

ISSN 1026-3470

Номер 4

Июль - Август 2023

ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



www.sciencejournals.ru

Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



СОДЕРЖАНИЕ

Номер 4, 2023

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Физико-химические и сорбционные характеристики кутикулы куколок мухи *Hermetia illucens*

С. В. Свергузова, И. Г. Шайхиев, Ж. А. Сапронова, А. В. Святченко, Н. А. Ушакова 339

БИОХИМИЯ

Влияние различных методов получения твердых дисперсий и кристаллов фенбендазола на биологическую активность

И. А. Архипов, С. О. Мовсесян, С. С. Халиков, Е. А. Хакина, А. И. Варламова, М. С. Халиков, М. М. Ильин 346

ГЕНЕТИКА

Внутрипородное разнообразие и взаимоотношения между карпатской (*Apis mellifera carpathica*) и кавказской (*Apis mellifera caucasica*) расами медоносной пчелы

Т. А. Триселева, А. Ф. Сафонкин, Т. О. Быкова, М. Я. Рухлян 356

БОТАНИКА

Морфолого-анатомические особенности *Plantago maritima* L. как адаптивная реакция к условиям приморских биотопов

А. В. Сони́на, Т. Ю. Дьячкова, К. В. Морозова 366

ЗООЛОГИЯ

Использование микроструктуры покровных перьев в систематике саксаульных соек (Aves, Corvidae: *Podoces*, *Eurodoces*)

О. Ф. Чернова, В. Ю. Ильяшенко 378

Столкновения самолетов с птицами отрядов соколообразные и ястребообразные

О. Л. Силаева, А. С. Педенко 393

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Внутригодовая изменчивость органов иммунной системы и содержания лизоцима у самцов щуки *Esox lucius* L.

М. Ф. Субботкин, Т. А. Субботкина 404

ЭКОЛОГИЯ

Аккумуляция железа растениями галофитами на литорали Белого моря

Е. Н. Терехова, М. А. Павлова, Н. В. Орешникова 413

Разнообразие и трансформация сообщества планктонных пресноводных протистов в эстуарной зоне притока крупного равнинного водохранилища: метабаркодинг гена 18S-рибосомной РНК

М. В. Уманская, М. Ю. Горбунов, С. В. Быкова, Н. Г. Тарасова 426

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Воздействие эллаготанинов на активность пептидаз кишечника радужной форели

Д. В. Микряков, А. Ф. Тарлева 444

Contents

No. 4, 2023

Cell Biology

- Physicochemical and Sorption Characteristics of the *Hermetia illucens* Fly Pupal Cuticle
S. V. Sverguzova, I. G. Shaikhiev, Zh. A. Sapronova, A. V. Svyatchenko, and N. A. Ushakova 339
-

Biochemistry

- Influence of Different Methods of Obtaining of Solid Dispersions and Crystals of Fenbendazole on Biological Activity
I. A. Arkhipov, S. O. Movsesyan, S. S. Khalikov, E. A. Khakina, A. I. Varlamova, M. S. Khalikov, and M. M. Ilyin 346
-

Genetics

- Intrabreed Diversity and Relationships between Races of Honey Bee *Apis mellifera carpatica* and *Apis mellifera caucasica*
T. A. Triseleva, A. F. Safonkin, T. O. Bykova, and M. J. Rukhkyan 356
-

Botany

- Morphological and Anatomical Features of *Plantago maritima* L. As an Adaptive Reaction to the Conditions of Coastal Biotopes
A. V. Sonina, T. Yu. Dyachkova, and K. V. Morozova 366
-

Zoology

- The Use of the Microstructure of Covering Feathers in the Systematics of Ground Jays (Aves, Corvidae: *Podoces*, *Eupodoces*)
O. F. Chernova and V. Yu. Ilyashenko 378
- Aircraft Collisions With Birds (Order *Falconiformes* and *Accipitriformes*)
O. L. Silaeva and A. S. Pedenko 393
-

Animal and Human Physiology

- The Intra-Annual Variability of Immune System Organs and Lysozyme Content in Male Pike *Esox lucius* L.
M. F. Subbotkin and T. A. Subbotkina 404
-

Ecology

- Iron Accumulation of Halophytes on the White Sea Littoral Zone
E. N. Terebova, M. A. Pavlova, and N. V. Oreshnikova 413
- Diversity and Transformation of the Freshwater Planktonic Protist Community Along the Estuarine Tributary Zone of the Large Plainland Reservoir: 18S rRNA Gene Metabarkoding
M. V. Umanskaya, M. Yu. Gorbunov, S. V. Bykova, and N. G. Tarasova 426
-

Short Communications

- Effects of Ellagotannins on Intestinal Peptidase Activity in Rainbow Trout
D. V. Mikryakov and A. F. Tarleva 444
-
-

УДК 576.7

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СОРБЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУТИКУЛЫ КУКОЛОК МУХИ *HERMETIA ILLUCENS*

© 2023 г. С. В. Свергузова*., И. Г. Шайхиев**, Ж. А. Сапронова*,
А. В. Святченко*, Н. А. Ушакова***

*Белгородский технологический университет им. В.Г. Шухова, ул. Костюкова, 46, Белгород, 308012 Россия

**Казанский национальный исследовательский технологический университет,
ул. Карла Маркса, 68, Казань, 420015 Россия

***Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия
@E-mail: pe@intbel.ru

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 06.03.2023 г.

Исследованы физико-химические свойства кутикулы куколок мухи черная львинка *Hermetia illucens*. Определен качественный и гранулометрический составы хитинового материала, методом сканирующей микроскопии изучен микрорельеф поверхности частиц хитина. С помощью метиленового голубого исследованы сорбционные свойства материала. Установлено, что сорбционная емкость материала составляет 0.118 ммоль/г или около 38 мг/г. Математическая обработка изотермы сорбции в рамках моделей Ленгмюра, Фрейндлиха, Дубинина–Радушкевича показала, что лучше всего процесс описывается моделью Дубинина–Радушкевича ($R^2 = 0.8031$), а процесс сорбции имеет физическую природу ($E = 5.534$ кДж/моль).

Ключевые слова: кутикула, хитин, черная львинка, адсорбция, сорбционная емкость, метиленовый голубой

DOI: 10.31857/S1026347022601047, **EDN:** TQCDDH

Онтогенез насекомых, способных развиваться в чистой культуре, состав и физико-химические свойства их тканей являются объектом пристального внимания исследователей в связи с фундаментальными вопросами адаптации организма к условиям жизни, а также практической востребованностью продуктов переработки выращенной биомассы насекомых. Муха черная львинка *Hermetia illucens* широко используется в мировой практике для разведения в искусственных условиях и получению биомассы в промышленных масштабах, при этом особый интерес проявляется к тем органам и тканям насекомого, которые могут использоваться в качестве сырья для дальнейшей переработки. К их числу относится хитин кутикулы.

Муха *H. illucens* относится к насекомым с полным циклом развития, который включает стадию куколки, из которой затем вылетает взрослая муха. Кутикула куколки состоит в основном из комплекса хитина с белком. Известны сорбционные свойства хитина, в том числе и в отношении различных ксенобиотиков и избыточно поступающих металлов. Хитин содержит несколько функциональных групп – гидроксильные, карбонильные,

амино-, ацетиламидные группы и кислородные мостики, поэтому механизм сорбции металлов этими полимерами имеет довольно сложный характер. В зависимости от условий он может включать комплексобразование, ионный обмен и поверхностную адсорбцию, однако большинство исследователей в последнее время склоняются к тому, что чаще всего преобладает хелатное комплексобразование, обусловленное высокой электронодонорной способностью атомов азота и кислорода. Благодаря этому хитиновые сорбенты обладают широким спектром сорбируемых элементов. Практически это ионы всех металлов, за исключением щелочных и щелочноземельных (Ahmed *et al.*, 2020; Sirajudheen *et al.*, 2021).

Основными источниками хитина являются раковины и панцири ракообразных. Однако перспективным также может быть получение хитина и хитозана из насекомых (Хайрова и др., 2018; Hahn *et al.*, 2020; Mohan *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020). Показано, например, что из личинок *Hermetia illucens* возможно выделение хитина (Jayanegara *et al.*, 2020; Monisha, Loganathan, 2021; Шайхиев и др., 2022). Содержание хитина в обезжиренных личинках черной львинки составило

Таблица 1. Состав кутикулы куколок *H. illucens*

| № | Показатель | Содержание, % |
|---|--|---------------|
| 1 | Протеин | 54.14 ± 1.83 |
| 2 | Хитин | 41.05 ± 2.97 |
| 3 | Жир | 2.49 ± 0.49 |
| 4 | Безазотистые экстрактивные вещества (в том числе углеводы) | 2.32 |

18.22%, клетчатки – 9.29% (Monisha, Loganathan, 2021). Одним из путей использования хитина, в том числе и выделенного из биомассы мухи *H. illucens*, является применения в качестве пребиотиков (Строкова и др., 2018; Aroa *et al.*, 2020). В этой связи представляло интерес исследовать хитин куколок мухи черная львинка на его сорбционные свойства для выявления теоретических основ биологического действия хитина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали сухую биомассу тонкоизмельченной хитинсодержащей кутикулы куколок (КК) мухи *H. illucens*, состав которой был изучен в соответствии с методиками и выражен в %: протеин – по ГОСТ 13496.4–2019, п.8; хитин по клетчатке – по ГОСТ 31675–2012; жир – по ГОСТ 13496.15–2016; содержание углеводов – безазотистых экстрактивных веществ определяли расчетным способом путем вычитания из 100% суммы вышеперечисленных компонентом.

Качественный состав функциональных групп хитина определялся методом ИК-Фурье спектроскопии с применением приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Исследование проводилось на ИК-Фурье спектрометре марки “Frontier” (Perkin Elmer).

Для разделения материала КК на фракции использовали стандартный набор сит ГОСТ 51568–99.

Изучение микрорельефа и энергодисперсионных спектров поверхности частиц хитина куколок проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа “TESCAN Mira 3 LMU” (Чехия).

Для исследования сорбционных свойств материала КК использовался краситель метиленовый голубой (МГ) как общепринятое стандартное вещество при определении сорбционной емкости. Растворы, содержащие МГ в заданных концентрациях, готовились путем растворения расчетной навески реактива в дистиллированной воде.

Адсорбционные исследования проводились в статических условиях. Использовался раствор МГ с исходной концентрацией 25 мг/дм³, объемом по 100 см³, который помещали в стеклянные колбы вместимостью 250 см³, куда добавляли навески материала КК заданной массы. Колбы с

раствором МГ и навесками КК встряхивались на автоматическом шейкере в течение 24 ч при температуре 22 ± 0.1°C. Затем содержимое колб отфильтровывалось через бумажный фильтр, в фильтрате определялись остаточные концентрации МГ. Сорбционная емкость *A*, ммоль/дм³, рассчитывалась по формуле:

$$A = \frac{C_n - C_p}{m} V,$$

где C_n – начальная концентрация МГ, ммоль/дм³; C_p – равновесная концентрация МГ после адсорбции, ммоль/дм³; V – объем модельного раствора, дм³; m – масса сорбционного материала, г.

Изучение процесса адсорбции осуществлялось при температуре 22 ± 0.1°C.

Статистическую обработку данных осуществляли согласно ГОСТ Р 8.736–2011 “Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения”

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кутикула куколок содержит белок и хитин практически в равных количествах, составляя 95% от всех компонентов. Суммарная доля жира и безазотистых экстрактивных углеводов не превышала 5% (табл. 1). Результат указывает на перспективность кутикулы куколок как источника хитина, который не требует специального обезжиривания для последующего выделения.

Высушенный и измельченный материал КК с помощью набора сит разделился на фракции: $\emptyset < 0.25$ мм; $0.25 < \emptyset < 0.5$ мм; $0.5 < \emptyset < 1$ мм. Путем взвешивания определенных объемов КК определялся насыпной вес ($\rho_{нас}$) для каждой фракции (табл. 2).

Как видно из табл. 2, с повышением размера частиц, насыпной вес материала уменьшается, что объясняется меньшей плотностью упаковки частиц.

Качественный состав материала КК фракции < 0.25 мм изучали методом ИК-спектроскопии.

На ИК-Фурье спектре (рис. 1) исследованного образца в области 3500–3100 см⁻¹ присутствует

Таблица 2. Насыпной вес кутикулы куколок *H. illucens*

| № | Размер частиц фракции, мм | $\rho_{\text{нас}}$, г/см ³ |
|---|------------------------------|---|
| 1 | $\varnothing < 0.25$ мм | 0.362 |
| 2 | $0.5 < \varnothing < 0.5$ мм | 0.252 |
| 3 | $0.5 < \varnothing < 1$ мм | 0.223 |

широкая полоса, характерная для валентных колебаний гидроксильных групп. В области 3000–2800 см⁻¹ имеются два пика, характерные для метильных и метиленовых групп. В области 1700–800 см⁻¹ присутствуют полосы при 1643 см⁻¹, характерные для N–H связи, 1543 см⁻¹ для C=O-связи, полоса при 1378 см⁻¹ соответствует сумме колебаний связей N–H и C–N в амидах. Полоса 1010 см⁻¹ соотносится с валентными колебаниями C–O-связи.

Анализ полос в ИК-спектре полученного нами хитина из КК *H. illucens* показал сходство структуры

хитина, полученного из личинок, куколок и имаго насекомого другими исследователями (Soetemans *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Triunfo *et al.*, 2022), что позволяет предположить его пригодность для промышленных и биомедицинских применений.

Также выявлено, что ИК-спектры хитинов, выделенных из панцирей креветок, водорослей и КК *H. illucens*, сопоставимы между собой (Coltelli *et al.*, 2022). Сходную картину имеют ИК-спектры хитинов, полученных из личинок черной львинки, лосося атлантического, кальмара и панциря тигровой креветки (Brigode *et al.*, 2020).

На рис. 2 показаны микрофотографии частиц сорбционного материала при разных увеличениях. Как видно из полученных данных, поверхность частиц сорбционного материала имеет высоко-развитую структуру, а его состав содержит множество элементов, таких, как Ca, Mn, P, S, O и др. (табл. 3). Основными элементами являлись углерод (в среднем 39.3%), кислород (в среднем 32.2%), а также кальций (в среднем 11%). Можно

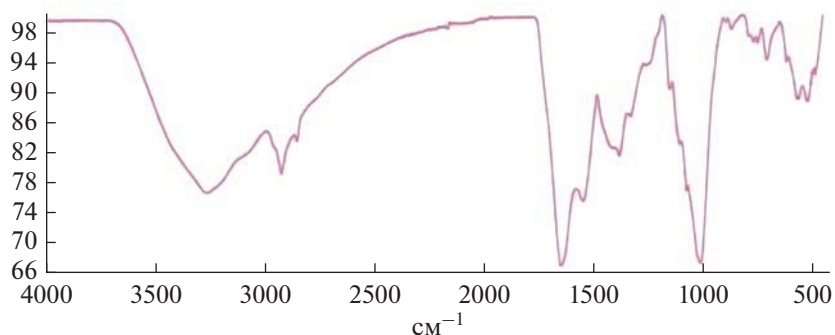


Рис. 1. ИК-спектр образца сорбционного материала из кутикулы куколок *H. illucens*.

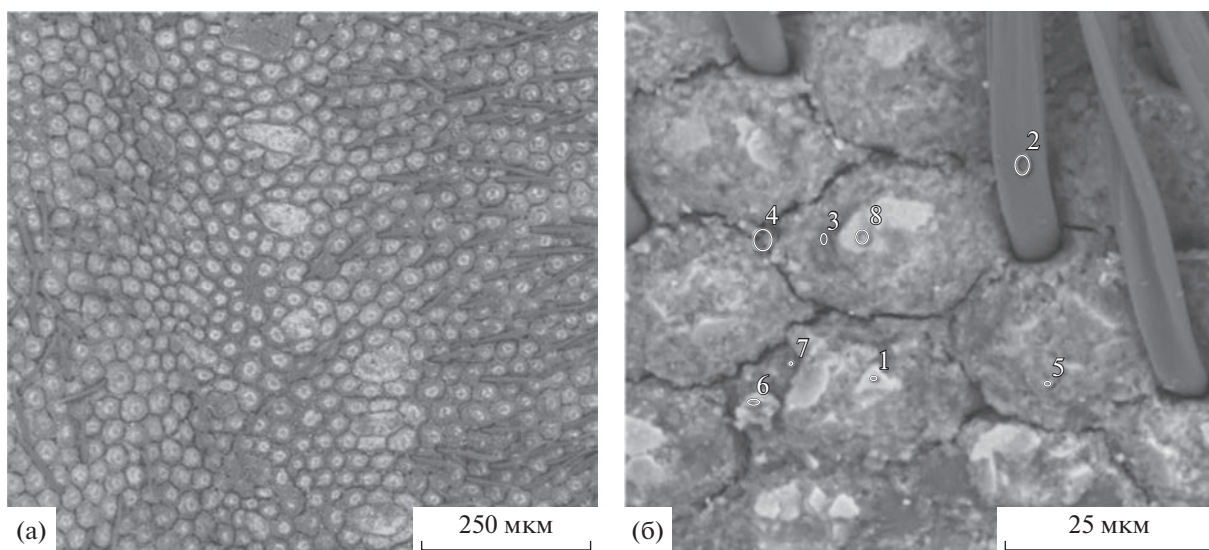


Рис. 2. Микрофотографии частицы сорбционного материала с разрешением: а – 250; б – 25 нм.

Таблица 3. Элементный состав кутикулы куколок *H. illucens*, %

| Название | C | O | Na | Mg | P | S | Cl | K | Ca | Mn |
|-----------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|
| Участок 1 | 40.22 | 33.12 | 1.81 | 0.50 | 4.62 | 0.57 | 1.66 | 2.02 | 14.25 | 1.22 |
| Участок 2 | 38.96 | 31.35 | 12.09 | 0.29 | 4.69 | 0.56 | 2.12 | 1.70 | 7.74 | 0.50 |

отметить, что по содержанию углерода и кислорода образцы разных участков кутикулы существенно не различались, что характерно для органической природы исследуемого материала, в то время как доля кальция различалась в два раза. Это, по-видимому, связано с особенностями структурной организации кутикулы, в которой Са располагается нерав-

номерно по всей массе кутикулы, и локализован в зоне соединения между хитиновой и белковой фазами, которая включает соли кальция, обычно карбонаты в форме кальцита, для увеличения жесткости кутикулы (Vincent, Wegst, 2004).

Для проверки возможности использования хитинового материала для очистки водных сред использовался раствор метиленового голубого, как общепринятый стандарт при определении сорбционной емкости. Рациональная масса добавки составила 2 г/дм³, длительность взаимодействия модельного раствора и хитиновым сорбционным материалом – 20 мин (рис. 3, 4).

Последующим этапом работы было определение расчетным путем удельной площади поверхности ($S_{уд}$) сорбционного материала. Для этого строилась изотерма адсорбции, представленная на рис. 5, которая по классификации ИЮПАК, относится к изотермам I типа и характеризует изотерму на микропористых твердых телах.

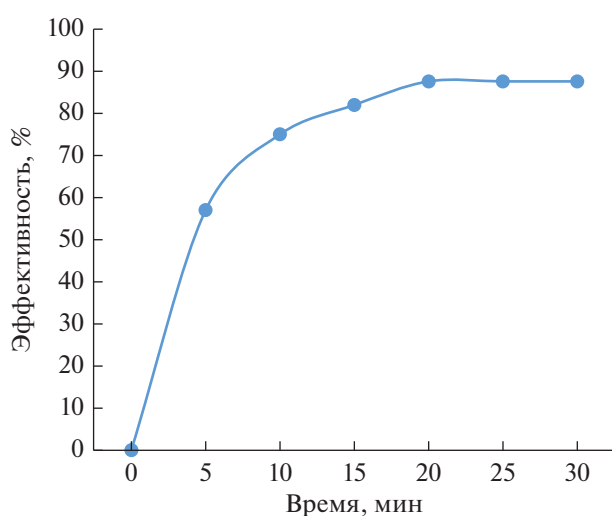
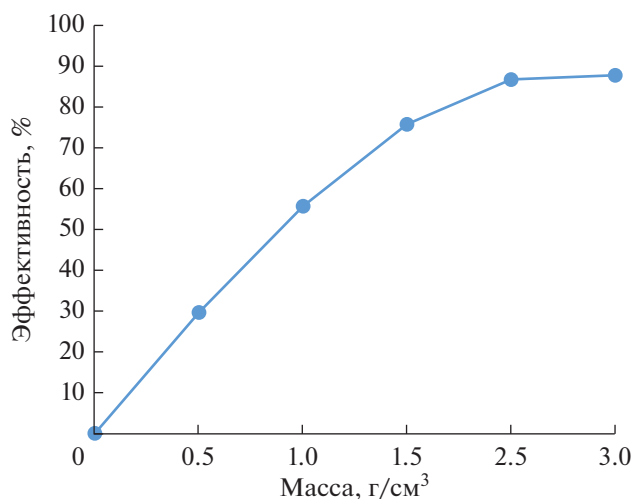
Значение $S_{уд}$ исследуемого сорбционного материала рассчитывалось по формуле:

$$S_{уд} = \frac{A_{\infty} N_A Q}{M},$$

где $A_{\infty} = 0.118$ ммоль/г; N_A – число Авогадро, 6.02×10^{23} ммоль⁻¹; Q – площадь поперечного сечения молекулы МГ, $M = 319.85$ г/моль.

Полученное значение $S_{уд}$ составило 20.6 м²/г.

Изотерма адсорбции обработана методом регрессии с помощью программного обеспечения MATLAB в рамках моделей Ленгмюра, Фрейндлиха и Дубинина–Радушкевича (Галимова и др., 2016). Полученные результаты (рис. 6, табл. 4) позволяют утверждать, что адсорбция МГ материалом хитиновых КК черной львинки наиболее адекватно описывается моделью Дубинина–Радушкевича ($R^2 = 0.8031$), которая описывает процесс адсорбции на твердых пористых адсорбентах, к которым можно отнести материал КК. Эта модель используется также для идентификации протекания физической или химической адсорбции, так как константа Дубинина–Радушкевича применяется для определения энергии адсорбции. По величине энергии сорбции (E) можно судить о природе взаимодействия между КК и активными центрами сорбционной поверхности, т.е. получить ответ на вопрос, является ли процесс закрепления МГ на поверхности сорбента физическим процессом, или он имеет химический характер.

**Рис. 3.** Влияние длительности взаимодействия модельного раствора с хитиновым сорбционным материалом на эффективность очистки.**Рис. 4.** Влияние массы добавки сорбционного материала на эффективность очистки.

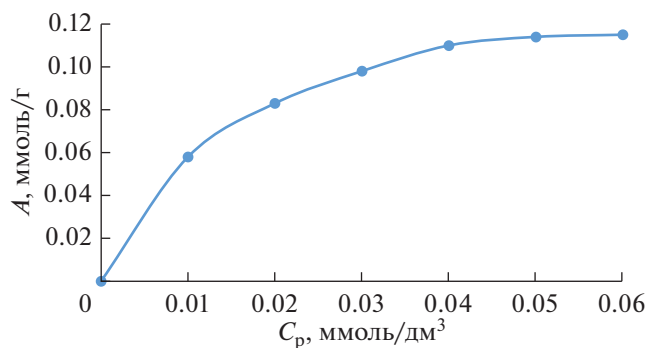


Рис. 5. Изотерма адсорбции красителя метиленовый голубой на поверхности порошка хитиновых кутикул куколок *H. illucens*.

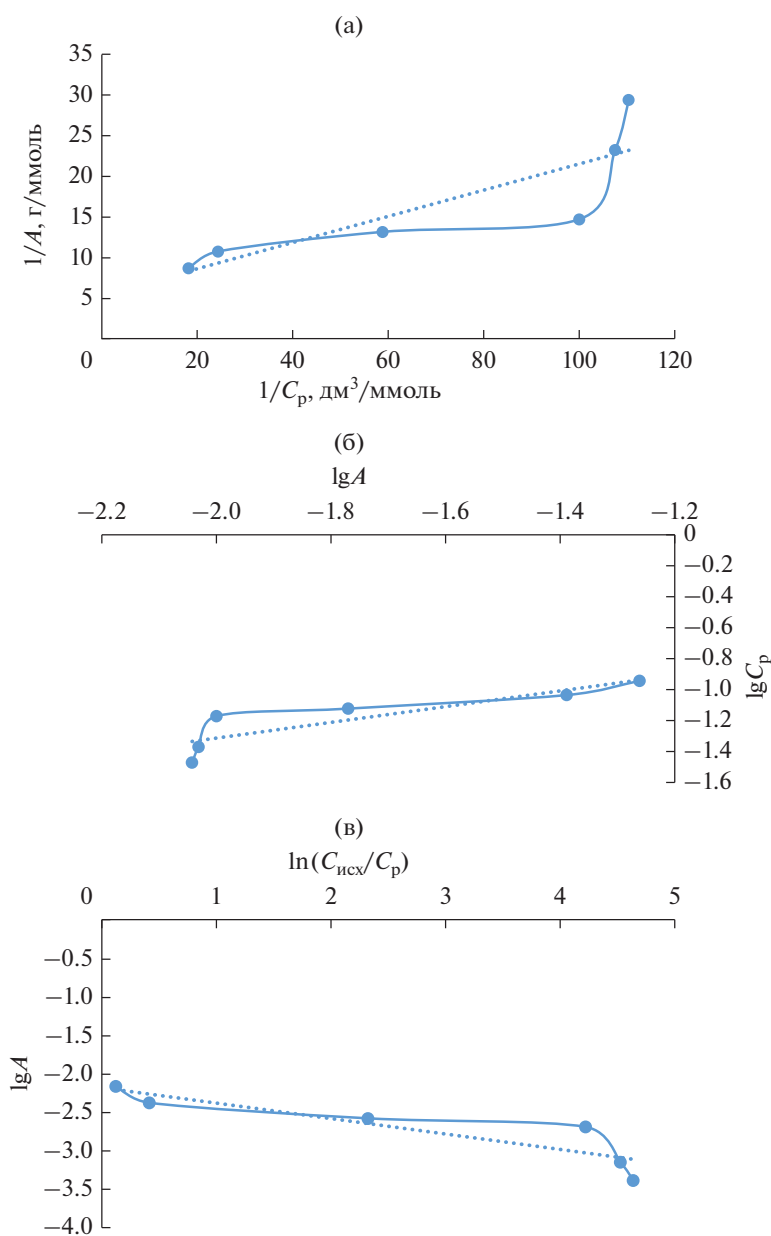


Рис. 6. Изотермы адсорбции, обработанные в рамках моделей: а) Ленгмюра, б) Фрейндлиха, в) Дубинина–Радушкевича.

Таблица 4. Уравнения изотерм адсорбции МГ сорбционным материалом

| № | Уравнение модели | Уравнение процесса | Коэффициент корреляции |
|---|---|-------------------------|------------------------|
| 1 | Ленгмюра $\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{\infty}} + \frac{1}{K_L A_{\infty} C_p}$ | $y = 0.1614x + 5.3835$ | 0.7176 |
| 2 | Фрейндлиха $\lg A = \lg K_F + 1/n \lg C_p$ | $y = 0.5077x - 0.2944$ | 0.7662 |
| 3 | Дубинина-Радушкевича $\ln A = \ln A_{\infty} - \left(\frac{RT}{E}\right)^2 \left(\ln \frac{C_n}{C_p}\right)^2$ | $y = -0.2004x - 2.1795$ | 0.8031 |

При $E < 8$ кДж/моль адсорбция носит физический характер, а при E от 40 кДж/моль и выше – химический.

В нашем случае значение $E = 5.534$ кДж/моль, поэтому следует утверждать, что в данном случае имеет место физический процесс адсорбции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы некоторые физико-химические свойства хитина, выделенного из кутикулы куколок мухи *H. illucens*. Определен качественный и гранулометрический составы полученного хитина, а также изучен микрорельеф поверхности последнего. Исследованы сорбционные свойства материала на примере красителя метиленового голубого. Установлено, что сорбционная емкость материала составляет 0.118 ммоль/г (38 мг/г). Математическая обработка изотермы сорбции в рамках моделей Ленгмюра, Фрейндлиха, Дубинина–Радушкевича, показала, что лучше всего процесс описывается моделью Дубинина–Радушкевича ($R^2 = 0.8031$), а процесс адсорбции имеет физическую природу ($E = 5.534$ кДж/моль). Полученные данные свидетельствуют о возможности доставки пробиотиков, сорбированных на поверхности хитина силами физической адсорбции, в организм-реципиент, где, благодаря, слабой энергии сорбционного взаимодействия пробиотика освобождаются и вступают в биохимический круговорот веществ в организме, а хитиновая часть принимает участие в моторике кишечника.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной программы поддержки университетов “Приоритет 2030” с использованием оборудования на базе Центра высоких технологий БГТУ им. В.Г. Шухова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Галимова Р.З., Шайхиев И.Г., Алмазова Г.А., Свергузова С.В. Исследование кинетики процессов адсорбции фенола отходами валяльно-войлочного производства // Вестник БГТУ им. В.Г. Шухова. 2016. № 10. С. 179–184.
- Строкова Н.Г., Подкорытова А.В. Современные способы переработки хитинсодержащего сырья // Труды ВНИРО. 2018. Т. 170. С. 124–152
- Хайрова А.Ш., Лопатин С.А., Синецына О.А., Синецын А.П., Варламов В.П. Получение хитина из черной львинки *Hermetia illucens* путем прямой экстракции // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3(2). С. 84–88.
<https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-2-3-84-87>
- Шайхиев И.Г., Свергузова С.В., Ушакова Н.А., Сапронова Ж.А., Воронина Ю.С. Хитин и хитозан из личинок *Hermetia illucens*: получение, свойства и перспективы использования // Экономика строительства и природопользования. 2022. № 3(84). С. 138–148.
- Ahmed M.J., Hameed B.H., Hummadi E.H. Review on recent progress in chitosan/chitin-carbonaceous material composites for the adsorption of water pollutants // Carbohydrate polymers. 2020. V. 247. № 116690. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116690>
- Aroa L.-S. Mondragon A.C., Lamas A. Animal-origin prebiotics based on chitin: an alternative for the future? A critical review // Foods. 2020. V. 9. P. 1–20.
<https://doi.org/10.3390/foods9060782>
- Brigode C., Hobbi P., Jafari H. Isolation and physicochemical properties of chitin polymer from insect farm side stream as a new source of renewable biopolymer // J. Cleaner Production. 2020. V. 275. № 122924. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122924>
- Coltelli M.-B., Panariello L., Vannozzi A. Chitin and its derivatives: nanostructured materials from different marine and terrestrial sources // Chemical Engineering Transactions. 2022. V. 93. P. 295–300.
<https://doi.org/10.3303/CET2293050>
- Hahn T., Tafi E., Paul A. Current state of chitin purification and chitosan production from insects // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2020. V. 95.

- № 11. P. 2775–2795.
<https://doi.org/10.1002/jctb.6533>
- Jayanegara A., Haryati R.P., Nafisah A. Derivatization of chitin and chitosan from Black soldier fly (*Hermetia illucens*) and their use as feed additives: An *in vitro* study // *Advanced in Animal and Veterinary Sciences*. 2020. V. 8. № 5. P. 472–477.
<https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.5.472.477>
- Kumar M. Insect chitin and chitosan: structure, properties, production, and implementation prospective / M. Kumar, V. Vivekanand, N. Pareek // *Natural Materials and Products from Insects: Chemistry and Applications* / Eds. Kumar D., Shahid M.: Springer Nature Switzerland AG, 2020. P. 51–66.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-36610-0_4
- Mohan K., Ganesan A.R., Muralisankar T. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects // *Trends in Food Science & Technology*. 2020. V. 105. P. 17–42.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.016>
- Monisha C., Loganathan M. Impact of drying methods on the physicochemical properties and nutritional composition of defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae flour // *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.16184>
- Sirajudheen P., Poovathumkuzhi N.C., Vigneshwaran S. Applications of chitin and chitosan based biomaterials for the adsorptive removal of textile dyes from water – A comprehensive review // *Carbohydrate Polymers*. 2021. V. 273. № 118604. P. 1–40.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118604>
- Soetemans L., Uyttebroek M., Bastiaens L. Characteristics of chitin extracted from black soldier fly in different life stages // *International J. Biological Macromolecules*. 2020. V. 165. P. 3206–3214.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.041>
- Triunfo M., Tafi E., Guarnieri A. Characterization of chitin and chitosan derived from *Hermetia illucens*, a further step in a circular economy process // *Scientific Reports*. 2022. V. 12. № 6613. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-10423-5>
- Vincent J.F.V., Wegst U.G.K. Design and mechanical properties of insect cuticle // *Arthropod Structure & Development*. 2004 V. 33. P. 187–199.
<https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.05.006>
- Wang H., Rehman K., Feng W. Physicochemical structure of chitin in the developing stages of black soldier fly // *International J. Biological Macromolecules*. 2020. V. 149. P. 901–907.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.293>

Physicochemical and Sorption Characteristics of the *Hermetia illucens* Fly Pupal Cuticle

S. V. Sverguzova^{1, #}, I. G. Shaikhiev², Zh. A. Sapronova¹, A. V. Svyatchenko¹, and N. A. Ushakova³

¹ Belgorod Technological University. V.G. Shukhov, st. Kostyukova, 46, Belgorod, 308012 Russia

² Kazan National Research Technological University, st. Karl Marx, 68, Kazan, 420015 Russia

³ Institute of Problems of Ecology and Evolution. A.N. Severtsov Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia

#e-mail: pe@intbel.ru

Physicochemical and sorption characteristics of the Black Soldier fly pupal cuticle have been studied. The qualitative and granulometric compositions of chitin material were determined, and the surface microrelief of chitin particles was studied by scanning microscopy. The sorption properties of the material were studied using the methylene blue dye. It was found that the sorption capacity of the material is 0.118 mmol/g, or about 38 mg/g. Mathematical processing of the sorption isotherm using the Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich models showed that the process is best described by the Dubinin-Radushkevich model ($R^2 = 0.8031$), and the sorption process has a physical nature ($E = 5.534$ kJ/mol).

Keywords: cuticle, chitin, black soldier fly, adsorption, sorption capacity, methylene blue

УДК 577.325.5:57.021

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ТВЕРДЫХ ДИСПЕРСИЙ И КРИСТАЛЛОВ ФЕНБЕНДАЗОЛА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2023 г. И. А. Архипов*, С. О. Мовсесян**, С. С. Халиков***, Е. А. Хакина***, А. И. Варламова*.,@, М. С. Халиков*.,***, М. М. Ильин***

*Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал ФГБНУ “Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН”, ул. Большая Черемушкинская, 28, Москва, 117218 Россия

**Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

***Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, ул. Вавилова, д. 28, стр. 1, Москва, 119334 Россия

@E-mail: arsphoeb@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Фенбендазол (ФБЗ) – является одним из наиболее широко применяемых препаратов в ветеринарной практике. Модификация его физико-химических свойств, в частности параметра растворимости, способствует изменению его биологической активности, что показано на модели трихинеллеза белых мышей. В работе представлен анализ методов получения новых препаратов фенбендазола: твердых дисперсий фенбендазола с полимерами, а также комбинаций с полимерами и янтарной кислотой (ЯК) и смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК; изучено содержание действующего вещества, стабильность и влияние на биологическую активность.

Ключевые слова: фенбендазол, сульфоксид, твердая дисперсия, смешанные кристаллы, стабильность, полимеры, биологическая активность, белые мыши

DOI: 10.31857/S1026347022600856, **EDN:** MOPEWD

В связи с расширением возможностей механохимической технологии для модификации плохо растворимых субстанций лекарственных препаратов и проблемой достаточно широкого распространения гельминтозов жвачных животных и необходимостью их профилактики и терапии актуальным явилось привлечение в сферу исследований субстанций антигельминтных препаратов. В результате были получены твердые дисперсии (ТД) фенбендазола, альбендазола, празиквантела, триклабендазола и др. с водорастворимыми полимерами (поливинилпирролидон, арабиногалактан) и другими вспомогательными компонентами для повышения их растворимости. Полученные ТД можно рассматривать как альтернативные лекарственные формы, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с обычными лекарственными формами, в частности, получение в одну стадию, удобство применения и низкая себестоимость (Гламаздин и др., 2013; Халиков и др., 2015; Chistyachenko *et al.*, 2015; Мусаев и др., 2017; Arkh-

ipov *et al.*, 2017, 2019; Avgustinovitch *et al.*, 2019; Khalikov *et al.*, 2019; Meteleva *et al.*, 2019). Анализ растворимости полученных ТД указывает на возможность регулирования этого показателя путем варьирования условий твердофазной механохимической модификации субстанций лекарственных веществ с помощью полимеров, а по данным ИК-спектроскопии сделано предположение об образовании комплексов включения (внутримолекулярные или супрамолекулярные) при формировании ТД и их дальнейшем использовании при приготовлении лекарственных форм. Полученные ТД обладали повышенной биологической активностью, что позволяет считать метод твердофазной механохимической модификации лекарственных веществ перспективным в получении инновационных препаратов (Khalikov *et al.*, 2019; Varlamova *et al.*, 2020).

