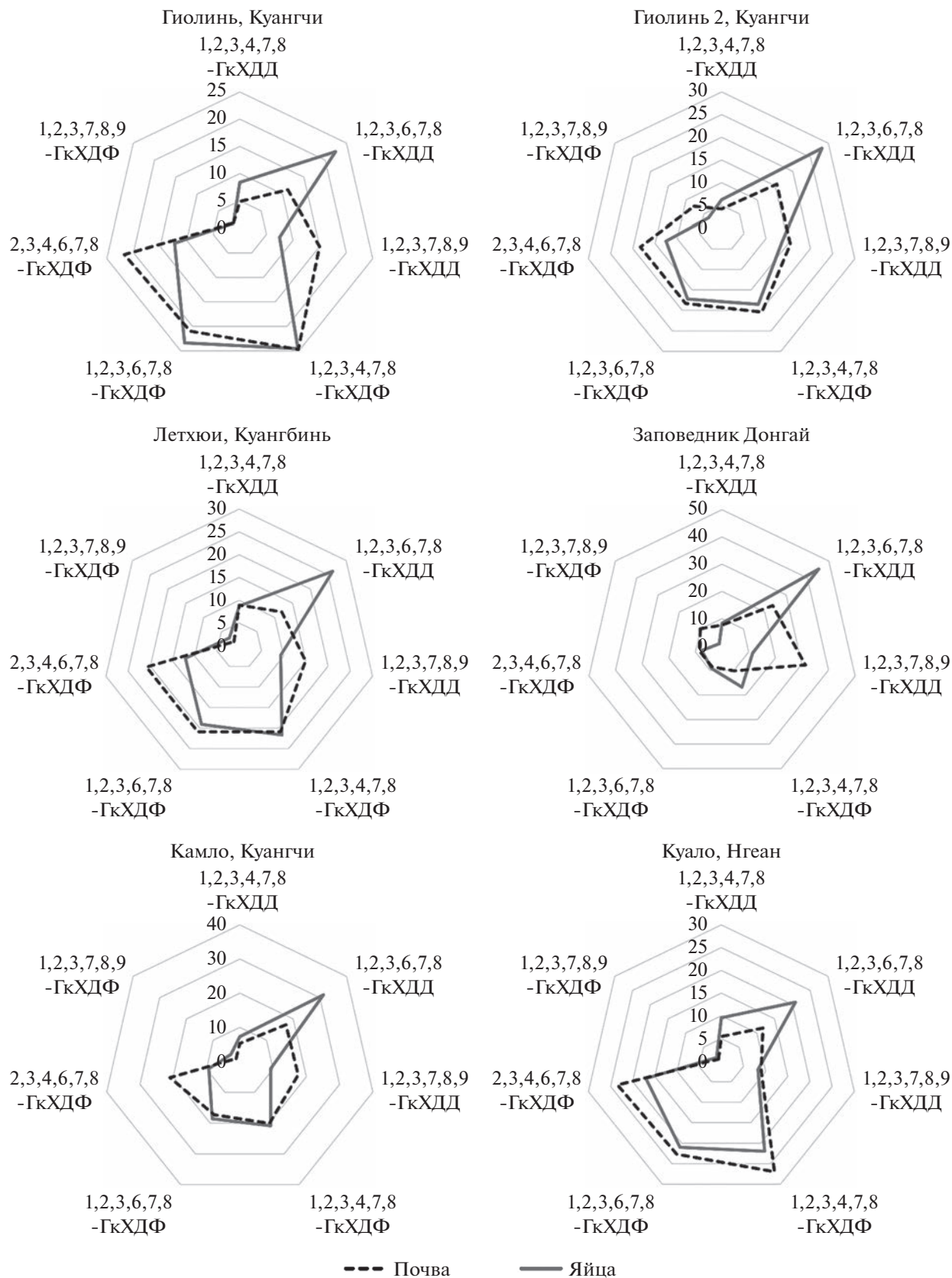
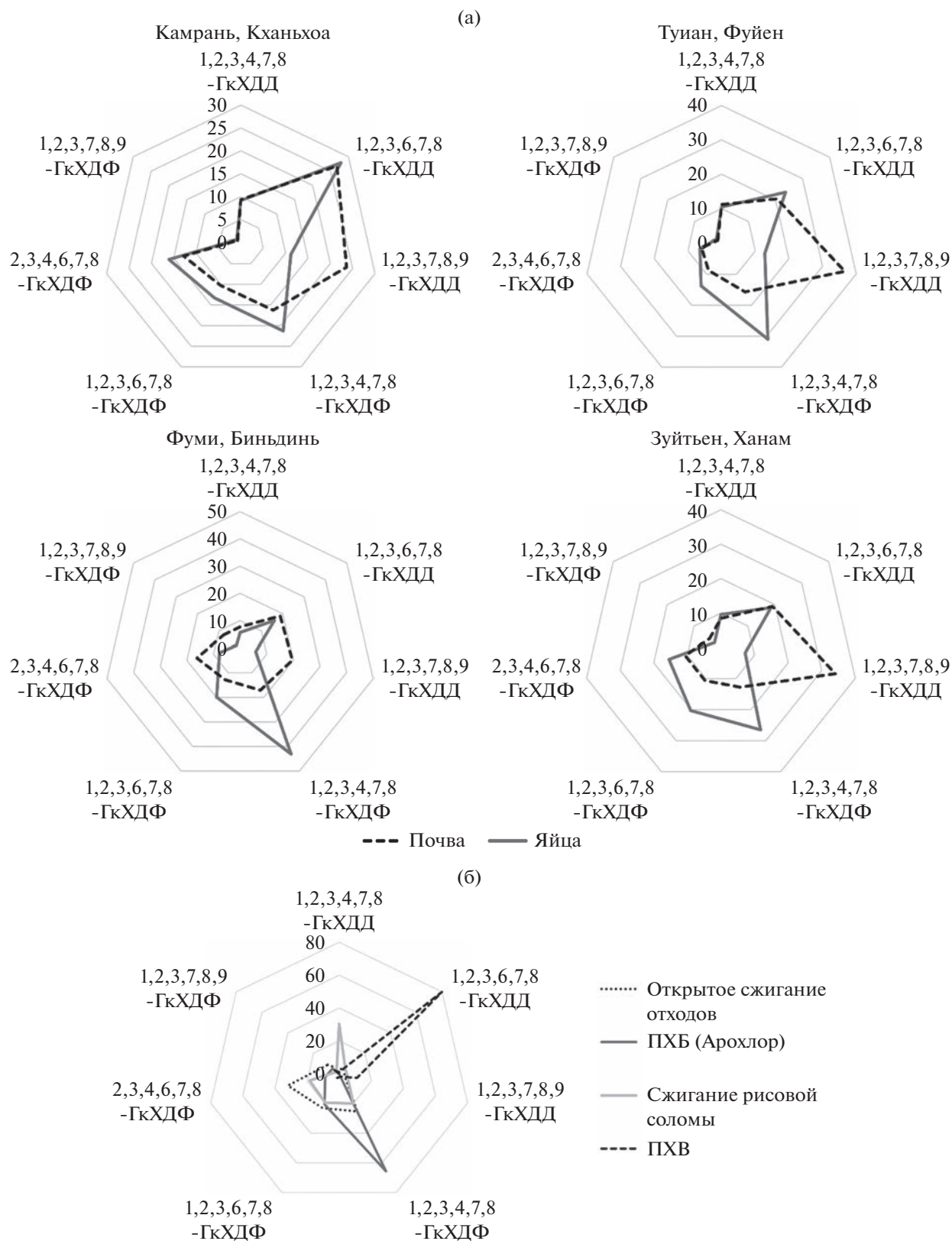


Рис. 3. Профили гексахлорированных ПХДД/Ф в яйцах кур на свободном выгуле и соответствующих почвах с типичным сдвигом в яйцах в сторону 1,2,3,6,7,8-ГкХДД.





**Рис. 4.** Профили гексахлорированных конгенов диоксинов и фуранов в яйцах кур на свободном выгуле и соответствующих почвах со сдвигом профиля в яйцах в сторону некоторых фуранов (а); профили гексахлорированных конгенов известных источников ПХДД/Ф по литературным данным (открытое сжигание отходов (Lemieux *et al.*, 2000), смеси ПХБ (Johnson *et al.*, 2008), сжигание рисовой соломы (Chang *et al.*, 2014), ПХФ (Hagenmaier, Brunner, 1987) (б).