Однако существует другой подход для получения альтернативных форм на основе фенбендазола (ФБЗ). Сузов с соавт. (Surov *et al.*, 2021) сообщили о

получении со-кристаллов солей ФБЗ с некоторыми сульфокислотами. Новые твердые формы ФБЗ показали значительное повышение растворимости по сравнению с субстанцией ФБЗ, что представляло интерес для изучения их антигельминтной активности с целью оценки перспектив применения таких форм ФБЗ. Принимая во внимание возможность получения со-кристаллов бетулина методами механохимии (Мызь и др., 2020), нами была предпринята попытка получения кристаллов ФБЗ с янтарной кислотой (ЯК), обладающей широким спектром активности. Известно, что ЯК является эндогенным внутриклеточным метаболитом цикла Кребса с энергосинтезирующей функцией. При участии кофермента флавинадениндинуклеотида ЯК митохондриальным ферментом сукцинатдегидрогеназой быстро трансформируется в фумаровую кислоту и далее в другие метаболиты цикла трикарбоновых кислот. Таким образом, ЯК стимулирует аэробный гликолиз и синтез АТФ в клетках. Конечным продуктом метаболизма янтарной кислоты в цикле Кребса является двуокись углерода и вода. ЯК улучшает тканевое дыхание за счет активации транспорта электронов в митохондриях. Механизм действия янтарной кислоты определяет прежде всего ее антиоксидантные свойства, способность стабилизировать биомембраны клеток, модулировать работу рецепторных комплексов и прохождение ионных токов, усиливать связывание эндогенных веществ, улучшать синаптическую передачу. Соли ЯК – сукцинаты способны предотвращать или устранять постгипоксические нарушения энергетического метаболизма в организме и метаболический ацидоз (Папуниди и др., 2000; Евлевский и др., 2013).

В связи с этим целью работы было проведение анализа методов получения новых препаратов фенбендазола (твердые дисперсии ФБЗ с полимерами, твердые дисперсии ФБЗ с полимерами и ЯК, смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК), изучение содержания в них действующего вещества, стабильности и влияния на биологическую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводили на базе Центра паразитологии Института проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН, Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала ФГБНУ “Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН”. В опытах использовали: фенбендазол (ФБЗ) – 5-(фенилтио)-2-бензимидазолкарбамаг (99.0%) производства Changzhou Yabang Pharmaceuticals Co. Ltd (Китай); янтарную кислоту (ЯК) производства ООО “Верфарм” (Москва); поливинилпирролидон

(ПВП) – 1 этенилпирролидин-2-он марки К-30, производитель – Boai NKY Pharmaceuticals Ltd. (КНР), Batsch number P160828002-0; арабиногалактан (АГ) марки “Левитол-арабиногалактан” ТУ 9325-008-70692152-08, производитель – АО “Аметис” (Россия, Благовещенск); экстракт солодки (ЭС) – с содержанием 24.9% глицирризиновой кислоты производства ООО “Вистерра”, Алтайский край (Декларация соответствия ТСН RU Д–RU.AF96.V.00958).

Механохимическое получение твердой дисперсии состава ФБЗ : ПВП (1 : 9) проводили в металлическом барабане валковой мельницы LE-101 (Hungary) путем загрузки 10.0 г субстанции ФБЗ, 90.0 г ПВП и 1600 г металлических шаров (30 шаров с диаметром 25 мм компании ООО “Техно-Центр”, г. Рыбинск) с последующей механообработкой при следующих условиях: объем загрузки – 80%; модуль – 1 : 16; скорость вращения барабана 60–70 об./мин. Механообработку проводили в течение 6 часов с отбором проб через 1 ч для анализа на изменение растворимости. Аналогично были получены ТД следующих составов, соответственно: ФБЗ : АГ (1 : 9), ФБЗ:ЭС (1 : 9). Для получения ТД ФБЗ с ПВП и ЯК в металлический барабан валковой мельницы была загружена предварительно приготовленная физическая смесь из 10.0 г ФБЗ, 10.0 г ЯК и 30.0 г полимера (ПВП или АГ соответственно), которая подвергалась механообработке при следующих условиях: модуль 1 : 16, скорость вращения барабана 60–70 об./мин, время обработки 5 ч.

Получение образцов смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК проводили аналогично методики (Мызь и др., 2020) с некоторыми изменениями, а именно, вместо планетарно-центробежной мельницы АГО, нами механообработка компонентов проводилась в агатовой ступке путем перетиравания 460 мг ФБЗ и 460 мг ЯК в течение 10 мин. Добавив в содержимое ступки 10 мл диоксиана, механообработка была продолжена еще в течение 5 мин. Содержимое ступки переносили в колбу на 50 мл и проводили нагревание при перемешивании на магнитной мешалке. Через 5 мин нагревания белая суспензия превращалась в прозрачный светло-розовый раствор, который оставляли в закрытой колбе. В растворе в течение суток выпало 0.78 г мелкодисперсного осадка светло-желтого цвета. Аналогично получали смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК с добавлением в качестве растворителей ацетонитрила и изопропанола.

Для определения растворимости полученных ТД фенбендазола с полимерами и ЯК использовали методику С.С. Халикова с соавт. с погрешностью анализа $\pm 3\%$ (Халиков и др., 2015).

Изучение содержания действующего вещества и возможных процессов окисления при получении ТД и смешанных кристаллов ФБЗ проводили

Таблица 1. Растворимость образцов смешанных кристаллов ФБЗ

| Наименование образца | Растворимость | |
|---|-------------------|-----------------|
| | абсолютная, мг/кг | увеличение, раз |
| Фенбендазол, исходная субстанция | 0.33 | – |
| Смешанные кристаллы ФБЗ и ЯК, полученные в диоксане (22% ФБЗ и 16% СО ФБЗ) | 0.20 | 0.6 |
| Смешанные кристаллы ФБЗ и ЯК, полученные в ацетонитриле (95% ФБЗ и 3% СО ФБЗ) | 0.73 | 2.2 |
| Смешанные кристаллы ФБЗ и ЯК, полученные в изопропаноле (75% ФБЗ и 3% СО ФБЗ) | 1.1 | 3.2 |

с помощью ВЭЖХ-МС анализа по собственной методике с помощью жидкостного хромато-масс-спектрометра Shimadzu LCMS-2020 с ионизацией электрораспылением и одноквадрольным детектором масс. В качестве стационарной фазы использовали колонку Shim-pack GIST 3 μ m C18 3 \times 150 мм с предколонкой Shim-pack GIST (G) 5 μ m C18 4 \times 10 мм. Элюирование проводили в изократическом режиме смесью 60 об. % ацетонитрила (99.9%) и 40 об. % раствора муравьиной кислоты (0.1 об. %) в воде (Milli-Q), скорость потока 0.7 мл/мин. Температуры термостата колонок, нагревательного блока и линии десольватации составляли 40°C, 250°C и 400°C, соответственно. В качестве осушающего и распыляющего газа использовался азот (99.999%), скорость потока 15 и 3 л/ч соответственно. Разность потенциалов между капилляром распыления и капилляром ввода составляла 4.5 кВ. Навеску анализируемой лекарственной субстанции (0.1–0.7 мг) растворяли в 1 мл ацетонитрила с использованием вортекса, перед анализом пробы центрифугировали в течение 2 мин при 5000 об./мин для осаждения нерастворенной части образца. Объем ввода пробы составил 2 μ л. Для проведения количественного анализа содержания ФБЗ в лекарственных субстанциях использовали метод внешнего стандарта. Готовили исходный раствор ФБЗ в ацетонитриле с концентрацией 0.66 мг/мл, затем методом разбавления исходного раствора получали растворы с концентрациями 0.33, 0.165, 0.0825 и 0.04125 мг/мл. Полученные растворы анализировали с использованием указанных выше условий анализа и строили зависимость площади под пиком фенбендазола от концентрации для получения калибровочного графика. Для расчетов использовали программу LabSolutions и Microsoft Excel.

Изучение биологической активности различных форм на основе ФБЗ проводили на лабораторной модели трихинеллеза белых мышей, экспериментально инвазированных *Trichinella spiralis* в возрасте 1.5–2 мес. в дозе 200 личинок. На третьи сутки после заражения мышам шести опытных групп (по 10 особей в каждой) вводили перорально однократ-

но субстанции ФБЗ, полученные с различными компонентами в дозе по 2.0 мг/кг по действующему веществу (ДВ), т.е. по фенбендазолу. Мыши седьмой группы получали базовый препарат – субстанцию ФБЗ в дозе 2.0 мг/кг. Животные контрольной группы препарат не получали. Животных убивали декапитацией на вторые сутки после введения препаратов. Тонкий кишечник мышей разрезали ножницами по всей длине и помещали в аппарат Бермана в физиологическом растворе. Пробы ставили в термостат на 2 ч при 37–39°C, после чего осадок исследовали под бинокулярной лупой, подсчитывая число обнаруженных *T. spiralis* и рассчитывая интенсэфективность (ИЭ) (Астафьев и др., 1989; Архипов и др., 2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении растворимости твердой дисперсии ФБЗ с полимерами, было установлено повышение растворимости до 24 раз для композиции ФБЗ : ПВП (1 : 9); для ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9) – увеличение растворимости в 12 раз; ТД состава ФБЗ : ЭС (1 : 9) – увеличение растворимости в 37 раз, что подтверждено результатами наших предыдущих исследований. Полученные ТД многокомпонентных составов ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3) и ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3) обладали повышенной растворимостью – в 19 и 11 раз соответственно. Данные по растворимости смешанных кристаллов ФБЗ и ЯК, полученных в различных растворителях представлены в табл. 1.

Анализ данных табл. 1 позволил выбрать для проведения биологических испытаний образцы смешанных кристаллов с наибольшей растворимостью, т.е. образцы смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК, полученных в ацетонитриле и изопропаноле.

Надо отметить, что ТД с полимерами представляют собой стабильные по ДВ тонкодиспергированные порошки, которые не подвергаются процессам деструкции ни в условиях механообработки, ни в течение 5–6 лет хранения, что подтверждается данными ВЭЖХ-МС исследований (рис. 1).

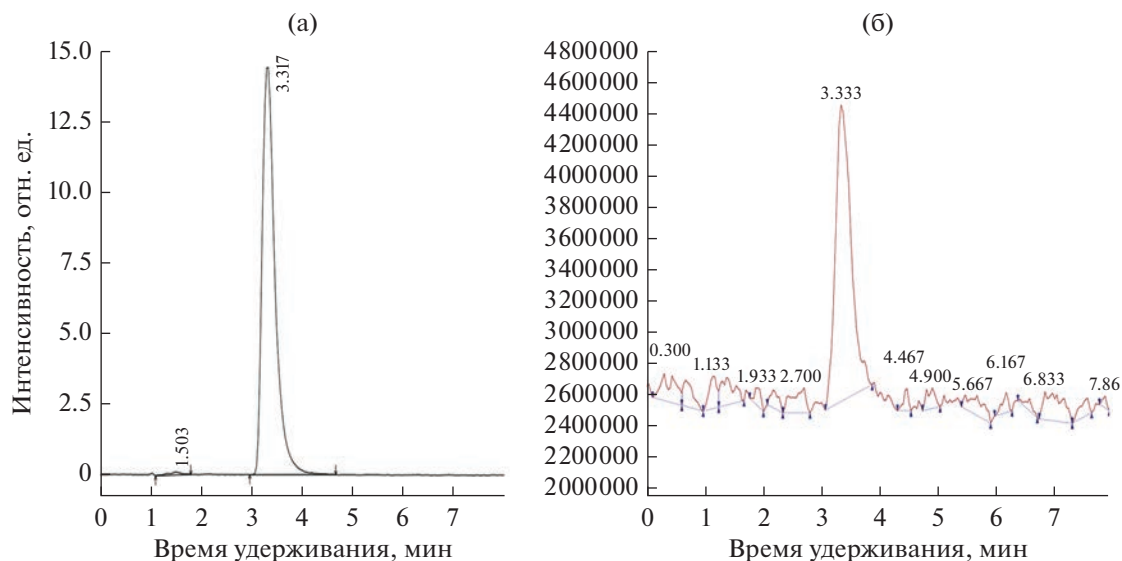


Рис. 1. Хроматограмма ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9), 2015 г. производства, спектрофотометрический детектор, 295 нм (а); хроматограмма тока для положительных ионов ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9), 2015 г. производства (б).

Анализ данных рис. 1 показывает, что в масс-спектре время 3.33 мин соответствует чистому ФБЗ, а сульфоксида ФБЗ – это основной метаболит фенбендазола, образующийся в реакции его сульфокисления, в образце обнаружено не было даже при сроках хранения более 7 лет.

Анализ ВЭЖХ-МС образцов ТД фенбендазола с ПВП и с ЭС (табл. 2) также показал отсутствие примесей в целевых продуктах.

Анализ многокомпонентных твердых дисперсий составов ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3) и ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3) методом ВЭЖХ-МС подтвердил ста-

бильность субстанции ФБЗ при его твердофазной механообработке с ЯК (рис. 2).

Масс-спектры обоих образцов при 3.33 мин соответствуют чистому ФБЗ, а продукта его окисления – сульфоксида ФБЗ (СО ФБЗ) – в образцах не обнаружено.

При изучении кристаллов ФБЗ с ЯК, полученных с использованием в качестве растворителя диоксана, ВЭЖХ-МС анализ осадка показал, что они представляет собой смесь из 22% ФБЗ, 16% СО ФБЗ, около 7% не идентифицированных примесей, остальное – ЯК (рис. 3). При этом продукта присоединения не обнаружено.

Таблица 2. Содержание фенбендазола (%) в его продуктах, полученных различными методами

| Образец, условия и дата получения | ФБЗ теор. | ФБЗ* найденное |
|---|-----------|-----------------|
| ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9), 27.02.2015 | 10 | 15 ¹ |
| ТД состава ФБЗ : ПВП (1 : 9), 30.06.2020 | 10 | 14 ¹ |
| ТД состава ФБЗ : ЭС (1 : 9), м/о** 0.5 час, 20.11.2019 | 10 | 5 ² |
| ТД состава ФБЗ : ЭС (1 : 9), м/о 1,5 час, 20.11.2019 | 10 | 11 ¹ |
| ТД состава ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3), 07.04.2022 | 20 | 23 ¹ |
| ТД состава ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3), 07.04.2022 | 20 | 21 ¹ |
| Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК, полученные в диоксане с содержанием 16% СО ФБЗ, 29.04.2022 | 98 | 22 |
| Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК, полученные в ацетонитриле с содержанием 3% СО ФБЗ, 29.04.2022 | 98 | 95 |
| Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК, полученные в изопропанолe с содержанием 3% СО ФБЗ, 29.04.2022 | 98 | 75 |

Примечание. * различие между теоретическим и найденными значениями можно объяснить увеличением растворимости в воде¹ и не полным растворением ТД в ацетонитриле², ** м/о – механохимическая обработка.

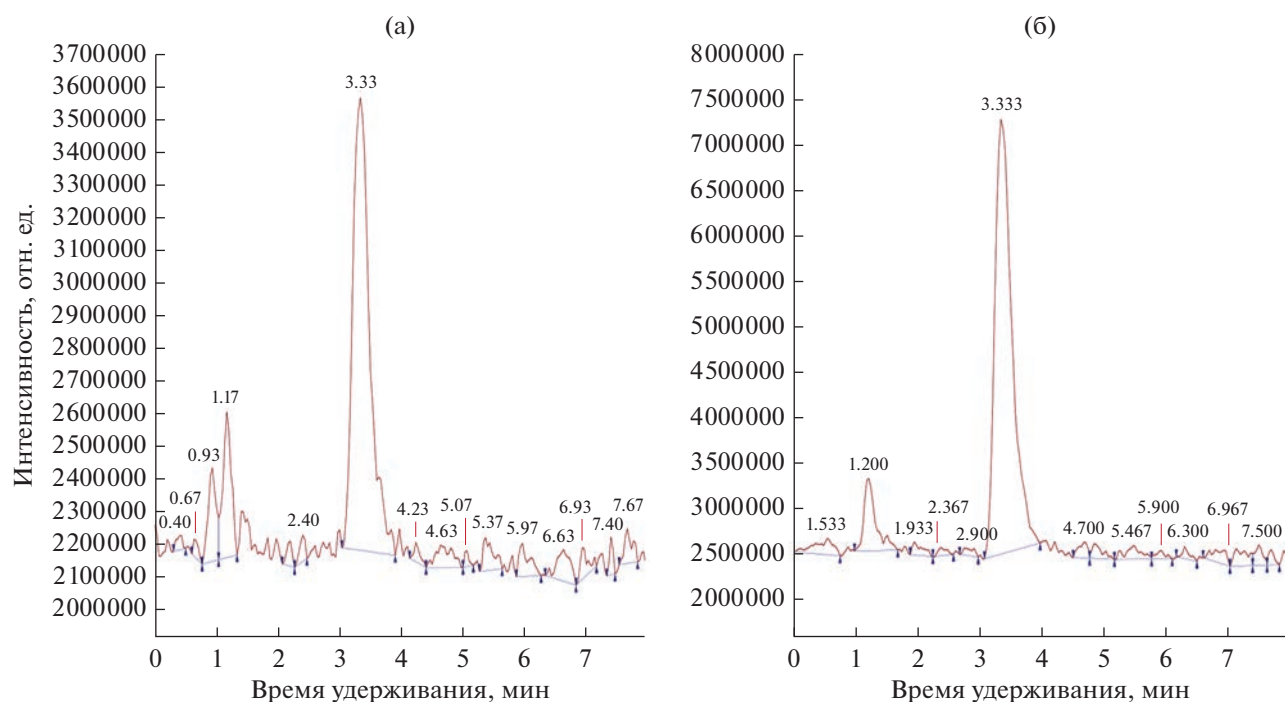


Рис. 2. Хроматограммы тока для положительных ионов ТД составов: а) ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3), полученной при твердофазной механообработке компонентов (ФБЗ, ПВП и ЯК) в апреле 2022 г.; б) ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3), полученной при твердофазной механообработке компонентов (ФБЗ, АГ и ЯК) в апреле 2022 г.

Из данных на рис. 3 видно, что при проведении реакции в кипящем диоксане получается продукт, который представляет собой смесь исходного ФБЗ (в масс-спектре время 3.33 мин) и СО ФБЗ (в масс спектре время 1.57 мин).

Аналогично были изучены смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК, полученные при добавлении ацетонитрила. Установлено, что выпавший осадок состоял из 95% ФБЗ, 3% СО ФБЗ, остальное – ЯК. Продукта присоединения не найдено. Смешанные кристаллы, в процессе получения которых добавляли изопропанол, состояли из 75% ФБЗ, 3% СО ФБЗ, остальное – ЯК. Продукта присоединения не найдено.

Стоит отметить, что изучение эффективности и безопасности нового лекарственного препарата, внедряемого в ветеринарную практику, является необходимым важным условием. Стабильность лекарственного вещества и его качество тесно связаны между собой. Основной критерий стабильности – это сохранение качества лекарственного средства. Снижение активности лекарственного вещества говорит о его нестабильности и уменьшении количества активно действующего вещества. Процессы, происходящие при хранении лекарственных веществ, могут привести к изменению их химического состава или физических свойств, что может привести к постепенной потере фармакологической активности и накоплению посторонних примесей. Из физических факторов

наибольшее влияние оказывают температура, свет и влажность. Химические процессы, происходящие при хранении лекарственных веществ, тесно связаны с влиянием физических факторов, к ним можно отнести: реакции окисления-восстановления, декарбоксилирования, гидролиз, фотохимическую деструкцию, изомеризацию и др. Так, в работе (Fan *et al.*, 2021) была показана возможность превращения ряда сульфидов, в том числе альбендазола (АБЗ) и ФБЗ в соответствующие сульфоксиды в смеси MeOH и H₂O (об./об. 2/1) под действием света, а именно, синглетный кислород играет важную роль в фотосульфоксидировании сульфидов. Надо отметить, что в наших более ранних работах (Халиков и др., 2015; Chistyachenko *et al.*, 2015) по получению ТД на основе АБЗ и ФБЗ с водорастворимыми полимерами методами механохимии не наблюдалось образования соответствующих сульфонов и сульфоксидов, что было подтверждено методом ВЭЖХ анализа продуктов механообработки. В то же время известно, что высокая антигельминтная активность ФБЗ объясняется образованием первичных метаболитов, в частности, сульфоксида и сульфона ФБЗ, которые были обнаружены в крови и молоке обработанных животных (Кочетков и др., 2016; Varlamova *et al.*, 2020). Известно, что при поступлении в организм фенбендазол в печени последовательно метаболизируется до сульфоксида и затем до сульфона фенбендазола под действием микросо-

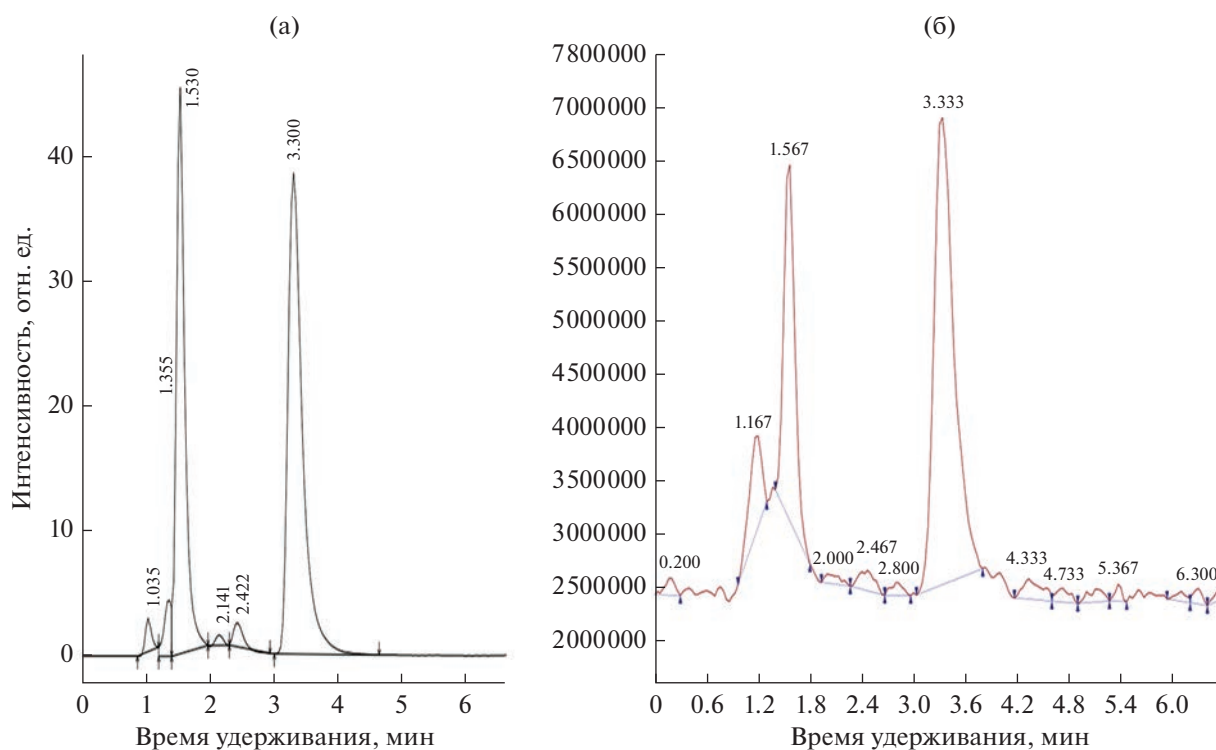


Рис. 3. Хроматограмма смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК (механохимия твердых компонентов с последующим кипячением композиции в диоксане), спектрофотометрический детектор, 295 нм (а); хроматограмма тока для положительных ионов этого же образца (б).

мальных ферментов. Для жвачных при этом характерна энтерогепатическая циркуляция, сульфоксид попадая в рубец, трансформируется микрофлорой в фенбендазол, что приводит к более длительному воздействию на гельминтов и говорит о корреляции между уровнем препарата в плазме, содержанием пищеварительного тракта жвачных и тканях гельминта (Riviere, Papich, 2009).

Образование сульфоксида ФБЗ нами было впервые обнаружено при попытках модифицировать ФБЗ с целью получения смешанных кристаллов ФБЗ и ЯК с использованием условий, описанных в работе (Мызь и др., 2020), в которой сначала проводят механохимическое взаимодействие компонентов бетулина с адипиновой кислотой в присутствии следов растворителя с последующим кипячением полученной массы в соответствующем растворителе. И если в указанной работе с использованием планетарно-центробежной мельницы «АГО-2» наблюдается образование целевого продукта — со-кристалла бетулина с адипиновой кислотой, то в нашем эксперименте при механообработке в агатовой ступке с последующим кипячением в различных растворителях, наблюдалось образование продукта деструкции ФБЗ. Степень деструкции зависит, по-видимому, от природы растворителя, их температур кипения и других физико-химических параметров. В тоже

время при твердофазной обработке субстанции ФБЗ с полимерами с последующим хранением в плотно закрытой таре не наблюдается окисления ФБЗ даже в образцах 2015 и 2020 гг.

Из данных табл. 2 видно, что при твердофазной механообработке ФБЗ (основание) с ЯК (кислота) и полимером не наблюдается окисления ФБЗ.

Если при проведении механообработок с получением твердых дисперсий регистрировали стабильность субстанции ФБЗ, отсутствие химических взаимодействий, то при проведении комбинированных механообработок с использованием растворителей и получением смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК, отмечали процессы окисления ФБЗ до его сульфоксида. При этом в зависимости от растворителя изменялся количественный состав полученных продуктов. Максимальное окисление ФБЗ до СО ФБЗ происходило в диоксане, а наибольшее содержание ФБЗ отмечено в ацетонитриле.

Результаты изучения нематодоцидной активности при экспериментальном трихинеллезе различных форм на основе ФБЗ представлены в табл. 3.

Анализ данных табл. 3 позволяет сделать выводы о том, что наиболее активными формами применения ФБЗ являются его ТД с ПВП и с АГ, то-

Таблица 3. Нематодоцидная активность комплексных твердых дисперсий антигельминтиков при экспериментальном трихинеллезе

| Препарат и его состав | Содержание ДВ, % | Доза по массе порошка, мг/кг | Доза по ДВ мг/кг | Обнаружено <i>T. spiralis</i> , экз./гол. | ИЭ, % |
|---|------------------|------------------------------|------------------|---|-------|
| ФБЗ : ПВП (1 : 9) | 10 | 10 | 2 | 0 | 100.0 |
| ФБЗ : АГ (1 : 9) | 10 | 10 | 2 | 4.5 ± 0.8 | 94.9 |
| ФБЗ : ЭС (1 : 9) | 10 | 10 | 2 | 12.3 ± 1.0 | 86.60 |
| ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3) | 20 | 10 | 2 | 79.2 ± 7.1 | 54.17 |
| Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК (растворитель—ацетонитрил) | 75 | — | — | 120.0 ± 9.8 | 30.56 |
| Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК (растворитель—изопропанол) | 95 | — | — | 108.0 ± 8.5 | 37.50 |
| ФБЗ субстанция | 98 | 2 | 2 | 132.0 ± 9.7 | 23.62 |
| Контрольная группа | — | — | — | 172.8 ± 12.2 | — |

гда как с ЭС продукт оказывался менее активным. ТД на основе ФБЗ с ЯК оказалась менее активной, вопреки нашим ожиданиям на том основании, что при совместной механообработке ФБЗ с кислотами должны были образовываться более растворимые солевые формы. Смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК обладали слабой активностью, несмотря на высокое содержание ФБЗ (75% и 95% соответственно).

Наибольшую активность ТД ФБЗ с полимерами, что можно объяснить образованием мелкодисперсных порошков, которые при растворении в воде образуют супрамолекулярные комплексы с повышенной растворимостью, что в свою очередь, увеличивает биодоступность и антигельминтную активность препарата (Arkhipov *et al.*, 2019).

По предложенной технологии ранее получены препараты не только на основе ФБЗ и других бензимидазолкарбаматов (альбендазол, триклабендазол) (Чистяченко и др., 2014; Мусаев и др., 2017; Лагерева и др., 2019; Khalikov *et al.*, 2020), но и субстанций антигельминтиков из других классов органических соединений — фенасал, празиквантел, ивермектин и пр. (Arkhipov *et al.*, 2017; Марченко и др., 2019; Avgustinovitch *et al.*, 2019; Metel'eva *et al.*, 2019; Мусаев и др., 2020; Marchenko *et al.*, 2020, 2021). В наших работах было показано, что метод механохимической модификации плохо растворимых антигельминтных субстанций из различных классов органических соединений с помощью полимеров и растительных метаболитов позволил существенно изменить растворимость, биодоступность и эффективность препаратов (Khalikov *et al.*, 2015; Мусаев и др., 2017; Arkhipov *et al.*, 2019; Metel'eva *et al.*, 2019).

Так, супрамолекулярный комплекс фенбендазола с АГ в уменьшенной дозе 3.0 мг/кг по ДВ показал 100%-ю эффективность при диктиокаулезе, стронгилоидозе и стронгилятозах пищеварительного тракта и 98.3%-ную активность при трихоцефалезе овец (Варламова и др., 2016). Тогда как комплекс ФБЗ с ПВП при нематодозах овец в дозе 2.0 мг/кг по ДВ в форме 10%-ного порошка показал эффективность, равную 98.7% против нематодуриусов и 99.2% против других видов стронгилят пищеварительного тракта, а также оказался эффективным в дозе 2.0 мг/кг по ДВ против стронгилят пищеварительного тракта овец, т.е. комплекс обладал в 2.5 раза большей антигельминтной активностью по сравнению с базовым препаратом — субстанцией фенбендазола. По результатам испытаний были сделаны рекомендации по использованию комплекса в ветеринарной практике при нематодозах овец (Arkhipov *et al.*, 2019; Варламова и др., 2020, 2021).

Комплекс ФБЗ с экстрактом солодки обладал повышенной растворимостью, повышенным уровнем абсорбции и поступления в кровь ФБЗ и его метаболитов и увеличением в 2.3–2.5 раза их максимальной концентрации в крови и времени достижения этой концентрации. В результате эффективность комплекса на лабораторной модели *T. spiralis* составила 96.27% в дозе 2 мг/кг по ДВ по сравнению с 13.70%-й эффективностью самой субстанции ФБЗ в этой же дозе. Высокая эффективность комплекса наблюдалась против нематод при сниженной (в 2.5 раза) дозе по ДВ (Архипов и др., 2020; Varlamova *et al.*, 2020).

Изучение нематодоцидной активности супрамолекулярных комплексов альбендазола с полисахаридами (АГ, ГЭК) и ПВП, проведенные на

лабораторной модели трихинеллеза на белых мышях, экспериментально инвазированных *T. spiralis*, подтвердило их высокую эффективность (97.47–100.0%). Комплекс с АГ проявил 100%-ю эффективность при гименолепидозе мышей, он оказался активен против имагинальных цестод (Чистяченко и др., 2014; Халиков и др., 2015; Chistyachenko *et al.*, 2015).

Эти данные указывают на то, что продукты механомодификации проявляют высокую эффективность в дозе, которая более чем в 3 раза меньше терапевтической дозы исходной субстанции, что мы объясняем увеличением растворимости и биодоступности ФБЗ.

При этом добавление ЯК в состав твердой дисперсии ФБЗ с ПВП не привело к ожидаемому росту биологической активности, не смотря на высокую растворимость (увеличение растворимости в 19 раз). Возможно в данном случае нам не удалось достигнуть повышения биодоступности комплекса ФБЗ : ПВП : ЯК. Хроматографический анализ показал стабильность ФБЗ в ТД состава ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3). В случае использования растворителей и процессов нагревания для получения смешанных кристаллов в хроматограммах были детектированы пики, характерные для метаболита ФБЗ и отмечено уменьшение концентрации ДВ. Значительного повышения антигельминтного действия на лабораторной модели не установлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования подтверждают возможность получения новых препаратов фенбендазола с полимерами и низкомолекулярными веществами. При этом наряду с сохранением действующего вещества в одних случаях, наблюдаются также процессы окисления фенбендазола до его метаболита — сульфоксида фенбендазола при получении смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК. Этот процесс зависит как от природы растворителя, так и условий проведения реакции взаимодействия ФБЗ с кислотами (в твердой фазе или в растворителе). Было установлено, что в субстанциях ФБЗ с полимерами, полученными по методу твердофазной механохимической модификации, не отмечено процессов окисления исходного действующего вещества, а также химических взаимодействий между лекарственным веществом и полимерами. ТД при растворении в воде образуют супрамолекулярные комплексы с большей биологической активностью, что и было подтверждено нами на лабораторной модели трихинеллеза белых мышей в отношении ТД ФБЗ с ПВП и ФБЗ с АГ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-20055), при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ с использованием научного оборудо-

вания центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Архипов И.А., Варламова А.И., Одоевская И.М. Методические рекомендации по испытанию и оценке эффективности препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели // Рос. паразитол. журн. 2019. Т. 13(2). С. 58–63.
- Архипов И.А., Варламова А.И., Халиков С.С., Садов К.М., Душкин А.В. Влияние механохимической технологии на антигельминтную эффективность супрамолекулярных комплексов фенбендазола с экстрактом солодки // Рос. паразитол. журн. 2020. Т. 14(1). С. 70–74.
- Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. 278 с.
- Варламова А.И., Лимова Ю.В., Садов К.М., Садова А.К., Белова Е.Е., Радионов А.В., Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В., Скира В.Н., Архипов И.А. Эффективность супрамолекулярного комплекса фенбендазола при нематодозах овец // Рос. паразитол. журн. 2016. Т. 35(1). С. 76–81.
- Варламова А.И., Архипов И.А., Садов К.М., Халиков С.С. Эффективность супрамолекулярного комплекса фенбендазола против нематод при комиссионном производственном испытании // Рос. паразитол. журн. 2020. Т. 14(2). С. 93–97.
- Варламова А.И., Архипов И.А., Садов К.М., Халиков С.С., Арисов М.В., Борзунов Е.Н. Эффективность твердой дисперсии фенбендазола при желудочно-кишечных стронгилятозах молодняка крупного рогатого скота // Рос. паразитол. журн. 2021. Т. 15(1). С. 92–97.
- Гламаздин И.И., Архипов И.А., Одоевская И.М., Хиллота Н.В., Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В. Антигельминтная эффективность лекарственных форм альбендазола, полученных по механохимической технологии с использованием адресной доставки Drug Delivery System на лабораторной модели // Рос. паразитол. журн. 2013. № 3. С. 92–95.
- Евглевский Г.Ф., Рыжкова Е.П., Евглевская Н.В., Ванина И.И., Михайлова А.В. Денисова Н.Ф., Ерыженская Н.Ф. Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. С. 67–69.
- Кочетков П.П., Варламова А.И., Абрамов В.Е., Мисюра И.А., Абрамова Е.В., Абрамов С.В., Кошечкина Н.И., Архипов И.А. Определение фенбендазола и его метаболитов в молоке коров методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Рос. паразитол. журн. 2016. Т. 38(4). С. 554–562.
- Лагерева Е.В., Абрамов В.Е., Мусаев М.Б., Халиков С.С. Эффективность супрамолекулярного комплекса на основе албендазола и триклабендазола при фасциолезе и нематодозах пищеварительного тракта овец // Рос. паразитол. журн. 2019. Т. 13(2). С. 82–88.