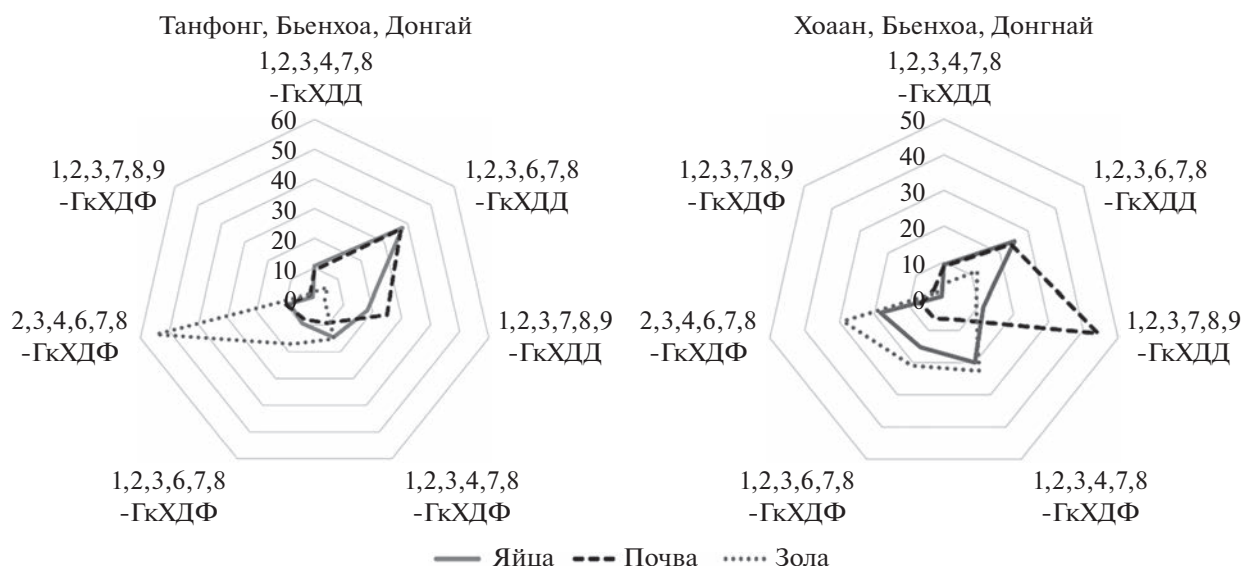


Рис. 5. Профили гексахлорированных конгенов диоксинов и фуранов в яйцах кур на свободном выгуле, почвах и золе из двух хозяйств в г. Бьенхоа.

циях путей поступления ПХДД/Ф в организм конкретных особей. На рис. 6 выделяются два образца (3 и 4) со сдвигом профиля, не соответствующим соотношениям коэффициентов бионакопления и характерным для профиля открытого сжигания, в то время как в остальных трех образцах наблюдается типичное распределение. Различия в

профилях могут быть частично обусловлены индивидуальными особенностями биотрансформации и поступления ПХДД/Ф в яйца у отдельных особей. Однако поскольку в остальных исследованных хозяйствах профили гексахлорированных конгенов в индивидуальных яйцах были одинаковы, вклад подобных процессов, по-видимому, невелик. Следует также отметить, что общий эквивалент токсичности (TEQ) ПХДД/Ф в этих двух образцах с отличающимся профилем в 2 раза превышает аналогичные в остальных пробах с данного участка (8.4–8.7 и 4.0–4.2 пг TEQ<sub>2005</sub>/г липидов соответственно), что свидетельствует о повышенном поступлении в них ПХДД/Ф. В данном случае профиль распределения гексахлорированных конгенов также указывает на золу как на наиболее вероятный источник дополнительного поступления ПХДД/Ф. Таким образом, анализ распределения конгенов с одной степенью хлорирования может более четко выявить источники специфического загрязнения отдельных особей в пределах одного хозяйства.

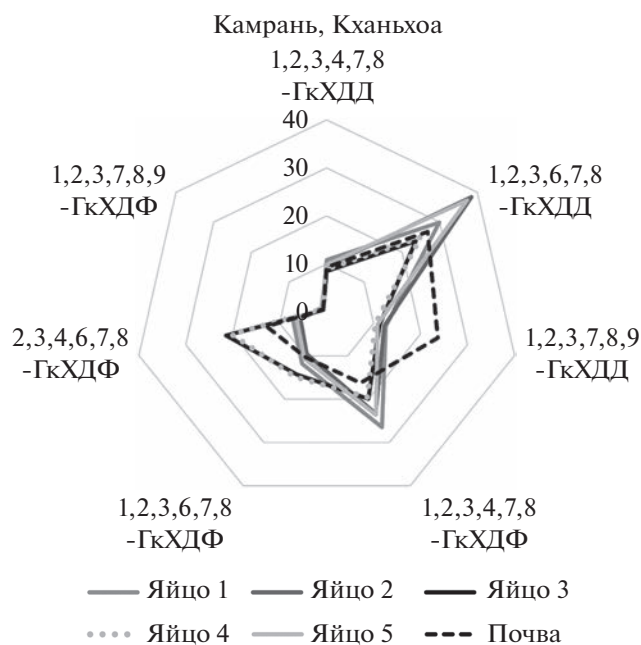


Рис. 6. Профили гексахлорированных конгенов диоксинов и фуранов в индивидуальных пробах яиц кур на свободном выгуле и почве в хозяйстве в г. Камрань.

Таким образом, общим направлением изменения профиля ПХДД/Ф в процессе бионакопления в яйцах кур на свободном выгуле является увеличение относительного вклада низкохлорированных конгенов и снижение вклада ОХДД по сравнению с почвой.

Сравнение профилей конгенов ПХДД/Ф с одинаковой степенью хлорирования, в частности гексахлорированных, в почвах и яйцах позволяет выявить поступление ПХДД/Ф в организм кур из дополнительных источников помимо почвы, например, золы от сжигания бытовых отходов. Наблюдаемый в большинстве хозяйств сдвиг про-

филя гексахлорированных конгенеров в яйцах в сторону 1,2,3,6,7,8-ГхХДД, по-видимому, обусловлен поступлением ПХДД/Ф в яйца при употреблении курами червей и других почвенных животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский Е.С., Шелепчиков А.А., Фешин Д.Б., Румак В.С., Умнова Н.В., Кузнецов А.Н., Чинь Кхак Шау, Нгием Суан Чыонг, Павлов Д.С.* Современный уровень диоксинового загрязнения Вьетнама в районе массивированного распыления Оранжевого Агента // Докл. Акад. Наук. 2009. Т. 429. № 3. С. 425–429.
- Кудрявцева А.Д., Шелепчиков А.А., Бродский Е.С., Фешин Д.Б., Румак В.С.* Содержание диоксинов в яйцах птиц из различных районов Вьетнама // Вест. Москов. ун-та. Серия 16. Биология. 2015. С. 239–244.
- Окружающая среда и здоровье человека в загрязненных диоксидами регионах Вьетнама / Под ред. Румак В.С., Павлов Д.С., Софронов Г.А. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2011. 271 с.
- Фешин Д.Б., Шелепчиков А.А., Бродский Е.С., Калинин Г.А., Мир-Кадырова Е.Я., Румак В.С., Павлов Д.С.* Современный уровень ПХДД и ПХДФ в плаценте и грудном молоке жителей Вьетнама // Докл. Акад. Наук. 2008. Т. 423. № 4. С. 570–573.
- Aitchison J.* The statistical analysis of compositional data. London–N.Y.: Chapman and Hall, 1986. 416 p.
- Andersson M., Nordin E., Jensen P.* Domestication effects on foraging strategies in fowl // Appl. Behav. Sci. 2001. V. 72. № 1. P. 51–62.
- Assefa A., Tysklind M., Bignert A., Josefsson S., Wiberg K.* Sources of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to Baltic Sea herring // Chemosphere. 2019. V. 218. P. 493–500.
- Baker J.I., Hites R.A.* Is combustion the major source of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to the environment? A mass balance investigation // Envir. Sci. Tech. 2000. V. 34. № 14. P. 2879–2886.
- Bonn B.A.* Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran concentration profiles in sediment and fish tissue of the Willamette basin, Oregon // Envir. Sci. Technol. 1998. V. 32. № 6. P. 729–735.
- Chang S.S., Lee W.J., Holsen T.M., Li H.W., Wang L.C., Chang-Chien G.P.* Emissions of polychlorinated-*p*-dibenzo dioxin, dibenzofurans (PCDD/Fs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from rice straw biomass burning // Atmosph. Envir. 2014. V. 94. P. 573–581.
- De Solla S.R.* Exposure, bioaccumulation, metabolism and monitoring of persistent organic pollutants in terrestrial wildlife // Dioxin and Related Compounds. The Handbook of Envir. Chem. V. 49. Springer, Cham, 2015. P. 203–252.
- De Vries M., Kwakkel R.P., Kijlstra A.* Dioxins in organic eggs: a review // NJAS – Wageningen J. Life Sciences. 2006. V. 54. № 2. P. 207–221.
- DiGangi J., Petrlik J.* The egg report. 2005. P. 1–49. [https://doi.org/sites/default/files/documents/ip-en\\_egg\\_report-en.pdf](https://doi.org/sites/default/files/documents/ip-en_egg_report-en.pdf)
- Fiedler H.* Dioxins and furans (PCDD/PCDF) The handbook of environmental chemistry V. 3, Part 0 Persistent Organic Pollutants / Ed. Fiedler H. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2003. P. 123–201.
- Greenacre M.* Compositional data analysis in practice. Boca Raton: CRC Press, 2018. 122 p.
- Hagenmaier H., Brunner H.* Isomer-specific analysis of pentachlorophenol and sodium pentachlorophenate for 2,3,7,8-substituted PCDD and PCDF at sub-ppb levels // Chemosphere. 1987. V. 16. № 8/9. P. 1759–1764.
- Hagenmaier H., Lindig C., She J.* Correlation of environmental occurrence of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans with possible sources // Chemosphere. 1994. V. 29. № 9–11. P. 2163–2174.
- Henriksson S., Bjurlid F., Rotander A., Engwall M., Lindström G., Westberg H., Hagberg J.* Uptake and bioaccumulation of PCDD/Fs in earthworms after in situ and in vitro exposure to soil from a contaminated sawmill site // Sci. Total Envir. 2017. V. 580. P. 564–571.
- Johnson G.W., Hansen L.G., Coreen Hamilton M., Fowler B., Hermanson M.H.* PCB, PCDD and PCDF congener profiles in two types of Aroclor 1254 // Envir. Toxicol. Pharmac. 2008. V. 25. № 2. P. 156–163.
- Kijlstra A., Traag W.A., Hoogenboom L.A.P.* Effect of flock size on dioxin levels in eggs from chickens kept outside // Poultry Science. 2007. V. 86. № 9. P. 2042–2048.
- Kudryavtseva A.D., Shelephnikov A.A., Brodsky E.S.* Free-range chicken eggs as a bioindicator of dioxin contamination in Vietnam, including long-term Agent Orange impact // Emerg. Contam. 2020. V. 6. P. 114–123.
- Lemieux P.M., Lutes C.C., Abbott J.A., Aldous K.M.* Emissions of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from the open burning of household waste in barrels // Environ. Sci. Technology. 2000. V. 34. № 3. P. 377–384.
- Liu Y., Chen L., Zhao J., Wei Y., Pan Z., Meng X.Z., Huang Q., Li W.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface soil of Shanghai, China: concentrations, distribution and sources // Org. Geochemistry. 2010. V. 41. № 4. P. 355–362.
- Lovett A.A., Foxal C.D., Creaser C.S., Chewe D.* PCB and PCDD/DF concentrations in egg and poultry meat samples from known urban and rural locations in Wales and England // Chemosphere. 1998. V. 37. № 9–12. P. 1671–1685.
- Megson D., Dack S.* Assessing changes to the congener profile of PCDD and PCDF during bioaccumulation in chicken and duck eggs // Proceedings of the 2011 INEF Conference on Environmental Forensics / Ed. Morrison R.D., O’Sullivan G. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2011. P. 244–261.
- McKone T.E.* Uncertainty and variability in human exposures to soil contaminants through home-grown food: a Monte Carlo assessment // Risk Analysis. 1994. V. 14. № 4. P. 449–463.
- Petreas M.X., Goldman L.R., Hayward D.G., Chang R.R., Flattery J.J., Wiesmüller T., Stephens R.D., Fry D.M., Rappe C., Bergek S., Hjelt M.* Biotransfer and bioaccumulation of PCDD/PCDFs from soil: controlled exposure studies of chickens // Chemosphere. 1991. V. 23. № 11–12. P. 1731–1741.