- Марченко В.А., Халиков С.С., Ефремова Е.А., Василенко Ю.А., Халиков М.С. Эффективность твердых дисперсий ивермектина и альбендазола при кишечных гельминтозах овец в Республике Алтай // Вестник НГАУ. 2019. № 3. С. 82–90.
- Мусаев М.Б., Миленина М.В., Архипов И.А., Халиков С.С., Михайлицин Ф.С., Варламова А.И. Эффективность супрамолекулярных комплексов триклабендазола с полимерными наполнителями при фасциолезе // Рос. паразитол. журн. 2017. Т. 41(3). С. 271–276.
- Мусаев М.Б., Зацепкина В.В., Вацаев Ш.В., Джамалова А.З., Ильин М.М., Халиков С.С. Эффективность супрамолекулярного комплекса ивермектина в условиях производства при нематодозах пищеварительного тракта лошадей табунного содержания // Рос. паразитол. журн. 2020. Т. 14(3). С. 104–108.
- Мызь С.А., Михайленко М.А., Михайловская А.В., Политова А.А., Кузнецова С.А., Шахтинейдер Т.П. Механохимический синтез смешанных кристаллов бетулина с адипиновой кислотой // Журн. Сибирского федерального университета. Химия. 2020. Т. 13(4). С. 511–524.
- Папуниди К.Х., Иванов А.В., Зухрабов М.Г. Патология обмена веществ и пути его коррекции // Ветеринарный врач. 2000. № 1. С. 62–65.
- Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В., Метелева Е.С., Поляков Н.Э., Архипов И.А., Варламова А.И., Гламаздин И.И., Данилевская Н.В. Создание антигельминтных препаратов повышенной эффективности на основе межмолекулярных комплексов действующих веществ с водорастворимыми полимерами, в том числе с полисахаридами // Химия в интересах устойчивого развития. 2015. Т. 23(5). С. 567–577.
- Чистяченко Ю.С., Хвостов М.В., Белоусов А.И., Жукова Н.А., Пахарукова М.Ю., Катохин А.В., Халиков С.С., Толстикова Т.Г., Душкин А.В., Мордвинов В.А., Ляхов Н.З. Физико-химические свойства и противоопистархозное действие механохимически синтезированных супрамолекулярных комплексов албендазола и полисахарида арабиногалактана из лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* // Доклады Академии Наук. 2014. Т. 456(6). С. 741–743.
- Arkhipov I.A., Sadvov K.M., Limova Y.V., Sadvova A.K., Varlamova A.I., Khalikov S.S., Dushkin A.V., Chistyachenko Y.S. The efficacy of the supramolecular complexes of niclosamide obtained by mechanochemical technology and targeted delivery against cestode infection of animals // Veterinary Parasitology. 2017. V. 246. P. 25–29.
- Arkhipov I.A., Khalikov S.S., Sadvov K.M., Dushkin A.V., Meteleva E.S., Varlamova A.I., Odoevskaya I.M., Danilevskaya N.V. Influence of mechanochemical technology on anthelmintic efficacy of the supramolecular complex of fenbendazole with polyvinylpyrrolidone // J. Advanced Veterinary and Animal Research. 2019. V. 6(1). P. 133–141.
- Avustinovitch D., Tsyganov M., Vishnivetskaya G., Kovner A., Sorokina I., Orlovskaya I., Toporkova L., Goiman E., Tolstikova T., Dushkin A., Lyakhov N., Mordvinov V. Effects of supramolecular complexation of praziquantel with disodiumglycyrrhizinate on the liver fluke *Opisthorchis felinus*: an in vitro and in vivo study // Acta Tropica. 2019. V. 194. P. 1–12.
- Chistyachenko Y.S., Meteleva E.S., Pakharukova M.Y., Katochin A.V., Khvostov M.V., Varlamova A.I., Glamazdin I.I., Khalikov S.S., Polyakov N.E., Arkhipov I.A., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A., Dushkin A.V., Lyakhov N.Z. Physicochemical and pharmacological study of the newly synthesized complex of albendazole and polysaccharide arabinogalactan from larch wood // Current Drug Delivery. 2015. V. 12 (5). P. 477–490.
- Fan Q., Zhu L., Li X., Ren H., Wu G., Zhu H., Sun W. Catalyst-free visible light-mediated selective oxidation of sulfides into sulfoxides under clean conditions // Green Chem. 2021. V. 23. P. 7945–7949.
- Khalikov S.S., Lokshin B.V., Ilyin M.M., Varlamova A.I., Mусаev M.B., Arkhipov A.I. Methods for obtaining solid dispersions of drugs and their properties // Rus. Chem. Bull. 2019. V. 68(10). P. 1924–1932.
- Khalikov S.S., Lokshin B.V., Ilyin M.M. Solid dispersions of medamine and albendazole with water-soluble polymers: preparation and properties // Pharm. Chem. J. 2020. V. 54(8). P. 816–821.
- Marchenko V.A., Khalikov S.S., Efremova E.A., Ilyin M.M. Efficiency of novel formulations of ivermectin and albendazole in parasitic infections of sheep in the Altai Mountains of Russia // Iran J Parasitol. 2021. V. 16(2). P. 198–208.
- Marchenko V.A., Khalikov S.S., Vasilenko Y.A., Ilyin M.M., Kravchenko I.A. Innovative anthelmintic based on mechanochemical technology and their efficacy against parasitic infection of sheeps // J. advanced veterinary and animal research. 2020. V. 7(4). P. 718–8725.
- Meteleva E.S., Chistyachenko Y.S., Suntsova L.P., Khvostov M.V., Polyakov N.E., Selyutina O.Y., Tolstikova T.G., Frolova T.S., Mordvinov V.A., Dushkin A.V., Lyakhov N.Z. Disodium salt of glycyrrhizic acid – A novel supramolecular delivery system for anthelmintic drug praziquantel // J. Drug Delivery Science and Technology. 2019. V. 50. P. 66–77.
- Riviere J.E., Papich M.G. Veterinary pharmacology & Therapeutics / 9thed. Hoboken: Willey-Blackwell, 2009. 1541 p.
- Surov A.O., Vasilev N.A., Vener M.V., Parashchuk O.D., Churakov A.V., Magdysyuk O.V., Perlovich G.L. Pharmaceutical salts of fenbendazole with organic counterions: structural analysis and solubility performance // Crystal Growth & Design. 2021. V. 21(8). P. 4516–4530.
- Varlamova A.I., Movsesyan S.O., Arkhipov I.A., Khalikov S.S., Arisov M.V., Kochetkov P.P., Abramov A.E., Ilyin M.M., Lokshin B.V. Biological activity and pharmacokinetic behavior of fenbendazole integrated into a supramolecular delivery system with licorice Extract and Sodium Dioctyl Sulfosuccinate // Biology Bulletin. 2020. V. 47(6). P. 565–574.

Influence of Different Methods of Obtaining of Solid Dispersions and Crystals of Fenbendazole on Biological Activity

**I. A. Arkhipov¹, S. O. Movsesyan², S. S. Khalikov³, E. A. Khakina³, A. I. Varlamova^{1, #},
M. S. Khalikov^{1, 3}, and M. M. Ilyin³**

¹ *All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV”, Bolshaya Cheremushkinskaya street, 28, Moscow, 117218 Russia*

² *Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the RAS, Leninsky Prospect, 33, Moscow, 119071 Russia*

³ *Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the RAS, Vavilova street, 28, Moscow, 119334 Russia*
[#]*e-mail: arspheob@mail.ru*

Fenbendazole (FBZ) is one of the most widely used drugs in veterinary medicine. Modification of its physicochemical properties, in particular the parameter of solubility, contributes to a change of its biological activity, that is shown on the model of trichinellosis of white mice. The analysis of methods of obtaining new preparations of fenbendazole is presented: solid dispersions of fenbendazole with polymers, as well as the combinations with polymers and succinic acid (SA) and mixed crystals of FBZ with SA. The concentration of the active substance, stability and effect on biological activity were studied.

Keywords: fenbendazole, sulfoxide, solid dispersion, mixed crystals, stability, polymers, biological activity, white mice

УДК 638.123.575.174.5

ВНУТРИПОРОДНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ КАРПАТСКОЙ (*Apis mellifera carpathica*) И КАВКАЗСКОЙ (*Apis mellifera caucasica*) РАСАМИ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

© 2023 г. Т. А. Триселева*^{*, @}, А. Ф. Сафонкин*, Т. О. Быкова**, М. Я. Рухкян***

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 117071 Россия

**Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь,
просп. Академика Вернадского, 4, Симферополь, 295007 Россия

***Центр зоологии и гидроэкологии АН, ул. П. Севака, 7, Ереван, 0014 Армения

@E-mail: triselyova@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 08.02.2023 г.

По анализу 94 сиквенсов гена *CO1* мтДНК изучено внутривидовое разнообразие и эволюционные взаимоотношения пчел из России, Украины, Армении, Киргизии, Таджикистана, Польши. Выявлено два основных гаплотипа, соответствующие расам *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica*, распространенных в исследуемых регионах. Однако в Армении преобладают пчелы кавказской расы, а в Польше – карпатской. Большим гаплотипическим разнообразием обладает *A. m. caucasica*, один из ее гаплотипов образован образцами пчел крымской горной породы, возможно самостоятельной расы *A. m. taurica*. На филогенетическом дереве выделяются 2 кластера: один включает *A. m. mellifera* и *A. m. iberica* (эволюционная линия М), другой (линия С) – *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*. Гаплотипы *A. m. caucasica* имеют большее количество замен на сайт, что указывает на их более раннее происхождение по сравнению с *A. m. ligustica* и *A. m. carpathica*. По времени расхождения *A. mellifera* и *A. cerana* в 6 млн лет, отхождение всех рас линии С оценено от 1.3 до 0.6 млн, расы *A. m. caucasica* 0.35–0.25 млн, *A. m. carpathica* – 0.2–0.04 млн. При использовании универсальных праймеров с подбором условий амплификации для участка гена *CO1* мтДНК выявлен несинонимичный SNP G/A в позиции 4 (680 п.н.) отличающий *A. m. carpathica* от *A. m. ligustica*.

Ключевые слова: медоносная пчела, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, филогения пчел, *CO1* мтДНК

DOI: 10.31857/S102634702360005X, **EDN:** TQCXWF

Виды медоносных пчел рода *Apis*: *A. florea* – малая, *A. dorsata* – гигантская, *A. cerana* – восточная, *A. mellifera* – западная определились как самостоятельные виды уже во время олигоцена. Последний Ледниковый период привел к тому, что пчелы на территории Европы отодвинулись на юг, где в результате сформировались современные расы медоносной пчелы *A. mellifera* (Ruttner, 1992). Медоносные пчелы, населяющие Европу в настоящее время – результат их вторичного расселения из южных регионов.

В процессе эволюции и расселения внутри вида *Apis mellifera* сформировались группы пчел, приуроченные к разным природно-климатическим условиям, различающиеся по комплексу биологических признаков и имеющие определенный ареал. В.В. Алпатов (Алпатов, 1948), разбирая вопросы внутривидовой изменчивости, предложил различать несколько типов подвидов и придерживался мнения, что географические подвиды

пчел соответствуют понятию “природных” или “примитивных” пород. Таким образом, группы пчел, различные по комплексу признаков, в отечественной литературе обозначаются как породы. В зарубежной литературе эти группы пчел обозначают термином “раса”, рассматривая их как результат естественного отбора. В научной литературе породы пчел в зоологическом смысле часто рассматриваются как подвиды пчел. В современных условиях разведения пчел зоологический термин “подвид” на наш взгляд может быть отнесен только к аборигенным пчелам определенного региона, что соответствует понятию “раса”. Термин “породность” более близок к группам пчел, искусственно разводимым в питомниках и на пасеках.

Медоносная пчела играет большую роль в формировании структуры растительных биоценозов посредством опыления. Для каждого биоценоза имеет значение таксономическая принад-

лежность пчел и поддержание чистопородности генофонда, поскольку разные расы медоносной пчелы предпочитают определенные виды опыляемых растений (Ильясов и др., 2017б).

Таксономия медоносной пчелы содержит множество вопросов, связанных со спецификой популяционной структуры, особенностями биологии и решениями методов распознавания подвидов медоносных пчел. Существование переходных зон между ареалами подвидов привело к обмену генетическим материалом и, как следствие, к постепенному изменению характеристик соседних подвидов. Большую роль в этом процессе играет также искусственная гибридизация в результате вмешательства человека (Ильясов и др., 2017а, 2017в; Ильясов *et al.*, 2020).

К настоящему времени разработаны десятки методов идентификации таксономической принадлежности семей пчел. Первоначально во всем мире использовали только морфометрические методы исследования. Однако морфометрические признаки не всегда информативны, поскольку под воздействием условий среды обитания подвержены изменчивости (Franck *et al.*, 2000). Еще в начале 20 в. А.С. Михайлов (Михайлов, 1927), изучая сезонную изменчивость экстерьерных признаков пчел (длина хоботка, длину и ширину правого переднего крыла, число зацепов на правом заднем крыле, сумму длин 3 и 4 тергитов), установил, что в течение сезона, в той или иной степени, меняются все измеренные показатели.

Методы молекулярной диагностики для идентификации пчел включают анализ варибельности аллозимных локусов, мтДНК, микросателлитных локусов ядерной ДНК, сайтов однонуклеотидных замен. (Ильясов и др., 2017в). Разработка штрихкодирования ДНК для создания стандартизованного, экономичного и эффективного по времени метода идентификации видов (Bouga *et al.*, 2011), несмотря на некоторые критические замечания (Meuer, Paulay, 2006; Rubinoff *et al.*, 2006), дает свои результаты. Для филогенетических и филогеографических исследований медоносной пчелы успешно используются методы на основе полиморфизма локусов мтДНК (Smith 1991; Ильясов и др., 2006). Учитывая появление новых данных о географическом распределении, генетическом разнообразии и структуре можно ожидать, что штрихкодирование ДНК улучшит исследования молекулярной филогенетики и популяционной генетики (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Широко распространенными на территории Европы и интенсивно используемыми пчеловодами являются две близкие расы: кавказская *A. m. caucasica* и карпатская *A. m. carpathica*. Эти расы имеют перекрывающиеся места обитания с другими расами, что привело к увеличению степени гибридизации *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* не

только друг с другом, но и с другими подвидами (Bouga *et al.*, 2011; Pentek—Zakar *et al.*, 2015; Kukrer *et al.*, 2017). Несмотря на широкое использование на пасеках Европы этих рас, таксономическое положение и генетическое родство *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* до сих пор остаются спорными.

A. m. carpathica – наименее изученная из всех рас медоносных пчел. Она практически неизвестна для многих исследователей и не всегда упоминается в литературе как самостоятельная раса (Maa, 1953; Ruttner, 1988; Arias, Sheppard, 1996; Franck *et al.*, 2000; Smith, 2002; Kandemir *et al.*, 2011; Ильясов *et al.*, 2019). Например, *A. m. carpathica* как самостоятельная раса не была подтверждена также F. Ruttner, который считал ее ответвлением от *A. m. carnica* в западной части Румынии и от *A. m. macedonica* на юго-востоке (цитруется по Bouga *et al.*, 2011).

Филогенетический анализ на основе полной мтДНК показал, что *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* являются самостоятельными подвидами и представляют эволюционную линию С (Ильясов *et al.*, 2019), куда кроме них входят следующие расы медоносной пчелы Восточной Европы и Северного Средиземноморья: *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia*, *A. m. sicula* (Ильясов и др., 2018).

Ранее нами было описано внутривидовое разнообразие *A. m. carpathica* на основе морфологических и молекулярных данных (Сафонкин и др., 2019). Однако известные данные не позволяют уточнить взаимоотношения между *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*.

Цель работы – исследование внутривидового разнообразия и эволюционных взаимоотношений между *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* и выявление критериев определения чистопородности на основе секвенирования участка гена *COI* мтДНК в пробах рабочих пчел.

МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ

Нами были получены и проанализированы 94 сиквенса (из них 68 новые) от особей рабочих пчел *A. mellifera*, отловленных с частных пасек на территории Российской Федерации (Москва, Московская, Липецкая области, Крым), Украины, разных регионов Армении, из Киргизии, Таджикистана, а также из пасек разных районов Польши. Только часть образцов из пасек имела обозначенный породный статус. Крым: *A. m. carpathica* *A. m. caucasica*; Украина: *A. m. carpathica*; Польша: *A. m. carnica* *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* (табл. 1).

Общая ДНК была выделена из лапок имаго пчел с использованием реагентов “Diatom™ DNA Prep 200” (Изоген, Москва). Амплификацию проводили с использованием набора реактивов

Таблица 1. Образцы пород рабочих пчел *Apis mellifera*

| Исходные данные с пасеки | | | Результаты анализа COI мт ДНК |
|---|------------|---|---|
| Место сбора | Год | Кол-во проб/раса | Кол-во сиквенсов/раса/ гаплотип |
| Москва, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина | 2015 | 3/не указана | 1/карпатка/Г2 2/кавказка/Г1 |
| Московская область, г. Гжель | 2015 | 2/не указана | 2/карпатка/Г2 |
| Липецкая область, г. Липецк | 2016 | 2/не указана | 1/карпатка/Г2 1/кавказка/Г1 |
| Крым с. Укромное Симферопольского р-на г. Феодосия “Красные пещеры” Симферопольского р-на г. Бахчисарай | | 6/не указана 2/не указана 4/не указана 1/не указана 10/Крымская? 3/карпатка 3/кавказка 6/ не указана | 6/карпатка/Г2 2/кавказка/Г1 4/карпатка/Г2 1/кавказка/Г1 10/Крымская/Г1-4 3/кавказка/Г1 3/кавказка/Г1 6/карпатка/Г2 |
| Ставропольский край | 2017 | 3/не указана | 2/карпатка/Г2 1/кавказка/Г1 |
| Закарпатская обл. Украины | 2016 | 2/карпатка | 2/карпатка/Г2 |
| Армения Наирыйский район Ширакский р-н Гегаркуникская обл. Котайкская обл. Сюникская обл. Тавушская обл. Вайоцзорская обл. | 2017, 2019 | 1/не указана 1/не указана 4/не указана 7/не указана 2/не указана 1/не указана 1/не указана | 1/кавказка/Г1-2 1/карпатка/Г2 4/кавказка/Г1 7/кавказка/Г1, Г1-3 2/кавказка/Г1 1/кавказка/Г1 1/кавказка/Г1 |
| Киргизстан, Жалабатская обл. | 2017 | 4/не указана | 2/карпатка/Г2 2/кавказка/Г1, Г1-1 |
| Таджикистан с. Хистевараз, Согдийская обл. | 2014, 2016 | 4/не указана 4/не указана | 4/карпатка/Г2-1 4/кавказка/Г1, Г1-1 |
| Польша Mrozy Seglow Ladzyn Minska Mazwieickiego Poreby Nowe Kobylanka | 2018 | 4/карника 2/карника 2/итальянка 5/кавказка 1/итальянка 1/не указана 2/не указана 2/не указана | 4/карпатка/Г2, Г2-1 1/кавказка/Г1 1/карпатка/Г2 2/карпатка/Г2 5/кавказка/Г1 1/карпатка/Г2 1/карпатка/Г2 2/карпатка/Г2-1 2/карпатка/Г2 |

для ПЦР 5xMasterMix (Диалат, Москва). Анализируемый фрагмент гена *COI* мтДНК составлял 680 пар нуклеотидов. Для амплификации данного участка были использованы пары праймеров для начального участка гена *COI* LCO1490 и HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Реакцию проводили при следующих условиях: 94° – 3 мин (1 цикл); 94° – 1 мин, 45° – 1 мин, 72° – 1 мин (6 циклов); 94° – 1 мин, 55° – 1.5 мин, 72° – 1.5 мин (40 циклов); 72° – 6 мин (1 цикл). Продукт амплификации очищали методом осаждения раствором этилового спирта с добавлением 5 М ацетата натрия. Электрофорез и чтение нуклеотидных последовательностей продукта амплификации выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов BigDye Terminator kit 3.1 (Applied Biosystems) в ЦКП “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН.

Обработку данных проводили с использованием пакетов программ MEGA II (Tamura *et al.*, 2021), Network ver. 4.6.1.1 (Bandelt *et al.*, 1999, ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2011), BEAST ver. 2.4 (Bouckaert *et al.*, 2014) с использованием Строгих часов и модели видообразования (Yule, 1925)

Вновь полученные последовательности гена *COI* мтДНК образцов медоносной пчелы *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica*, представленные отдельными гаплотипами, или образцы одних и тех же гаплотипов, но из разных мест сбора, депонированы в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами OP890235–OP890259, а полученные нами ранее и используемые в данной работе под номерами MF100910–MF100926.

Для сравнительного анализа дополнительно из GenBank были взяты последовательности гомологичного участка мтДНК медоносной пчелы: *A. m. carpathica* (AP018403), *A. m. caucasica* (AP018404, KX819203, MN7141), *A. m. ligustica* (L06178, KX908209, M23409), а также рас *A. m. mellifera* (KY9268), *A. m. iberica* (MN5851) и трех видов рода *Apis*: *A. cerana* (GQ162109), *A. dorsata* (NC_037709), *A. florea* (NC_021401). Филогенетические деревья включают только отдельные гаплотипы, полученные нами для настоящего исследования и гаплотипы, взятые из ГенБанка для сравнения. Кроме того, из GenBank были взяты и проанализированы короткие последовательности, содержащие участок с SNP (Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидные полиморфизмы (замены)), входящий в анализируемый участок гена *COI* мтДНК и специфический для *A. m. carpathica* (KY271917–KY271927) и *A. m. caucasica* (KY271890–KY271900).

Для построения медианной сети и дендрограмм использовали все полученные нами последовательности участка *COI* и последовательности гомологичного участка из GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из рис. 1 медианной сети видно, что большая часть полученных образцов распределилась между двумя гаплотипами, которые определяются образцами с породным статусом *A. m. caucasica* (гаплотип 1) и *A. m. carpathica* (гаплотип 2). Один из трех образцов *A. m. caucasica* из GenBank (KX819203) также имеет тот же гаплотип, что и полученные нами образцы с породным статусом *A. m. caucasica* (гаплотип 1). Следует отметить, что практически все образцы из Армении, не имеющие породного статуса, имеют гаплотип *A. m. caucasica* (гаплотип 1). Исключение составляют образцы из Ширакского района, расположенного на севере Армении, которые имеют гаплотип породного статуса *A. m. carpathica* (гаплотип 2). Кроме того, от гаплотипа со статусом породы *A. m. caucasica* (гаплотип 1) отходят 4 отдельных гаплотипа (1-1, 1-2, 1-3, 1-4), в том числе гаплотип (1-4) образцов крымской горной пчелы (Быкова и др, 2016, Сафонкин и др, 2019), остальные три гаплотипа представлены единичными образцами пчел с пасек Армении, Таджикистана и Киргизии. Гаплотип с породным статусом *A. m. carpathica* (гаплотип 2) включает также образцы из Польши, обозначенные в сборах как *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*, и собранные в г. Цеглув (Ceglów), Ладзын (Ladzyn), Мрозы (Mrozy), и образцы неизвестной породы из г. Миньск-Мозовецки (Minska Mazowieckiego), Мазовецкого воеводства, с. Кобылянка (Kobyłanka) Малопольского воеводства. От этого же гаплотипа отходит гаплотип (Г2-1) образцов из Польши *A. m. carnica* из Мрозы и неизвестной породы из с. Poreby Nowe Мазовецкого воеводства, а также из выборки с одной из пасек Таджикистана. Как видно на медианной сети, образцы из Таджикистана неизвестной породы распределились между гаплотипами с разным породным статусом. Образцы *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* из GenBank также образуют на медианной сети отдельные гаплотипы. Причем, гаплотип *A. m. caucasica* из GenBank (AP018404, MN7141) дает начало гаплотипу 1 (с породным статусом *A. m. caucasica*), а также гаплотипу, представленному образцами из GenBank *A. m. carpathica* (AP018403) и *A. m. ligustica* (L06178, KX908209, M23409). *A. m. mellifera* (KY9268), *A. m. iberica* (MN5851) и три вида рода *Apis*: *A. cerana*, *A. florea*, *A. dorsata* образуют соответственно отдельные гаплотипы. Группа рас *A. mellifera* связана между собой двумя гипотетическими гаплотипами (медианными векторами), один из которых является общим для *A. m. mellifera* и *A. m. iberica*, другой дает начало *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* (рис. 1).

Дендрограммы, построенные методами ближайшего связывания (Neighbor-Joining), максимального правдоподобия (Maximum Likelihood),

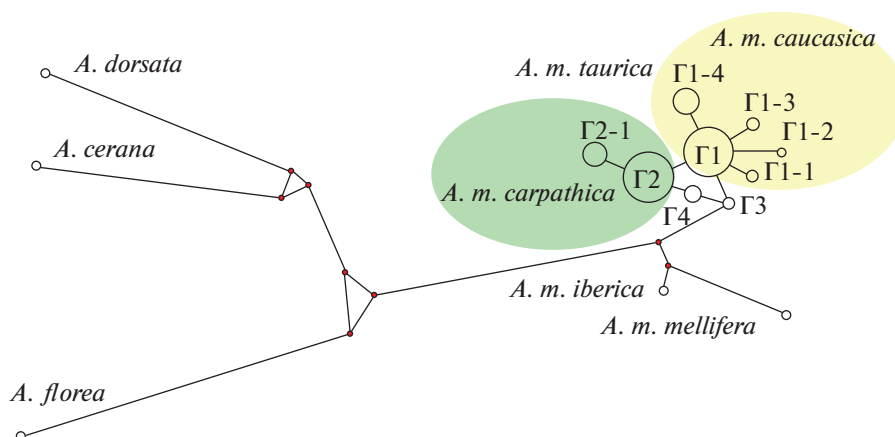


Рис. 1. Медианная сеть 3-х видов рода *Apis* и 6-ти рас *Apis mellifera*, построенная на основе нуклеотидных последовательностей участка *COI* мтДНК. Кружки – отдельные гаплотипы. Г1, Г1-1 – Г1-4 – гаплотипы *A. m. caucasica*, Г2, Г2-1 – гаплотипы *A. m. carpathica*, Г3 – гаплотип *A. m. caucasica* (Генбанк MN714160, AP018404), Г4 – гаплотип *A. m. ligustica* (Генбанк L06178, KX908209, M23409), *A. m. carpathica* (Генбанк AP018403).

максимальной экономии (Maximim Parsimony) по нуклеотидным последовательностям гаплотипов *COI* мтДНК, совпадают в ключевых узлах. Группа рас *A. mellifera* объединена в общий кластер. При этом *A. m. mellifera* и *A. m. iberica* стоят отдельно от группы рас *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*. Такое распределение рас соответствует двум эволюционным линиям С и М соответственно. Гаплотип *A. m. caucasica*, представленный двумя образцами из GenBank на всех деревьях является объединяющим для остальных гаплотипов, включая *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica* (рис. 2).

Большее гаплотипическое разнообразие (H) у *A. m. caucasica* (0.551 ± 0.071) по сравнению с *A. m. carpathica* (0.371 ± 0.079) при низком нуклеотидном разнообразии (π) у обеих рас (0.001 ± 0.0008 , 0.0005 ± 0.0006 соответственно) обычно является результатом мутаций в течение достаточно длительного времени. Это приводит к увеличению гаплотипической изменчивости, однако недостаточного для накопления значительных различий между нуклеотидными последовательностями (Avisе, 1994). Низкое и гаплотипическое, и нуклеотидное разнообразие характерно для исторически более молодых популяций (Avisе, 1994).

Для уточнения времени появления и распространения рас *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* была построена дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей участка гена *COI* в программе BEAST (рис 3).

Исходя из времени дивергенции между видами *A. mellifera* и *A. cerana* 5.9–6 млн (Garnerу et al, 1991; Cognuet, Garnerу, 1991), рассчитанного на основе скорости эволюции мтДНК у видов рода *Apis*, предполагаемое по нашим расчетам время расхождения рас внутри *A. mellifera* составляет от

1.3 до 0.6 млн лет. При этом гаплотипы, относящиеся к расе *A. m. caucasica*, датируются более ранним временем происхождения (0.35–0.25 млн лет) по сравнению с *A. m. carpathica* (0.2–0.04 млн лет).

Согласно последним данным (Tihelka et al., 2020) местом происхождения *Apis mellifera* скорее всего являлась Северная Африка и, возможно, регион Ближнего Востока. Один из предполагаемых пу-

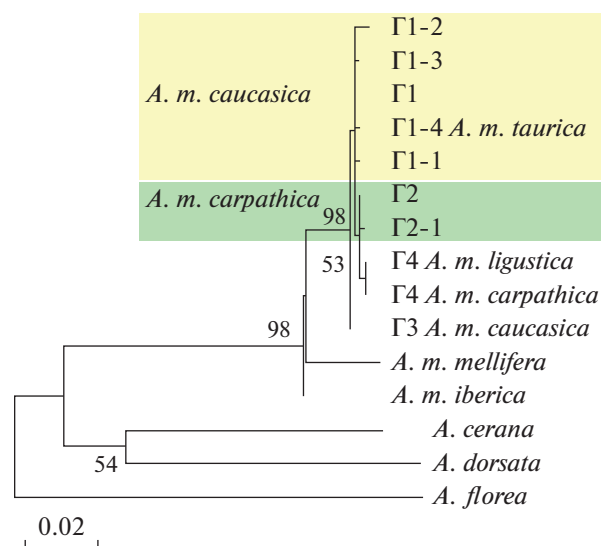


Рис. 2. Дендрограмма отношений 3-х видов рода *Apis* и 6-ти рас *Apis mellifera*, построенная на основе нуклеотидных последовательностей участка *COI* мтДНК методом максимального правдоподобия (ML). Г1, Г1-1 – Г1-4 – гаплотипы *A. m. caucasica*, Г2, Г2-1 – гаплотипы *A. m. carpathica*, Г3 – гаплотип *A. m. caucasica* (Генбанк MN714160, AP018404), Г4 – гаплотип *A. m. ligustica* (Генбанк L06178, KX908209, M23409) и *A. m. carpathica* (Генбанк AP018403).

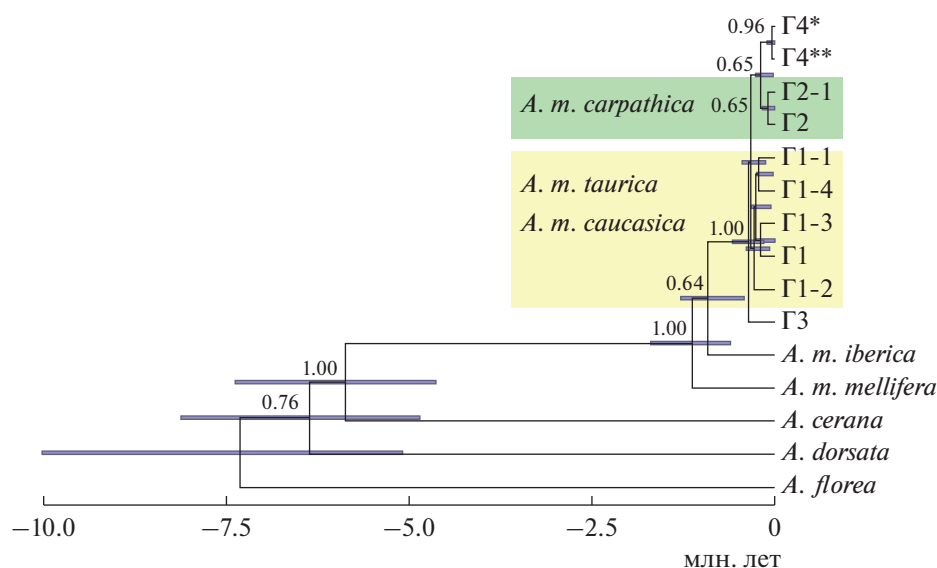


Рис. 3. Шкала времени дивергенции представителей рода *Apis*, построенная на основе фрагмента гена *COI* мтДНК в программе BEAST v. 2.4. Г4* – гаплотип *A. m. ligustica* (Генбанк L06178, KX908209, M23409), Г4** – *A. m. carpathica* (Генбанк AP018403).

тей проникновения в Европу пчел эволюционной линии С шел через Кавказ.

В ранневалдайское время произошло позднеплейстоценовое похолодание и оледенение, которое затронуло Кавказ и Карпаты. Это было последнее оледенение на Кавказе, которое датируется примерно 50–тыс. лет. Последнее четвертичное оледенение (поздневалдайское), датируемое 24–тыс. лет, охватило северо-западную часть Европы, включая современную территорию Польши, далее до стран Балтии, через Валдайскую возвышенность, до низовьев Северной Двины и Пинеги (Чочиа, Евдокимов, 1993) и, следовательно, в это время пчелы могли обитать только на юге Европы и на Кавказе.

Вторичное проникновение пчел линии С на остальную территорию Европы после окончания ледникового периода могло происходить из южной Европы. По мнению П.М. Комарова, проникновению пчел на Кавказ из центральных регионов западной Европы мешали степи. Поэтому автор считал аборигенных кавказских пчел древнее других европейских рас (Комаров, 1937). Более раннее время происхождения кавказской расы подтверждается и нашими данными.

По молекулярным данным *A. m. carpathica* отличается от *A. m. caucasica* по наличию SNP A/G в позиции 99 начального участка гена *COI* мтДНК размером 658 п.н. (Folmer *et al.*, 1994). То есть, последовательности *COI* демонстрируют стабильные SNP, типичные для этих рас (Syromyatnikov *et al.*, 2018). В нашем случае при длине сиквенсов 680 п.н. это позиция соответствует 110.

Наличие общего гаплотипа для образцов пчел из Польши *A. m. carpathica*, *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* для данного участка *COI* может свидетельствовать о несоответствии образцов породному статусу.

Таким образом, большинство образцов в нашей работе, распредившихся между гаплотипами с соответствующим SNP, относятся к двум расам *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica*. Наличие отдельных гаплотипов, отходящих от двух основных может, с одной стороны, свидетельствовать о некотором разнообразии внутри рас. С другой стороны, один из гаплотипов, отходящий от основного гаплотипа *A. m. caucasica*, образован образцами пчел крымской горной породы (Быкова и др., 2016), которую крымские исследователи вслед за В.В. Алпатовым (Алпатов, 1948) по морфологическим признакам и биологии сравнивают с самостоятельной расой – *A. m. taurica* (Быкова и др., 2016). Стабильные различия в определенных нуклеотидных позициях могут свидетельствовать о начале формирования особых экотипов пчел, адаптированных к определенному региону, особенно в условиях предгорий и горных местностей.

Диапазон генетической дистанции (Jukes–Cantor) по мтДНК между подвидами насекомых в целом составляет 0.005–0.100 (Han *et al.*, 2016; Eimanifar *et al.*, 2017; Pysov *et al.*, 2019). Однако генетическая дистанция может различаться у разных групп насекомых как по всей мтДНК, так и по отдельным генам. В литературе приводятся различные диапазоны генетической дистанции по гену *COI* мтДНК для разных групп насекомых, в том числе для разных семейств и родов Hymenoptera.

Таблица 2. Генетическая дистанция (Jukes–Cantor, Kimur 2-parameter) между гаплотипами образцов рас медоносной пчелы *A. mellifera*

| | <i>A. m. caucasica</i> | <i>A. m. carpathica</i> | <i>A. m. ligustica</i> | Крымская пчела | <i>A. m. mellifera</i> | <i>A. m. iberica</i> | <i>A. m. syriaca</i> |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>A. m. caucasica</i> | | 0.001–0.003 0.005* | 0.003 0.005* | 0.001 | 0.031–0.033 | 0.012–0.018 | 0.012–0.015* |
| <i>A. m. carpathica</i> | | | 0.001 0.005* | 0.003 | 0.031–0.033 | 0.013–0.017 | 0.012–0.015* |
| <i>A. m. ligustica</i> | | | | 0.004 | 0.031–0.033 | 0.013 | 0.012–0.015* |
| Крымская пчела | | | | | 0.033 | 0.015 | – |

Примечание. * Из работы Ильясов и др., 2021.

Так, например, генетическая дистанция участка гена *COI* внутри видов *Vespa orientalis* и *Polistes bucharensis* составляет от 0.0 до 0.002 и от 0.0 до 0.005 соответственно, что по мнению авторов связано с различием в корме и географическими локалитетами (Abd-El-Samie *et al.*, 2018). В другой работе (Eimanifar *et al.*, 2017) было показано, что генетическая дистанция в семействе Apidae между подвидами, относящимся к разным эволюционным линиям, в среднем выше и может составлять 0.0047–0.0132 (*A. m. lamarckii* и *A. m. mellifera*), а между *A. m. lamarckii* и *A. m. intermissa*, которые находятся внутри одной эволюционной линии А – 0.0117.

Генетическая дистанция между гаплотипами образцов рас медоносной пчелы *A. mellifera* представлена в табл. 2.

В работе (Ильясов и др. 2021) генетическая дистанция, определенная авторами как 0.005, имеет отношение только к *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica*, тогда как генетическая дистанция между этими расами и *A. m. syriaca* из другой эволюционной линии Z, находится в диапазоне от 0.012 до 0.015. Исходя из выше изложенных данных, диапазон генетической дистанции по *COI* мтДНК в образцах, представленных в нашей работе, между *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* в большей мере соответствует внутривидовой изменчивости, что говорит о близости этих рас, относящихся к одной эволюционной линии С. Генетическая дистанция между *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* (линия С) и *A. m. mellifera*, *A. m. iberica*, которые относятся к другой эволюционной ветви (М), превосходит внутривидовую дистанцию по гену *COI*. Анализ генетической дистанции между гаплотипом крымской горной породы и *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica* и *A. m. ligustica* (табл. 2) показывает тесную связь гаплотипа крымской горной породы с *A. m. caucasica*. Это указывает на возможное влияние генотипа аборигенной расы *A. m. taurica*, выделенной по морфометрическим признакам В.В. Алпатовым (1948), на формирование пчел крымской горной породы.

Вероятно, определение пород/рас, экотипов или подвигов медоносной пчелы может быть связано, в том числе с их эволюционной историей, так как степень дивергенции между подвидами/расами/ породами внутри одной эволюционной линии и между подвидами из разных линий различна (Arias, Sheppard, 1996). Дивергенция *A. mellifera* на основные эволюционные линии оценивалась некоторыми авторами от 0.33 до 1.35 млн лет (Cornuet, Garnery, 1991), что подтверждается и нашими данными при оценке времени дивергенции между линией М и С в 0.6 млн лет (рис. 3).

Различия в эволюции линий М и С могут быть связаны с экологической специализацией предковых форм пчел. Пчелы линии М адаптированы больше к обитанию в лесных массивах равнин. Пчелы линии С – в условиях предгорных и горных лугов, что способствовало их расселению с Кавказа на Крым, а через Турцию на Альпы и Карпаты.

Наличие отличающегося гаплотипа *A. m. carpathica* (AP018403) и одного из гаплотипов *A. m. caucasica* (AP018404) из Генбанка от гаплотипов аналогичных рас, представленных в нашей работе связано с нахождением в позиции 1828 полного генома мтДНК аденина А (Plyasov *et al.*, 2019), тогда как во всех полученных нами образцах (при длине сиквенса 680 п.н. это позиция 4) и в одном сиквенсе (KX819203) из ГенБанка в этой позиции находится гуанин G, что ведет к замене аспарагина на аспарагиновую кислоту.

Следует отметить, что гаплотип *A. m. carpathica* из GenBank (AP018403) получен от пчел из пасек Майкопского региона Республики Адыгея (Научного отдела ППХ “Майкопское” – филиала ФГБНУ “ФНЦ пчеловодства”), где в последние годы проводятся селекционно-племенные работы по выведению линии карпатских пчел. Гаплотип *A. m. caucasica* GenBank (AP018404) получен из пасек Сочинского региона Краснодарского края, где занимаются разведением серой горной кавказкой породы.

Наличие G вместо A (в позиции 4 при 680 п.н.) во всех полученных нами образцах может говорить об изменчивости пород относительно генетически “выверенных” линий. Однако, по нашему мнению, отличие наших образцов скорее связано с тем, что мы сиквенировали определенный участок гена *COI* мтДНК с использованием универсальных праймеров (Folmer *et al.*, 1994). Такая же замена присутствует в одном сиквенсе (KX819203) из Генбанка, который представлен тем же начальным участком гена *COI*. Остальные немногочисленные образцы данных пород из GenBank представлены или полным геномом мтДНК или участком *COI-COII* мтДНК с возможной ошибкой в определении нуклеотида в данной позиции.

Использование универсальных праймеров и подбор условий амплификации для участка гена *COI* мтДНК образцов медоносной пчелы позволили нам по наличию несинонимичного SNP G/A в позиции 4 (680 п.н.) отличить *A. m. carpathica* от другой близкой расы, *A. m. ligustica*, тогда как образцы *A. m. carpathica* и *A. m. ligustica* из ГенБанка по данному участку гена *COI* мтДНК объединены в один общий гаплотип (гаплотип 4).

Таким образом, результаты, полученные на основе анализа собственных данных по 94 сиквенсам участка гена *COI* мтДНК проб медоносной пчелы *A. mellifera* в сравнении с имеющимися данными из GenBank по представленным там расам *A. mellifera* с использованием универсальных праймеров позволили распределить выборки медоносных пчел из разных регионов между двумя основными гаплотипами, соответствующими двум расам: *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica* и дифференцировать их от *A. m. ligustica*. *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica* практически равномерно распространены на европейской территории России, в бывших республиках СССР Центральной Азии, на Крымском полуострове. В Польше преобладают пчелы *A. m. carpathica*, в то время как в Армении породное разнообразие пчел определяется пчелами *A. m. caucasica*.

Эволюция *A. mellifera* линии С происходила от пчел, близких к породному статусу *A. m. caucasica*, возможно сохраненному в районе Кавказских гор и обладающих большим гаплотипическим разнообразием. Послеледниковое расселение пчел привело к образованию рас *A. m. ligustica* и *A. m. carpathica*, с естественным распространением в условиях горных массивов Альп и Карпат. Близка к *A. m. caucasica* и выявленная группа пчел Крыма, возможно соответствующая породному статусу *A. m. taurica*.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Kamil Karaban, Institute of Biological Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw за предоставление материала из Польши и А.А. Яцук, Институт проблем экологии и эволюции РАН, за

сбор материала из Ставропольского края и Наиринского района Армении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аллатов В.В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. М., 1948.
- Быкова Т.О., Триселева Т.А., Ивашов А.В., Сафонкин А.Ф. К оценке морфогенетического разнообразия медоносной пчелы *Apis mellifera* L. из горно-лесной зоны Крыма // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. № 6. С. 625–630.
<https://doi.org/10.7868/S0002332916060059>
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А. Г. Макро- и микроэволюция медоносной пчелы *Apis mellifera* // Биомика. 2017а. Т. 9. № 2. С. 60–70.
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Основные методы идентификации подвидов пчел *Apis mellifera* // Биомика. 2017б. Т. 9. № 2. С. 71–82.
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Современные методы оценки таксономической принадлежности семей пчел // Экологическая генетика. 2017в. Т. 15. № 4. С. 41–51.
<https://doi.org/10.17816/ecogen15441-51>
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Три сценария эволюции подвидов пчелы *Apis mellifera* // Пчеловодство. 2018. № 1. С. 16–18.
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Митохондриальная ДНК в изучении популяций пчел на Урале // Материалы межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 2006. С. 72–74.
- Ильясов Р.А., Хан Г.Ю., Ли М.Л., Ким К.В., Парк Д.Х., Такахаши Д.И., Квон Х.В., Николенко А.Г. Филогенетические отношения подвидов пчел *Apis mellifera caucasica* и *Apis mellifera carpathica* по последовательностям митохондриального генома // Генетика. 2021. Т. 57. № 6. С. 697–710.
<https://doi.org/10.31857/S0016675821060047>
- Комаров П.М. Разведение пчел. М.: Сельхозгиз, 1937. 312 с.
- Михайлов А.С. К биометрической характеристике кавказской горной серой пчелы // Пчеловодный мир. 1927. № 3. С. 84–86.
- Сафонкин А.Ф., Триселева Т.А., Быкова Т.О. Внутривидовое разнообразие карпатской расы медоносной пчелы *Apis mellifera carpathica* // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 5. С. 524–532.
<https://doi.org/10.1134/S0002332919050096>
- Чочиа Н.Г., Евдокимов С.П. Палеогеография позднего кайнозоя Восточной Европы и Западной Сибири (ледниковая и ледово-морская концепции) / Под общ. ред. Н.Г. Чочиа. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 1993. 248 с.
- Abd-El-Samie E.M., Elkafrawy I., Osama M., Ageez A. Molecular phylogeny and identification of the Egyptian wasps (Hymenoptera:Vespidae) based on COI mitochondrial gene sequences // Egypt. J. Biol. Pest Con-

- trol. 2018. V. 28. P. 36.
<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0038-z>
- Arias M.C., Sheppard W.S. Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 3. P. 557–566.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
- Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. N.Y.: Chapman and Hall. 1994. 511 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2381-9>
- Bandelt H.J., Foster P., Rohlf A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bouckaert R., Heled J., Kuhnert D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis // PLoS Computational Biology. 2014. V. 10. № 4. P. e1003537.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Bouga M., Alaux C., Bienkowska M., Büchler R., Carreck N.L., Cauia E., Chlebo R., Dahle B., Dall'Olio R., De la Rúa P., Gregorc A., Ivanova E., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kozmus P., Kryger P., Le Conte Y., Lodesani M., Murilhas A.M., Siceanu A., Soland G., Uzunov A., Wilde J. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping // J. Apic. Res. 2011. V. 50. № 1. P. 51–84.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.06>
- Cornuet J.M., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // Apidologie. 1991. V. 22. P. 627–642.
<https://doi.org/10.1051/apido:19910606>
- Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L., Moustafa D.M., Haddad N., Fuchs S., Grünwald B., Ellis J.D. The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera lamarckii* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 1. P. 270–272.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1325343>
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2011. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotech. 1994. V. 3. № 5. P. 294–299.
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.M. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*) // Mol. Ecol. 2000. V. 9. № 7. P. 907–921.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00945.x>
- Garnery L., Vautrin D., Cornuet J. M., Solignac M. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data // Apidologie 1991. V. 22. P. 87–92.
<https://doi.org/10.1051/apido:19910111>
- Hajibabaei M., Singer G.A., Hebert P.D.N., Hickey D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics // Tr. Genet. 2007. V. 23. № 4. P. 167–172.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- Han T., Lee W., Lee S., Park J.G., Park H. Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0148602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602>
- Ilyasov R., Nikolenko A., Tuktarov V., Goto K., Takahashi J.-I., Kwon H.W. Comparative analysis of mitochondrial genomes of the honey bee subspecies *A. m. caucasica* and *A. m. carpathica* and refinement of their evolutionary lineages // J. Apicultural Res. 2019. V. 58. № 4. P. 567–579.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1622320>
- Ilyasov R.A., Lee M.-L., Takahashi J.-I., Kwon H.W., Nikolenko A.G. A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera* // Saudi J. Biological Sciences. 2020. V. 27. P. 3615–3621.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.001>
- Kandemir I., Ozkan A., Fuchs S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach // Apidologie. 2011. V. 42. № 5. P. 618–627.
<https://doi.org/10.1007/s13592-011-0063-3>
- Kukrer M., Kence M., Kence A. Genetic evidences for the impact of anthropogenic factors on honey bee diversity // BioRxiv. 2017. V. 1. P. 1–28.
<https://doi.org/10.1101/154195>
- Maa T.C. An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honey bees (Himenoptera) // Treubia. 1953. V. 21. P. 525–640.
- Meyer C.P., Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling // PLoS Biology. 2006. V. 3. № 12. P. 2229–2238.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>
- Pentek–Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // Ecol. Evol. 2015. V. 5(23). P. 5456–5467.
<https://doi.org/10.1002/ece3.1781>
- Rubinoff D., Cameron S., Will K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification // J. Hered. 2006. V. 97. № 6. P. 581–594.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esl036>
- Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Berlin: Springer Verlag, 1988. 284 p.
- Ruttner F. Naturgeschichte der Honigbienen // Ehrenwirth Verlag, Munich, Grenoble; Bukarest: Apimondia, 1992. S. 380–383.
- Smith D.R. Mitochondrial DNA and Honey Bee Biogeography / In Diversity in the genus *Apis*. Smith D.R. editor. Boulder, CO: Westview Press; 1991. P. 131–176.
- Smith D.R. Genetic diversity in Turkish honey bees // Uludag Arıcılık Dergisi. 2002. V. 2. № 3. P. 10–17.
- Syromyatnikov M.Y., Borodachev A.V., Kokina A.V., Popov V.N. A molecular method for the identification of honey bee

- subspecies used by beekeepers in Russia // *Insects*. 2018. V. 9. № 1. E10.
<https://doi.org/10.3390/insects9010010>
- Tamura K., Stecher G., and Sudhir Kumar / MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38(7). P. 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tihelka E., Cai Ch., Pisani D., Donoghue Ph.C.J. Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*) *Scientific Reports*. 2020. V. 10. P. 14515.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71393-0>
- Yule G.U. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. JC Willis, FRS // *Philosophical Transactions of the Royal Society. B. Biological Sciences*. 1925. V. 213. P. 21–87.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1925.0002>

Intrabreed Diversity and Relationships between Races of Honey Bee *Apis mellifera carpathica* and *Apis mellifera caucasica*

T. A. Triseleva^{1, #}, A. F. Safonkin¹, T. O. Bykova², and M. J. Rukhkyan³

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

² Vernadsky Crimean Federal University, prosp. Akademika Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007 Russia

³ Scientific Center of Zoology and Hydroecology, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Paruyr Sevaki St., 7, Yerevan, 0014 Armenia

#e-mail: triseleva@yandex.ru

Based on the analysis of 94 sequences of the mtDNA *COI* gene, the intrabreed diversity and evolutionary relationships of bees from Russia, Ukraine, Armenia, Kyrgyzstan, Tajikistan, and Poland were studied. We revealed two main haplotypes corresponding to the races *A. m. carpathica* and *A. m. caucasica*, common in the studied regions. However, in Armenia bees of the Caucasian race predominate, and in Poland – Carpathian. *A. m. caucasica* has higher haplotype diversity: one of its haplotypes is formed by samples of bees from the Crimean mountain breed, possibly an independent race *A. m. taurica*. There are 2 clusters on the phylogenetic tree: one cluster includes *A. m. mellifera* and *A. m. iberica* (evolutionary line M), the other (line C) – *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*. Haplotypes of *A. m. caucasica* have more substitutions per site, indicating their earlier origin compared to *A. m. ligustica* and *A. m. carpathica*. According to the time of divergence of *A. mellifera* and *A. cerana* at 6 Ma, the divergence of all races of line C is estimated from 1.3 to 0.6 Ma; races *A. m. caucasica* 0.35–0.25 million, *A. m. carpathica* – 0.2–0.04 million. When using universal primers with optimization of amplification conditions for the mtDNA *COI* gene region, a nonsynonymous G/A SNP was detected in position 4 (680 bp) which can be used to identify *A. m. carpathica* from *A. m. ligustica*.

Keywords: honey bee, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, bee phylogeny, *COI* mtDNA

УДК 582.933:574.3

МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *PLANTAGO MARITIMA* L. КАК АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ К УСЛОВИЯМ ПРИМОРСКИХ БИОТОПОВ

© 2023 г. А. В. Сонина*, @, Т. Ю. Дьячкова*, К. В. Морозова*

*Петрозаводский государственный университет, пр. Ленина, 33, Петрозаводск, 185910 Россия

@E-mail: angella_sonina@mail.ru

Поступила в редакцию 31.03.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Изучены морфологические и анатомические параметры вегетативных и генеративных органов растений *Plantago maritima* L., произрастающих в разных биотопах литорали на побережье Белого моря в окрестностях пос. Растьяноволок Беломорского района Республики Карелия. Установлено, что у растений формируются две биоморфы (розеточная и верхнерозеточная с удлинёнными верхними междоузлиями) как приспособление к засыпанию грунтом во время приливов и штормов. В пределах литорали в разных условиях заливания растения отличаются по ряду анатомических признаков. Толщина водозапасающей паренхимы находится в прямой корреляции с толщиной листа, изменяется в пределах литорали в зависимости от длительности заливания растений соленой водой. Хорошо развитые покровные и механические ткани корня и розеточных побегов являются адаптивной реакцией к подвижности почвенного субстрата и водной массы во время приливных нагонов. Развитие аэренхимы в подземных вегетативных органах обеспечивает газообмен в условиях затопления. Значимые отличия проанализированных анатомических и морфологических параметров по биотопам на литорали показали широкие адаптивные возможности *P. maritima*, которые обеспечивают его доминирование в растительных сообществах побережья Белого моря.

Ключевые слова: *Plantago maritima*, литораль, Белое море, морфология побегов, анатомия вегетативных и генеративных органов

DOI: 10.31857/S1026347023700191, **EDN:** MZPDMS

Изучение биологии приморских видов сосудистых растений, произрастающих в динамичных условиях литорали Белого моря проводится на протяжении десятка последних лет на организменном, популяционном и ценотическом уровнях. Установлена закономерность изменения основных характеристик ценопопуляций и отдельных биоморфологических единиц доминантных видов по градиенту заливания в период суточной приливо-отливной динамики (Сергиенко и др., 2016, 2017; Sergienko *et al.*, 2016). Изучены влияние физико-химических почвенных условий на структурно-морфологические показатели растений галофитов в разных биотопах побережья Белого моря (Сергиенко и др., 2021), вопросы адаптации фотосинтетического аппарата к условиям обитания на побережьях, адаптации к условиям засоления и заливания (Jefferis, Flanagan, 1989; Colmer, 2003; Rubinigg *et al.*, 2004; Larkum *et al.*, 2006; Markovskaya *et al.*, 2017), показано накопление галофитами тяжелых металлов и оценена их фиторе- медиационная роль на побережье (Sonina *et al.*, 2021). В научных публикациях обсуждаются так-

же вопросы о роли некоторых доминантных видов в поддержании устойчивости прибрежных экосистем в условиях нестабильности среды (Марковская и др., 2021), возрастной структуры ценопопуляций галофитов (Сергиенко, Фокусов, 2015; Приймак, Приймак, 2017), физиологических особенностей растений литорали (Марковская, Гуляева, 2020; Terebova *et al.*, 2020).

Актуальным в настоящее время является изучение механизмов адаптаций растений литорали к сохранению своих доминирующих позиций в растительных сообществах и самосохранению популяций на данной территории, как на организменном, так и на популяционном уровне. Как показали исследования Г.О. Османовой (2007, 2009, 2014), большую роль в адаптации растений к особенностям биотопов играет формирование особых биоморф и морфологических структур побеговой системы.

Одним из объектов изучения эколого-биологических особенностей приморских видов сосудистых растений является *Plantago maritima* L. —



Рис. 1. а – карта района исследования (М.А. Шредерс); б – схема расположения биотопов на литорали.

суккулентный галофит, часто доминирующий в растительных сообществах литорали Голарктических морей (Марковская и др., 2010); стержнекорневое каудексовое многолетнее травянистое растение, у которого самоподдержание популяций осуществляется партикуляцией без омоложения особей (Османова, 2009). Такой способ размножения обеспечивает виду сохранность на территории в условиях, когда семенное возобновление затруднено в силу требований к наличию пресной воды для прорастания семян галофитов (Katembe W.J. et al., 1998; Приймак, 2016).

P. maritima является гемизврибионтом (по климатическим факторам), гемистенобионтом (по почвенным факторам) и мезобионтом (по отношению к освещенности) (Цыганов, 1983). Это бореальный евразийский вид, центром его происхождения являются солончаковые пустыни Средней Азии, откуда он распространился на побережье Белого моря в послекайнозойское время, по мере таяния ледников Фенноскандинавского щита (Попов, 1963; Толмачев, Юрцев, 1970; Юрцев и др., 1978).

Цель данного исследования – изучение морфолого-анатомических параметров вегетативных и генеративных органов *P. maritima* в разных приморских биотопах, обеспечивающих устойчивость популяций в нестабильных условиях обитания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на Поморском берегу западного побережья Белого моря, в окрестностях пос. Растыволок Беломорского района Республики Карелия (64°22'81" N, 35°93'14" E) (рис. 1а) в вегетационный сезон 2021 г.

Место проведения исследования представляет собой фрагмент марша – аккумулятивного ландшафта береговой зоны с отложениями глины, песка, гальки в результате приливных нагонов. Микрорельеф не выражен, дренаж слабый, застойное переувлажнение сохраняется в течение ряда лет. Мезорельеф в пределах литорали сформирован выходом каменисто-глыбового вала высотой 40–60 см в нижней части литорали. Соленость воды в месте исследования не превышала 20‰, средняя величина прилива 1 м, наибольшая – 2 м.

Популяция *P. maritima* занимает среднюю и верхнюю литораль. В пределах литорали были выбраны 3 биотопа с доминированием в растительном покрове *P. maritima*. Для каждого биотопа составлена характеристика экологических параметров (положение на литорали, состав грунта) и определен флористический состав фитоценозов. В пределах биотопов выкопаны модельные растения для морфолого-анатомического анализа. Морфологический анализ выполнен на генеративных побегах ($n = 10$), у которых измеряли высоту растений по длине цветоноса, длину соцветия, размер

(при наличии) удлиненных верхних междоузлий розеточного побега, длину и ширину листьев ($n = 20$).

Для определения параметров анатомических структур вегетативных органов в полевых условиях проведена их фиксация в 70% этаноле. В каждом исследуемом биотопе у растений модельных клонов анализировали по 5 сформированных листьев без признаков повреждения, стебли и удлиненные верхние междоузлия розеточных побегов, а также главные корни.

На временных препаратах поперечных срезов, сделанных от руки с помощью безопасной бритвы, измеряли анатомические структуры при помощи светового микроскопа МИКМЕД-6 (ЛОМО, Россия) с использованием окуляр-микрометра WF10X/22 мм при увеличении объектива 4×, 10×, 40×. У листьев измеряли толщину листовой пластинки, верхней и нижней эпидермы, кутинизированных наружных стенок клеток верхней эпидермы, палисадного мезофилла, водозапасающей паренхимы, число и размеры устьиц, число клеток палисадного мезофилла и водозапасающей паренхимы, диаметр крупных проводящих пучков, размеры клеток колленхимы. Анатомическую структуру эпидермы листьев изучали методом отпечатков по Полаччи (Практикум..., 1972). Площадь устьица (Syc) вычисляли по формуле (Мокроносов, Борзенкова, 1978): $Syc = \pi DL/4$, где D – длина устьица, L – ширина устьица. Объем клеток (V) палисадного мезофилла, водозапасающей паренхимы, колленхимы рассчитывали по формуле (Борзенкова, Хромцова, 2006): $V = 4/3\pi L/2(d/2)^2$, где L – длина клетки, d – ширина клетки. Подсчет числа клеток палисадного мезофилла и водозапасающей паренхимы на единицу площади листа выполняли с помощью камеры Горяева в суспензии после предварительной мацерации клеток в 1 н растворе соляной кислоты при 80°C (Борзенкова, Хромцова, 2006).

У цветonoсов измеряли толщину эпидермы, первичной коры, центрального цилиндра, склеренхимы перицикла, а также диаметр сердцевин. У стебля розеточного побега и главного корня – толщину перидермы, первичной коры, перицикла, вторичной коры, камбия, вторичной древесины. В первичной коре стебля и главного корня отмечали толщину аэренхимы.

Для выявления механических тканей срезы окрашивали флороглюцином и 10% раствором HCl (Фурст, 1979). Измерения анатомических параметров вегетативных органов в каждом биотопе проводили в 30-кратной повторности.

Оценку варьирования анатомических параметров изучаемых органов растений выполняли с помощью коэффициента вариации (CV). Уровни варьирования приняты по Г.Н. Зайцеву (1991): CV > 20% – высокий, CV...11–20% – средний, CV < 10% – низкий. Статистическая обработка

данных выполнена с использованием программ MS Excel 2010 и Statistica 6.0. Достоверность различий анатомических параметров оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. В таблицах и на диаграммах приведены средние значения и ошибка средней арифметической. Обработка данных по морфологическим параметрам растений из разных биотопов выполнена однофакторным дисперсионным анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биотопы на литорали Белого моря, в растительном покрове которых доминировал изучаемый вид, отличались по положению в пределах литорали (рис. 1б), продолжительности заливания, механическому составу грунта и соотношению его основных компонентов, видовому составу фитоценозов.

Биотоп 1 – средняя литораль, грунт представляет собой илисто-песчано-галечную маршевую осушку – ил (10%) : песок (30%) : галька (60%). В растительном покрове доминируют виды *P. maritima* и *Triglochin maritima* L. Общее проективное покрытие видов составляет 40%. Во время приливов растения дважды в сутки заливаются водой. Биотоп располагается ближе всего к линии уреза воды во время отлива, занимает участок, примыкающий к каменисто-глыбовому валу, и располагается выше на 40 см, чем остальная часть литорали. В силу этого растения в этом биотопе оказываются в условиях заливания морской водой меньшую продолжительность времени, чем растения на других участках средней литорали.

Биотоп 2 – средняя литораль, грунт галечный на песчано-глинистой осушке – глина (10%) : песок (10%) : галька (80%). В состав сообщества входят *T. maritima*, *Ruppia maritima* L., *P. maritima*, изредка *Carex mackenziei* V. Krecz. Общее проективное покрытие видов составляет 20%. Остальная территория представляет собой голый грунт. Растения дважды в сутки полностью заливаются водой во время приливов.

Биотоп 3 – верхняя литораль, грунт глинисто-песчано-галечный – глина (20%) : песок (20%) : галька (60%). В составе сообщества встречаются *T. maritima*, *P. maritima*, *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla, *Tripolium pannonicum* (Jacq.) Dobroc. subsp. *tripolium* (L.) Greuter. Общее проективное покрытие видов составляет 70%. Биотоп находится ближе других к коренному берегу. Растения здесь находятся в зоне импульверизации, не заливаются водой во время квадратурных приливов, частично оказываются затопленными во время сизигийных приливов, т.е. дважды в месяц накрываются нагонной волной, а также во время штормов.

Таким образом, доминирующим компонентом механического состава грунтов исследован-

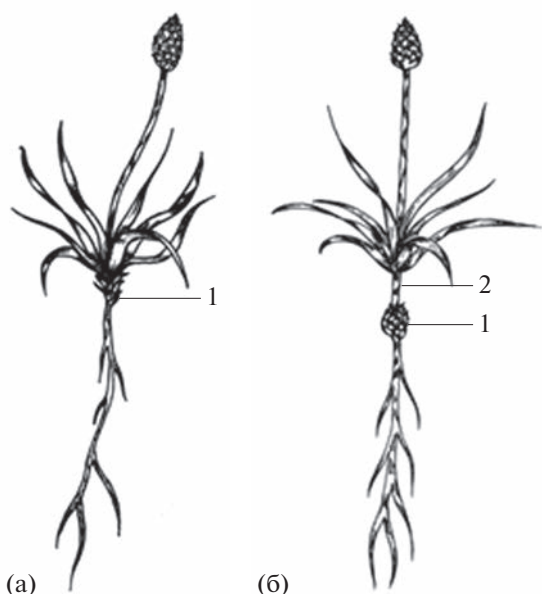


Рис. 2. Растения *P. maritima*: а – розеточное, б – верхнерозеточное. 1 – брахибласт, 2 – удлиненное верхнее междоузлие (А.В. Свирида).

ных биотопов является галька, в примеси к ней песок, глина или ил, но с разной долей участия. Время нахождения под водой у растений в трех биотопах разное. Дважды в сутки заливаются водой растения биотопов 1 и 2, при этом самое продолжительное время затопления у растений в биотопе 2, меньшее в биотопе 1 в силу геоморфологии берега. В биотопе 3 растения заливаются только во время сизигийных приливов и орошаются во время штормов.

P. maritima – розеточное растение с симподиальным ветвлением. Все ассимилирующие листья сосредоточены в прикорневой розетке, сформированной брахибластом. Цветоносные побеги представлены одним вытянутым междоузлием – цветочной стрелкой. Для *P. maritima* характерны две биоморфы – розеточная и верхнерозеточная, которая формируется за счет удлинения верхнего междоузлия розеточного побега (рис. 2).

В исследованной популяции *P. maritima* были отмечены растения разного календарного возраста: в виде одиночных розеток, небольших молодых клонов и крупных зрелых клонов (рис. 3) и в двух характерных для вида биоморфах – розеточной (рис. 4а) и верхнерозеточной (рис. 4б). Следует отметить, что растения с верхнерозеточными побегами отсутствовали в биотопе 2, в условиях средней литорали.

Данные по морфологии побегов свидетельствуют о том, что наиболее высокие растения были в клонах биотопа 2, здесь же отмечены растения и с наибольшей длиной соцветия (рис. 5). По результатам дисперсионного анализа длина цветоноса



Рис. 3. Формирование клонов *P. maritima* (фото А.В. Сониной).

($F_{\phi} > F_{\kappa}, p = 0.02$) и соцветия ($F_{\phi} > F_{\kappa}, p = 0.02$) отличаются в биотопах 1 и 2: в биотопе 1 растения значительно меньше, чем в биотопе 2. Растения биотопов 1 и 3, а также биотопов 2 и 3 по этим морфологическим показателям не различаются ($F_{\phi} < F_{\kappa}, p > 0.05$). Растения двух биоморф: с розеточными и верхнерозеточными побегами (то есть с удлиненными междоузлиями) обнаружены в биотопах 1 и 3, причем длина удлиненных междоузлий у побегов в биотопе 1 меньше ($F_{\phi} > F_{\kappa}, p < 0.001$), чем в биотопе 3 (рис. 5).

В целом, растения в биотопе 1 отличаются меньшими размерами, чем в биотопе 2, однако значительно не отличаются от растений в биотопе 3. Анализ размеров листьев показал, что в условиях биотопа 1 у растений формируются наименьшие по длине и ширине листовые пластинки, а в биотопе 3 – наиболее крупные листья. В биотопе 2 размеры листьев значительно больше, чем у растений в биотопе 1 и меньше, чем в биотопе 3 (рис. 5).

По результатам анатомического исследования у растений в трех биотопах выявлены общие структурные особенности. Так, листья покрыты однослойной эпидермой, у которой кутикульрированы наружные стенки клеток, мезофилл характеризуется изолатеральным типом строения, что согласуется с данными литературы (Janovici, 2011; Карташов, 2013). Палисадный мезофилл расположен в два слоя и на адаксылной, и на абаксылной сторонах листовой пластинки, в центральной части листа формируется до 9–14 слоев водозапасающей паренхимы, ближе к ребрам пластинки количество ее слоев уменьшается и составляет 5–6 (рис. 6а). Механическая ткань – колленхима имеется в ребрах листа и в крупных проводящих пучках, образуя со стороны флоэмы 3–4 слоя, со стороны ксилемы – от 5 до 10 слоев (рис. 6б). Устьица находятся на обеих сторонах листа, при этом на нижней стороне их в 1.5–1.8 раза больше (табл. 1). Листья растений в биотопе 1 отличаются наибольшим числом устьиц как на верхней, так и на нижней эпидерме в отличие от биотопов 2 и 3.



Рис. 4. Биоморфы *P. maritima*: а – розеточный побег, биотоп 1, б – верхнерозеточные побеги в составе клона с выраженным верхним удлиненным междоузлием, биотоп 2 (фото А.В. Сониной).

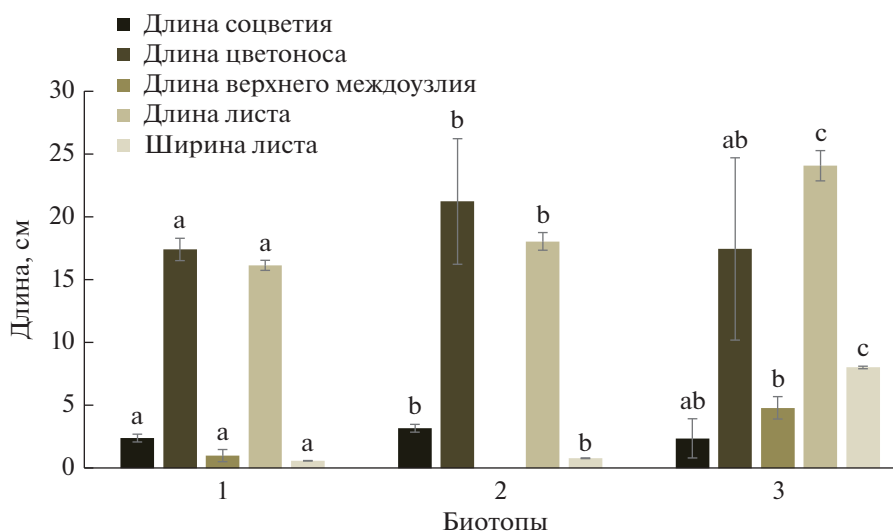


Рис. 5. Размерные характеристики побегов *P. maritima* в разных биотопах. Разные буквы обозначают значимые различия ($p \leq 0.05$) при сравнении одинаковых морфологических характеристик по биотопам.

При этом площадь устьиц на верхней стороне листа наименьшая у растений в биотопе 1, а в биотопе 3 – наибольшая площадь устьиц на нижней стороне листа.

К наиболее изменчивым из всех анализируемых параметров в пределах трех биотопов, относится площадь устьиц на нижней эпидерме (CV 10–18%). Также средний уровень варьирования

показали все измеренные параметры в пределах биотопа 2 (CV 10–18%) (табл. 1).

Растения в биотопе 1 отличаются наибольшей толщиной листьев, более развитой водозапасающей паренхимой. Толщина верхней и нижней эпидермы, кутинизированных наружных стенок клеток верхней эпидермы и палисадного мезофилла здесь наименьшие (табл. 2). В биотопах 2 и 3, напротив, толщина водозапасающей паренхи-

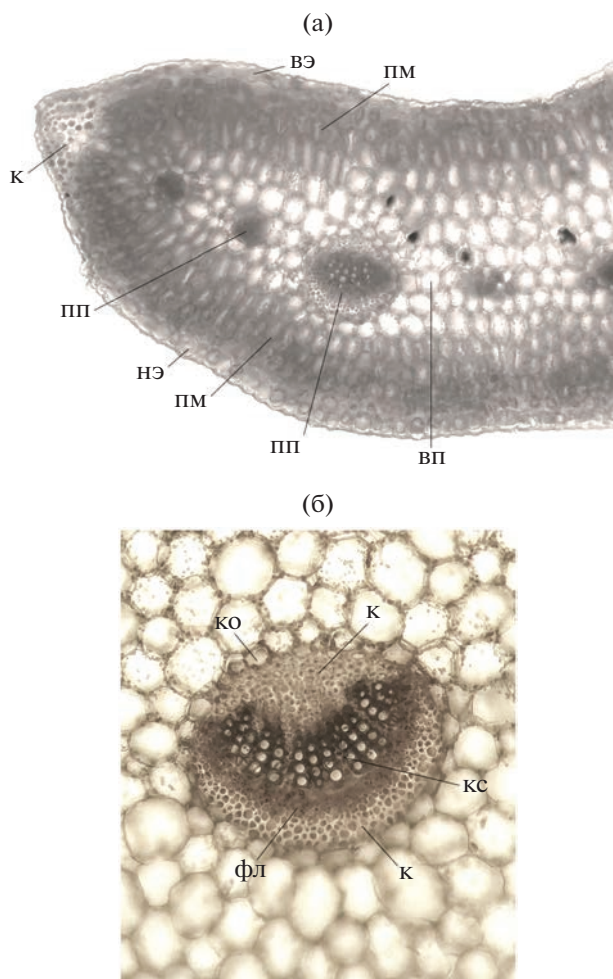


Рис. 6. Фрагмент поперечного среза листа (а, увеличение 4×) и проводящего пучка в листе (б, увеличение 40×) *P. maritima* в 3 биотопах: вэ – верхняя эпидерма, нэ – нижняя эпидерма, пм – палисадный мезофилл, вп – водозапасная паренхима, к – колленхима, пп – проводящий пучок, ко – клетки обкладки, кс – ксилема, фл – флоэма (фото К.В. Морозовой).

мы и листа в целом меньше (число клеток на единицу площади листа увеличивается при уменьшении их объема), а толщина эпидермы (верхней и нижней) и палисадной хлоренхимы – больше. Число клеток палисадной хлоренхимы на единицу площади меньше, при этом сами клетки круп-

нее (в 1.2 раза длиннее и в 1.4 раза шире), что и обуславливает больший объем клеток этой ткани.

Наиболее крупные по объему клетки колленхимы обнаружены в ребрах листьев у растений в биотопе 1, в биотопах 2 и 3 объем клеток этой механической ткани значимо уменьшается. В проводящих пучках листьев объем клеток колленхимы у растений в исследуемых биотопах не изменяется. При этом объем клеток колленхимы в ребрах в 2 раза больше, чем в проводящих пучках. Диаметр крупных проводящих пучков в биотопе 3 наименьший, а в биотопах 2 и 1 значимо повышается за счет увеличения числа слоев колленхимы. Так, в биотопе 1 в сосудистых пучках листьев число слоев колленхимы со стороны ксилемы составляет 8–10, в биотопе 2 – 7–8, в биотопе 3 – 5–6 слоев.

По значениям коэффициента вариации, можно заключить, что более стабильными являются диаметр крупных проводящих пучков, толщина кутинизированных наружных стенок клеток эпидермы и в целом толщина листа (CV 7–11%). При этом ткани листа эпидерма, хлоренхима, водозапасная паренхима, колленхима значительно варьируют (CV 11–35%) в пределах литорали (табл. 2).

Цветonos имеет первичное анатомическое строение (рис. 7). В перикле расположена склеренхима, толщина слоя которой в цветоносах растений в биотопе 1 составляет 62.4 ± 0.7 мкм (CV 6%), в биотопе 2 – 55.3 ± 0.6 мкм (CV 6%), в биотопе 3 – 47.0 ± 1.1 мкм (CV 14%). Достоверных различий толщины других тканей и диаметра сердцевинны цветоноса у растений в исследуемых биотопах не выявлено.

Стебель розеточного побега и удлиненное междоузлие характеризуются вторичным анатомическим строением (рис. 8а, 8б). В первичной коре удлиненного междоузлия отмечена запасная паренхима, а в стебле розеточного побега – аэренхима.

В стебле розеточного побега выявлено значимое уменьшение толщины аэренхимы: в биотопе 1 – 774.6 ± 11.8 мкм (CV 8.4%), в биотопе 2 – 670.6 ± 9.7 мкм (CV 8%), в биотопе 3 – 587.3 ± 10.0 мкм (CV 9%) с незначительным варьированием этого параметра. Достоверных различий толщины других тканей в стебле розеточного побега и в удли-

Таблица 1. Параметры устьиц листьев *P. maritima*

| Параметры | | Биотоп 1 | CV, % | Биотоп 2 | CV, % | Биотоп 3 | CV, % |
|--|------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| Площадь устьиц, мкм ² | Верхняя эпидерма | 700.4 ± 12.0^a | 9 | 733.1 ± 16.4^b | 12 | 752.7 ± 12.8^b | 9 |
| | Нижняя эпидерма | 501.0 ± 16.4^d | 18 | 526.2 ± 17.5^d | 18 | 554.0 ± 10.4^c | 10 |
| Количество устьиц, шт./мм ² | Верхняя эпидерма | 122 ± 2^r | 9 | 96 ± 1^m | 10 | 82 ± 2^n | 15 |
| | Нижняя эпидерма | 187 ± 2^t | 6 | 161 ± 3^k | 10 | 154 ± 2^g | 8 |

Примечание. Сравниваем параметры анатомической структуры листьев у растений в разных биотопах в столбцах и в строках, значения с разными буквами значимо различаются при $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Параметры анатомической структуры листьев *P. maritima*

| Параметры | | Биотоп 1 | CV, % | Биотоп 2 | CV, % | Биотоп 3 | CV, % |
|---|--|---------------------------|-------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
| Толщина листа, мкм | | 840.8 ± 16.7 ^a | 11 | 796.6 ± 14.1 ^b | 9 | 678.3 ± 10.4 ^c | 8 |
| Толщина кутикулизованных наружных стенок клеток эпидермы, мкм | | 4.7 ± 0.06 ^a | 6 | 6.2 ± 0.2 ^b | 8 | 7.1 ± 0.3 ^c | 7 |
| Толщина верхней эпидермы, мкм | | 18.8 ± 0.3 ^a | 11 | 22.6 ± 0.7 ^b | 18 | 26.6 ± 0.7 ^c | 16 |
| Толщина нижней эпидермы, мкм | | 16.3 ± 0.3 ^a | 12 | 18.3 ± 0.3 ^b | 11 | 21.1 ± 0.5 ^c | 14 |
| Палисадный мезофилл | толщина мезофилла мкм | 64.2 ± 1.6 ^a | 16 | 68.0 ± 0.8 ^b | 14 | 76.2 ± 1.2 ^c | 18 |
| | объем клетки, тыс. мкм ³ | 5.2 ± 0.3 ^a | 34 | 7.6 ± 0.2 ^b | 14 | 12.0 ± 0.5 ^c | 26 |
| | число клеток, тыс. шт./см ² | 62 ± 2 ^a | 14 | 54 ± 1 ^b | 9 | 46 ± 1 ^c | 12 |
| Водозапасающая паренхима | толщина паренхимы, мкм | 712.4 ± 10.3 ^a | 25 | 660.6 ± 8.1 ^b | 22 | 526.0 ± 8.3 ^c | 26 |
| | объем клетки, тыс. мкм ³ | 49.8 ± 3.0 ^a | 32 | 35.5 ± 1.4 ^b | 21 | 24.7 ± 1.3 ^c | 30 |
| | число клеток, тыс. шт./см ² | 28 ± 2 ^a | 16 | 32 ± 1 ^b | 15 | 38 ± 1 ^c | 15 |
| Диаметр крупных проводящих пучков, мкм | | 354.0 ± 3.0 ^a | 7 | 335.1 ± 5.2 ^b | 9 | 311.2 ± 7.1 ^c | 9 |
| Объем клетки колленхимы, тыс. мкм ³ | в ребрах листа | 5.5 ± 0.3 ^a | 34 | 4.1 ± 0.2 ^b | 25 | 3.0 ± 0.1 ^c | 30 |
| | в проводящих пучках | 2.6 ± 0.1 ^a | 30 | 2.4 ± 0.1 ^a | 35 | 2.3 ± 0.1 ^a | 30 |

Примечание. Сравниваем параметры анатомической структуры листьев у растений в разных биотопах в строках, значения с разными буквами значимо различаются при $p \leq 0.05$.