- Pirard C., De Pauw E.* Toxicokinetic study of dioxins and furans in laying chickens // *Environment International*. 2006. V. 32. № 4. P. 466–469.
- Piskorska-Pliszczynska J., Mikolajczyk S., Warenik-Bany M., Maszewski S., Strucinski P.* Soil as a source of dioxin contamination in eggs from free-range hens on a Polish farm // *Sci. Total Envir.* 2014. V. 466–467. P. 447–454.
- Piskorska-Pliszczynska J., Strucinski P., Mikolajczyk S., Maszewski S., Rachubik J., Pajurek M.* Pentachlorophenol from an old henhouse as a dioxin source in eggs and related human exposure // *Envir. Pollution*. 2016. V. 208. P. 404–412.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2018.
- Ross P.S., Jeffries S.J., Yunker M.B., Addison R.F., Ikonomou M.G., Calambokidis J.C.* Harbor seals (*Phoca Vitulina*) in British Columbia, Canada, and Washington state, USA, reveal a combination of local and global polychlorinated biphenyl, dioxin, and furan signals // *Envir. Toxicol. Chemistry*. 2004. V. 23. № 1. P. 157–165.
- Schütz K.E., Jensen P.* Effects of resource allocation on behavioural strategies: a comparison of red junglefowl (*Gallus gallus*) and two domesticated breeds of poultry // *Ethology*. 2001. V. 107. № 8. P. 753–765.
- Shields W.J., Saba T., Boehm P.D., Pietari J.* Congeners. A forensic analysis // *Introduction to environmental forensics* / Eds Murphy B.L., Morrison R.D. Academic Press, 2015. P. 347–393.
- Sycheva L.P., Umnova N.V., Kovalenko M.A., Zhurkov V.S., Shelepchikov A.A., Roumak V.S.* Dioxins and cytogenetic status of villagers after 40 years of agent Orange application in Vietnam // *Chemosphere*. 2016. V. 144. P. 1415–1420.
- Yuan Q., Sallach J.B., Rhodes G., Bach A., Crawford R., Li H., Johnston C.T., Teppen B.J., Kaminski N.E., Boyd S.A.* Natural organic matter does not diminish the mammalian bioavailability of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin // *Chemosphere*. 2021. V. 261. 8 p.

## Transformation of Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins and Dibenzofurans Congener Profile during Bioaccumulation in Free-Range Chicken Eggs

A. D. Kudryavtseva<sup>1, #</sup>, A. A. Shelepchikov<sup>1</sup>, E. Ya. Mir-Kadyrova<sup>1</sup>, and E. S. Brodsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: a.kudryavtseva@sevin.ru*

The PCDD/F profiles in free-range chicken eggs and corresponding soils from private households in Vietnam were compared. The main trend in the change in the profile of PCDD/F congeners during bioaccumulation in eggs is the relative increase in the contributions of low-chlorinated congeners and the decrease in the contribution of OCDD. Differences in the profile of hexachlorinated congeners in eggs and soil may indicate additional sources of PCDD/F in eggs other than soil.

**Keywords:** PCDD/F, dioxin, free-range chickens, contamination sources, congener profile, bioaccumulation

УДК 599.323.43:574.34

## ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ СИНХРОННОСТЬ ДИНАМИКИ ЧИСЛЕННОСТИ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ (*Myodes rutilus* Pall.) НА ЕВРОПЕЙСКОМ СЕВЕРЕ РОССИИ

© 2023 г. А. В. Бобрецов\*, \*\*, @, А. А. Калинин\*\*\*, Л. Я. Сабурова\*\*\*\*, **А. В. Сивков\*\*\*\*\***

\*Печоро-Ильчский государственный природный заповедник, ул. Ланиной, 8, Якша, 169436 Россия

\*\*Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, 167982 Россия

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

\*\*\*\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр  
комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук,  
ул. Набережная Северной Двины, 23, Архангельск, 163000 Россия

\*\*\*\*\*Пинежский государственный природный заповедник, ул. Первомайская, 123а, Пинега, 164610 Россия  
@E-mail: avbobr@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2021 г.

После доработки 04.07.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2022 г.

Проведен анализ пространственной сопряженности динамики популяций красной полевки (*Myodes rutilus* Pall.) в разные периоды времени между девятью локалитетами Республики Коми и Архангельской области. Расстояние между ними варьировало от 88 до 947 км. В период с 1965 по 2006 гг. наблюдались асинхронные колебания численности вида. С увеличением географической дистанции между локалитетами пространственная синхронизация уменьшалась. В период с 2007 по 2018 гг. на всей территории были отмечены уже согласованные изменения численности данного вида. Одним из вероятных факторов смены типов пространственной изменчивости в динамике популяций красной полевки во времени являются изменения в климате.

**Ключевые слова:** *Myodes rutilus*, динамика численности, пространственная синхронность, Европейский Север

**DOI:** 10.31857/S102634702301002X, **EDN:** IIXTXS

Пространственная синхронность колебаний численности популяций животных является поразительным биологическим феноменом (Saether *et al.*, 2007) и считается одной из центральных проблем экологии (Sheppard *et al.*, 2016). Классическим примером ее являются согласованные изменения плотности канадской рыси (*Lynx canadensis* Kerr.) на огромной территории Северной Америки (Lindström *et al.*, 2001). Она выявлена у видов разных таксономических групп (Ranta *et al.*, 1999; Liebhold *et al.*, 2004; Krebs *et al.*, 2013; Исаев и др., 2015; Koenig, Liebhold, 2016), в том числе хорошо известна и у мелких млекопитающих (Ims, Andreassen, 2000; Sundell *et al.*, 2004; Gouveia *et al.*, 2016).

Наблюдаемая синхронность на обширных территориях обычно интерпретируется как следствие воздействия внешних эффектов — погоды (эффект Морана), кормов, хищников, а также расселения животных (Liebhold *et al.*, 2004). Масштаб их влияния на пространственную сопряженность

изменений обилия млекопитающих сильно различается.

Климатические и погодные факторы могут вызвать синхронные колебания численности отдельных видов животных на огромных территориях — от нескольких сотен до 1000 км и более (Post, Forchhammer, 2002; Henden *et al.*, 2009). Значительная роль эффекта Морана (особенно в связи с изменением климата) на примере птиц и крупных млекопитающих была продемонстрирована в ряде последних работ (Koenig, Liebhold, 2016; Hansen *et al.*, 2019).

Влияние расселения животных на синхронизацию динамики популяций зависит от способности вида к миграциям. Поэтому для мелких грызунов, расселение которых происходит на относительно небольших территориях, этот фактор имеет локальное значение (Sundell *et al.*, 2004; Krebs *et al.*, 2013; Selonen *et al.*, 2019). По мнению ряда исследователей (Ims, Andreassen, 2000; Korpimäki *et al.*, 2005), пространственную синхронность

**Таблица 1.** Характеристика использованных материалов

№	Локалитет	Координаты (с.ш., в.д.)	Годы	Объем лов.-сут.	Число особей	Индекс обилия
1	Якша*	61°49', 56°51'	1965–2018	33800	2135	6.3 ± 0.7
2	Гаревка*	62°03', 58°28'	1984–2018	15480	1292	8.3 ± 0.9
3	Ильч	62°38', 58°54'	2007–2018	15950	2553	16.0 ± 28
4	Дань	61°27', 51°42'	1981–1988	44380	683	1.5 ± 0.2
5	Раменье	60°49', 42°18'	1972–1983	49375	586	1.2 ± 0.1
6	Пижма	64°52', 51°28'	2012–2018	2400	203	8.1 ± 3.2
7	Пинега*	64°41', 43°23'	1978–2018	15100	598	4.0 ± 0.4
8	Поморье	65°20', 41°06'	2007–2018	2900	256	8.8 ± 1.1
9	Солозеро	64°16', 38°47'	1965–1970	52758	2248	4.3 ± 1.7

Примечание. \* Локалитеты с наиболее длинными временными рядами численности красной полевки, использованные как базовые для сравнения двух периодов.

у мелких млекопитающих на довольно большой территории могут вызвать хищные птицы, ведущие кочевой образ жизни. Вместе с тем, долговременные исследования леммингов в Канадской Арктике не согласуются с данной гипотезой (Krebs *et al.*, 2002).

Оценить роль какого-то отдельного фактора часто оказывается довольно сложно. Пространственная синхронность в большинстве случаев является следствием взаимодействия различных механизмов и может при этом сильно варьировать у разных видов (Eberhart-Phillips *et al.*, 2015; Pardikes *et al.*, 2017).

Мелкие млекопитающие являются классическими модельными видами для анализа пространственных закономерностей динамики популяций (Fay *et al.*, 2020), поскольку колебания их численности характеризуются значительным варьированием во времени и пространстве. Вместе с тем, определенным препятствием для этого является незначительное число долговременных мониторинговых исследований, а также охват ими больших территорий.

Красная полевка является многочисленным видом мелких млекопитающих на Европейском Севере (Бобрецов, Куприянова, 2002). По динамике популяций этого вида в других регионах имеется достаточно много работ (Чернявский, Лазуткин, 2004; Boonstra, Krebs, 2012; Ивантер, Моисеева, 2015; Ермаков, Моролдоев, 2017 и др.). Однако в большинстве их аспекты пространственной синхронизации динамики численности практически не рассматриваются. В настоящей работе проанализированы имеющиеся материалы по численности красной полевки и сопряженности динамики ее популяций между разными локалитетами Республики Коми и Архангельской области. Рассматриваются также особенности пространственных изменений обилия вида в раз-

ные промежутки времени. Последнему аспекту уделено мало внимания в литературе (Koenig, Liebold, 2016), хотя его актуальность в связи с глобальными изменениями климата не вызывает сомнений.

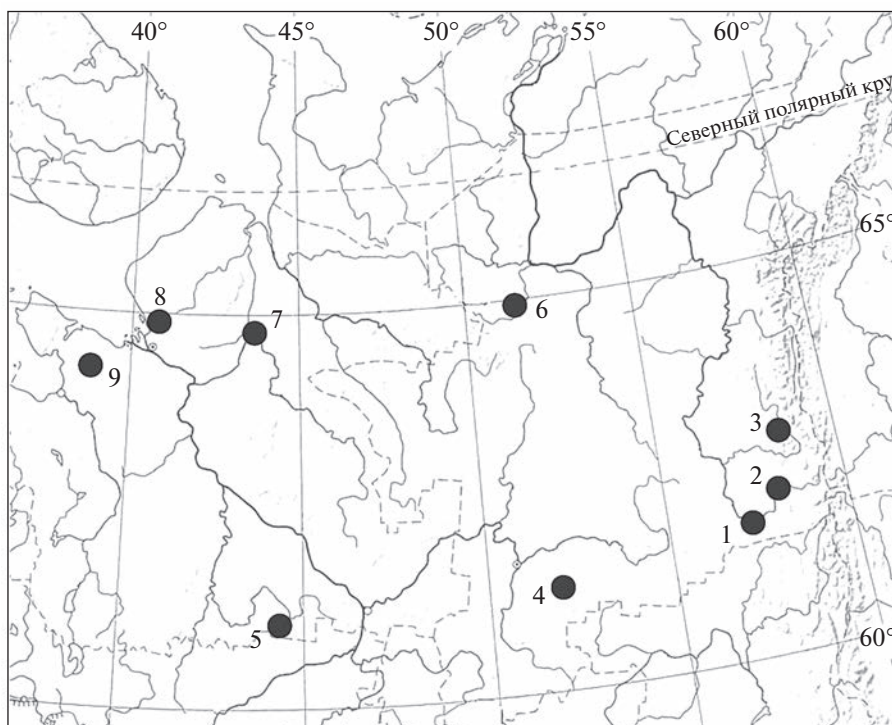
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки пространственной синхронности динамики популяций красной полевки на таежном Европейском Севере использованы временные ряды численности животных из девяти локалитетов Республики Коми и Архангельской области (рис. 1). Минимальное расстояние между ними составило 88 км, максимальное – 947 км. Длительность учетов полевков в локалитетах варьировала от 6 до 54 лет (табл. 1). Наиболее длинные временные ряды получены для Якши (54 года), Пинеги (41 год) и Гаревки (35 лет). Они стали базовыми для оценки сопряженности динамики популяций данного вида в разные периоды времени. Все временные ряды были разделены на два периода, отличающихся друг от друга разной степенью синхронизации локальных изменений численности животных. В первый период (1965–2006 гг.) сравнивали локалитеты Якша, Гаревка, Дань, Раменье, Пинега и Солозеро, во второй период (2007–2018 гг.) – Якша, Гаревка, Пинега, Ильч, Пижма и Поморье.

Численность полевков оценивали с помощью метода ловушко-линий. На каждом стационаре в ельниках выставляли в линии определенное число давилок (чаще всего по 100 шт.) через 5 м на 2–4 сут. В качестве приманки использовали корочки хлеба, смоченные в растительном масле. За единицу учета принимали число животных, отловленных на 100 ловушко-суток (ос. на 100 лов.-сут).

При этом оценку численности красной полевки локалитета формировали как среднюю частных значений обилия животных, оптимальных для данного вида местообитаний. Динамика чис-





**Рис. 1.** Локалитеты сбора данных по численности красной полевки. 1 – Якша, 2 – Гаревка, 3 – Ильч, 4 – Дань (Бобрецов, Куприянова, 2002), 5 – Раменье (Бобрецов, Куприянова, 2002), 6 – Пижма, 7 – Пинега, 8 – Поморье, 9 – Солозеро (Губарь, 1976).

ленности в различных биотопах может различаться, поэтому усреднение данных позволяет получить общий тренд изменения обилия в локалитете.

Пространственная синхронность динамики численности животных может быть измерена разными способами. Самый простой и наиболее распространенный подход заключается в использовании корреляции между парами пространственно разбросанных временных рядов локального обилия (Liebhold *et al.*, 2012). Для этого нами была использована ранговая непараметрическая корреляция Спирмена ( $r_s$ ), которая не требует оценки типа распределения. Для характеристики изменчивости численности популяции применяли S-индекс, который представляет собой стандартное отклонение десятичных логарифмов показателей относительного обилия. На полевках Фенноскандии было показано, что популяции со значением индекса 0.5 и выше демонстрируют 3–5-летние циклы численности (Henttonen *et al.*, 1985). Однако разделение по этому индексу на циклические и нециклические популяции является искусственным (Sandell *et al.*, 1991). Тем не менее, S-индекс позволяет обнаруживать популяции со значимым перепадом обилия. Это, в свою очередь, дает возможность оценить синхронность проявления пиков и депрессий. Все вычисления и построения диаграмм проводили в программном пакете Statistica 6.0 for Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Красная полевка доминирует среди лесных полевков предгорий Северного Урала и северной равнинной тайги Европейского Севера. Ее доля превышает 69% в уловах лесных полевков. В средней тайге она уступает по численности рыжей полевки (*Myodes glareolus* Schreb.) Доля красной полевки в этой подзоне тайги менее 32% в уловах. При этом везде численность обоих видов изменялась по годам согласованно.