ненном междоузлии у растений в изученных биотопах не установлено.

Главный корень у *P. maritima* имеет вторичное анатомическое строение (рис. 9), что согласуется с данными литературы (Janović, 2011). В первичной коре хорошо развита аэренхима. Во вторичной ксилеме формируются древесинные волокна. Толщина аэренхимы у главного корня растений в биотопе 1 составляет 886.0 ± 18.1 мкм с коэффициентом вариации 11%, в биотопе 2 – 727.6 ± 15.4 мкм, CV 12% и в биотопе 3 – 639.6 ± 12.0 мкм, CV 10%, т.е. значение этого параметра значимо уменьшается ($p < 0.05$). Толщина других тканей главного корня у растений достоверно не отличается. Следует отметить наличие многослойной перидермы во всех изученных вегетативных структурах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Галофит *P. maritima* доминирует в растительных сообществах литорали практически на всей территории побережья Белого моря. Растения адаптируются к нестабильным условиям среды, которые создаются приливно-отливной динамикой: к периодическому заливаннию морскими водами, засолению корнеобитаемого слоя из-за повышенного содержания солей натрия, магния, кальция (хлоридов, сульфатов, карбонатов), к изменению освещенности и перепаду температуры, резкому снижению концентрации доступного

кислорода и неорганического углерода (в воде по сравнению с воздухом замедляется скорость диффузии углекислого газа), а также к подвижности субстрата (Bowes, 1987; Madsen, Sand-Jensen, 1991;

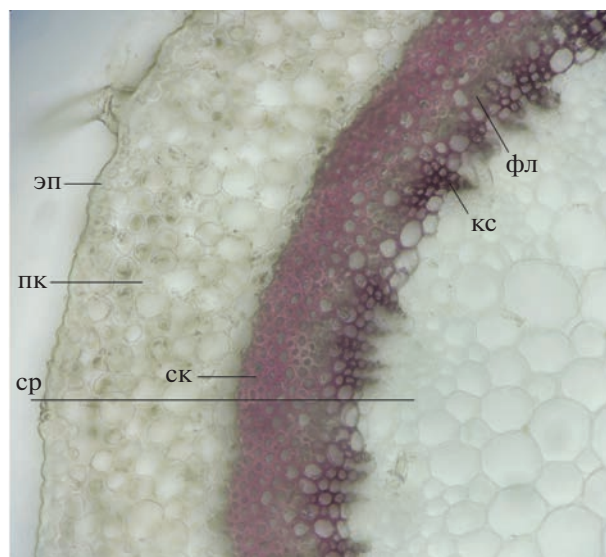


Рис. 7. Фрагмент поперечного среза цветоноса *P. maritima* в биотопе 3 (увеличение 4×): эп – эпидерма, пк – первичная кора, ск – склеренхима, кс – ксилема, фл – флоэма, ср – сердцевина (фото К.В. Морозовой).

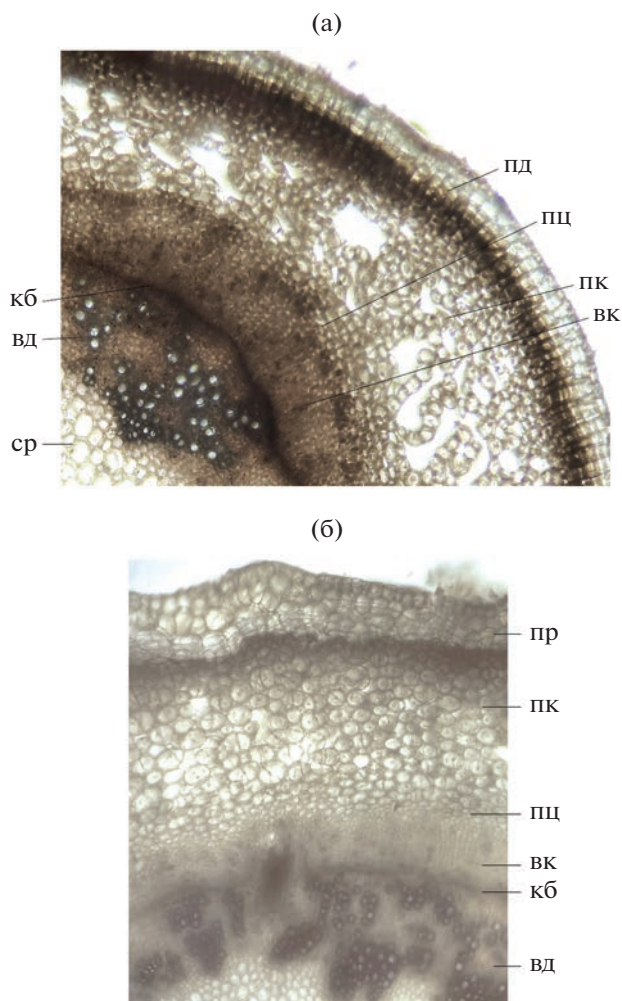


Рис. 8. Фрагмент поперечного среза розеточного побега (а) и удлиненного междоузлия верхнерозеточного побега (б) *P. maritima* в биотопе 3 (увеличение 4×): пр – перидерма, ПК – первичная кора, ПЦ – перицикл, ВК – вторичная кора, КБ – камбий, ВД – вторичная древесина, ср – сердцевина (фото К.В. Морозовой).

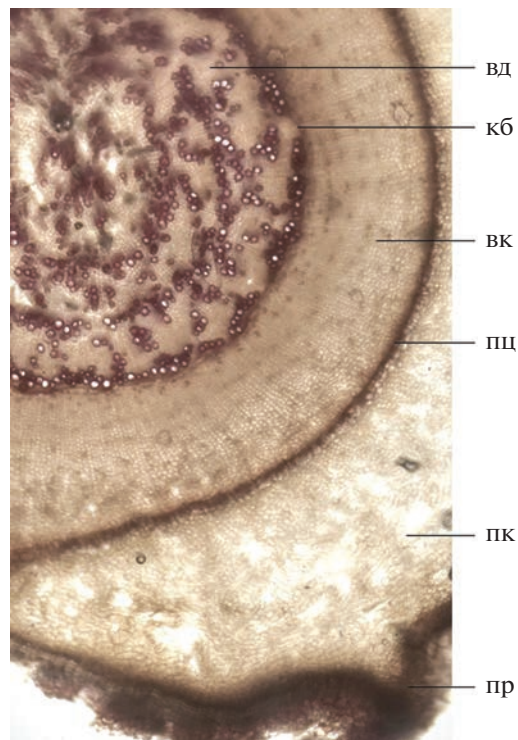


Рис. 9. Фрагмент поперечного среза главного корня *P. maritima* в биотопе 3 (увеличение 4×): пр – перидерма, ПК – первичная кора, ПЦ – перицикл, ВК – вторичная кора, КБ – камбий, ВД – вторичная древесина (фото К.В. Морозовой).

Воронкова и др., 2008; Марковская и др., 2010; Макаров и др., 2012). Отмечено, что по градиенту заливания в направлении от линии уреза воды в полный отлив до коренного берега у *P. maritima* наблюдается увеличение популяционных (численность, плотность особей, жизнеспособность отдельных локусов популяции) параметров и основных биометрических характеристик побегов (Sergienko *et al.*, 2016).

Успешное существование этого вида в широком диапазоне условий литорали свидетельствует о его пластичности и высокой адаптированности к разным условиям произрастания.

Г.О. Османовой (2009) на гербарном материале показано наличие двух биоморф у вида. В наших исследованиях эти биоморфы были найдены в изученных биотопах: розеточные побеги с ук-

роченными междоузлиями в биотопе 2 и верхнерозеточные с удлиненными междоузлиями в биотопах 1 и 3. Формирование второй биоморфы в данных биотопах свидетельствует об адаптации растений к произрастанию в условиях постоянного засыпания грунтом в период волнового воздействия. В биотопе 3 размер удлиненного междоузлия значительно больше, чем в биотопе 1 (рис. 4б). На данном участке побережья увеличение длины верхних междоузлий побега у растений в биотопе 3 обусловлено особенностями условий, которые создаются из-за геоморфологии берега. В биотопе 1 сила воздействия волны снижается за счет стоящей на ее пути каменной преграды. Растения у каменного вала оказываются в защищенных условиях, нежели растения в биотопе 3. К коренному берегу волна проходит значительное расстояние по выровненному за валом рельефу и угасание скорости и силы волны происходит постепенно. В условиях биотопа 3 формируется зона наноса грунта и морских выбросов приливными нагонами и штормами. У растений в этом биотопе развиваются длинные междоузлия, за счет чего фотосинтезирующие органы приподнимаются над субстратом. Это можно рассматривать как ответную реакцию растений на засыпание и погребение их в грунт. Наличие неодинаковых биоморф, как отме-

чает Ю.А. Злобин (2009), повышает общую устойчивость популяции, а в изученных биотопах с нестабильными условиями, данный факт имеет большое значение для сохранения и стабильного существования популяции *P. maritima*.

Проведенный анатомический анализ вегетативных структур показал типичное строение галофитного растения (Нагалеvский, 2001; Grigore, Toma, 2005; Ianovici, 2011; Карташов, 2013; Grigori *et al.*, 2014). Интерес представляет изменение анатомических структур в разных условиях исследуемых биотопов на литорали. Значимо изменяются параметры листовой пластинки (табл. 1, 2), кроме площади устьиц на верхней эпидерме у растений в биотопах 2 и 3, площади устьиц на нижней эпидерме у растений в биотопах 1 и 2, объема клеток колленхимы в проводящих пучках во всех трех биотопах. Листовая пластинка толще за счет увеличения объема клеток водозапасающей паренхимы, при этом длина и ширина листа, уменьшаются. У растений в биотопах 1 и 2 количество слоев этой паренхимы в центральной части листовых пластинок составляет от 10 до 14, в биотопе 3 — от 9 до 11.

Большой объем водозапасающей паренхимы в листьях у растений средней литорали (биотопы 1 и 2) свидетельствует о более высокой степени суккулентности по сравнению с биотопом 3 (Марковская, Гуляева, 2020). Суккулентность — характерный признак эвгалофитов, к которым принадлежит *P. maritima* (Воронкова и др., 2008; Марковская и др., 2010), а развитие водозапасающей паренхимы — одно из приспособлений у них для уменьшения потери воды (Нагалеvский, 2001; Воронкова и др., 2008; Munns, Tester, 2008; Иванова, Музычко, 2013; Grigore *et al.*, 2014; Grigore, 2019) в условиях физиологической засухи из-за наличия растворимых солей в литоральных грунтах, что снижает поглощение воды и приводит к обезвоживанию (Munns, 2002; Grigore *et al.*, 2014; Grigore, Toma, 2017).

Выявленный нами высокий уровень варьирования объема клеток водозапасающей паренхимы у *P. maritima* (CV 21–33%) отмечает и Н.М. Воронкова с соавторами (2008) для галофитов *Salicornia europaea* L. и *Suaeda heteroptera* Kitag, произрастающих на морском побережье на Дальнем Востоке.

Увеличение числа устьиц на 1 мм² листовой поверхности (в биотопах 1 и 2) и уменьшение их площади у растений в средней литорали (в биотопе 1) согласуется с данными литературы (Нагалеvский, 2001), и свидетельствует об адаптивных изменениях, связанных с условиями затенения во время прилива и с необходимостью поддержания водного режима при отливе (Марковская, Гуляева, 2020). Во время прилива наземные растения погружаются под воду и оказываются в условиях затенения и ограничения доступного неорганического углерода. Особенно в условиях биотопа 2,

когда они более продолжительное время находятся в толще морской воды. Свет индуцирует открытие устьиц, а снижение освещения приводит к их закрытию (Зитте и др., 2008). Отмеченное нами уменьшение толщины кутинизированных наружных стенок клеток верхней эпидермы у растений средней литорали, также может способствовать лучшему газообмену между растением и водной средой в условиях затопления, о чем упоминается в работах ряда авторов (Maberly, Madsen, 1998; Sand-Jensen, Frost-Christensen, 1999).

Увеличение числа слоев колленхимы в проводящих пучках и объема ее клеток в ребрах листовых пластинок, а также увеличение толщины склеренхимы в цветоносах на средней литорали позволяют растениям противостоять действию волны при приливе и отливе. Формирование колленхимы в проводящих пучках отмечено и у других видов галофитов этого рода, в частности у *P. coronopus* L., *P. crassifolia* Forssk., *P. schwarzenbergiana* Schur (Grigori *et al.*, 2014).

В стебле розеточного побега и главном корне у растений, обитающих в условиях средней литорали (в биотопах 1 и 2), отмечено увеличение толщины аэренхимы первичной коры. Развитие аэренхимы у растений морских побережий обусловлено недостаточной аэрацией грунтов, и является признаком гигроморфоза, одним из механизмов предотвращения аноксии у растений в периоды затопления, так как она позволяет запастись газообразные вещества внутри вегетативных органов (Jackson, Armstrong, 1999; Colmer, 2003; Tabot, Adams, 2013). Эта воздухоносная ткань формируется у большинства галофитов затапливаемых мест обитания (Saadeddin, Doddema, 1986; Flowers, Colmer, 2008; Grigore *et al.*, 2014; Grigore, Toma, 2017), например, в приливно-отливной зоне Белого моря у *Triglochin maritima*, *Tripolium pannonicum*, *Bolboschoenus maritimus* (Марковская и др., 2015, 2021; Markovskaya *et al.*, 2017; Морозова, Алексеева, 2021).

В биотопе 3 на верхней литорали приливно-отливная динамика ослабевает, содержание солей в грунте снижается за счет распреснения из-за прибрежных водотоков (Цейц и др., 2000). Поэтому растения в данном биотопе отличаются крупными по размерам и более тонкими листьями с наименьшими по объему клетками водозапасающей паренхимы, наибольшими по объему клетками палисадного мезофилла, с немногочисленными, но более крупными устьицами. В проводящих пучках отмечено снижение количества слоев колленхимы и объема ее клеток в ребрах листьев. Увеличение толщины кутинизированных наружных стенок клеток верхней эпидермы, толщины верхней и нижней эпидермы листьев является приспособлением к постоянно высокой освещенности. Кроме того, в этой зоне литорали улучшаются усло-

вия аэрации грунта, о чем свидетельствует установленное нами существенное уменьшение толщины аэренхимы первичной коры у стеблей розеточного побега и главного корня.

Во всех исследованных биотах в стебле укороченного розеточного побега, в удлиненном междоузлии и главном корне у растений хорошо развита многослойная перидерма, во вторичной ксилеме формируется либриформ. Как отмечает З. Даджик (Dajić, 2006) корень типичного галофита имеет хорошо развитую пробку и первичную кору с межклетниками, а также хорошо сформированные механические и проводящие ткани. Наличие большого количества либриформа в центральном цилиндре корня и стебля галофитов – адаптация к закреплению растений в грунте с преобладанием довольно подвижной песчано-галечной фракции.

Оценка пластичности анатомических структур в условиях приливно-отливной динамики литорали побережья Белого моря на основании коэффициента вариации позволила выявить группу более стабильных показателей ($CV < 20\%$): толщина листа, кутинизированных наружных стенок клеток покровной ткани, верхней и нижней эпидермы, палисадного мезофилла, число и площадь устьиц, число клеток палисадного мезофилла и водозапасающей паренхимы, диаметр проводящих пучков в листовых пластинках, толщина аэренхимы в первичной коре стебля розеточного побега и главного корня. Более варьирующими параметрами ($CV > 20\%$) оказались толщина водозапасающей паренхимы, объем клеток палисадного мезофилла, водозапасающей паренхимы, колленхимы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование выявило различия морфологических и анатомических показателей растений *P. maritima* в разных биотопах, которые можно рассматривать как адаптивную реакцию вида для сохранения устойчивости популяций и доминирующего положения в растительных сообществах приморских биотопов в условиях нестабильности литорали Белого моря.

Работа выполнена при поддержке проекта Госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 0752-2020-0007).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику Водлозерского национального парка М.А. Шредерс и студентке Института биологии, экологии и агротехнологий ПетрГУ А.Н. Свирида за помощь в подготовке иллюстрационного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борзенкова Р.А., Храмова Е.В. Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2006. 14 с.
- Воронкова Н.М., Бурковская Е.В., Безделева Т.А., Бурундукова О.Л. Морфологические и биологические особенности растений в связи с адаптацией к условиям морских побережий // Экология. 2008. № 1. С. 3–9.
- Зайцев Г.Н. Математический анализ биологических данных. М.: Наука, 1991. 183 с.
- Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В., Брезински А., Кёрнер К. Ботаника. Т. 2. Физиология растений. М.: Академия, 2008. 496 с.
- Злобин Ю.А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. Сумы: Университетская книга, 2009. 263 с.
- Иванова Н.А., Музычко Л.М. Анатомическое строение листьев у растений на засоленных почвах // Вестник Нижневартовского государственного университета. 2013. Вып. 3. С. 3–8.
- Карташов А.В. Значение морфофизиологических особенностей растений подорожника приморского и подорожника большого для поддержания водно-солевого баланса при засолении: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ИФР РАН, 2013. 29 с.
- Макаров М.В., Рыжик И.В., Воскобойников Г.М. Влияние глубины произрастания на морфофизиологические показатели *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря // Альгология. 2012. Т. 22. № 4. С. 345–360.
- Марковская Е.Ф., Сергиенко Л.А., Шкляревич Г.А., Сонина А.В., Стародубцева А.А., Смолькова О.В. Природный комплекс побережья Белого моря. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. 85 с.
- Марковская Е.Ф., Гуляева Е.Н. Роль устьиц в адаптации растений *Plantago maritima* L. к приливно-отливной динамике на литорали Белого моря // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 1. С. 75–83.
- Марковская Е.Ф., Сонина А.В., Дьячкова Т.Ю., Морозова К.В. Структурные адаптации галофита *Triglochin maritima* L. в условиях нестабильности территории литорали Белого моря // Заметки ученого. 2021. Ч. 1. № 12. С. 27–37.
- Марковская Е.Ф., Кособрюхов А.А., Морозова К.В., Гуляева Е.Н. Фотосинтез и анатомо-морфологическая характеристика листьев астры солончаковой на побережье Белого моря // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 847–853.
- Мокронос А.Т., Борзенкова Р.А. Методика количественной оценки структуры функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1978. Т. 61. Вып. 3. С. 119–133.
- Морозова К.В., Алексеева М.С. Анатомическое исследование листьев клубнекамышья морского (*Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla) в приливно-отливной зоне на побережье Белого моря (Карелия) // Тенденции развития науки и образования. 2021. № 69. Т. 1. С. 89–92.
- Нагалецкий В.Я. Галофиты Северного Кавказа. Краснодар: Изд-во Кубанского гос. ун-та, 2001. 246 с.

- Османова Г.О. Разнообразие способов вегетативного размножения некоторых видов *Plantago* L. // Биоморфологические исследования современной ботаники. Матер. межд. научн. конф. Владивосток: БСИ ДВО РАН, 2007. С. 343–346.
- Османова Г.О. Экобиоморфология и структура ценопопуляций видов рода *Plantago* L. (Plantaginaceae Juss.): Автореф. дис. докт. биол. наук. Оренбург: МарГУ, 2009. 37 с.
- Османова Г.О. О партикуляции у видов рода *Plantago* Juss. // Международный научно-исследовательский журн. 2014. Вып. 3(22). Ч. 1. С. 53–54.
- Попов М.Г. Основы флорогенетики. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 135 с.
- Практикум по физиологии растений / Под ред. И.И. Гунара. М.: Колос, 1972. 168 с.
- Приймак Е.В. Семенная продуктивность галофитных подорожников на побережье Баренцева и Белого морей // Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств. Матер. Межд. научно-практ. конф. Мурманск: МГТУ, 2016. Ч. 1. С. 157–160.
- Приймак Е.В., Приймак П.Г. Возрастной состав *Plantago maritima* и *Plantago schrenkii* в сообществах галофитных растений на побережье Баренцева и Белого моря // Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств. Матер. Межд. научно-практ. конф. Мурманск: МГТУ, 2017. Ч. 1. С. 136–139.
- Сергиенко Л.А., Дьячкова Т.Ю., Андросова В.И. Биологические особенности *Plantago maritima* L., как индикатора физико-химических условий арктических приморских экотопов // Современные проблемы естественных наук и медицины. Сб. статей Всероссийск. научн. конф. с междунар. участием. Йошкар-Ола: МарГУ, 2021. Т. 1. С. 151–157.
- Сергиенко Л.А., Дьячкова Т.Ю., Андросова В.И. Характеристика местообитаний и состояние популяций *Plantago maritima* L. и *Triglochin maritima* L. на западном побережье Белого моря // Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря. Матер. XIII Всероссийск. конф. с междунар. участием, приуроченная к 60-летию Беломорской биостанции “Мыс Картеш” Зоологического института РАН. СПб.: ЗИН, 2017. С. 181–184.
- Сергиенко Л.А., Фокусов А.В. Ценопопуляционная структура *Plantago maritima* L. (подорожник морской, сем. Plantaginaceae – Подорожниковые) в приморских экосистемах западного побережья Белого моря // Проблемы современной науки и образования. 2015. № 1(31). С. 12–14.
- Сергиенко Л.А., Дьячкова Т.Ю., Андросова В.И., Марковская Е.Ф., Фокусов А.В. Биоморфология и структура популяций *Plantago maritima* L. по градиенту заливания на побережьях голарктических морей // Ученые записки ПетрГУ. Сер. Биологические науки. 2016. № 4(157). С. 64–71.
- Толмачев А.И., Юрцев Б.А. История арктической флоры в ее связи с историей Северного Ледовитого океана // Северный Ледовитый океан и его побережье в кайнозое. Л.: Гидрометеиздат, 1970. С. 87–101.
- Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. М.: Наука, 1979. 155 с.
- Цейц М.А., Добрынин Д.В., Белозерова Е.А. Структурная организация почвенно-растительного покрова маршей Поморского берега Белого моря // Экологические функции почв Восточной Фенноскандии. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2000. С. 124–132.
- Цыганов Д.Н. Фитоиндикация экологических режимов в подзоне хвойно-широколиственных лесов. М.: Наука, 1983. 197 с.
- Юрцев Б.А., Толмачев А.И., Ребристая О.В. Флористическое ограничение и разделение Арктики // Арктическая флористическая область. Л.: Наука, 1978. С. 9–104.
- Bowes G. Aquatic plant photosynthesis: strategies that enhance carbon gain / G. Bowes // Plant life in aquatic and amphibious habitats. L.: Oxford, 1987. P. 79–98.
- Colmer T.D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots // Plant Cell and Environment. 2003. № 26. P. 17–36.
- Dajić Z. Salt stress // Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants /Eds Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K. India: Published by Springer, 2006. P. 41–99.
- Flowers T.J., Colmer T.D. Salinity tolerance in halophytes // New Phytologist. 2008. V. 179. № 4. P. 945–963.
- Grigore M.N., Ivanescu L., Toma C. Halophytes: An Integrative Anatomical Study. N.Y.: Published by Springer, 2014. 548 p.
- Grigore M.N., Toma C. Anatomical Adaptation of Halophytes. A review of Classic Literature and Recent Findings. N.Y.: Published by Springer, 2017. 337 p.
- Grigore M.N. Defining Halophyte: a conceptual and historical approach in an ecological frame // Halophyte and Climate Change: Adaptive Mechanisms and Potential Uses. Wallingford, Oxfordshire, UK; Boston, MA: CAB, 2019. P. 3–18.
- Grigore M.N., Toma C. Contributions to the knowledge of the anatomical structure of some halophytes // St. sci. Cerc. Ser. Biologie. 2005. V. 10. P. 125–128.
- Ianovici N. Histoanatomical and ecophysiological studies on some halophytes from Romania – *Plantago maritima* // Annals of West University of Timișoara. Ser. Biology. 2011. V. XIV. P. 1–14.
- Jackson M.B., Armstrong W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence // Plant Biology. 1999. V. 48. № 1. P. 274–287.
- Jefferies R.L., Flanagan L.B. Photosynthetic and stomatal responses of the halophyte *Plantago maritima* L. to fluctuations in salinity // Plant Cell and Environment. 1989. V. 12. № 5. P. 559–568.
- Katembe W.J., Ungar I.A., Mitchell J.P. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae) // Annals of Botany. 1998. V. 82. P. 167–175.
- Larkum A.W.D., Orth R.J., Duarte C.M. Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Netherlands: Published by Springer, 2006. 691 p.

- Maberly S.C., Madsen T.V. Affinity for CO₂ in relation to the ability of freshwater macrophytes to use HCO₃⁻ // Functional Ecology. 1998. № 12. P. 99–106.
- Madsen T.V., Sand-Jensen K. Photosynthetic carbon assimilation in aquatic macrophytes // Aquatic Botany. 1991. № 41. P. 5–40.
- Markovskaya E.F., Gulyaeva E.N., Morosova K.V., Sergienko L.A. Structural and functional features of the leaves of the dominant plants in the tidal zone of the White Sea // Plant Archives. 2017. V. 17. № 2. P. 1685–1692.
- Munns R. Comparative physiology of salt and water stress // Plant Cell and Environment. 2002. № 25. P. 239–250.
- Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annual Reviews of Plant Biology. 2008. № 59. P. 651–681.
- Rubinigg M., Elzenga J.T.M., Stulen I., Wenisch J. NaCl salinity affects lateral root development in *Plantago maritima* // Functional plant biology. 2004. V. 31. № 8. P. 775–780.
- Saadeddin R., Doddema H. Anatomy of the “extreme” halophyte *Arthrocnemum fruticosum* (L.) Moq. in relation to its physiology // Annals of Botany. 1986. № 57. P. 531–544.
- Sand-Jensen K., Frost-Christensen H. Plant growth and photosynthesis in the transition zone between land and stream // Aquatic Botany. 1999. № 63. P. 23–35.
- Sergienko L.A., D'yachkova T.Y., Androsova V.I. Features of the structural organization and biomorphology of dominant plant species of holarctic seas' coasts along the tidal gradient // Czech Polar Reports. 2016. V. 6. № 2. P. 122–131.
- Sonina A.V., Terebova E.N., Dyachkova T.Y., Morozova K.V., Elkina N.A. Ecological and biological features of *Triglochin maritima* L. in the biotopes of the littoral zone with different degree of flooding on the coast of the White Sea // Czech Polar Reports. 2021. V. 11. № 2. P. 233–252.
- Tabot P.T., Adams S.B. Ecophysiology of salt marsh plants and predicted responses to climate change in South Africa // Oceans and Coastal Management. 2013. № 80. P. 89–99.
- Terebova E.N., Markovskaya E.F., Androsova V.I., Pavlova M.A., Oreshnikova N.V. Cell wall functional activity and metal accumulation of halophytic plant species *Plantago maritima* and *Triglochin maritima* on the White Sea littoral zone (NW Russia) // Czech Polar Reports. 2020. V. 10(2). P. 169–188.

Morphological and Anatomical Features of *Plantago maritima* L. As an Adaptive Reaction to the Conditions of Coastal Biotopes

A. V. Sonina¹, #, T. Yu. Dyachkova¹, and K. V. Morozova¹

¹ Petrozavodsk State University, pr. Lenina, 33, Petrozavodsk, 185910 Russia

#e-mail: angella_sonina@mail.ru

The morphological and anatomical parameters of the vegetative and generative organs of plants *Plantago maritima* L. were studied in different biotopes of the littoral zone on the coast of the White Sea in the vicinity of the village Rastnavolok (Belomorsky district, Republic of Karelia). It has been established that plants have developed certain adaptations to conditions of the littoral zone: two biomorphs are formed (rosette and upper rosette with elongated upper internodes) as an adaptation to covering with soil during tides and storms. Within the littoral zone under different flooding conditions, plants differ in some anatomical features. The thickness of the water-strage parenchyma correlates directly with the thickness of the leaf, it varies within the littoral zone depending on the time the plants are flooded with salt water. Well-developed integumentary and mechanical tissues of the root and rosette shoots are an adaptive response to the mobility of the soil substrate and water mass during tidal surges. The development of aerenchyma in underground vegetative organs ensures gas exchange under flooding conditions. Significant differences of the studied anatomical and morphological parameters in biotopes of the littoral showed the wide adaptive capabilities of *P. maritima*, which ensure its dominance in the plant communities of the White Sea coast.

Keywords: *Plantago maritima*, littoral of the White Sea, shoot morphology, anatomy of vegetative and generative organs

УДК 591.478.7+598.293.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСТРУКТУРЫ ПОКРОВНЫХ ПЕРЬЕВ В СИСТЕМАТИКЕ САКСАУЛЬНЫХ СОЕК (Aves, Corvidae: *Podoces*, *Eupodoces*)

© 2023 г. О. Ф. Чернова*, @, В. Ю. Ильяшенко*

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

@E-mail: olga.chernova.moscow@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 24.02.2023 г.

С помощью сканирующей электронной микроскопии получены новые данные о микроструктуре дефинитивных покровных перьев всех четырех видов саксаульных соек *Podoces pleskei*, *P. panderi*, *Eupodoces hendersoni* и *E. biddulphi* и восьми других видов Corvidae: *Ptilostomus afer*, *Garrulus glandarius*, *Perisoreus infaustus*, *Corvus cornix*, *Cyanopica cyana*, *Nucifraga caryocatactes*, *Pica pica* и *Pyrrhocorax pyrrhocorax*. Сравнительно-морфологический анализ с привлечением ранее опубликованных данных о микроструктуре маховых перьев этих видов и покровных перьев *Corvus monedula*, *C. frugilegus*, *C. corax* выявил ряд специфических для видов саксаульных соек микроструктур пера и различия между *Podoces* и *Eupodoces*, что подтверждает их родовой статус, возможную родственную близость с *G. glandarius* и *Pt. afer*, а также сохранение анцестральных черт у *P. pleskei*.

Ключевые слова: микроструктура, покровные перья, саксаульные сойки, сканирующая электронная микроскопия, систематика

DOI: 10.31857/S1026347022600704, EDN: TPAPAK

Саксаульные сойки (*Podoces* и *Eupodoces*) – это мелкие врановые (Corvidae) четырех видов, распространенные в аридных и полуаридных пустынях Ирана, Туркмении, Узбекистана, Казахстана, Китая и Монголии. Их систематический статус выясняют на протяжении нескольких десятков лет. Саксаульных соек традиционно относили к одному роду *Podoces*, но на основании того, что у обитающих в Средней Азии саксаульных соек верхние кроющие рулевые перья удлинены и выступают за середину длины хвоста, предложено выделять два подрода (Zarudny, Loudon, 1902). Среднеазиатский подрод *Podoces* включает иранскую – *P. pleskei* Zarudny, 1896 и туркестанскую – *P. panderi* Fischer, 1821, а центрально-азиатский подрод *Eupodoces* – монгольскую – *E. hendersoni* Hume, 1871 и кашгарскую – *E. biddulphi* Hume, 1874 саксаульных соек. Хотя отмечено, что центрально-азиатские сойки отличаются от среднеазиатских наличием черного оперения на голове, темными ногами и отсутствием черного окраса на груди, большинство авторов продолжают включать все четыре вида в один род *Podoces* (del Hoyo, Collar, 2016), сближая их с лесными сойками (*Garrulus*) (Amadon, 1944). Сравнительная морфология некоторых элементов черепа, рисунка и окраса оперения в онтогенезе, формулы крыла, ареалов, местобитаний и их исторической реконструкции показывают, что предковая форма рода *Podoces* вероятно

была наиболее генерализованной, происходила от древних представителей врановых и ближе к лесным сойкам (*Garrulus*) и кушкам (*Perisoreus*), чем к представителям других сравниваемых рецентных видов Палеарктики. Наиболее анцестральными признаками обладает группа *Podoces*, а в пределах этой группы – *P. pleskei* (Козлова, 1975). Размеры соек из этих двух групп значительно различаются. Длина тела *P. pleskei* равна 24 см, масса 85–90 г, *P. pandery* соответственно 25 см и 86–96 г, а *E. hendersoni* – 28 см и 104–140 г и *E. biddulphi* – 26.7–31.2 см, масса самцов 134–141 г, а самки – 120–132 г (del Hoyo, Collar, 2016), т.е. центрально-азиатские саксаульные сойки крупнее среднеазиатских. Вышеперечисленные признаки и недавно установленные существенные различия в характере телодвижений, особенностях вокализации, конструкции гнезд, эмбриональном птерилолизе птенцов подтверждают возможность разделения саксаульных соек на более высокие таксономические ранги с выделением рода среднеазиатских (*Podoces* Fischer, 1821) и рода центрально-азиатских (*Eupodoces* Zarudny, 1896) саксаульных соек (Ильяшенко и др., 2018; Ilyashenko, 2018; Oraev *et al.*, 2019).

Изучение микроструктуры первостепенного махового пера разных видов врановых (туркестанская саксаульная сойка, кушка *Perisoreus in-*

faustus L., 1758, лесная сойка *Garrulus glandarius* L., 1758, голубая сорока *Cyanopica cyanus* Pallas, 1776, сорока *Pica pica* L., 1758, кедровка *Nucifraga caryocatactes* L., 1758, галка *Corvus monedula* L., 1758, грач *Corvus frugilegus* L., 1758, серая ворона *Corvus cornix* L., 1758 и ворон *Corvus corax* L., 1758) свидетельствует, что в целом, разнообразие микро-структуры пера этого типа у них невелико (Фадеева, Чернова, 2011; Силаева и др., 2012). Выявленные характеристики не являются уникальными и встречаются у представителей других таксонов, однако при комплексном подходе, они достаточно информативны в аспекте таксономической диагностики и биологической экспертизы. Так, сама конфигурация симметрично прикрепленных к стержню пера боронок первого порядка – *rami*, (далее – бороночки I) специфична на уровне не только семейства, но и вида, и, безусловно, имеет диагностическое значение. Информативно строение кутикулы боронок I и, прежде всего, орнамент поверхности кутикулы: форма и рельеф ее клеток, структура боронок второго порядка – *radii* (далее – бороночки II) пуховой части пера, диагностическими признаками которой являются конфигурация апикального края этого сегмента, а также специальные выросты (ворсинки) базальной клетки бороночки II.

Предложенный нами сравнительный электронно-микроскопический метод исследования особенностей микро-структуры пера позволяет не только эффективно диагностировать виды по этим перьям и их фрагментам, но и в перспективе выявлять специфические черты, на формирование которых оказал влияние комплекс эколого-морфологических адаптаций компенсаторного типа, а также эволюционная близость или разобщенность таксонов разного ранга (Чернова и др., 2006; Фадеева, Чернова, 2011). Сравнительный анализ микро-структуры покровных перьев саксаульных соек до сих пор не проводили, хотя вполне ожидаемо, что именно детали тонкого строения пера могли бы подтвердить или опровергнуть предложенное разделение саксаульных соек на два рода, определить степень усложнения микро-структуры пера у представителей разных родов, а также выявить родственные связи этих родов с другими представителями врановых.