Сравнение динамики численности красной полевки в локалитетах Якша и Пинега (самые длинные временные ряды и географически удаленные друг от друга) показало, что синхронность изменений показателей обилия данного вида в них различалась в разные периоды времени. В период с 1965 по 2006 гг. были отмечены асинхронные колебания численности полевков не только между Якшей и Пинегой, но и между другими локалитетами (рис. 2). Достоверные согласованные изменения показателей обилия данного вида были обнаружены лишь между двумя ближайшими локалитетами Якшей и Гаревкой ( $r_s = 0.72$ ;  $p < 0.001$ ), расположенных друг от друга на расстоянии 88 км. С увеличением расстояния значения показателя корреляции Спирмена уменьшались (рис. 3). Если между Якшей и Данью (276 км) он составлял 0.52 ( $p > 0.05$ ), то свыше 500 км снижался до 0.1 и



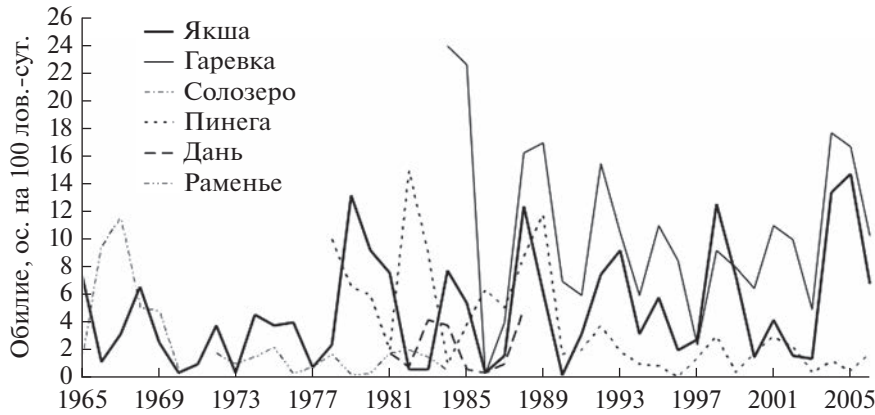


Рис. 2. Динамика численности красной полевки в разных локалитетах Европейского Севера в период с 1965 по 2006 гг.

ниже. Связь между показателями корреляции с расстоянием в целом оказалась статистически достоверной ( $r_s = -0.93$ ;  $p < 0.001$ ).

В последние 12 лет (2007–2018 гг.) несогласованные колебания численности красной полевки между отдельными локалитетами сменились на огромном пространстве Европейского Севера синхронными изменениями (рис. 4). В этот период везде фазы депрессий (2007, 2011, 2014 и 2018) и пиков (2009, 2013 гг.) совпадали. Показатели корреляции были в большинстве высокими (от 0.66 и выше при  $p < 0.01$ ). Несколько ниже оказалось значение связи лишь между Пинегой и Поморьем (0.60,  $p < 0.05$ ), что объясняется некоторыми изменениями численности в 2015–2017 гг. В эти годы наблюдалось некоторое несовпадение фаз цикла у красной полевки в пространстве. Так, в 2015 г. во всех локалитетах отмечен рост показателей обилия кроме Поморья, где произошла депрессия. На следующий год на фоне дальнейшего

повышения численности на Ильче и Пинеге зафиксированы пики обилия полевков. Однако в 2018 г. повсеместно произошел спад показателей обилия.

Связь между показателями корреляции и географическим расстоянием в период с 2007 по 2018 гг. была очень слабой и статистически незначимой ( $r_s = 0.14$ ;  $p > 0.05$  (рис. 5)). Так, значение коэффициента корреляции между динамикой обилия в Якше и на Гаревке (88 км) равнялось 0.85 ( $p < 0.001$ ), между Якшей и Поморьем (874 км) — 0.83 ( $p < 0.001$ ), между Якшей и Пижмой (436 км) — 0.96 ( $p < 0.001$ ). Даже в случае максимального удаления локалитетов друг от друга (Гаревка–Поморье, более 900 км) связь между изменениями численности была довольно высокой ( $r_s = 0.86$ ;  $p < 0.001$ ).

В многолетнем аспекте определенные изменения произошли в динамике популяции красной полевки на Пинеге. С начала наблюдений (1978) по 1990 гг. численность животных составляла в среднем 6.6 (от 1.0 до 15) ос. на 100 лов.-сут. С 1991 по 2006 гг. обилие животных снизилось до 1.6 (от 0.4 до 3.8) ос. на 100 лов.-сут. Для этого периода характерны глубокие депрессии и незначительные по силе пики. Однако в последние годы наблюдается небольшой рост численности: годы повышения и понижения показателей обилия отчетливо регистрировались.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследований показали, что пространственная синхронность колебаний численности красной полевки на Европейском Севере значительно изменялась во времени. До 2007 г. достоверные согласованные изменения численности красной полевки наблюдались лишь на расстоянии не более 90 км. С увеличением расстояния между популяциями степень синхронизации снижалась, и колебания принимали асинхронный характер.

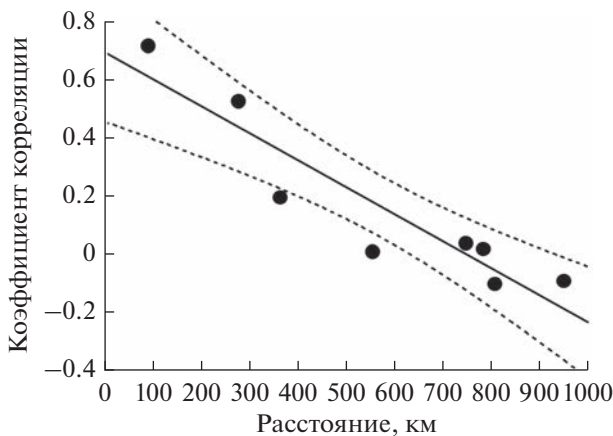


Рис. 3. Зависимость степени синхронности динамики численности красной полевки от расстояния между локалитетами в период с 1965 по 2006 гг.

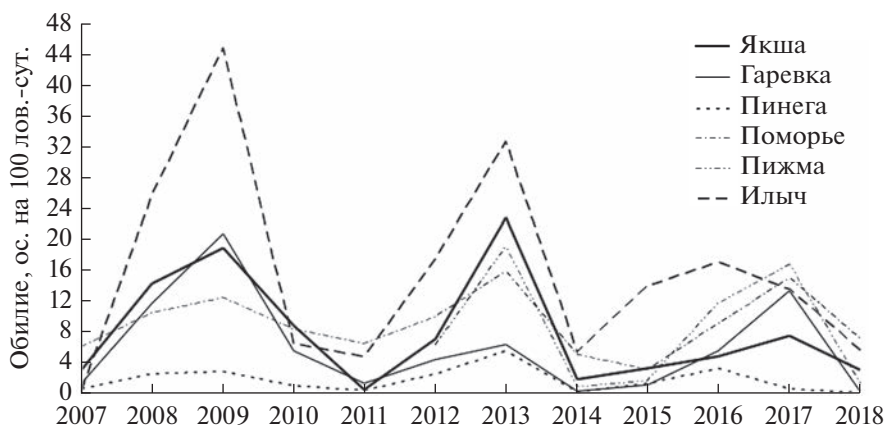


Рис. 4. Динамика численности красной полевки в разных локалитетах Европейского Севера в период с 2007 по 2018 гг.

Данная закономерность была подтверждена во многих работах (Ranta *et al.*, 1997; Liebhold *et al.*, 2004). Специальные исследования по рыжей полевке в бореальных лесах Норвегии вдоль 256-километрового профиля, на котором через одинаковое расстояние были расположены 31 пунктов учетов животных, показали полное отсутствие синхронности между самыми отдаленными популяциями. Статистически значимые корреляции были обнаружены лишь на расстоянии 30–40 км (Steen *et al.*, 1996). У рыжей полевки в Финляндии сильная корреляция между колебаниями численности животных наблюдалась на расстоянии до 90 км (Huitu *et al.*, 2003). В канадских бореальных лесах синхронизация в динамике численности у оленьего хомячка (*Peromyscus maniculatus* Vigors) отмечена на небольшом расстоянии (менее 50 км), у полевки Гаппера (*Myodes gapperi* Wagner) – на более значительном расстоянии, но не превышающим 200 км (Bowman *et al.*, 2008). Отсутствие единого ритма колебаний численности лесных полевок отмечали на Северо-Востоке Сибири. Более или менее сходной оказалась динамика популяций, удаленных друг от друга на расстояние не более 200–250 км (Чернявский, Лазуткин, 2004). В Карелии у фоновых видов полевок между двумя стационарами, расположенных в 150 км друг от друга, отсутствовала согласованность в динамике их численности (Кутенков, 2006). В Центральной Европе у обыкновенной полевки (*Microtus arvalis* Pall.) синхронизация в динамике локальных популяций наблюдалась на расстоянии от 150 км (Gouveia *et al.*, 2016) до 300 км (Fay *et al.*, 2020).

С 2007 г. динамика популяций красной полевки на обширной территории Европейского Севера стала согласованной. Пики и депрессии численности вида в разных локалитетах отмечались в одни и те же годы вне зависимости от расстояния. Сходные по силе значения коэффициента корреляции Спирмена (более 0.80) отмечены как при

минимальной, так и при максимальной географической дистанции.

На значительные различия в сопряженности изменений обилия красной полевки в разные периоды времени указывают длинные ряды наблюдений в локалитетах Якша и Пинега, удаленных друг от друга на 745 км. В первый период показатель коэффициента корреляции Спирмена был очень низким и оставлял только 0.05 ( $p > 0.05$ ), во второй период он увеличился до 0.76 ( $p < 0.001$ ).

Литературные данные свидетельствуют, что временные изменения степени пространственной синхронности в динамике численности животных – явление довольно распространённое и характерно для многих таксонов. При этом отмечаются разные тренды в таких изменениях. Так, у 49 видов североамериканских птиц за 50-летний период пространственная сопряженность колебаний обилия увеличилась на 63–69% (Koenig, Liebhold, 2016). У американского зайца (*Lepus*

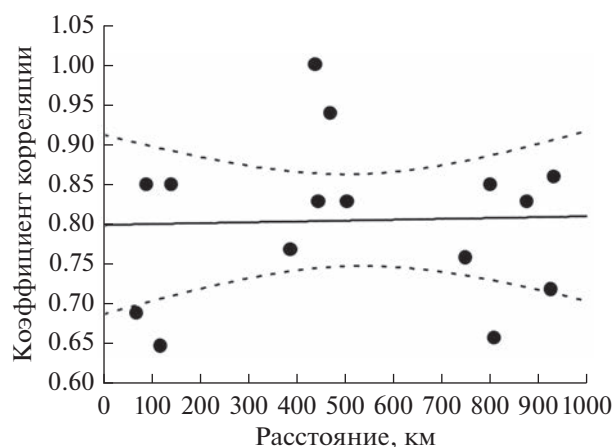


Рис. 5. Зависимость степени синхронности динамики численности красной полевки от расстояния между локалитетами в период с 2007 по 2018 гг.

*americanus* Erxleben) сильные синхронные изменения численности на огромной территории с 1970 по 1995 гг. нарушились, и с конца 90-х годов прошлого века по 2012 г. наблюдались асинхронные изменения (Krebs *et al.*, 2013). Подобные тенденции зафиксированы у леммингов и полевков в Фенноскандии (Henden *et al.*, 2009; Elmhagen *et al.*, 2011; Катаев, 2016), а также во многих районах Северной Европы (Cornulier *et al.*, 2013).

Пространственная синхронность тесно связана с типом динамики популяций. Циклические колебания численности у животных способствуют увеличению пространственной сопряженности динамики локальных популяций (Henden *et al.*, 2009; Elmhagen *et al.*, 2011; Haynes *et al.*, 2019). Ослабление цикличности приводит к уменьшению или исчезновению пространственной сопряженности, что и было продемонстрировано на примере полевков и леммингов Северной Европы. В тоже время, популяционная динамика может сильно меняться во времени. Так, для норвежского лемминга (*Lemmus lemmus* L.) показано, что периоды с регулярными циклами прерываются периодами с постоянной низкой плотностью в течение десятилетия или более (Ehrich *et al.*, 2020). Видимо, подобная ситуация отмечена в Пинежском заповеднике (Сивков, 2012).

Для красной полевки Европейского Севера России характерны циклические колебания численности (Семенов, 1982; Окулова и др., 2004; Бобрецов, Куприянова, 2002). Продолжительность циклов составляет от 3 до 5 лет. Значения S-индекса для временных рядов практически всех локалитетов превышало 0.5. Меньше этого значения был этот показатель только для Поморья. Здесь отсутствовали глубокие депрессии, следовательно, и амплитуда колебаний обилия была относительно незначительной. Однако в данном случае совпадение пиков и депрессий можно рассматривать как синхронность динамики. Кроме того, рассчитанные показатели данного индекса для наиболее длинных временных рядов численности красной полевки (Якша, Гаревка, Пинега) мало изменялись в разные периоды времени. Так, для Якши в первый период наблюдений (1965–2006 гг.) они составляли 0.51, во второй (2007–2018 гг.) – 0.52, для Пинеги, соответственно, 0.51 и 0.58. Таким образом, цикличность популяций в регионе сохранялась во многих локалитетах в течение всего периода исследований.

Численность животных и ее изменения является результатом взаимодействия внутривидовых факторов с изменчивыми условиями внешней среды (Шилов, 1991; Radchuk *et al.*, 2016; Oli, 2019). Воздействие внешних факторов проявляется как на местном, так и региональном уровнях. В первом случае они опосредованы условиями местобитаний, поэтому локальная динамика в разных

биотопах может различаться (Zub *et al.*, 2012). Во втором случае региональные различия в климатических и биотопических условиях обуславливают несинхронные колебания численности между различными локалитетами. В свое время это показал Н.П. Наумов (Наумов, 1963) на примере обыкновенной белки (*Sciurus vulgaris*) и Н.К. Стенсет с соавт. (Stenseth *et al.*, 1996) на примере красно-серой полевки (*Myodes rufocanus* Sundevall) Хоккайдо.

Большое значение в формировании устойчивых циклов имеют климатические факторы (Yan *et al.*, 2013). Они прямо и опосредованно влияют на соотношение рождаемости и смертности и, таким образом, модифицируют динамику численности животных. В Карелии, например, погодные условия на 80% определяют обилие перезимовавших рыжих полевков в июне (Ивантер, Жигальский, 2000). Погодные факторы определяют и возможность достижения пиков, и вызывают депрессии. Известно, что в некоторые годы депрессии и пики численности ряда видов грызунов охватывают огромные географические регионы (Ивантер, 2008; Емельянова, Оботуров, 2017). Очевидно, что в этом случае сопряженность хода численности определяется совпадением динамики климатических процессов на всем пространстве, где обнаружена синхронность.

В последнее время роль изменчивости климата для объяснения циклических колебаний получает все большее внимание и поддержку (Bierman *et al.*, 2006; Krebs, 2013; Hansen *et al.*, 2020). Ослабление и исчезновение популяционных циклов и пространственной синхронизации у мелких грызунов в Фенноскандии объясняется изменением зимних условий (частые оттепели, изменение плотности снежного покрова) в результате трансформации климата (Kausrud *et al.*, 2008; Gilg *et al.*, 2009).

Современные изменения климата и повышение температуры воздуха сопровождаются все более согласованными паттернами изменчивости климата, что может усилить синхронизацию динамики населения в большом пространственном масштабе (Post, Forchhammer, 2004; Koenig, Liebhold, 2016; Pomara, Zuckerberg, 2017; Hansen *et al.*, 2020). Так, возрастание во времени пространственной сопряженности численности североамериканских птиц связано с параллельным увеличением пространственной автокорреляции температуры воздуха (Koenig, Liebhold, 2016). В условиях глобального потепления климата зимние условия могут быть ключевым фактором, влияющим на циклическую динамику популяций арктических животных (Domine *et al.*, 2018).

На территории Европейского Севера за последние 50 лет произошло достоверное увеличение среднегодовой температуры воздуха. Эти показатели повысились как на северо-западе (Архангельск) на 2.1°C (Радцевич и др., 2017), так и на юго-во-

стоке Республики Коми – на  $1.5^{\circ}\text{C}$  (Бобрецов и др., 2017). Скорость изменения температуры воздуха в последнем случае за период с 1968 по 2016 гг. составила  $0.23^{\circ}\text{C}/10$  лет ( $t = 4.05$ ,  $p < 0.01$ ). Наибольший вклад в среднегодовое повышение температуры воздуха вносят зима ( $0.34^{\circ}\text{C}/10$  лет) и весна ( $0.30^{\circ}\text{C}/10$  лет). Однако теплые зимы на севере Русской равнины в отличие от Фенноскандии не привели к нарушению циклов фоновых видов грызунов.

Усиление синхронности в динамике численности популяций красной полевки между разными локалитетами Европейского Севера с 2007 г. произошло на фоне увеличения согласованности температурных колебаний на территории региона (Чередыко и др., 2020) и увеличения числа погодных аномалий (Голицын, Васильев, 2019; Лемешко, Евстигнеев, 2019). Экстремальные климатические явления могут вызвать серьезные демографические катастрофы у животных на большой территории и, таким образом, синхронизировать население на фазе депрессии. Следует отметить, что сопряженность в изменениях обилия красной полевки на Европейском Севере началась в 2007 г. именно с фазы депрессии численности полевков.

В условиях глобального изменения климата влияние эффектов Морана на пространственную синхронизацию динамики численности животных возрастает (Hansen *et al.*, 2020). Однако часто интерпретация их бывает сильно затруднена, так как разные виды реагируют на колебания климата и погоды посредством сложного взаимодействия между демографическими особенностями популяции и комбинациями факторов окружающей среды (Knappe, de Valpine, 2011).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За более чем полувековой период в динамике популяций красной полевки на Европейском Севере России отмечены значительные изменения в сопряженности колебаний численности между локальными популяциями. С 1965 по 2006 гг. на всей территории региона наблюдали асинхронную динамику популяций данного вида. Она возрастала с увеличением географического расстояния между локалитетами. С 2007 г. асинхронные изменения обилия красной полевки сменились синхронными.