Цель нашей работы состоит в определении родовых признаков и видовой специфики микро-структуры покровных перьев представителей двух родов саксаульных соек, и родственного отношения этих родов с другими родами врановых, с использованием как оригинальных, так и ранее опубликованных данных (Чернова, 2005; Чернова и др., 2009; Фадеева, Чернова, 2011; Силаева и др., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью сканирующей электронной микроскопии изучили в сравнительном аспекте микро-структуру покровных перьев из грудной птерилии (*pterylae pectoralis*) у всех четырех видов саксаульных соек, приняв за основу их разделение на два рода – среднеазиатский род *Podoces* (туркестанская саксаульная сойка *P. panderi panderi* и иранская саксаульная сойка *P. pleskei*), и центрально-азиатский род *Eupodoces* (монгольская саксаульная сойка *E. hendersoni* и кашгарская саксаульная сойка *E. biddulphi*). Материал получен в Научно-исследовательском зоологическом музее Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и в Зоологическом институте РАН. Поскольку исследования микро-структуры покровных перьев у врановых ранее проводили в ограниченном объеме (Фадеева, Чернова, 2011), а имеются довольно полные сведения об их перво-степенных маховых перьях (Шарафутдинова, Валуйев, 2009; Фадеева, Чернова, 2001; Силаева и др., 2012), то для выполнения сравнительно-морфологического исследования мы не только сравнили маховые и покровные перья, но и специально изучили покровные перья из грудной птерилии некоторых других представителей семейства врановых (серая ворона, голубая сорока, лесная сойка, кедровка, кукушка, сорока, клушица и черная сорока *Ptilostomus afer* Linnaeus, 1766). Используемая терминология соответствует общепринятой (Chandler, 1916; Rutschke, 1960; Davies, 1970; Lucas, Stettenheim, 1972; Baumel, 1979; King, McLelland, 1985; Brom, 1986; Чернова и др., 2006; Dove, Koch, 2010). Внешний вид перьев соек получен с помощью сканирующего устройства EPSON PERFECTION 2580 PHOTO с разрешением 300 dpi.

Электроннограммы боронок I и боронок II получены в сканирующем электронном микроскопе JSM 840A (“Jeol”, Япония). Предварительная подготовка препаратов заключалась в очистке перьев в мягком шампуне, обезжиривании и обезвоживании в проводке через спирты с повышающейся концентрацией, приклеивании на специальный столик бесцветным лаком, напылении образцов золотом на установке Edwards S-150A (“Edwards”, Великобритания). Полученные электроннограммы скомпонованы в порядке, указанном в подписях: (1) поперечный срез проксимальной части бороночки I с различимыми дорсальным (*crista dorsalis*) и вентральным (*crista ventralis*) гребнями, сердцевинной и базальной клеткой бороночки II; (2) продольный срез бороночки I для изучения степени развития и строения сердцевин; (3) орнамент кутикулы бороночки I в месте отхождения пуховых боронок II; (4) узлы и междоузлия бороночки II в ее срединной части. Участки перьев, выбранные для сканирующей электронной микроскопии соответствуют наиболее информатив-

ным в плане таксономической диагностики (Чернова и др., 2006; Силаева и др., 2012). Электронограммы масштабированы и отредактированы с помощью компьютерной программы Adobe Photoshop Elements 11 (США), но изменения касались лишь масштаба, яркости и контраста изображений. Измерения микроструктур пера проводили, используя компьютерную программу TЕСCAN ATLAS (Чехия). За основу описания микроструктуры пера взяты качественные показатели: (1) конфигурация поперечного среза бородки I; (2) строение сердцевинки на поперечном и продольном срезах бородки I; (3) строение кутикулы бородки I: рельеф поверхности кутикулы и конфигурация и ориентация (относительно длинной оси бородки) ее чешуек; (4) конфигурация и распределение узлов в срединном отделе пуховых бородок II; (5) характер и степень разделения апикальной части сегментов пуховой бородки II, форма зубцов узлов и степень отклонения их от основной оси бородки II. Для количественных показателей измерили и вычислили следующие параметры пера и его элементов: (1) площадь опахала (у соек); (2) площадь поперечника бородки I; (3) площадь дорсального и вентрального гребней бородки I; (4) размеры базальной клетки бородки II; (5) толщина сердцевинки относительно толщины бородки I; (6) длина, ширина и площадь узлов, длина и ширина междоузлий бородки II. Измерения выполняли в программе ATLAS (Tescan, Чехия). Число измерений каждого параметра равно пяти ($n = 5$). Полученные данные статистически обработаны в программе STATISTICA 10 (USA). Всего изучено тринадцать покровных перьев, по одному покровному перу из грудной птерилии у четырех видов саксаульных соек и девяти видов других врановых (по одной взрослой особи каждого вида).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опахало покровного пера из грудной птерилии. У всех изученных видов *Podoces* и *Eupodoces* опахало (*vexillum*) покровного пера неплотное, рассученное и двуцветное – светлая верхняя половина пера и темная нижняя половина развиты сходно (табл. 1). Оттенок светлой части опахала изменяется от практически белого у *P. panderi* до желтоватого у *E. biddulphi*, светло-желтого у *P. pleskei* и *E. hendersoni* (рис. 1). Светлая часть занимает примерно половину или немного больше площади опахала (табл. 1). Наиболее хорошо представлена светлая часть опахала у *P. pleskei* и *E. hendersoni*. Расположение и размеры светлого участка опахала меняются от полного отсутствия (у двух видов) до наличия в верхней части опахала (у большинства видов) или в нижней части опахала (один вид) (табл. 1). Особенности строения имеют мелкое овальное светлое пятно на апикальной части опахала у *N. caryocatactes*. По степени развития до-

полнительного пера (*hypopenna*) сойки разделяются на две группы, и это может служить родовым признаком: у *Eupodoces* проксимальные бородки I опахала многочисленны и очень длинные, а у *Podoces* они развиты слабо (рис. 1) Площадь опахала максимальна у *E. hendersoni*, у которой покровные перья в 2.0–2.8 раза крупнее, чем у других видов (табл. 1). Так, ранжирование этих видов по размерам и массе тела выглядит следующим образом: *E. hendersoni* → *E. biddulphi* → *P. panderi* → *P. pleskei*, чему вполне соответствует уменьшение площади опахала в этом ряду. Соответственно площадь опахала пера *E. hendersoni* статистически достоверно больше, чем у других видов ($p < 0.1$). Из остальных видов достоверны различия между *P. pleskei* и *E. biddulphi* ($p < 0.001$). У *P. pleskei* опахало пера наименьшее, как и размеры этого вида. У других изученных представителей врановых площадь опахала покровных перьев сильно варьирует, однако не превышает 825 мм², наиболее мелкое перо у *Pt. afer* (табл. 1). Площадь поперечника бородки I также сильно изменяется у разных видов и максимальных значений достигает у *P. pyrrhocorax* и *C. cornix*. По этому показателю сходство с саксаульными сойками демонстрируют *G. glandarius*, *P. pica* и *Pt. afer*.

Конфигурация бородки I. Конфигурация бородки I покровных перьев, судя по форме поперечника в ее проксимальной части, сходна у всех видов *Podoces* и *Eupodoces* (рис. 2а). Она незначительно уплощенная, эллипсоидная, с хорошо различимыми гребнями, тянущимися по дорсальной и вентральной сторонам бородки I. Дорсальный гребень бородки I у *E. biddulphi* и *P. pleskei* развит лучше, чем вентральный, у *E. hendersoni* и *P. panderi* площадь гребней на поперечном срезе почти равна (табл. 1, рис. 2а), а максимальна у *P. pleskei*, за счет чего площадь поперечника бородки I наибольшая среди сравниваемых видов, и также отражает видовую специфику, т.е. этот вид обладает наиболее крупной бородкой с высоким гребнем, тянущимся по ее дорсальной стороне. Микроструктура покровных и маховых перьев у других изученных нами видов Corvidae имеет ряд общих черт с *Podoces* и *Eupodoces*. Конфигурация бородки I имеет незначительные топографические различия у одних видов, слабо различается у маховых и покровных перьев, но значительно отличается у других видов. Для большинства видов характерна уплощенная эллипсоидная форма бородки I маховых и покровных перьев с незначительно увеличенным дорсальным гребнем или с невыраженными гребнями, однако у *C. corax* бородка I махового пера с сильным латеральным уплощением и высоким изогнутым вентральным гребнем, т.е. сильно специализирована (Фадеева, Чернова, 2011). Бородка I покровного пера также вытянута, и вентральный гребень выше дорсального. По конфигурации бородки I покровного пера,

Таблица 1. Основные промеры структур покровных перьев из грудной птерилии у изученных видов врановых ($n = 1-5$, $M \pm m$)*

| Вид | Площадь | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|--|----------------|------------------|-----------------------|---|--------------|
| | опахала, мм ² | светлой части опахала, % площади всего опахала | поперечник | сердцевина | | поперечного среза бородки I, мкм ² | |
| | | | | мкм ² | % площади поперечника | | |
| | | | | | дорсальный гребень | вентральный гребень | |
| <i>P. pleskei</i> | 398.0 ± 4.1 | 59.3 | 828.3 | 355.9 | 42.9 | 186.3 | 105.8 |
| <i>P. panderi</i> | 452.0 ± 211 | 46.9 | 519.5 | 236.6 | 45.5 | 59.4 | 56.54 |
| <i>E. hendersoni</i> | 1130.0 ± 494.3 | 61.7 | 650.8 | 308.9 | 47.5 | 73.3 | 74.2 |
| <i>E. biddulphi</i> | 598.0 ± 6.3 | 54.7 | 528.5 | 99.0 | 18.7 | 176.6 | 123.2 |
| <i>G. glandarius</i> | 657.9 | 27.1 | 686.5 ± 95.8 | 300.6 ± 102.9 | 43.7 | 118.1 ± 4.5 | 141.2 ± 35.5 |
| <i>P. infaustus</i> | 501.3 | 35.0 | 363.1 | 141.3 | 38.9 | 66.6 | 58.4 |
| <i>C. cyana</i> | 809.4 | 88.9 | 318.7 | 71.0 | 74.1 | 74.1 | 40.4 |
| <i>N. caryocatactes</i> | 488.2 | 8.0 | 346.2 | 78.3 | 22.6 | 67.5 | 62.8 |
| <i>P. pyrrhocorax</i> | 825.3 | Отсутствует | 2898.2 ± 244.5 | 1409 ± 0.3 | 48.6 | 378.3 ± 45.4 | 350.9 ± 62.8 |
| <i>C. comix</i> | 571.6 | 51.8** | 2530.2 | 1086.9 | 42.9 | 220.8 | 484.9 |
| <i>P. pica</i> | 785.2 | 40.6 | 741.2 ± 38.3 | 275.7 ± 40.3 | 37.0 | 104.5 ± 2.8 | 177.6 |
| <i>Pt. afer</i> | 268.6 | Отсутствует | 795.6 ± 193.1 | 279. ± 101 | 35.2 | 137.3 ± 27.9 | 88.2 ± 29.4 |

Примечание. * $M \pm m$ – средняя арифметическая с ошибкой средней арифметической, ** – светлый окрас нижней части опахала.

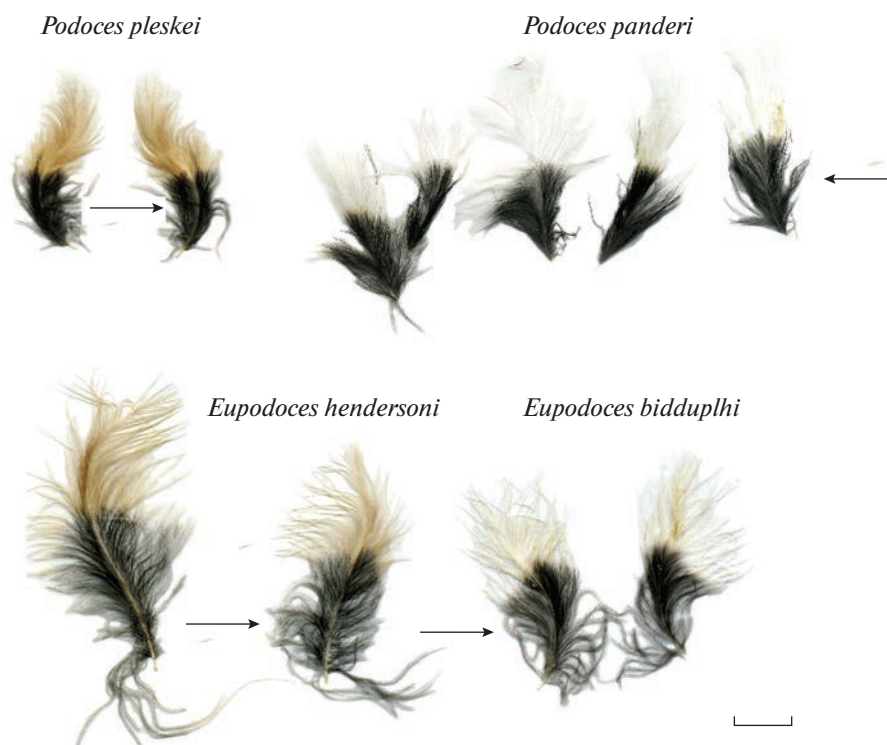


Рис. 1. Покровные перья из грудной птерилии саксаульных соек *Podoces* и *Eupodoces*. Места взятия проб для сканирующей электронной микроскопии указаны стрелками. Сканированное изображение. Масштаб 1 см.

изученные виды можно разделить на две группы (рис. 3, 4, 5): (1) уплощенная эллипсоидная конфигурация поперечника бородки I у *G. glandarius*, *C. cyana*, *P. pyrrhacorax*, *P. pica* и *Pt. afer* сходна с таковой у *Podoces* и *Eupodoces*; (2) у *P. infaustus*, *N. caryocatactes* и *C. cornix* бородка I имеет поперечный слабо- или сильно выраженный S-образный изгиб в верхней трети на уровне отхождения бородок II, что свидетельствует о присутствии неглубоких продольных бороздок в этом месте. У покровных перьев изученных нами врановых по середине дорсальной и вентральной сторон нижней трети бородки I проходит по одному гребню, которые обычно незначительно приподняты над поверхностью бородки, причем они могут иметь как сходную высоту и площадь, так и различаться (табл. 1). Например, вентральной гребень выше и больше дорсального у *C. cornix*, *P. infaustus*, *P. pica*. У *P. pyrrhacorax* гребни развиты сходно, а у *G. glandarius* и *Pt. afer*, как и у *Podoces* и *E. biddulphi*, — более высокий дорсальный гребень. Таким образом, конфигурация бородки I покровных перьев наиболее сходна у *Podoces* и *E. biddulphi* с таковой у *G. glandarius* и *Pt. afer*.

Архитектоника сердцевин бородки I. Степень развития сердцевин, размеры и компоновка составляющих ее полостей и перегородок различны у разных видов *Podoces* и *Eupodoces*, а у *E. hendersoni* и полости заметно крупнее (площадь сердце-

винных полостей на продольном срезе бородки I составляет 130.1 ± 16.5 мкм² против 91.2 ± 6.5 – 57.7 ± 15.6 мкм² у других видов); у *E. biddulphi* сердцевина развита очень слабо (табл. 1, рис. 2б). Очевидно, что степень развития сердцевин и размеры ее полостей специфичны для вида. На продольных срезах сердцевина одно-двухрядная, состоит из полиморфных прямоугольных полостей разного размера. На поперечных срезах в сердцевинном тяже ужимаются от трех (*Eupodoces*) до четырех (*Podoces*) сердцевинных полостей. Перегородки полостей покрыты мелкими перфорациями и имеют многочисленные волосовидные роговые выросты, а пигментные гранулы не обнаружены (рис. 2а). У других врановых сердцевина двух основных типов: двух-трехрядная ячеистая-сотовая (*G. glandarius*, *P. infaustus*, *C. cornix*, *Pt. afer*) и двухрядная лестничная (*P. pica*, *P. pyrrhacorax*, *C. cyana*, *N. caryocatactes*) (рис. 3, 4, 5). На продольных срезах первая состоит из расположенных тремя поперечными рядами пяти-шестиугольных полостей более-менее одинаковых размеров; вторая — из продольно вытянутых одной-двух полиморфных полостей, лежащих поперек стержня бородки I. По компоновке ячеек сердцевина бородки *P. pyrrhacorax* наиболее похожа на сердцевину *Eupodoces* (рис. 2б, 4). На поперечных срезах число рядов ячеек изменяется от двух (*P. pica*) до одиннадцати (*C. cornix*), а у *G. glandarius* и *Pt. afer* вполне сходно

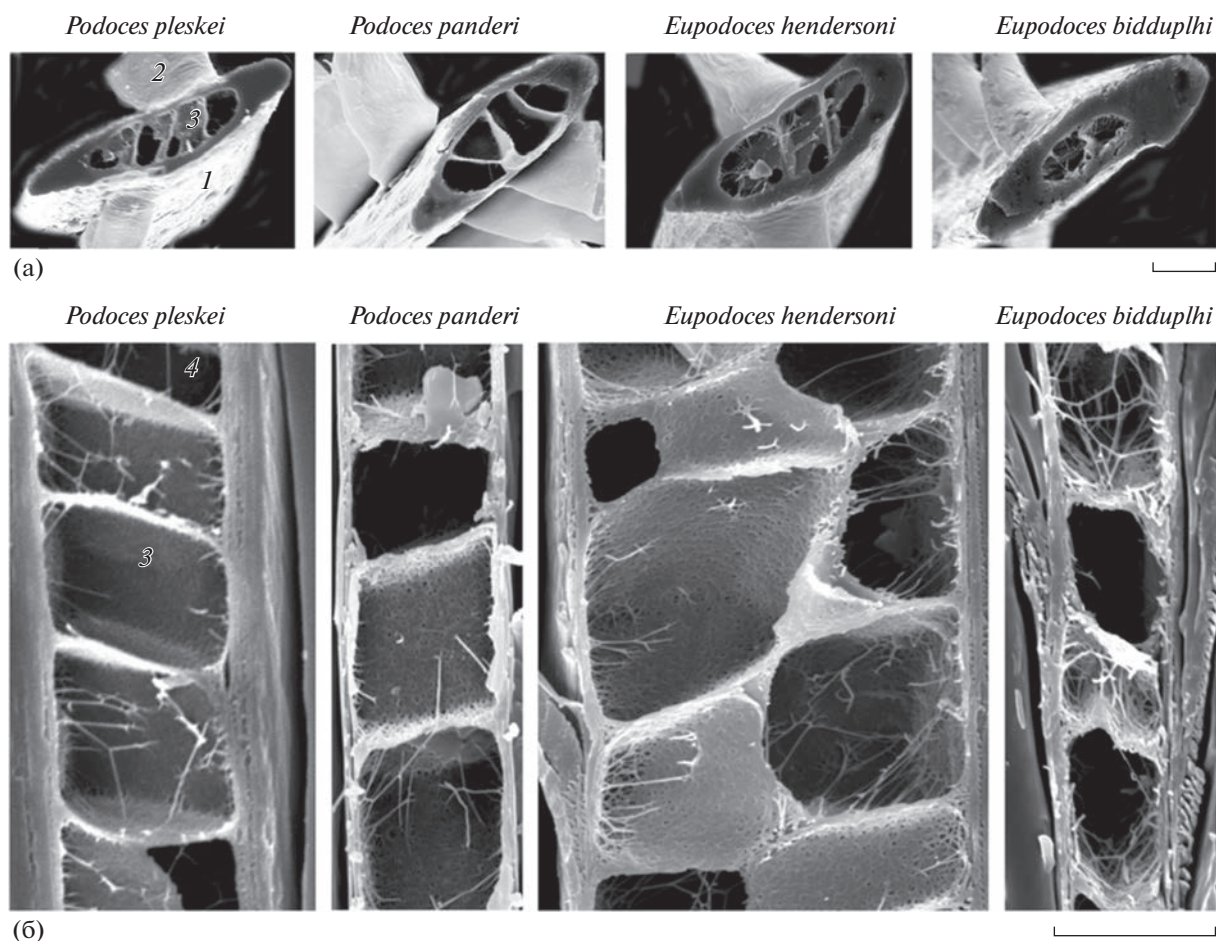


Рис. 2. Микроструктура боронок I покровных перьев из грудной птерилии саксаульных соек *Podoces* и *Eupodoces*. а – поперечные срезы боронок I; б – продольные срезы боронок I. 1 – боронок I, 2 – боронок II, 3 – стенка сердцевинной полости (“клетки”), 4 – полость сердцевинной клетки. Данные сканирующей электронной микроскопии. Масштаб 10 мкм.

с количеством ячеек у *Podoces* и *Eupodoces* (рис. 2а, 3, 4, 5). Перегородки между полостями неравномерной толщины, волнистые и тонкие, с многочисленными перфорациями и складками, а также с палочковидными пигментными гранулами и немногочисленными тонкими роговыми выростами. У покровных перьев грудной птерилии *Podoces* и *Eupodoces*, в отличие от маховых перьев других видов, пигментация крайне слаба, и пигментные гранулы в сердцевине единичны, что также характерно для покровных перьев *G. glandarius* и *P. infaustus*. Таким образом, у разных видов врановых в бородке I маховых и покровных перьев степень развития сердцевинной полости примерно одинакова, площадь ее тяжа занимает чуть меньше половины площади бородки (исключение – слабое развитие сердцевинной полости у *E. bidduphi*). Разнообразие конфигурации сердцевинных полостей и их компоновки невелико, что подтверждает общую закономерность процессов ороговения, проходящих в развивающемся перье, сопровождающихся выпадением

перинуклеарных участков и образованием многочисленных перфораций (Фадеева, Чернова, 2011).

Орнамент кутикулы боронок I. Кутикула боронок I покровного пера состоит из веретеновидных слабо извитых продольных жгутов, и роговые чешуйки здесь не обнаружены у *Podoces* и *E. bidduphi*, но у *E. hendersoni* в основаниях боронок II они различимы (рис. 6а, 6б). Чешуйки вытянуты вдоль боронок, имеют неправильную форму и волнистый апикальный край. Их поверхность образована хаотично переплетающимися довольно тонкими роговыми жгутами. У *E. hendersoni* высота такой чешуйки достигает 28.3 мкм, а максимальная ширина – 9.19 мкм. Площадь чешуйки составляет 210.99 мкм². Таким образом, чешуйки кутикулы специфичны для *E. hendersoni*. В отличие от маховых перьев врановых (Фадеева, Чернова, 2011) у покровных перьев других изученных видов, как и у *Podoces* и *Eupodoces*, в основании боронок I в месте отхождения пуховых боронок II чешуйки кутикулы не различимы или единичны, и не имеют

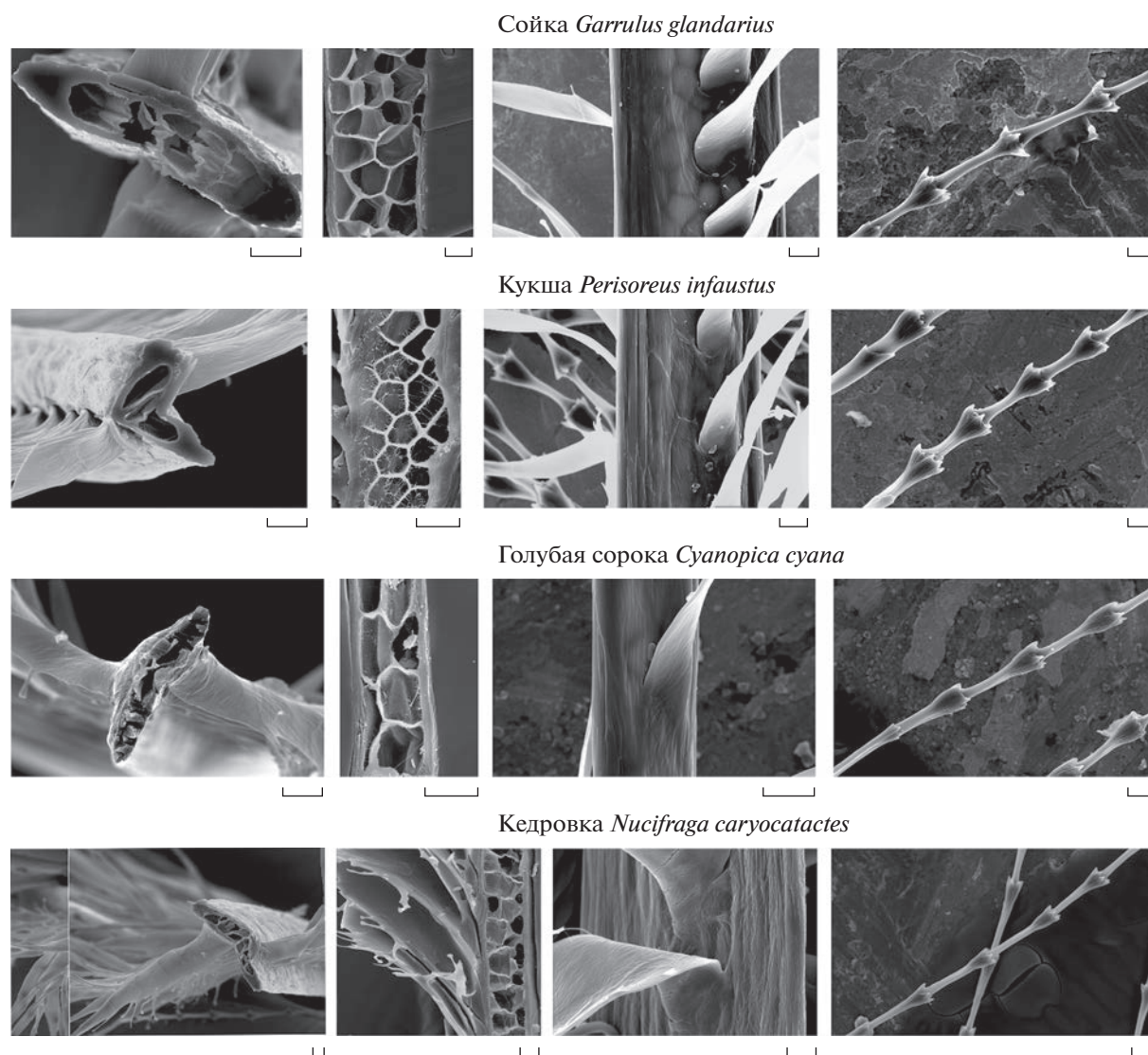


Рис. 3. Микроструктура боронок покровных перьев из грудной птерилии четырех видов врановых (Corvidae). Слева направо: поперечный срез бородки I; сердцевина на продольном срезе; кутикула бородки I и базальные клетки боронок II; узлы и междоузлия боронок II. Данные сканирующей электронной микроскопии. Масштаб 10 мкм.

четких границ (*C. cornix*, *P. pica*, *P. infaustus*) (рис. 4). Сама кутикула фибриллярная, состоит из продольно вытянутых роговых жгутов разной толщины, иногда связанными поперечными жгутами (*P. infaustus*, *Pt. afer*) (рис. 3, 5) или образующими ромбовидное переплетение (*P. pyrrhocorax*) (рис. 4). У маховых перьев, в отличие от покровных, кутикула хорошо выражена, мозаична, так как чешуйки располагаются встык (Фадеева, Чернова, 2011). Форма и ориентация (относительно продольной оси бородки I) чешуек махового пера сильно варьирует у разных видов. У *P. panderi* чешуйки имеют довольно редко встречающуюся округлую форму (обычно пяти-, шестиугольная), что сходно с таковой у чешуек *P. infaustus*. Отметим, что у всех исследованных видов, за исключением *P. panderi*, края

чешуек кутикулы махового пера утолщенные и напоминают валики, вследствие чего границы между клетками хорошо различимы (Фадеева, Чернова, 2011). Особенно отчетливо заметны валики у чешуек махового пера у *P. infaustus*, *G. glandarius*, *C. cornix* и *C. corax*, а у *C. monedula* имеется очень характерный валик по периферии клетки (Фадеева, Чернова, 2011). Отсутствие мозаичной кутикулы у покровного пера *P. panderi* свидетельствует в пользу возможно менее эволюционно продвинутого статуса этого вида, а наличие их у махового пера сближает этот вид с *P. infaustus*. Очевидно, что общая структура кутикулы покровного пера у всех видов и в обеих категориях перьев (покровных и маховых) сходна у всех врановых. Кутикула представляет собой фибриллярную структуру, состоит из изви-

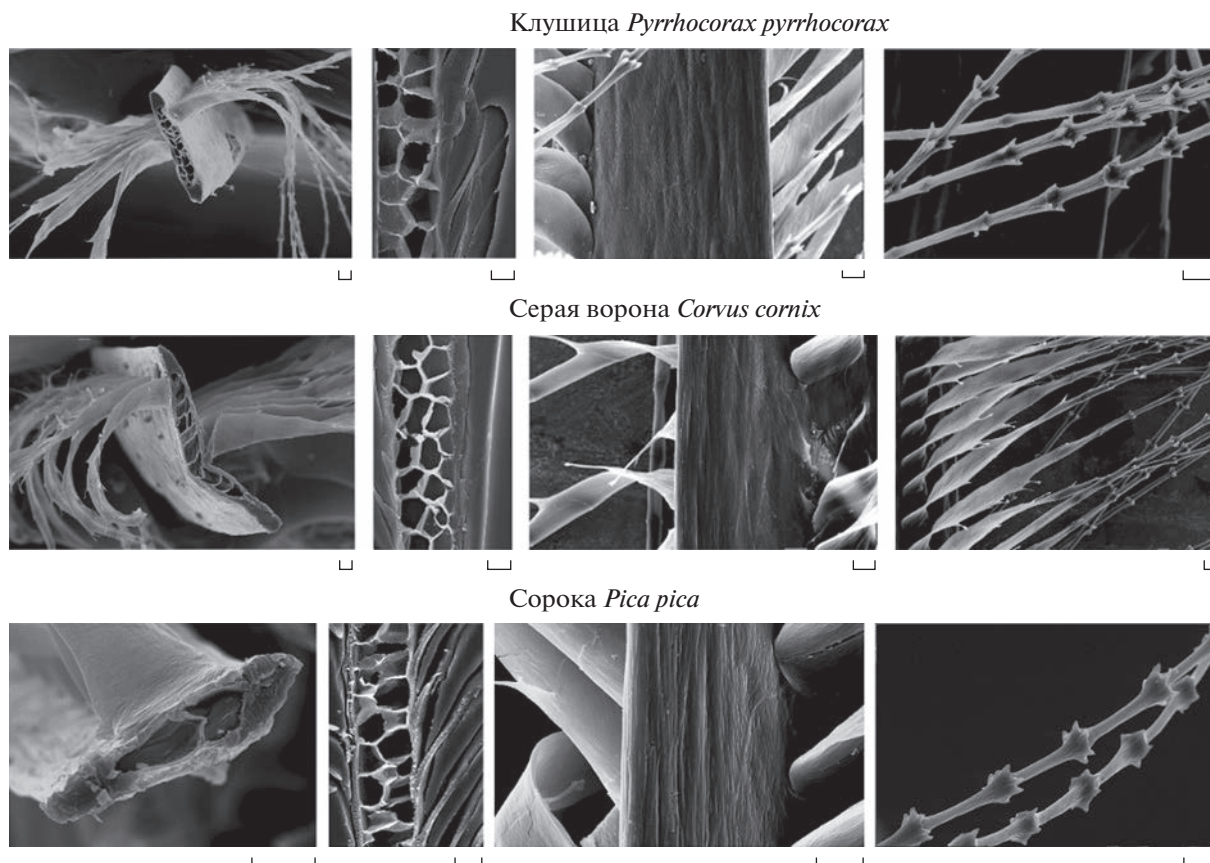


Рис. 4. Микроструктура боронок покровных перьев из грудной птерилии трех видов врановых (Corvidae). Слева направо: поперечный срез бородки I; сердцевина на продольном срезе; кутикула бородки I и базальные клетки боронок II; узлы и междоузлия боронок II. Данные сканирующей электронной микроскопии. Масштаб 10 мкм.

тых роговых тяжей разной толщины, тянущихся вдоль бородки I и иногда образующих ромбовидное переплетение и короткие выросты либо имеет чешуйчатое строение и мозаичный орнамент.

Строение базальной клетки пуховой бородки II и ее ворсинок. У покровных перьев *Podoces* и *Eupodoces* базальная клетка бородки II крупная, ремневидная, имеет два поворота оси на 180° , один в нижней трети проксимальной части и второй — перед переходом в перышко (*pennulum*), состоит из четырех кольцевидных чешуек кутикулы, размеры которых значительно увеличиваются от основания до места перехода в перышко (рис. 6в, 6г). У *E. biddulphi* эти промеры для чешуйки базальной клетки равны соответственно 41.75 и 18.65 мкм, а площадь — 603.45 мкм². Площадь базальной клетки максимальна у *E. hendersoni*, составляет 1035.5 ± 64.3 мкм² и минимальна у *P. pleskei* — 606.2 ± 109.5 мкм². Она статистически достоверно ($p < 0.1$) различается у *E. hendersoni* и *P. pleskei*, а также у *P. panderi* (781.3 ± 109.5 мкм²) и *E. biddulphi* (718 ± 173 мкм²). Таким образом, степень развития базальной клетки определяет размеры основания бородки II и максимальна у

крупной сойки *E. hendersoni*, по сравнению с самой мелкой сойкой *P. pleskei*, т.е. видоспецифична. На боковых апикальных краях базальной клетки имеются многочисленные ворсинки (*villi*), которые представляют собой полиморфные выросты ее кутикулы. Конфигурация ворсинок изменяется от шиповидной и грибовидной, до удлиненной раздвоенной и заканчивающейся дисковидным утолщением (рис. 6в, 6г). Наиболее длинные (29.6 ± 8.1 мкм), разнообразные по конфигурации (вплоть до раздвоенных) и многочисленные ворсинки (до пяти на одной базальной клетке) отмечены у *E. hendersoni*. Слабее они развиты у *P. panderi* (по одной—четыре на базальной клетке, высотой до 8 мкм). По-видимому, степень развития и конфигурация ворсинок относятся к видоспецифичным признакам. У других изученных видов врановых базальная клетка также ремневидная. У покровного пера она крупная и в проксимальной части повернута на 180° (рис. 3, 4, 5). Ее нижние чешуйки обычно имеют по одному-два зубчатому выросту на апикальном крае, а ворсинки наиболее многочисленны у *S. cornix* (рис. 4). Также ворсинки разной конфигурации обнаружены на прокси-

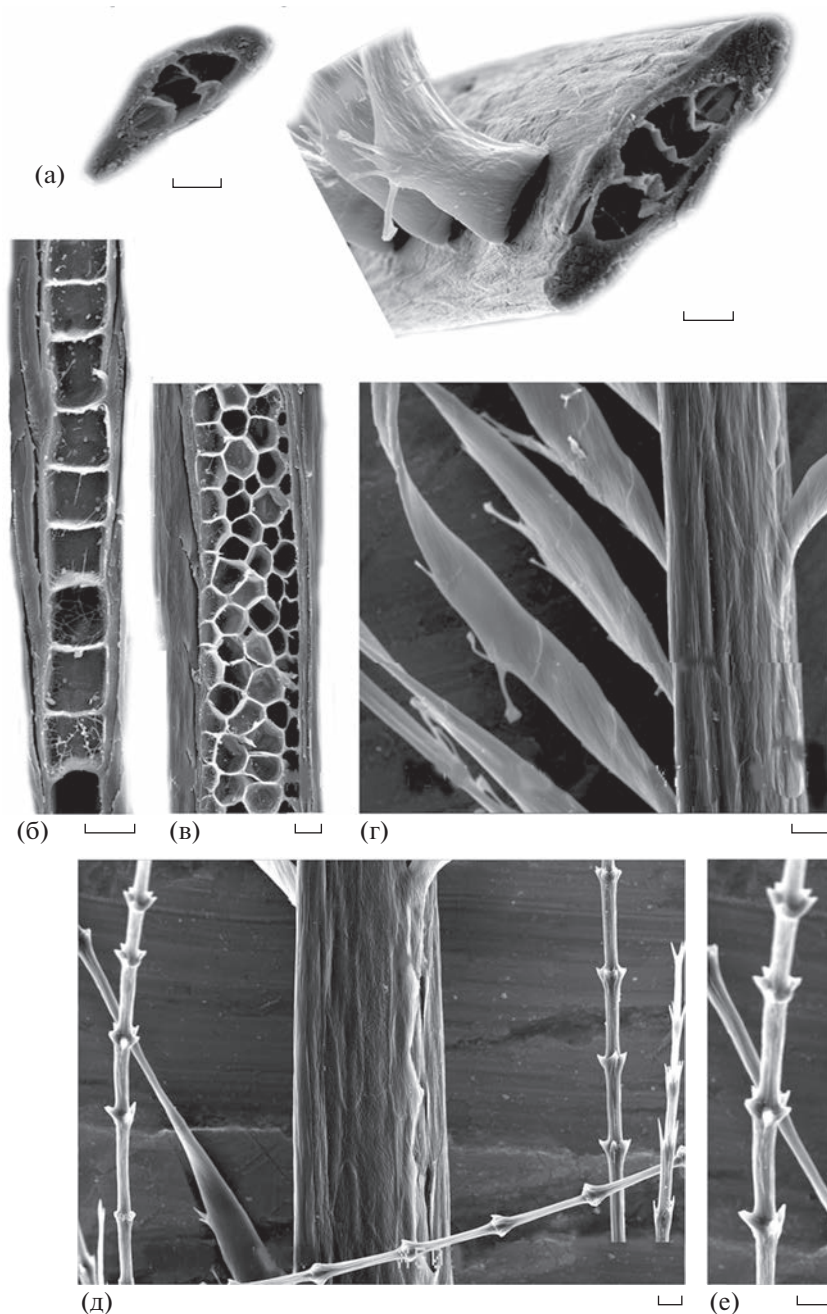
Черная сорока *Ptilostomus afer*

Рис. 5. Микроструктура боронок I и II покровного пера из грудной птерилии черной сороки *Ptilostomus afer*. а – поперечные срезы боронок I; б – продольный срез нижней части боронок I; в – то же в середине боронок I; г – кутикула боронок I и базальные клетки боронок II с ворсинками; д – то же и боронок II с узлами и междоузлиями; е – узлы и междоузлия боронок II. Данные сканирующей электронной микроскопии. Масштаб 10 мкм.

мальных чешуйках на вентральной поверхности боронок II у *N. caryocatactes* (рис. 3) и *Pt. afer* (рис. 5). Базальные клетки боронок II пуховой части махового пера не содержат выростов, однако у большинства этих же видов базальные клетки пуховых боронок II покровного пера могут иметь один (*C. cyaneus*, *P. pica*, *C. monedula*, *C. corax*) или два

(*G. glandarius*, *P. panderi*) выроста (Фадеева, Чернова, 2011). Известно, что наличие ворсинок на базальной клетке таксономически значимо (Brom, 1986, 1990; Dove, 2000). Например, они имеются у всех Воробьинообразных и Дятлообразных, а вот количество ворсинок, их конфигурация и размеры могут быть специфичными на уровне рода или ви-

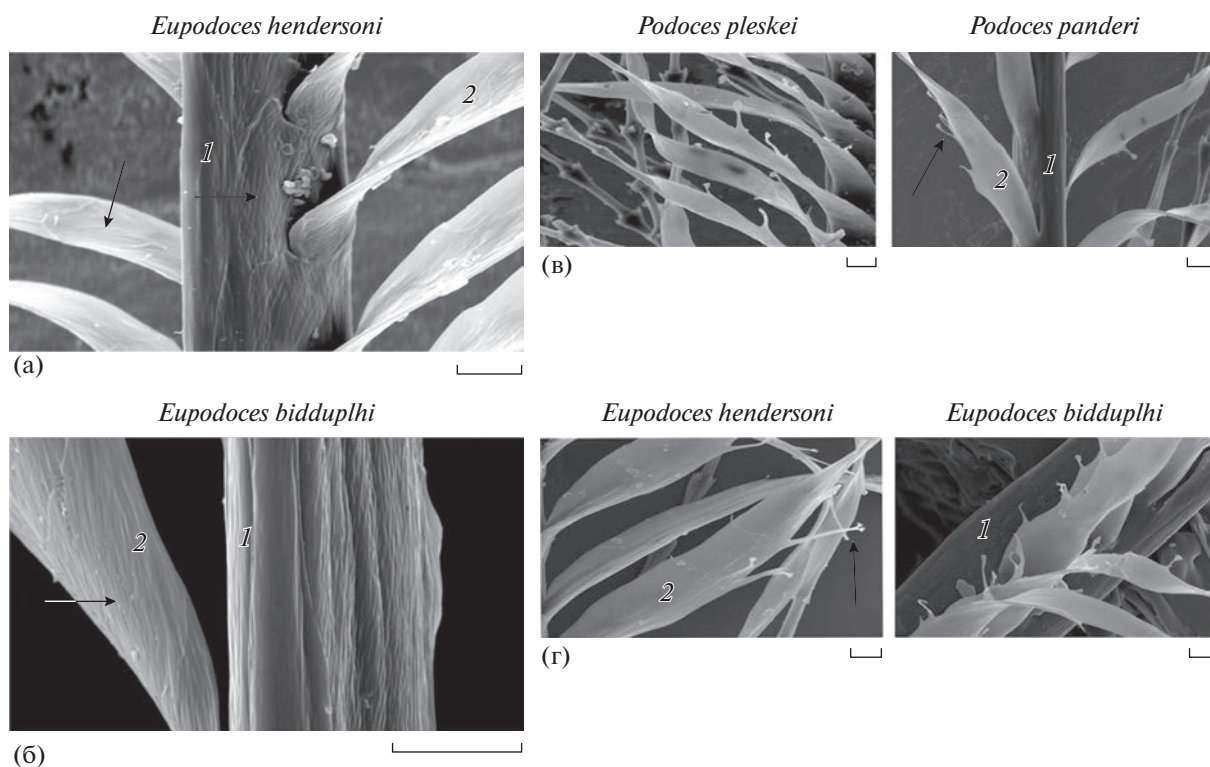


Рис. 6. Микроструктура кутикулы бородки I (1), бородки II (2) из грудной птерилии *Eupodoces* (а, б) и базальной клетки бородок II покровного пера из грудной птерилии *Podoces* и *Eupodoces* (в, г). Чешуйки кутикулы и ворсинки указаны стрелками. Обозначения как на рис. 5. Данные сканирующей электронной микроскопии. Масштаб 10 мкм.

да, и по этому показателю *Podoces* и *Eupodoces* сближаются с *Pt. afer* и *N. caryocatactes*.

Узлы и междоузлия пуховых бородок II. Поверхность кутикулы бородок II покровного пера имеет продольную фибриллярную исчерченность, которая отчетливо различима у *Podoces* (кроме *P. panderi*) и *Eupodoces*: хорошо различимая ребристость плотная как на узлах, так и на междоузлиях (рис. 7). У маховых и покровных перьев других представителей врановых поверхность кутикулы узлов и междоузлий пуховых бородок II также имеет фибриллярную ребристость, выраженную в разной степени у разных видов и у перьев разных типов. Она может быть неотчетливой и неплотной (*C. cyana*, *P. panderi*, *C. monedula*, *C. frugilegus*), хорошо различимой плотной (*P. pyrrhacorax*, *P. pica*, *C. corax*, *C. cornix*, *Pt. afer*), очень рельефной у махового пера (*P. infaustus*, *G. glandarius*), но неплотной и неотчетливой у покровного пера (*G. glandarius*, *P. pyrrhacorax*, *C. cyana*, *N. caryocatactes*) (Фадеева, Чернова, 2011). По-видимому, степень развития ребристости бородки II значительно варьирует в перьях разных птерилий у одного вида и не может служить достоверным видовым признаком. Узлы имеют вполне сходное расположение на бородках II и размеры у всех четырех видов саксальных соек (табл. 2, рис. 7). Однако у *Podoces*

обычно узлы имеют колокольчатую и чашевидную (*P. panderi*) форму, и их апикальные зубчики плотнее прилегают к бородке II, в то время как у *Eupodoces* зубчики узлов сильно оттопырены, и сам узел уплощен и “раскрыт”, более похож на тарелку, чем на чашку. Различия в длине узлов статистически достоверны между *P. pleskei* и *P. panderi* ($p = 0.01$; $n = 5$), и между *P. panderi* и *E. hendersoni* ($p = 0.04$). Площадь узла статистически достоверно отличается у *P. pleskei* от *E. bidduphi* ($p = 0.02$; $n = 3$) и *E. hendersoni* ($p = 0.001$; $n = 3$), а также отличается у *P. panderi* от обоих видов *Eupodoces* (соответственно $p = 0.017$; $n = 3$ и $p = 0.0079$; $n = 3$). Длина междоузлий сходна у обоих видов *Eupodoces*, у *Podoces* она наибольшая у *P. panderi*, а наиболее утолщенные междоузлия характерны для *E. bidduphi* (табл. 2). Количество узлов составляет 3–5 у всех видов, а их высота наибольшая у *P. pleskei*. Видимо, размеры и конфигурация узлов отражают не только видовую, но и родовую специфику строения бородок II покровных перьев саксальных соек. Пуховые бородки II покровного пера других изученных видов врановых также характеризуются плотным расположением мелких колокольчатых узлов за счет укороченных междоузлий (табл. 2). Как и у *Podoces* и *Eupodoces* узлы снабжены тремя–пятью мелкими зубчика-

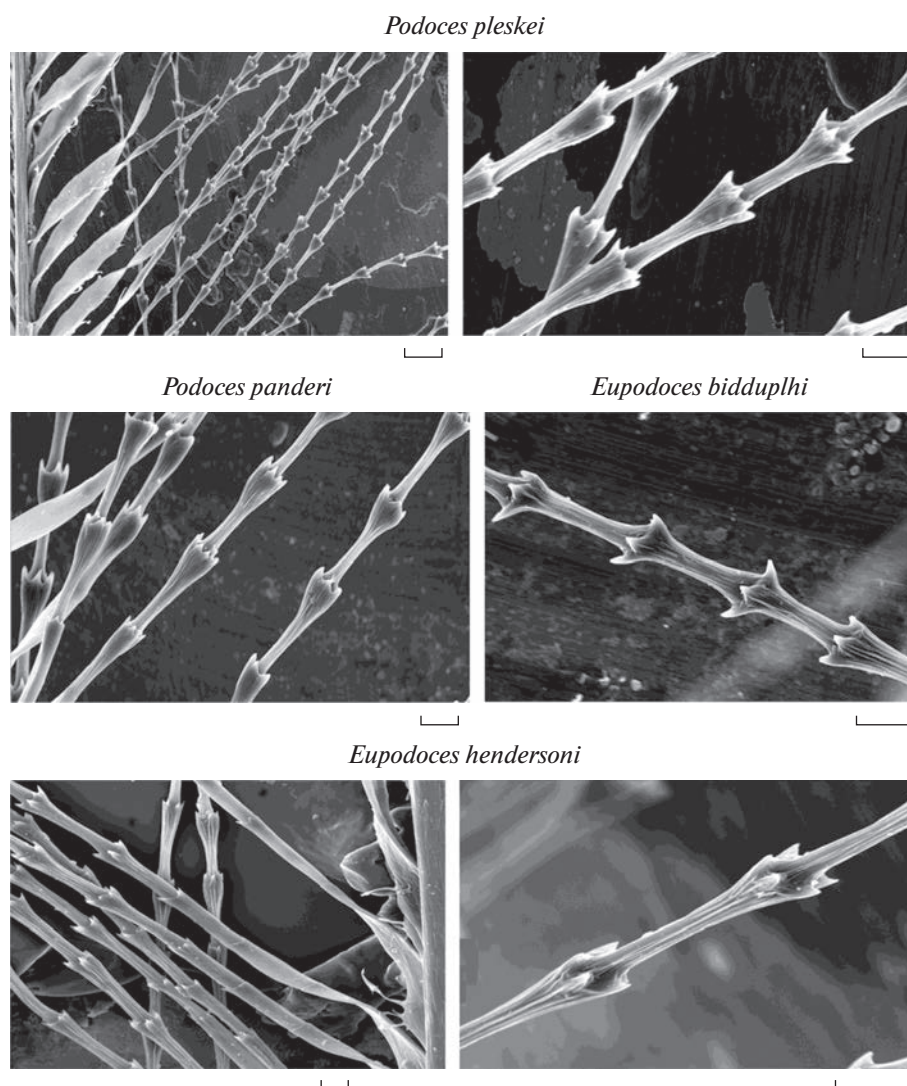


Рис. 7. Микроструктура узлов кутикулы боронок II покровного пера из грудной птерилии *Podoces* и *Eupodoces*. Данные сканирующей электронной микроскопии. Масштаб 10 мкм.

ми сходной длины у разных видов. Из всех видов только *G. glandarius*, *P. pyrrhocorax*, *P. pica* и *Pt. afer* имеют широко “раскрытые” узлы, как у *Eupodoces*. Кроме того, у *P. panderi* отмечена бокаловидная форма узлов пуховых боронок II махового пера (Фадеева, Чернова, 2011). У большинства других видов апикальная часть сегмента слабо расширена, и междуузлие плавно переходит в узел (рис. 3, 4, 5). У *G. glandarius* узел пуховых боронок II махового пера практически не выражен (Фадеева, Чернова, 2011), хотя у покровного пера он заметен за счет более тонких междуузлий (рис. 3), что демонстрирует вариабельность этого признака в перьях разных категорий (маховые, пуховые) и предполагает, что сравнительные исследования необходимо проводить на перьях одной категории и из сходных птерилий у сравниваемых видов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В середине прошлого века полагали, что архитектура пера не может помочь таксономическим исследованиям. Исторически сложилось так, что основным направлением в изучении микроструктуры перьевого покрова птиц стала идентификация таксонов разного ранга, что было и остается крайне важной практической задачей орнитологии, в том числе экологической, авиационной, а также палеозоологии, криминалистики и филогенетических исследований (см. обзоры: Силаева и др., 2013, 2015, 2018; Силаева, Чернова, 2021). В настоящее время предложено, помимо светооптической микроскопии, применять сканирующую электронную микроскопию для описания и измерения микроструктур пера и показаны возможности использования архитектуры пера для решения таксономических задач: по орнаменту кутикулы, форме и

Таблица 2. Размеры узлов и междуузлий боронок II покровных перьев изученных видов врановых ($n = 3-5$)

| Вид | Узел | | | Междуузлие | | Длина зубчика, мкм |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------|------------|-------------|--------------------|
| | длина вдоль боронок II, мкм | ширина поперек, мкм | площадь, мкм ² | длина, мкм | ширина, мкм | |
| <i>P. pleskei</i> | 7.7 ± 1.4 | 8.9 ± 0.7 | 82.4 ± 9.8 | 17.2 ± 1.5 | 3.9 ± 0.7 | 4.8 ± 0.9 |
| <i>P. panderi</i> | 9.5 ± 1.7 | 9.0 ± 0.5 | 71.5 ± 5.8 | 21.5 ± 3.5 | 3.3 ± 0.2 | 3.2 ± 0.3 |
| <i>E. hendersoni</i> | 7.9 ± 1.4 | 7.4 ± 0.6 | 36.8 ± 8.1 | 19.8 ± 2.1 | 3.6 ± 0.4 | 3.9 ± 0.9 |
| <i>E. biddulphi</i> | 5.6 ± 0.4 | 10.5 ± 1.1 | 53.3 ± 3.1 | 19.2 ± 2.3 | 4.4 ± 0.5 | 4.1 ± 0.6 |
| <i>G. glandarius</i> | 10.2 ± 1.6 | 13.1 ± 0.5 | 76.4 ± 18.4 | 20.4 ± 4.9 | 4.5 ± 0.5 | 3.6 ± 0.4 |
| <i>P. infaustus</i> | 10.8 ± 0.9 | 9.5 ± 0.7 | 84.9 ± 10.7 | 14.1 ± 2.0 | 4.7 ± 1.1 | 3.6 ± 0.8 |
| <i>C. cyana</i> | 13.6 ± 1.3 | 8.3 ± 0.6 | 83.2 ± 0.6 | 16.5 ± 0.8 | 3.9 ± 0.4 | 4.1 ± 1.5 |
| <i>N. caryocatactes</i> | 10.8 ± 0.9 | 9.5 ± 0.7 | 84.9 ± 10.7 | 14.1 ± 2.0 | 4.7 ± 1.1 | 3.6 ± 0.8 |
| <i>P. pyrrhocorax</i> | 5.2 ± 1.3 | 9.6 ± 0.7 | 33.0 ± 3.9 | 23.0 ± 5.7 | 4.5 ± 0.6 | 4.3 ± 0.7 |
| <i>C. cornix</i> | 8.3 ± 0.7 | 7.0 ± 1.3 | 47.8 ± 10.3 | 32.9 ± 4.4 | 5.2 ± 0.7 | 4.3 ± 0.4 |
| <i>Pica pica</i> | 9.5 ± 1.2 | 12.3 ± 2.3 | 70.4 ± 13.6 | 19.3 ± 3.0 | 4.0 ± 0.2 | 4.5 ± 0.2 |
| <i>Pt. afer</i> | 8.8 ± 1.8 | 7.8 ± 1.5 | 48.8 ± 9.6 | 28.3 ± 3.2 | 4.8 ± 0.7 | 2.1 ± 0.9 |

рельефу ее чешуек можно различить некоторые таксоны (Reaney *et al.*, 1978; Булыга, 1998; Чернова и др., 2006, 2009). Предприняты попытки определения эволюционных связей разных таксонов по микроструктуре перьев (Dove, 1997). Эти исследования показали наличие качественных и количественных межвидовых различий. Они касаются, прежде всего, морфологии узлов, их количества и цвета, пигментации базального сегмента луча, длины и интенсивности окраски базальной части боронок, длины боронок. По всем количественным признакам выявлены и приведены точные статистические коэффициенты различия. Результаты исследования подтверждают обоснованность использования микроструктур пера для идентификации родственных видов и в том числе применения количественных подходов для таких исследований. При этом отмечено, что для идентификации лучше использовать качественные микроструктурные признаки, чем количественные, так как последние требуют многочисленных и трудоемких измерений и подсчетов. Однако в настоящее время специальные компьютерные программы позволяют брать точные промеры структур (например, не только их линейные размеры, но и площадь на срезах) и статистически их обрабатывать. Исследования этого аспекта проблемы крайне редки, что объясняется в основном трудностями методического порядка, сложностью сбора и обработки материала. У Ржанкообразных выявлены признаки, которые подтверждены статистически как диагностические для систематического анализа, способные обозначить связи между отрядами, подотрядами и частично семействами (Силаева и др., 2018). По мере развития методической базы, в частности, средств скани-

рующей электронной микроскопии становится возможным не только идентифицировать виды, но и определять их таксономический ранг и предполагать вероятную эволюционную общность.

Многие микроструктуры покровного пера из грудной птерилии врановых сходны и формируют специфические для семейства признаки, позволяющие идентифицировать это семейство и отдельные роды (табл. 3). Кроме того, выявляется сходство между представителями разных родов, которое может указывать на родственные связи таксонов. Разные элементы покровного пера имеют нетождественное значение для решения таксономических задач. По такому важному признаку, как размеры и конфигурация узлов пуховой боронок II покровного пера, саксаульные сойки разделяются на две ветви *Podoces* и *Eupodoces*. Наиболее четко выражено сходство разных микроструктур этих соек с *G. glandarius* и *Pt. afer* (табл. 3).

Семейство врановых включает около 130 видов, обычно объединяемых более чем в 25 родов. На основании секвенирования ядерных и митохондриальных генов, в зависимости от числа исследованных видов и применяемых методов, саксаульных соек располагают в филогенетическом древе врановых по-разному. В кладе с саксаульными сойками использовали материал только от монгольской, иногда и кашгарской, соек. Сестринскую пару могут составлять центральноазиатские саксаульные сойки (*Eupodoces*) и африканская черная сорока (*Ptilostomus*). Включение в исследование кустарникового ворона (*Zavattariornis*), обитателя редкостойных акациевых саванн и весьма схожего по поведению и внешней морфологии с саксаульными сойками, указало на их возможное общее про-

Таблица 3. Сходство основных микроструктур бородок покровных перьев из грудной птерилии у представителей разных родов врановых*

| Признак | Роды | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|------------------|---------------|
| | | <i>Garrulus</i> | <i>Ptilostomus</i> | <i>Pyrrhocorax</i> | <i>Perisoreus</i> | <i>Nucifraga</i> | <i>Pica</i> | <i>Cyanopica</i> | <i>Corvus</i> |
| Бородка I | <i>Podoces</i> | + | + | + | | | | | |
| | <i>Eupodoces</i> | + | + | + | | | | | |
| Сердцевина бородки I | <i>Podoces</i> | + | + | | | | | | |
| | <i>Eupodoces</i> | + | + | + | | | | | |
| Перфорации перегородок сердцевин | <i>Podoces</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Eupodoces</i> | + | | + | + | + | + | + | + |
| Пигментные гранулы | <i>Podoces</i> | + | + | | + | | | | |
| | <i>Eupodoces</i> | + | | | + | | | | |
| Базальная клетка бородки II | <i>Podoces</i> | + | + | | + | | | | |
| | <i>Eupodoces</i> | + | + | | + | | | | |
| Ворсинки базальной клетки | <i>Podoces</i> | + | + | + | | + | | | |
| | <i>Eupodoces</i> | + | + | + | | + | | | |
| Орнамент кутикулы | <i>Podoces</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | <i>Eupodoces</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Узлы и междоузлия бородки II | <i>Podoces</i> | | | | + | + | | | |
| | <i>Eupodoces</i> | + | + | + | | | + | | |

Примечание. * Перечень исследованных видов указан в тексте; сходство микроструктуры пера с *Podoces* или *Eupodoces* обозначено знаком +.

исхождение с парой *Eupodoces* – *Ptilostomus*. Показаны и относительно близкие генетические отношения саксаульных соек с лесными сойками (*Garrulus*) или сороками (*Pica*) (Ericson *et al.*, 2005; Fernando *et al.*, 2017; Jin-Qing Jiang, 2019). Выявлена возможность образования от терминального таксона пары *Garrulus* – *Pica* и политомии из *Zavattariornis* и пары *Eupodoces* – *Ptilostomus* (Jönsson *et al.*, 2016).

По результатам филогенетических исследований, лесных соек (*Garrulus*) и кукш (*Perisoreus*) нельзя считать близкими родственниками, поскольку это противоречит морфологическим данным. Во всех филогенетических исследованиях кукши принадлежат иным кладам. Иногда их сближают с голубыми сороками (*Cyanopica*), но позиции этих родов во взаимоотношениях с другими родами врановых не могут быть строго детерминированы. Необходимо специально подчеркнуть, что клада не имеет реального предка. В узлах кладограммы подразумевается только гипотетический предок. Кладограмма не отражает реальной истории группы и даже может сильно исказить ее, а также в очень малой степени выявляет истинный процесс эволюции. Иерархия сестринских групп, считываемая через объединяющие их узлы, не является ге-

неалогией в строгом смысле слова. Наибольшим предсказательным потенциалом обладают не филогенетические системы, а те, что построены одновременно с учетом родства и сходства (Зеленков, 2012; Расницын, 2020). В ряде филогенетических исследований подтверждаются выводы, основанные на микроструктуре пера, о близкородственных отношениях саксаульных соек с африканской черной сорокой и, вероятно, с лесными сойками. Сближение саксаульных соек на основе морфологии с кукшами (Козлова, 1975), а также сходство микроструктур пера и с некоторыми другими изученными видами врановых следует относить к гомотипии – конструктивному подобию сравниваемых структур, не основанному на родстве (без генетической преемственности таксонов).

Эволюционная направленность формирования различных микроструктур пера остается неизвестной, но, судя по тому, что из *Podoces* у наиболее анцестрального вида *P. pleskei* при мелких размерах этого вида структуры пера (базальная клетка, узлы опахальца) сравнительно крупные, можно предполагать, что их формирование в процессе эволюции саксаульных соек шло по пути измельчания этих дополнительных компартментов кутикулы бородки II.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые с помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что (1) микроструктура покровных перьев, как и характер телодвижений, особенности вокализации, конструкция гнезд, эмбриональный птериловизис птенцов саксаульных соек, имея общее сходство, отражает не только принадлежность к семейству Corvidae, но и родовую, различаясь у *Podoces* и *Eupodoces*; (2) если признать анцестральными черты строения пера *Podoces pleskei*, к которым относятся мелкие размеры перьев, но крупные бородки I с развитым дорсальным гребнем, мелкие базальные клетки бородки II, но крупные чашеобразные узлы на пуховых бородках II, то можно предполагать, что у саксаульных соек в процессе эволюции шло измельчание роговых структур покровного пера; (3) сходство микроструктуры пера и результаты некоторых рядов филогенетических исследований саксаульных соек с представителями родов *Ptilostomus* и *Garrulus* позволяют предполагать близкие родственные связи этих таксонов; (4) метод сканирующей электронной микроскопии структуры пера эффективен не только для выявления диагностических черт строения пера, но и перспективен для понимания уровня родственных отношений таксонов птиц; (5) сканирующая электронная микроскопия дополняет и обогащает исследования перьев на уровне световой микроскопии, которые уже заслужили достойное место в орнитологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено на оборудовании Центра общего пользования “Инструментальные методы в экологии” ИПЭЭ РАН. Авторы благодарны сотрудникам Научно-исследовательского зоологического музея МГУ и Зоологического Института РАН за помощь в работе с коллекционным материалом, а также Т.Н. Целиковой за техническую помощь.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (№№ 0089-2021-0002, 0089-2021-0004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все этические стандарты были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Булыга Л.П.* Судебно-биологическое исследование перьев и пуха птиц. Киев: КНИИСЭ, 1998. 37 с.
- Зеленков Н.В.* Кластический анализ, эволюция и палеонтология // Современная палеонтология: классические и новейшие методы. М.: ПИН РАН, 2012. С. 9–25.
- Ильяшенко В.Ю., Ильяшенко Е.И., Гунгаа А., Пурев-Очир Г.* К биологии монгольской саксаульной сойки – *Eupodoces hendersoni* Hume, 1871 // *Selevinia*. 2018. Т. 25. С. 7–15.
- Козлова Е.В.* Птицы зональных степей и пустынь Центральной Азии // Тр. ЗИН АН СССР. 1975. Т. 59. Л. 251 с.
- Расницын А.П.* Философия эволюционной биологии // Журн. общ. биологии. 2020. Т. 81. № 1. С. 54–80.
- Силаева О.Л., Чернова О.Ф.* Современное состояние идентификационной птиологии // Успехи современной биологии. 2021. Т. 141. № 6. С. 1–16. <https://doi.org/10.31857/S0042132421060089>
- Силаева О.Л., Ильичев В.Д., Чернова О.Ф.* Определитель птиц по перу и его фрагментам. Врановые (Corvidae): LapLambert Acad. Publ, 2012. 316 с. + CD. ISBN: 978-3-8473-1403-5.
- Силаева О.Л., Ильичев В.Д., Чернова О.Ф., Вараксин А.Н.* Мультимедийный определитель птиц по перу и его фрагментам. Курообразные (Galliformes), Голубеобразные (Columbiformes), Рябкообразные (Pterocletiformes). М.: ИПЭЭ РАН, 2013. CD-ROM.
- Силаева О.Л., Чернова О.Ф., Вараксин А.Н.* Определитель птиц по перу и его фрагментам. Отряд Гусеобразные (Anseriformes). М.: ИПЭЭ РАН, 2015. CD-ROM.
- Силаева О.Л., Чернова О.Ф., Букреев С.А., Вараксин А.Н.* Определитель птиц по перу и его фрагментам. Отряд Ржанкообразные (Charadriiformes). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2018. 385 с.
- Фадеева Е.О., Чернова О.Ф.* Особенности микроструктуры контурного пера Врановых Corvidae // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 4. С. 436–446.
- Чернова О.Ф.* Полиморфизм архитектоники дефинитивных покровных перьев // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 2. С. 280–285.
- Чернова О.Ф., Ильяшенко В.Ю., Перфилова Т.В.* Архитектоника пера и ее диагностическое значение // Теоретические основы современных методов экспертного исследования. М.: Наука. 2006. 100 с.
- Чернова О.Ф., Перфилова Т.В., Фадеева Е.О., Целикова Т.Н.* Атлас микроструктуры перьев птиц (Библиотека судебного эксперта). М.: Российский Федеральный Центр Судебной Экспертизы, 2009. 172 с.
- Шарафутдинова Т.А., Валув В.А.* Идентификация врановых птиц по первостепенным маховым перьям, оставшимся после попадания птицы в двигатель летательного аппарата // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 6 (100). С. 425–426.
- Amadon D.* The genera of Corvidae and their relationships // *American Museum Novitates*. 1944. № 1251. P. 1–21.

- Baumel J.J.* (Ed.) *Nomina anatomica avium*. An annotated anatomical dictionary of birds. London e. c.: Acad. Press, 1979. 637 p.
- Brom T.G.* Microscopic identification of feathers and feather fragments of Palearctic birds // *Bijdragen tot de Dierkunde*. 1986. V. 56. P. 181–204.
- Brom T.G.* Villi and the phyly of Wetmore's order Pici-formes (Aves) // *Zool. J. Linn. Soc.* 1990. V. 98. P. 63–72.
- Chandler A.C.* A study of the structure of feathers with reference to their taxonomic significance // *Univ. of Calif. Publ.* 1916. V. 13. P. 243–446.
- Davies A.* Micromorphology of feathers using the scanning electron microscope // *J. Forensic Sci. Soc.* 1970. V. 10. № 3. P. 165–174.
- del Hoyo J., Collar N.J.* *HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World, Passerines*. Lynx Edicions, Barcelona, 2016. V. 2. 743 p.
- Dove C.J.* Quantification of microscopic feather characters used in the identification of North American plovers // *The Condor*. 1997. V. 99. № 1. P. 47–57.
- Dove C.J.* A discriptive and phylogenetic analysis of plumaceous feather characters in Charadriiformes // *Ornithol. Monographs*, 2000. № 51. 163 p.
- Dove C.J., Koch S.* Microscopy of feathers: A practical guide for forensic feather identification // *Jastee*, 2010. V. 1. № 1. P. 1–61.
- Ericson P.G.P., Jansén A.-L., Johansson U.S., Ekman J.* Inter-generic relationships of the crows, jays, magpies and allied groups (Aves: Corvidae) based on nucleotide sequence data // *J. Avian Biol.* 2005. V. 36. P. 222–234.
- Fernando S.W., Peterson A.T., Shou-Hsien Li.* Reconstructing the geographic origin of the New World jays // *Neotropical Biodiversity*. 2017. V. 3. № 1. P. 80–92.
- Ilyashenko V.Yu.* Taxonomical status of ground jays // *Рус. орнитол. журн.* 2018. Т. 27. Экспресс-выпуск № 1693. P. 5521–5525.
- Jin-Qing Jiang.* Characterization of the complete mitochondrial genome of *Corvus corone orientalis* // *Mitochondrial DNA* 2019. Part B. V. 4. № 2. P. 2102–2103.
- Jönsson K.A., Fabre P.-H., Kennedy J.D., Holt B.G., Borregaard M.K., Rahbek C., Fjeldså J.* A supermatrix phylogeny of corvoid passerine birds (Aves Corvides) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016. V. 94. P. 87–94.
- King A.S., McLelland J.* (Eds.) *Form and function in birds*. London: Acad. Press, 1985. V. 3. 522 p.
- Lucas A.M., Stettenheim P.R.* *Avian anatomy. Integument* // *Agricult. Handbook. Forest Serv. U.S. Parts 1, 2*. Washington, D.C.: US Dept. Agricult. U.S., Gov. Print. Office, 1972. 679 p.
- Opaev A., Ilyashenko V., Gungaa A., Ilyashenko E., Purev-Ochir G.* Vocalization of Ground Jays supports their subdivision into two genera: *Podoces* and *Eupodoces* // *Podoces*. 2019. V. 14. № 2. P. 18–27.
- Reaney B.A., Richer S.M., Cunningham W.P.* A preliminary scanning electron microscope study of the minute morphological features of feathers and their taxonomic significance // *Scanning Electron Microscopy*. 1978. V. 1. P. 471–478.
- Rutschke E.* Untersuchungen über Wasserfestigkeit und Struktur des Gefieders von Schwimmvögeln // *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Biologie der Tiere*. 1960. Bd. 87. S. 441–506.
- Zarudny N., Loudon H.* Über Einteilung des genus *Podoces* in subgenera // *Ornithologische Monatsberichte*. 1902. Bd. 10. № 12. P. 185.

The Use of the Microstructure of Coverling Feathers in the Systematics of Ground Jays (Aves, Corvidae: *Podoces*, *Eupodoces*)

O. F. Chernova^{1, #} and V. Yu. Ilyashenko¹

¹ *Severtsov Institute of ecology and evolution, Russian academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

[#]*e-mail: olga.chernova.moscow@gmail.com*

Using scanning electron microscopy, new data on the microstructure of the definitive coverling feathers of all four species of ground jays *Podoces pleskei*, *P. panderi*, *Eupodoces hendersoni* and *E. biddulphi* and eight other species of Corvidae were obtained: *Ptilostomus afer*, *Garrulus glandarius*, *Perisoreus infaustus*, *Corvus cornix*, *Cyanopica cyana*, *Nucifraga caryocatactes*, *Pica pica* and *Pyrrhocorax pyrrhocorax*. Comparative morphological analysis involving previously published data on the microstructure of the pen-feathers of these species, as well as *Corvus monedula*, *C. frugilegus*, *C. corax*, revealed a number of feather microstructures specific to ground jay species, as well as differences between *Podoces* and *Eupodoces*, which confirms their genus status, possible relationship with *G. glandarius* and *Pt. afer*, as well as the preservation of ancestral features in *P. pleskei*.

Keywords: microstructure, coverling feathers, ground jays, scanning electron microscopy, taxonomy

УДК 591.5;675.087

СТОЛКНОВЕНИЯ САМОЛЕТОВ С ПТИЦАМИ ОТРЯДОВ СОКОЛООБРАЗНЫЕ И ЯСТРЕБООБРАЗНЫЕ

© 2023 г. О. Л. Силаева*, @, А. С. Педенко*

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

@E-mail: silaeva.o@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Проанализированы статистические данные о столкновениях птиц из отрядов Соколообразных и Ястребообразных с воздушными судами. Основой анализа послужили экспертизы, выполненные в ИПЭЭ РАН. Рассмотрены причины и факторы, которые привлекают дневных хищных птиц на аэродромы. За период с 2005 до 2022 гг. выявлено 7 видов дневных хищных птиц, ставших участниками 29 столкновений с воздушными судами. В большинстве случаев участниками столкновений были обыкновенная пустельга и обыкновенный канюк. Наиболее часто инциденты происходят при взлёте и посадке самолета, причём при взлёте в 4.3 раза чаще, чем при посадке. Столкновения с дневными хищными птицами наносят повреждения преимущественно двигателю и крыльям самолета. Представлены рекомендации по управлению поведением дневных хищных птиц с целью минимизации случаев их столкновения с воздушными судами.

Ключевые слова: столкновения самолетов с птицами, дневные хищные птицы, идентификация вида после столкновения, структура пера

DOI: 10.31857/S1026347022601035, EDN: TRYTFH

Идентификация вида птицы, участвовавшей в столкновении с самолетом, чрезвычайно важна, так как позволяет определить биологические риски для конкретного аэродрома, принять адекватные меры по управлению поведением соответствующего вида птиц для сдерживания роста числа столкновений. Без определения вида невозможно определить и место столкновения. Определение видовой принадлежности птиц, не участвовавших в столкновении, или участвовавших, но не причинивших повреждений самолету, также целесообразно для прогнозирования возможных рисков столкновений с воздушными судами (ВС) в будущем. Вполне справедливо, что факт наличия вида на аэродроме квалифицируется в документе ИКАО как “опасное сближение” (Аэростандарт..., 2022). Определение видовой принадлежности необходимо и для конструирования защитных устройств для двигателей ВС, что особенно актуально в настоящее время, когда насущной проблемой становится создание новых отечественных типов авиационной техники.

С целью решения проблем аэродромной экологии, а именно защиты ВС от биоповреждений, вызываемых птицами и другими животными, а также выработки совместных предложений по предупреждению столкновений ВС с животными

в аэропортах в феврале 2020 года между Росавиацией и ИПЭЭ РАН заключено соглашение о сотрудничестве (Сайт Федерального агентства..., 2022). В рамках этого соглашения сотрудники Института проводят безоговорочные идентификационные исследования на основе перьевого материала; в этом случае анализируется материал и данные по столкновению, которое не привело к повреждениям.

В результате многолетнего сотрудничества ИПЭЭ РАН с ПАО “Аэрофлот – Российские авиалинии” значительно возросло число зарегистрированных инцидентов с идентификацией вида, по крайней мере, на маршрутах этой компании. Комплексные экспертизы проводятся в случае наличия биоповреждений ВС. Такие же исследования осуществляются для других российских авиакомпаний и аэропортов, но договоры с ними носят единичный характер. Комплексные исследования договорных работ включают молекулярно-генетический анализ, исследование структуры пера с целью определения вида, установления места инцидента, сведения по биологии вида, а также рекомендации по управлению поведением вида-участника столкновения.

Цель настоящего исследования — дать анализ данных о столкновениях птиц из отрядов Соколообразных и Ястребообразных с воздушными судами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источником информации, на основе которой проведено это исследование, были данные ИПЭЭ РАН, полученные в результате договорных экспертиз, а также выполненные в рамках сотрудничества с Росавиацией на бездоговорной основе за период с 2011 до 2022 г. включительно. Для определения видовой принадлежности хищных птиц, участвующих в столкновениях с воздушными судами, использовались методы молекулярно-генетического анализа (Силаева и др., 2020), методы определения структуры пера (макро- и микроморфология, совмещение тестируемых образцов с контрольными), биологического, географического и экологического анализа, а также методы электронной сканирующей и светоптической микроскопии (Силаева, 2019, Силаева и др., 2020; Силаева, Чернова, 2021). В случаях бездоговорных работ вид определяется исключительно по структуре пера/перьев (Силаева, 2019). Вид в этих случаях удается определить только при наличии показательных перьев, как правило, это маховые или рулевые перья или их фрагменты; по пуховым лучам пуховых боронок удается определить отряд или семейство.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая статистика столкновений птиц из отрядов Соколообразные и Ястребообразные. Данные по столкновению птиц на рейсах гражданской авиации РФ приведены в табл. 1.

Дневные хищники участвуют во многих биоопасных ситуациях, в частности, они активно сталкиваются с ВС. По статистике Международного комитета по столкновениям с птицами (International Bird Strike Committee) (Thorpe, 2012) с 1912 по 2002 г. с Ястребообразными *Accipitriformes* произошло 47% от всех инцидентов. В 60-ые и 70-ые годы в мире зарегистрировано 112 столкновений с дневными хищными птицами от общего числа инцидентов — 729 (Якоби, 1974). Известны случаи нападения хищных птиц на самолеты. Это происходит, когда ВС приближается к токующей паре, находясь на той же высоте или немного ниже (Bruderer, 1978).