Усиление синхронизации динамики численности данного вида в 2000-х гг. на Европейском Севере России произошло на фоне увеличения сопряженности температурных показателей между разными локалитетами региона и увеличения числа погодных аномалий. Началом ее послужила депрессия численности красной полевки в 2007 г. Однако выявить конкретные механизмы воздействия погодных и климатических факторов на обилие полевков пока не представляется

возможным. Теоретические и эмпирические исследования влияния глобального изменения климата на пространственную популяционную синхронность динамики численности животных все еще находятся на низком уровне.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность И.Ф. Куприяновой за представленные материалы по численности красной полевки по стационару Илыч (Печоро-Илычский заповедник).

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания “Распространение, систематика и пространственная организация фауны и населения животных таежных и тундровых ландшафтов и экосистем европейского северо-востока России” (АААА-А17-117112850235-2).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бобрецов А.В., Куприянова И.Ф. Динамика популяций лесных полевков (*Clethrionomys*, Rodentia) на Европейском Севере // Экология. 2002. № 3. С. 220–227.
- Бобрецов А.В., Тертица Т.К., Теплова В.П. Влияние изменения климата на фенологию растений и животных юго-восточной части республики Коми (Печоро-Илычский биосферный заповедник) // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. 2017. Т. 28. № 4. С. 74–93.
- Голицын Г.С., Васильев А.А. Изменение климата и его влияние на частоту экстремальных гидрометеорологических явлений // Метеорология и гидрология. 2019. № 11. С. 9–12.
- Губарь Ю.П. Численность лесных полевков и некоторые стороны их взаимоотношений // Фауна и экология животных. М., 1976. Ч. 2. С. 60–103.
- Емельянова Л.Г., Оботуров А.С. Пространственно-временная структура цикла динамики численности норвежского лемминга (*Lemmus lemmus* L.) в Фенноскандии // Arctic Envir. Res. 2017. Т. 17. № 4. С. 321–335.
- Ердаков Л.Н., Моролдоев И.В. Изменчивость многолетней цикличности в динамике численности красной полевки (*Myodes rutilus* (Pallas, 1779)) // Принципы экологии. 2017. № 4. С. 26–36.
- Ивантер Э.В. К популяционной организации политипического вида (на примере рыжей полевки – *Clethrionomys glareolus* Shreb) // Учен. зап. Петрозавод. гос. ун-та. Серия: естественные и технические науки. 2008. № 1. С. 39–60.
- Ивантер Э.В., Жигальский О.А. Опыт популяционного анализа механизмов динамики численности рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) на северном пределе ареала // Зоол. журн. 2000. Т. 79. № 8. С. 976–989.
- Ивантер Э.В., Мусеева Е.А. К экологии красной полевки (*Clethrionomys rutilus* Pall.) на юго-западной периферии ареала // Труды Карел. научного центра РАН. 2015. № 1. С. 37–47.
- Исаев А.С., Пальникова Е.Н., Суховольский В.Г., Тарасова О.В. Динамика численности лесных насекомых-

- филлофагов: модели и прогнозы. Москва: Товарищество науч. изд. КМК, 2015. 261 с.
- Катаев Г.Д. Долговременный (1936–2016 гг.) мониторинг видового состава и численности населения мелких млекопитающих северо-таежной Лапландии // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 2016. Т. 121. Вып. 6. С. 3–17.
- Кутенков А.П. Тридцать лет работы стационаров по учету мелких млекопитающих в заповеднике “Кивач”: основные итоги и обсуждение результатов // Тр. гос. природ. заповедника “Кивач”. Петрозаводск, 2006. Вып. 3. С. 80–106.
- Лемешко Н.А., Евстигнеев В.П. Современные изменения экстремальных значений приземной температуры воздуха // Современные проблемы гидрометеорологии и устойчивого развития Российской Федерации. СПб., 2019. С. 118–119.
- Наумов Н.П. Экология животных. М.: Высшая школа, 1963. 618 с.
- Окулова Н.М., Куприянова И.Ф., Сивков А.В. Динамика численности мелких млекопитающих. Сообщение 2. Лесные полевки // Териологические исследования. 2004. Вып. 5. С. 33–47.
- Радецкич Г.А., Черемисинов А.А., Черемисинов А.Ю. Исследование тенденций изменения климата на европейской части Российской Федерации за длительный период // Вестник Воронежского гос. аграрного университета. 2017. № 4(55). С. 30–40.
- Семенов В.Б. К методике прогнозирования численности горностая на севере Европейской части СССР // Охотничье-промысловые ресурсы и их использование. Киров: Волго-Вятское книжн. изд-во, 1982. С. 115–121.
- Сивков А.В. Динамика численности мелких млекопитающих заповедника “Пинежский” // Многолетняя динамика компонентов экосистем природного комплекса Пинежского заповедника и сопредельных территорий. Архангельск, 2012. С. 99–103.
- Шилов И.А. Динамика популяций и популяционные циклы // Структура популяций у млекопитающих. М.: Наука, 1991. С. 151–172.
- Чередыко Н.Н., Тартаковский В.А., Волков Ю.В., Крутиков В.А. Трансформация пространственной структуры поля приземной температуры Северного полушария // Известия РАН. Сер. географ. 2020. № 1. С. 1–9.
- Чернявский Ф.Б., Лазуткин А.Н. Циклы леммингов и полевок на Севере. Магадан: ИБПС ДВО РАН, 2004. 150 с.
- Bierman S.M., Fairbairn J.P., Petty S.J., Elston D.A., Tidhar D., Lambin X. Changes over time in the spatiotemporal dynamics of cyclic populations of field voles (*Microtus agrestis* L.) // Am. Nat. 2006. V. 167. № 4. P. 583–590.
- Boonstra R., Krebs C.J. Population dynamics of red-backed voles (*Myodes*) in North America // Oecologia. 2012. V. 168. P. 601–620.
- Bowman J., Phoenix R.D., Sugar A., Dawson F.N., Holborn G. Spatial and temporal dynamics of small mammals at a regional scale in Canadian boreal forest // J. Mammal. 2008. V. 89. № 2. P. 381–387.
- Cornulier T., Yoccoz N.G., Bretagnolle V., Brommer J.E., Butet A., Ecke F., Elston D.A., Framstad E., Henttonen H., Hörnfeldt B., Huitu O., Imholt C., Ims R.A., Jacob, Bogumiła Jędrzejewska, Alexandre Millon, Steve J Petty, Hannu Pietiäinen J., Tkadlec E., Zub K., Lambin X. Europe-wide dampening of population cycles in keystone herbivores // Science. 2013. V. 340. № 6128. P. 63–66.
- Domine F., Gauthier G., Vionnet V., Fauteux D., Dumont M., Barrere M. Snow physical properties may be a significant determinant of lemming population dynamics in the high Arctic // Arctic Science. 2018. V. 4. № 4. P. 813–826.
- Eberhart-Phillips L.J., Hudgens B.R., Colwell M.A. Spatial synchrony of a threatened shorebird: Regional roles of climate, dispersal and management // Bird Conserv. Int. 2015. V. 26. № 1. P. 119–135.
- Ehrich D., Schmidt N.M., Gauthier G., Alisauskas R., Angerbjörn A., Clark K., Ecke F., Eide N.E., Framstad E., Frandsen J., Franke A., Gilg O., Giroux M.-A., Henttonen H., Hörnfeldt B., Ims R.A., Kataev G.D., Kharitonov S.P., Killengreen S.T., Krebs C.J., Lanctot R.B., Lecomte N., Menyushina I.E., Morris D.W., Morrisson G., Oksanen L., Oksanen T., Olofsson J., Pokrovsky I.G., Popov I.Y., Reid D., Roth J.D., Saalfeld S.T., Samelius G., Sittler B., Sleptsov S.M., Smith P.A., Sokolov A.A., Sokolova N.A., Soloviev M.Y., Solovyeva D.V. Documenting lemming population change in the Arctic: Can we detect trends? // Ambio. 2020. V. 49. № 3. P. 786–800.
- Elmhagen B., Hellström P., Angerbjörn A., Kindberg, J. Changes in vole and lemming fluctuations in northern Sweden 1960–2008 revealed by fox dynamics // Ann. Zool. Fennici. 2011. V. 48. № 3. P. 167–179.
- Fay R., Michler S., Laesser J., Jeanmonod J., Schaub M. Large-Scale vole population synchrony in Central Europe revealed by kestrel breeding performance // Front. Ecol. Evol. 2020. V. 7. P. 512.
- Gilg O., Sittler B., Hanski I. Climate change and cyclic predator-prey population dynamics in the high Arctic // Global Change Biol. 2009. V. 15. № 11. P. 2634–2652.
- Gouveia A.R., Bjørnstad O.N., Tkadlec E. Dissecting geographic variation in population synchrony using the common vole in central Europe as a test bed // Ecol. Evol. 2016. V. 6. № 1 P. 212–218.
- Hansen B.B., Grøtan V., Herfindal I., Lee A.M. The Moran effect revisited: spatial population synchrony under global warming // Ecography. 2020. V. 42. № 11. P. 1591–1602.
- Hansen B.B., Pedersen Å.Ø., Peeters B., Le Moullec M., Albon S.D., Herfindal I., Sæther B.-E., Grøtan V., Aanes R. Spatial heterogeneity in climate change effects decouples the long-term dynamics of wild reindeer populations in the high Arctic // Global Change Biol. 2019. V. 25. № 11. P. 3656–3668.
- Haynes K.J., Walter J.A., Liebhold A.M. Population spatial-synchrony enhanced by periodicity and lowdetuning with environmental forcing // Proc. of the Royal Society B: Biol. Sci. 2019. V. 286. № 1903. P. 20182828.
- Henden J.A., Ims R.A., Yoccoz N.G. Nonstationary spatio-temporal small rodent dynamics: evidence from long-

- term Norwegian fox bounty data // *J. Anim. Ecol.* 2009. V. 78. № 3. P. 636–645.
- Henttonen H., McGuire A.D., Hansson L. Comparisons of amplitudes and frequencies (spectral analyses) of density variations in long-term data sets of *Clethrionomys* species // *Ann. Zool. Fennici.* 1985. V. 22. № 3. P. 221–227.
- Huitu O., Norrdahl K., Korpimäki E. Landscape effects on temporal and spatial properties of vole population fluctuations // *Oecologia.* 2003. V. 135. № 2. P. 209–220.
- Ims R.A., Andreassen H.P. Spatial synchronization of vole population dynamics by predatory birds // *Nature.* 2000. V. 408. № 6809. P. 194–196.
- Kausrud K.L., Mysterud A., Steen H., Vik J.O., Østbye E., Cazelles B., Framstad E., Eikeset A.M., Mysterud I., Solhøy T., Stenseth N.C. Linking climate change to lemming cycles // *Nature.* 2008. V. 456. № 7218. P. 93–97.
- Knape J., de Valpine P. Effects of weather and climate on the dynamics of animal population time series // *Proceedings of the Royal Society B: Biol. Sci.* 2011. V. 278. № 1708. P. 985–992.
- Koenig W.D., Liebhold A.M. Temporally increasing spatial synchrony of North American temperature and bird populations // *Nat. Clim. Chang.* 2016. V. 6. № 6. P. 614–617.
- Korpimäki E., Norrdahl K., Huitu O., Klemola T. Predator-induced synchrony in population oscillations of coexisting small mammal species // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2005. V. 272. № 1559. P. 193–202.
- Krebs C.J., Kenney A.J., Gilbert S., Danell K., Angerbjörn A., Erlinge S., Bromley R.G., Shank C., Carriere S. Synchrony in lemming and vole populations in the Canadian Arctic // *Can. J. Zool.* 2002. V. 80. № 8. P. 1323–1333.
- Krebs C.J., Kielland K., Bryant J.P., O'Donoghue M., Doyle F., McIntyre C., DiFolco D., Berg N., Carriere S., Boonstra R., Boutin S., Kenney A.J., Reid D.G., Bodony K., Putera J., Timm H.K., Burke T. Synchrony in the showshoe hare (*Lepus americanus*) cycle in northwestern North America, 1970–2012 // *Can. J. Zool.* 2013. V. 91. № 8. P. 562–572.
- Liebhold A., Koenig W.D., Bjørnstad O.N. Spatial synchrony in population dynamics // *Annu. Rev. Ecol. Systemat.* 2004. V. 35. № 1. P. 467–490.
- Liebhold A.M., Haynes K.J., Bjørnstad O.N. Spatial synchrony of insect outbreaks // *Insect Outbreaks Revisited*. Ed. (s). P. Barbosa, D.K. Letourneau, A.A. Agrawal. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. P. 113–125.
- Lindström J., Ranta E., Kokko H., Lundberg P., Kaitala V. From arctic lemmings to adaptive dynamics: Charles Elton's legacy in population ecology // *Biol. Rev.* 2001. V. 76. № 1. P. 129–158.
- Oli M.K. Population cycles in voles and lemmings: state of the science and future directions // *Mam. Rev.* 2019. V. 49. № 3. P. 226–239.
- Pardikes N.A., Harrison J.G., Shapiro A.M., Forister M.L. Synchronous population dynamics in California butterflies explained by climatic forcing // *R. Soc. Open Sci.* 2017. V. 4 № 7. P. 170190.
- Pomara L.Y., Zuckerberg B. Climate variability drives population cycling and synchrony // *Diversity and Distributions.* 2017. V. 23. № 4. P. 421–434.
- Post E., Forchhammer M.C. Synchronization of animal population dynamics by large-scale climate // *Nature.* 2002. V. 420. № 6912. P. 168–171.
- Post E., Forchhammer M.C. Spatial synchrony of local populations has increased in association with the recent Northern Hemisphere climate trend // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 25. P. 9286–9290.
- Radchuk V., Ims R.A., Andreassen H.P. From individuals to population cycles: the role of extrinsic and intrinsic factors in rodent populations // *Ecology.* 2016. V. 97. № 3. P. 720–732.
- Ranta E., Kaitala V., Lindstrom J. Spatially autocorrelated disturbances and patterns in population synchrony // *Proc. R. Soc. B.* 1999. V. 266. № 1431. P. 1851–1856.
- Ranta E., Kaitala V., Lundberg P. The spatial dimension in population fluctuations // *Science.* 1997. V. 278. № 5343. 1621–1623.
- Saether B.-E., Engen S., Grotan V., Fiedler W., Matthysen E., Visser M.E., Wright J., Møller A.P., Adriaensen F., van Balen H., Balmer D., Mainwaring M.C., McCleery R.H., Pampus M., Winkel W. The extended Moran effect and large-scale synchronous fluctuations in the size of great tit and blue tit populations // *J. Anim. Ecol.* 2007. V. 76. № 2. P. 315–325.
- Sandell M., Agrell J., Erlinge S., Nelson J. Adult philopatry and dispersal in the field vole *Microtus agrestis* // *Oecologia.* 1991. V. 86. № 2. P. 153–158.
- Selonen V., Remm J., Hanski I.K., Henttonen H., Huitu O., Jokinen M., Korpimäki E., Makela A., Sulkava R., Wistbacka R. Population fluctuations and spatial synchrony in an arboreal rodent // *Oecologia.* 2019. V. 191. № 4. P. 861–871.
- Sheppard L.W., Bell J.R., Harrington R., Reuman D.C. Changes in large-scale climate alter spatial synchrony of aphid pests // *Nat. Clim. Chang.* 2016. V. 6. № 6. P. 610–613.
- Steen H., Ims R.A., Sonerud G.A. Spatial and temporal patterns of small-rodent population dynamics at a regional scale // *Ecology.* 1996. V. 77. № 8. P. 2365–2372.
- Stenseth N.C., Bjørnstad O.N., Saitoh T. A gradient from stable to cyclic populations of *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido, Japan // *Proc. R. Soc. B.* 1996. V. 263. № 1374. P. 1117–1126.
- Sundell J., Huitu O., Henttonen H., Kaikusalo A., Korpimäki E., Pietiäinen H., Saurola P., Hanski I. Large-scale spatial dynamics of vole populations in Finland revealed by the breeding success of vole-eating avian predators // *J. Anim. Ecol.* 2004. V. 73. № 1. P. 167–178.
- Yan C., Stenseth N.C., Krebs C.J., Zhang Z. Linking climate change to population cycles of hares and lynx // *Glob. Change Biol.* 2013. V. 19. № 11. P. 3263–3271.
- Zub K., Jędrzejewska B., Jędrzejewski W., Bartoń K.A. Voles and shrews and non-cyclic mice in a marginal grassland within European temperate forest // *Acta Theriol.* 2012. V. 57. № 3. P. 205–216.



## **Spatially Temporal Synchronicity of the Population Dynamics of the Northern Red-Backed Vole (*Myodes rutilus* Pall.) in Northern European Russia**

**A. V. Bobretsov<sup>1, 2, #</sup>, A. A. Kalinin<sup>3</sup>, L. Ya. Saburova<sup>4</sup>, and A. V. Sivkov<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Pechoro-Ilych State Nature Reserve, Lanina str., 8, Yaksha, 169436 Russia

<sup>2</sup> Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the RAS, ul. Kommunisticheskaya, 28, Syktyvkar, 167982 Russia

<sup>3</sup> Institute of Ecological and Evolutional Problems A.N. Severtsov of the RAS, Leninsky ave., 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>4</sup> N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the RAS, Severnoy Dviny emb., 23, Arkhangelsk, 163000 Russia

<sup>5</sup> Pinezhsky State Nature Reserve, Pervomayskaya str., 123a, Pinega, 164610 Russia

#e-mail: avbobr@mail.ru

The analysis of the conjugacy of the dynamics of northern red-backed vole (*Myodes rutilus* Pall.) populations between 9 localities of the Komi Republic and the Arkhangelsk region, the distance between which varied from 88 to 947 km. Asynchronous oscillations were observed between 1965 and 2006. As the geographical distance between localities increased, spatial synchronization decreased. In the period from 2007 to 2018, there were already agreed changes in the number of this species throughout the territory. One of the likely factors for changing the spatial synchronicity of population dynamics is climate change.

*Keywords:* *Myodes rutilus*, population dynamics, spatial synchrony, European North