Территория аэродрома очень привлекательна и для этой группы птиц, в частности. От нагретой взлетно-посадочной полосы (ВПП) поднимаются теплые воздушные потоки, которые хищные птицы используют для парения, экономя свою энергию. На открытых безлюдных пространствах удобно охотиться. Самолет при взлете и посадке сбивает

множество крупных насекомых, которых поедают мелкие соколы. Пищедобывательное поведение хищных птиц основано на высматривании добычи с парящего полета, а также зависания на месте, последнее особенно характерно для пустельги, кобчика и канюка. Летающие кругами или зависающие на месте хищники, длительное время находящиеся в воздухе вблизи ВПП, представляют значительную угрозу для взлетающих и приземляющихся самолетов. Мелкие соколы используют также возможность поймать на ВПП ящерицу или землеройку, которые хорошо видны на гладком покрытии.

Черные коршуны, формирующие на пролете стаи, иногда насчитывающие сотни птиц, могут подолгу парить общей “каруселью”. Обычно такие скопления бывают у свалок и скотобоен, где птицы задерживаются. В Индии столкновения ВС с черным коршуном *Milvus migrans govinda* составляют 25%, а с бенгальским грифом *Gyps bengalensis* — 23% от общего числа инцидентов (Grubh, Satheesan, 1992). Пролетные птицы и, в частности, хищные используют территорию аэропорта и его ближайших окрестностей для кормежки или отдыха. И в то же время хищные птицы ястребы и соколы используются на аэродромах в качестве средства отпугивания мелких птиц от ВПП.

Важной составной частью работы наряду с идентификацией вида является установление географического места столкновения с птицей. Это необходимо не только для определения ответственности аэропорта, но и полного учета сведений в геоинформационной базе данных и в Единой базе учета и анализа данных о столкновениях с птицами. Географическое место столкновения напрямую связано с биологией вида. Анализируя данные по биологии вида, а также обстоятельствам столкновения, удается определить место инцидента. На основе биологических данных мы проводим эколого-географический анализ, включающий данные по фенологическому районированию вида, совмещаем эти данные с техническими сведениями, полученными из сообщений команды ВС (изменение технических параметров в работе двигателя, звук удара от столкновения, запах и т.д.) и сообщений сотрудников аэропортовых служб. На этой основе делаем вывод о географическом месте столкновения. При нехватке данных по обстоятельствам столкновения приходится прибегать к соотношению, указывающему в процентах вероятность столкновения в аэропорту взлета, посадки или на маршруте.

Приведем несколько примеров из Единой базы учета и анализа данных о столкновениях с птицами (табл. 1).

В случае № 2 после определения вида и подвида — черноухий коршун *Milvus migrans lineatus* — был сделан вывод, что столкновение произошло пред-

Таблица 1. Столкновения с Соколообразными и Ястребообразными на внутренних и зарубежных рейсах гражданской авиации РФ

| № | Название вида | Дата | Маршрут | Этап полета | Повреждения ВС |
|----|---|----------|--------------------------|-------------|--|
| 1 | Браминский коршун <i>Haliaeetus indus</i> | 18.10.05 | г. Пуна (Индия) | Взлет | Двигатель № 1 |
| 2 | Черный коршун <i>Milvus migrans</i> | 18.09.19 | Иркутск – МАШ | Взлет | Вмятина на левом предкрылке |
| 3 | » | 26.07.21 | Оренбург – Анапа | Взлет | Без повреждений |
| 4 | Болотный лунь <i>Circus aeruginosus</i> | 29.06.22 | Санкт-Петербург – Москва | Взлет | Обтекатель РЛС |
| 5 | » | 18.09.18 | Мин. Воды – МАШ | Взлет | Без повреждений |
| 6 | » | 03.03.19 | г. Аликанте – МАШ | Взлет | Горизонтальный стабилизатор |
| 7 | » | 18.05.21 | Бухара – МАШ | Взлет | Без повреждений |
| 8 | Тетеревятник <i>Accipiter gentilis</i> | 12.08.15 | Иркутск – МАШ | Взлет | Двигатель № 2 и панель ВНА |
| 9 | Зимняк <i>Viteo lagopus</i> | 01.05.22 | ШРМ – Храброво | Посадка | Двигатель № 1 |
| 10 | Курганник <i>Viteo rufinus</i> | 13.06.19 | МАШ – Бишкек | Посадка | Без повреждений |
| 11 | Обыкновенный канюк <i>Buteo buteo</i> | 25.04.18 | Старополю – МАШ | Взлет | Без повреждений |
| 12 | » | 04.05.21 | Пулково – МАШ | Посадка | ППД на фюзеляже, левый подкрылок, левый закрылок и левая ООШ |
| 13 | » | 11.01.19 | МАШ – Женева | Взлет | Двигатель № 1 |
| 14 | » | 20.10.21 | Владивосток – МАШ | Взлет | Двигатель № 1, панель ВНА и левый закрылок |
| 15 | » | 18.10.19 | Лион – ШРМ | Взлет | Двигатель № 1 |
| 16 | » | 31.07.19 | Дюссельдорф – МАШ | Взлет | Двигатель № 1 |
| 17 | Сапсан <i>Falco peregrinus</i> | 30.11.21 | Дюссельдорф – МАШ | Взлет | Двигатель № 2 |
| 18 | Чеглок <i>Falco subbuteo</i> | 18.08.17 | Ростов-на-Дону – МАШ | Взлет | Без повреждений |
| 19 | » | 15.08.16 | Хотилово – Внуково | Взлет | Двигатель № 1 |
| 20 | » | 28.09.22 | Сочи – МАШ | Взлет | Обтекатель РЛС |
| 21 | Кобчик <i>Falco vespertinus</i> | 14.05.08 | Ганновер – МАШ | Взлет | Левый закрылок |
| 22 | Обыкновенная пустельга <i>Falco tinnunculus</i> | 02.06.18 | Южно-Сахалинск – МАШ | Не уст. | Без повреждений |
| 23 | » | 08.08.19 | МАШ – Нижнекамск | Не уст. | Без повреждений |
| 24 | » | 10.04.18 | МАШ – Сочи | Взлет | Двигатель № 1 |
| 25 | » | 20.07.18 | Красноярск – МАШ | Взлет | Без повреждений |
| 26 | » | 05.07.18 | МАШ – Верона | Посадка | Двигатель № 1 |
| 27 | » | 21.04.12 | Улан-Батор – МАШ | Посадка | Плоскость левого крыла |
| 28 | » | 21.08.09 | Милан – МАШ | Не уст. | Без повреждений |
| 29 | » | 22.07.22 | Калининград – МАШ | Взлет | Двигатель № 2 |

Примечание: место столкновения выделено жирным шрифтом; МАШ – а/п Шереметьево. РЛС – радиолокационная станция; ООШ – основная опора шасси; ВНА – входной направляющий аппарат двигателя; ППД – приемники полного давления.

положительно в окрестностях аэропорта г. Иркутск с двумя пролетными особями указанного подвида. Было учтено, что в середине сентября вид в Московской области встречается нерегулярно или в очень незначительных количествах. При этом сообщения команда ВС и сотрудников аэропортовых служб подтвердили наш вывод.

В случае № 6 было установлено, что инцидент произошел в аэропорту г. Аликанте. В марте в Московской области встречаемость болотного луня чрезвычайно мала. В Испании же популяция болотного луня оседлая. Кроме того, во время сезонных миграций и зимой здесь встречаются особи из более северных регионов Европы. На зимовке и во время пролета болотные луни могут быть встречены в любых открытых биотопах, но предпочитают придерживаться водно-болотных угодий с зарослями тростника. Аэропорт г. Аликанте находится всего в трех километрах от берега Средиземного моря. Возможно, болотный лунь держался в прибрежных водно-болотных угодьях. Вывод был частично подтвержден докладами аэропортовых служб г. Аликанте.

В случае № 14 столкновение произошло с пролетным или кочующим подвидом обыкновенного канюка. Подвид относится к восточной расе обыкновенного канюка *Buteo buteo japonicus*, который гнездится в России от бассейна правых притоков Енисея, Восточного Саяна, Хангая к востоку до тихоокеанского побережья, поэтому был сделан вывод, что инцидент мог произойти только в аэропорту вылета, то есть во Владивостоке.

В случае № 17 видом-участником биоповреждающей ситуации был сапсан. И в Подмоскovie, и в Германии сапсан очень редкий гнездящийся пролетный и пролетный вид. Но в Германии сейчас разработаны программы по разведению сапсанов в вольерах с последующим выпуском молодняка в дикую природу, нередко при этом выпущенные птицы постепенно переселяются в города. В бесснежных и малоснежных районах Западной Европы, к которым относится и Дюссельдорф, сапсан также нередко зимует. В Москве и Подмоскovie зимует очень редко. Последние пролетные птицы отмечаются в октябре. Кроме того, сапсан — дневной хищник, а посадка в аэропорту Шереметьево была в темное время суток. Мы учли все эти данные и сделали вывод о том, что инцидент произошел в аэропорту г. Дюссельдорфа, что пришлось признать и немецким коллегам.

Подобный инцидент (случай № 20) произошел в аэропорту г. Ганновер. Кобчик вполне обычен в Западной и Восточной Европе; в Московской области он встречается очень редко, находится под угрозой исчезновения и занесен в Красную книгу Московской области. Редкость и спорадичность распространения были характерны для вида и в прошлом, однако в последней четверти XX в. чис-

ленность подмосковной популяции еще более сократилась; ныне вид встречается в области единично. Так, по результатам проведенного за три года до этого эколого-орнитологического обследования территории аэропорта и прилегающей к нему 15 км зоны кобчик не был отмечен.

В случае № 23 столкновение произошло на летном поле аэропорта Шереметьево с пролетной обыкновенной пустельгой. Такой вывод был сделан на основе сообщения команды ВС и биологических данных распространения этого вида. При взлете в аэропорту Шереметьево команда наблюдала пролеты птиц вблизи ВС, а через две секунды после взлета отметила увеличение параметров вибрации. Обыкновенная пустельга — сравнительно немногочисленный гнездящийся и пролетный вид Подмоскovie, чаще всего встречающийся в открытых сельскохозяйственных ландшафтах, где есть опушки древесных насаждений, а также в пригородах и окраинных районах различных населенных пунктов, включая Москву. Птицы часто используют ВПП для высматривания добычи, отдыха и ночевки.

Серьезными последствиями закончился инцидент с обыкновенным канюком (случай № 13). При взлете\отрыве от ВПП 11.01.2019 в а/п Шереметьево птица атаковала самолет. В результате канюка засосало в левый двигатель, были повреждены две лопасти подпорной ступени внутреннего контура направляющего аппарата двигателя. В салоне появился запах гари; было принято решение о возврате в аэропорт вылета (вынужденная посадка). При этом, вид в Подмоскovie зимой встречается спорадически, его экологическую нишу занимает зимняк.

Анализ столкновений по видам. Из 29 случаев столкновений наибольшее количество пришлось на обыкновенную пустельгу — 10; затем следует канюки: обыкновенный канюк — 6; по одному случаю курганник и зимняк. Болотный лунь — 4 случая; три случая с челлоком, три столкновения с коршунами: два с черными и один — с браминским; по одному с тетеревиатником, сапсаном и кобчиком.

Анализ столкновений по этапам полета, части ВС, подвергшейся удару и времени года. Частотность столкновений при взлете наибольшая, что чревато и наибольшими последствиями — самолет при взлете тяжелый, в этом случае он больше уязвим (рис. 1а).

Двигатель — самое уязвимое место, тяжесть от биоповреждающих последствий зависит от массы птицы, а представители всех изученных отрядов относятся ко второй весовой категории. Почти половина столкновений приходится на двигатель, так как он активно засасывает птиц (рис. 1в). Небольшую птицу двигатель может перемолоть без утраты работоспособности.

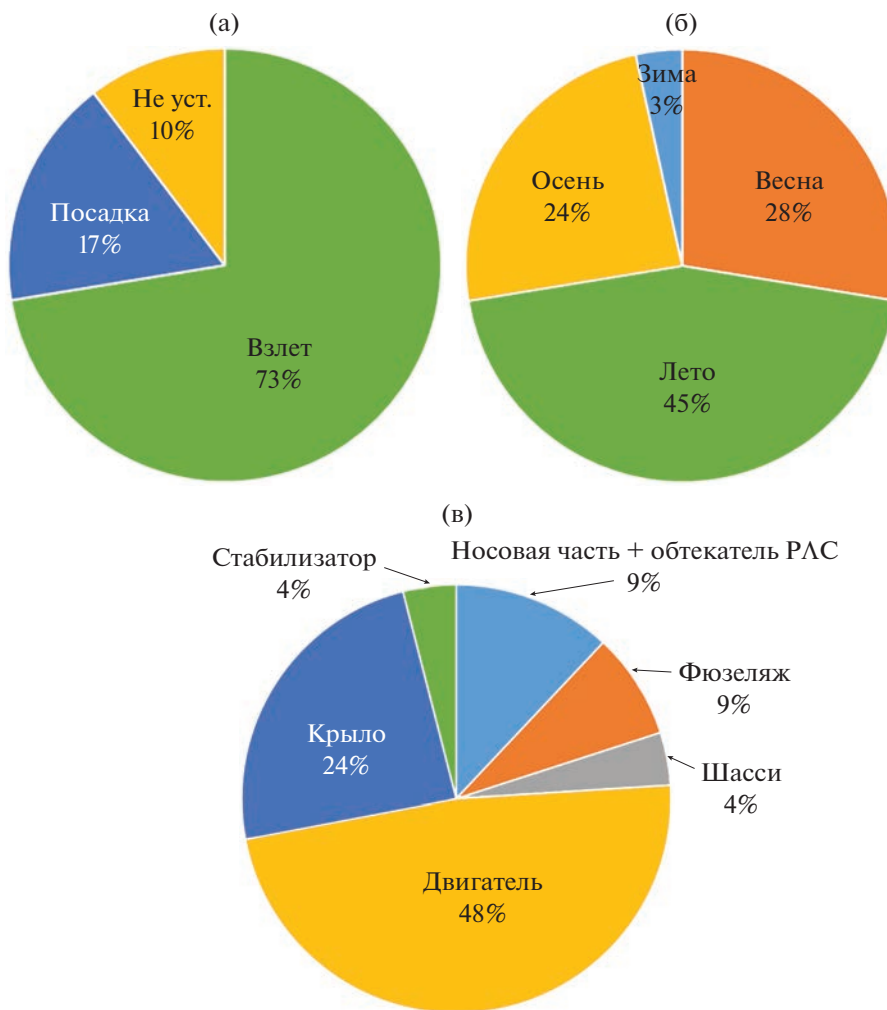


Рис. 1. Анализ столкновений по этапам полета (а), времени года (б) и по части ВС, подвергшейся удару (в).

Удар в РЛС в носовой части может грозить потерей некоторых функций радиолокатора.

Наибольшее количество столкновений происходит летом, примерно равное количество осенью и весной, наиболее свободное от инцидентов время – зима.

Анализ табл. 1 показал также, что с орнитологической безопасностью полетов за рубежом далеко не все в порядке. Из 10 зарубежных рейсов (случаи 1, 6, 7, 10, 13, 17, 20, 25–27) в 8 столкновения произошло за границей. Всего в одном случае (№ 26) – в Шереметьево, место еще одного инцидента не было установлено.

Основные меры предупреждения столкновений с Соколообразными и Ястребообразными в аэродромной среде. Для видов данной группы птиц нет специальных средств управления поведением. Применяются в основном эколого-санитарные меры для устранения факторов размножения мелких млекопитающих, которые в свою очередь привлекают хищных птиц. Но есть общие меры

минимизации столкновений, более или менее радикальные, но без причинения вреда птицам.

Геомониторинг и геоинформационные системы безопасности полетов в аэродромной экологии. Для создания геоинформационных систем безопасности полетов (ГИС БП) сотрудники ИПЭЭ РАН с помощью физико-географического и климатического районирования распределяют аэропорты РФ по однотипным зонам. При этом используются данные Росавиации по степени абсолютного и\или относительного числа столкновений в аэропортах и их окрестностях (рис. 2, по: Букреев, Вепринцева, 2009).

Для каждого аэропорта предполагается оценить ландшафтно-биотопические особенности местности, орнитологическую нагрузку и ее сезонную составляющую, выявить опасные виды. Не все фоновые виды (виды, пребывающие в данной зоне в данное время, будучи мигрирующими, кочующими или оседлыми) изучаемой зоны одинаково опасны, о чем свидетельствуют иденти-

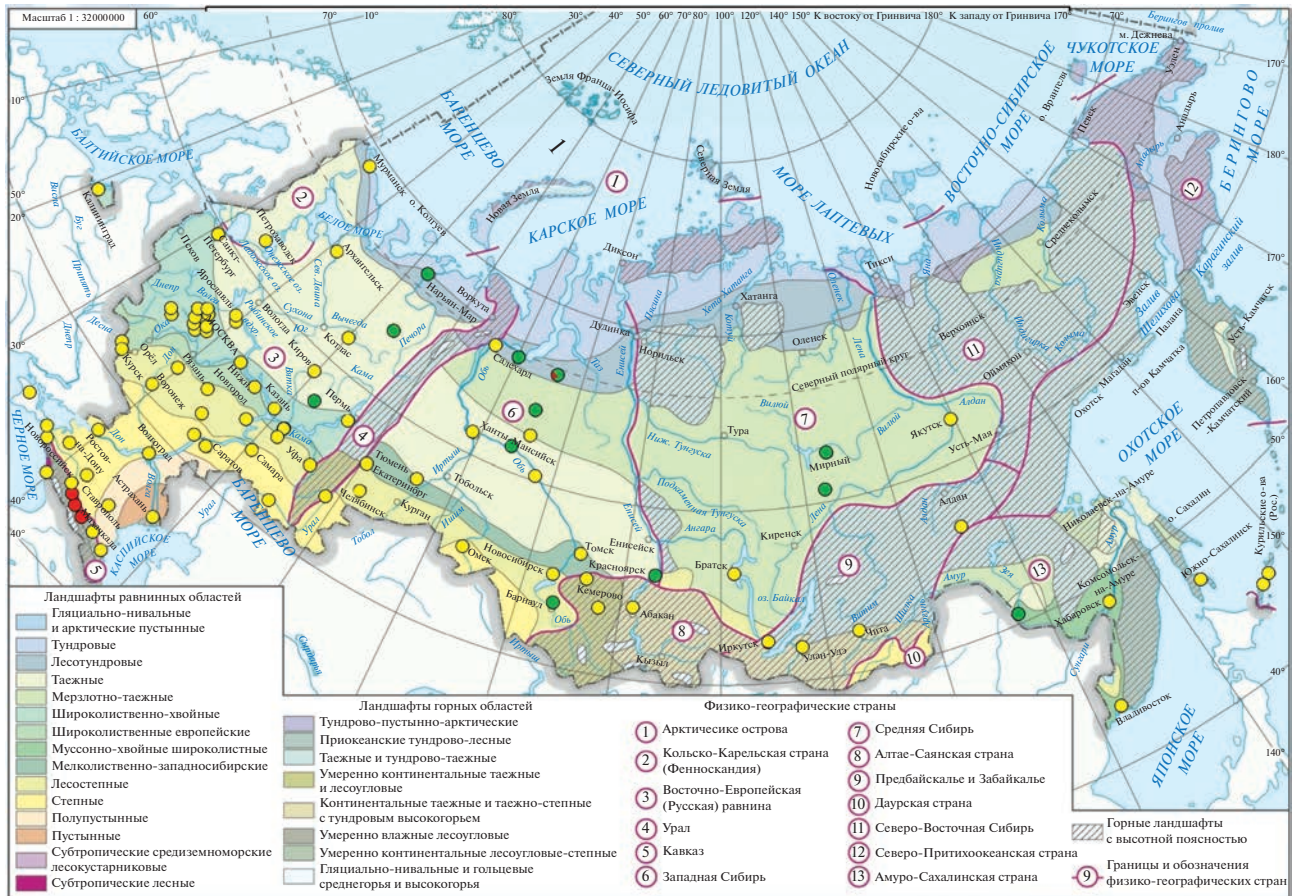


Рис. 2. Распределение аэропортов по физико-географическим регионам и количество столкновений на 10 тыс. взлетов и посадок. Красные кружки – более 10, желтые – от 1 до 9,9, зеленые – менее 1 (Букреев, Велпринцева, 2009, с изменениями).

фикационные данные, полученные в результате упомянутых выше экспертиз. Сведения об индивидуальных особенностях аэропорта имеются в отчетах эколого-орнитологических обследований, в полевых дневниках, а также схемах и картах кормовых и миграционных перемещений птиц. Для прогнозирования опасности столкновения с тем или иным видом птиц предпринимается анализ и сопоставление всех имеющихся данных по аэропорту и 15-км зоны вокруг него. Таким образом для каждого аэропорта создаются базы данных по столкновениям и поведению биоповреждающих видов птиц. Эти базы предполагается включить в ГИС БП для России.

За рубежом также собирают данные о наличии и численности разных видов животных с географической привязкой к месту, то есть создаются ГИС БП. Кроме того, данные этих баз оказались чрезвычайно ценными для пространственно-временного анализа, например, для выявления фенологических изменений, показывающих реакцию птиц на изменение климата (Parmesan, Yohe,

2003; Jonzen *et al.*, 2007; Menzel *et al.*, 2006). Анализ ГИС БП помогает также выявить тенденции сдвига численности популяций под воздействием изменения условий окружающей среды (Krebs *et al.*, 1999; Benton *et al.*, 2002; Stuart *et al.*, 2004).

На основе полевых наблюдений разработаны карты пространственно-временного распределения плотности птиц (рис. 3), а также две веб-модели для предотвращения столкновений в Нидерландах и континентальной части США и Аляски (Shamoun-Baranes *et al.*, 2007). Разработка таких моделей требует транс-дисциплинарного подхода, в частности, опыта работы в области полевой и радиолокационной орнитологии, геостатистики, компьютерного моделирования, управления информацией, дистанционного зондирования, компьютерных наук. Кроме того, в работе необходимо сотрудничество между академическими, коммерческими и природоохранными институтами, а также обществами любителей птиц и авиационными орнитологами аэропортов.

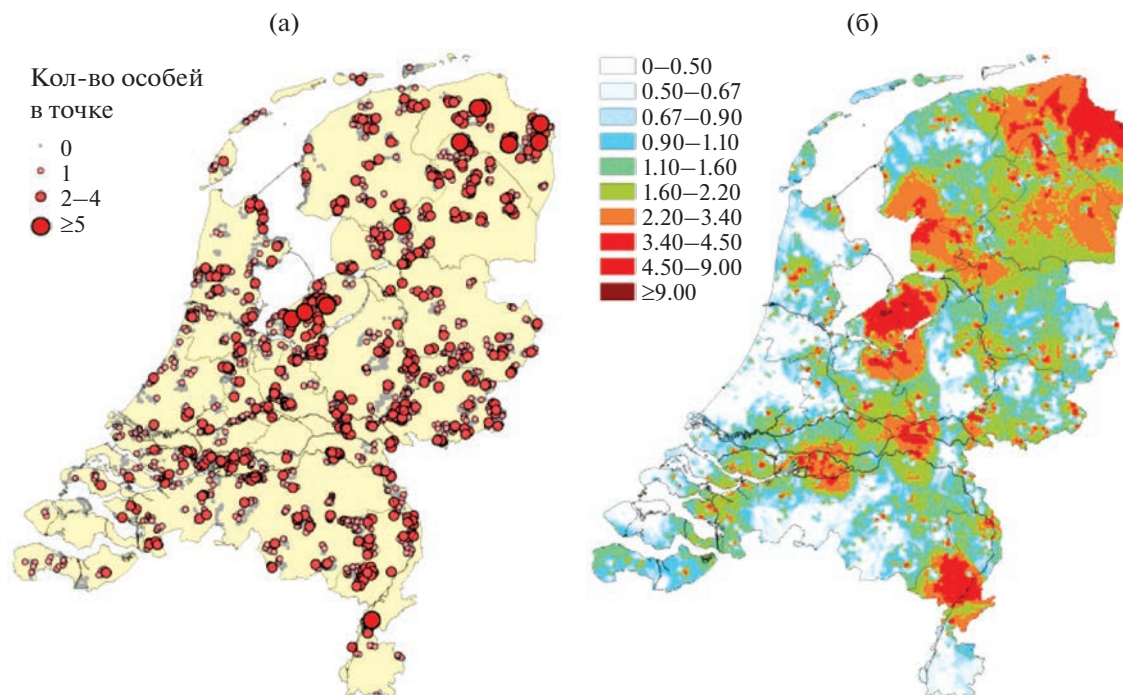


Рис. 3. Количество обыкновенных канюков, выявленных на одном участке учета в декабре 2000 г. (а). Смоделированная карта распределения канюков (б) (Shamoun–Baranes *et al.*, 2007).

В будущем на основе углубленного изучения многолетних данных мониторинга предлагается прогнозировать видоспецифическое поведение птиц в зонах аэропортов (Metz *et al.*, 2021). Долговечность прогнозов моделей предотвращения столкновений с птицами составляет порядка 5–10 лет (Shamoun–Baranes *et al.*, 2007).

Системы обнаружения птиц в полете в реальном времени. Такие системы создаются и у нас, и за рубежом. При этом применяется радар или стереосистемы (Gradolewski *et al.*, 2021). В зарубежных аэропортах с помощью этих систем рассчитывается риск попадания для птиц, которые предположительно пересекут центральную линию ВПП и нанесут ущерб воздушному судну. Остальные, находящиеся на земле, птицы подлежат вниманию наземных орнитологических служб. В результате на пути ВС выявляются птицы, прогнозируются их скорости и траектории перемещения, и, если возникает опасность столкновения, то наземные службы, получившие информацию о нахождении птиц на пути ВС, дают команду экипажу ВС, и вылет задерживается, в редких случаях при крупных и длительных миграциях — отменяется. Преимущественно происходит задержка взлета обычно не более, чем на 10 минут. Такие способы избежать столкновения предлагаются международными коллективами авторов из Германии, Голландии, Израиля, Дании и США (Metz *et al.*, 2016, 2017, 2019, 2020, 2021a, 2021b; Van Gasteren *et al.* 2018).

В аэропорту Пулково в Санкт-Петербурге установлена разработанная в Болгарии система Volacom (Сайт Volacom, 2022). В аэропорту Шереметьево установлена радиолокационная система обнаружения птиц Merlin, разработанная в США (Сайт AeroExpo, 2022).

На конференции Ассоциации по столкновениям самолетов с птицами 7–8 марта 2022 г. (World Birdstrike Association Europe Conference) представлена радиолокационная установка для управления поведением птиц, разработанная в Польше (Advanced Protection Systems, 2022).

В РФ на настоящий момент есть разработки АО НИИ “Вектор” — система орнитологической безопасности полетов для аэропортов “Orni” (сайт Ростеха, 2022) и радиолокационно-оптический комплекс РОСК-1 Концерна ВПО “Алмаз-Антей” (Официальный сайт ПАО НПО “Алмаз”, 2022). Обе системы находятся на стадии апробирования.

Есть и работающая система обнаружения и сопровождения воздушных объектов по отраженным радиосигналам сторонних источников в пассивно-активных системах радиолокации “Енот” (Батчев и др., 2016) с собственной диаграммой направленности акустического источника репеллентных сигналов, который позиционируется в пространстве в зависимости от положения птицы или птиц, на поведение которых предполагается воздействовать.

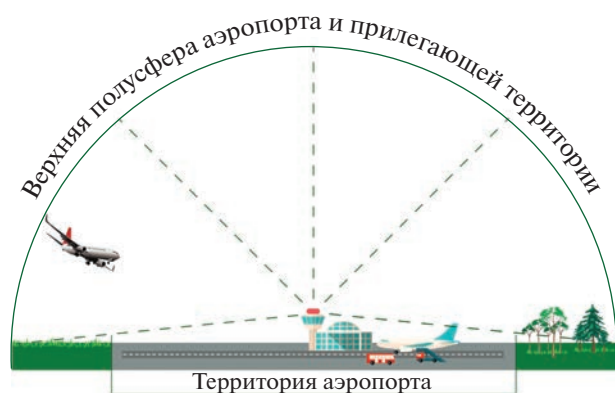


Рис. 4. Примерная схема контроля опасных по столкновениям с птицами зон.

Обзор всех перечисленных средств обнаружения и управления поведением птиц показывает, во-первых, их наличие в мире, во-вторых, возможность оптико-электронных и радиоэлектронных средств обнаруживать птиц на расстоянии до двух километров. При этом соизмеримая по размеру с самолетом плотная стая птиц может обнаруживаться и на расстоянии 20 км. Основными общими недостатками являются невозможность определения вида по радиолокационным данным; сопровождение исключительно одиночных целей, то есть одиночных птиц, но не групп или стай; а также отсутствие диаграммы направленности акустических сигналов, которая автоматически настраивается на отпугиваемый объект. Такая диаграмма есть только в системе «Енот». Главным же недостатком является отсутствие когнитивных, полностью автоматизированных систем обнаружения и управления поведением животных (Hoekstra, Ellerbroek, 2016).

Автоматизированным и наиболее эффективным средством обнаружения и управления поведением птиц без их элиминации могла бы стать комплексная когнитивная система, которая позволит осуществлять контроль воздушного пространства приаэродромной зоны с использованием радиолокационных и оптико-электронных средств (рис. 4).

При этом решаются следующие задачи:

- автоматическое обнаружение птицы в контролируемой зоне;
- автоматический виртуальный захват птицы с присвоением номера идентичности, сопровождение птицы, определение направления полета и скорости движения птицы;
- идентификация вида сопровождаемой птицы по взмахам крыльев, размерам и характеру полета.

К номеру идентичности привязываются все имеющиеся сведения, которые сохраняются в ба-

зе данных, включая время обнаружения птицы и время окончания наблюдения за ней после выхода птицы за пределы зоны.

Сведения из базы данных поступают в когнитивную модель, которая прогнозирует траектории полета всех сопровождаемых птиц и траектории ВС, осуществляет оценку уровня угроз столкновения с ВС. Каждый рейс, заходящий на посадку и идущий на взлет, получает количественную оценку в зависимости от уровня орнитологических угроз. Оценка уровня угроз трансформируется в управляющие воздействия, которые сводятся:

- к применению имеющегося в аэропорту средства управления поведением;
- к задержке или отмене рейса.

Такой автоматизированной системы нет и в зарубежных аэропортах, о чем свидетельствует анализ литературы и косвенно — упомянутый нами выше факт о преобладающем большинстве случаев столкновений с птицами, происходящих на территориях иностранных аэропортов (табл. 1).

Изъятие части популяции птиц и вывоз за территорию аэропорта. Мероприятия по отлову хищных птиц проводятся как в наших аэропортах, так и за рубежом. В Международном аэропорту О'Хара в Чикаго (США) проводили эксперименты по отлову и перемещению красхвостого сарыча *Buteo jamaicensis* за пределы аэропорта. При этом при отлове и вывозе канюков без их элиминации дало уменьшение относительного числа столкновений на 47%, а перемещение с частичной элиминацией уменьшило число случаев на 67% (Washburn et al., 2021).

При использовании данного метода необходимо следить за тем, чтобы происходило изъятие только части популяции птиц, и интересы птиц тоже учитывались. Некоторые «проблемные» для авиации виды являются редкими или уязвимыми, а большинство видов как звенья в цепи составляют биологическое разнообразие нашей орнитофауны, и представляют ценные ресурсы. Виды, наносящие ущерб на территории аэродрома, в другой эколого-хозяйственной ситуации оказываются незаменимыми. Хищные птицы — консументы высшего порядка, находящиеся на вершинах экологических пирамид, из-за чего они особенно чувствительны к изменениям окружающей среды. Основными факторами сокращения популяций пернатых хищников являются прямое преследование человеком, ухудшение условий существования в связи с антропогенной экспансией, обеднение кормовой базы, губительное воздействие пестицидов, гибель на техногенных сооружениях и влияние беспокойства (Ильях, Хохлов, 2010; Cleary, Dolbeer, 2005).

Мы не предлагаем сохранять птиц за счет безопасности авиатехники и пассажиров, но при прочих равных условиях призываем аэродромные

службы избегать летальных мер для животных. Это не только не гуманно, но и нецелесообразно. В этом случае экологическую нишу изъятых популяций займет другая популяция, менее опытные члены которой не имеют представления об опасности, исходящей от взлетающего или приземляющегося воздушного судна. В результате число столкновений с самолетами может возрасти.

При правильном управлении орнито-ресурсами в аэродромной экологии формируются популяции птиц, адаптированные к местным условиям жизни. Такие особи редко сталкиваются с ВС. При этом популяции, включающие опытных особей, занимают часть экологической емкости угодий и препятствуют вселению неадаптированных новичков. Но если таковые все-таки появляются, то аборигены служат хорошим примером для пришлых особей, облегчая их адаптацию.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем глубокую благодарность сотруднику Отдела орнитологии Научно-исследовательского зоологического музея МГУ им. М.В. Ломоносова за помощь в идентификации видов к. б. н. Я.А. Редькину. Благодарим также главного специалиста подразделения ИПЭЭ РАН к. т. н. А.Н. Вараксина за помощь в подготовке обзора технических средств по обнаружению птиц и управлению их поведением. Анализ перьевых структур проведен с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН. Молекулярно-генетический анализ исполнен в Кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН “51. Экология организмов и сообществ”

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все этические стандарты были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аэростандарт – База данных официальных электронных версий документов Международной организации гражданской авиации (ИКАО). Doc 9137. Руководство по аэропортовым службам. Часть 3. Предотвращение опасного присутствия птиц и диких животных ИКАО. 2020. [Электронный ресурс]

URL: <https://standart.aero/ru/icao> (дата обращения: 17.10.2022).

Батчев С.А., Зайцев А.Г., Талалаев А.Б., Тимаков Д.А. Метод обнаружения и сопровождения воздушных объектов по отраженным радиосигналам сторонних источников в пассивно-активных системах радиолокации // Программные продукты и системы. 2016. № 3(115). [Электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metod-obnaruzheniya-i-soprovozhdeniya-vozdushnyh-obektov-po-otrazhenным-radiosignalam-storonnyh-istochnikov-v-passivno-aktivnyh> (дата обращения: 19.10.2022).

Букреев С.А., Вепринцева О.Д. Орнитофаунистическая фенопериодизация года на Юго-Западном Копетдаге (Туркменистан). Орнитогеография Палеарктики: современные проблемы и перспективы. Махачкала. 2009. С. 240–262.

Ильях М.П., Хохлов А.Н. Хищные птицы и совы трансформированных экосистем Предкавказья. Ставрополь. 2010. 760 с.

Официальный сайт ПАО НПО “АЛМАЗ”. Радиолокационно-оптический комплекс “ROSC-1”. 2022 [Электронный ресурс]. URL: <https://lemz.ru/roscl-1-2> (дата обращения: 19.10.2022).

Сайт AeroExpo. Система обнаружения птиц радар. 2022 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.aeroexpo.com.ru/prod/detect-global-ltd/product-172588-15264.html> (дата обращения: 19.10.2022).

Сайт Volacom системы предотвращения столкновений птиц с воздушными судами. Демонстрация работы. 2022 [Электронный ресурс]. URL: <http://volacom.su/files/Demonstration.mp4> (дата обращения: 19.10.2022).

Сайт Ростеха. Новости. 2022 [Электронный ресурс]. URL: https://rostec.ru/news/rostekh-razrabotal-sistemu-zashchity-passazhirskikh-samoletov-ot-ptits-/?sphrase_id=4897068 (дата обращения: 19.10.2022).

Сайт Федерального агентства воздушного транспорта. 2022 [Электронный ресурс]. URL: <https://favt.gov.ru/novosti-novosti/?id=7456> (дата обращения: 19.10.2022).

Силаева О.Л. Система диагностических признаков покровных перьев птиц отряда Ржанкообразных // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 6. С. 614–624. <https://doi.org/10.1134/S000233291904012X>

Силаева О.Л., Холодова М.В., Свиридова Т.В., Букреев С.А., Вараксин А.Н. Исследования столкновений воздушных судов с птицами по данным экспертиз 2002–2019 гг. // Изв. РАН. Сер. биол. 2020. № 6. С. 636–645. <https://doi.org/10.31857/S0002332920060120>

Силаева О.Л., Чернова О.Ф. Современное состояние идентификационной птиологии в России // Успехи современной биологии. 2021. Т. 141. № 6. С. 595–610. <https://doi.org/10.31857/S0042132421060089>

Чернова О.Ф., Ильяшенко В.Ю., Перфилова Т.В. Архитектоника пера и ее диагностическое значение.

- Теоретические основы современных методов экспертного исследования. М.: Наука, 2006. 100 с.
- Чернова О.Ф., Перфилова Т.В., Фадеева Е.О., Целикова Т.Н. Атлас микроструктуры перьев птиц. М.: РФЦСЭ. 2009. 150 с.
- Якоби В.Э. Биологические основы предотвращения столкновений самолетов с птицами. М.: Наука, 1974. 166 с.
- Advanced Protection Systems. 2022 [Электронный ресурс]. URL: <https://apsystems.tech/en/> (дата обращения: 19.10.2022).
- Benton T.G., Bryan, D.M., Cole L., Crick H.Q.P. Linking agricultural practice to insect and bird populations: a historical study over three decades // *J. Applied Ecology*. 2002. V. 39. P. 673–687. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00745.x>
- Bruderer B. Collisions of aircrafts with birds of prey in the Alps. Bird Strike Committee Europe 13, WP 3; Bern, Switzerland; 29 May–2 June, 1978. P. 72–76.
- Cleary E.C. Dolbeer R.A. Wildlife Hazard Management at Airports. A Manual for Airport Personnel. Second Edition. 2005 [Электронный ресурс] URL: https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1127&context=icwdm_usdanwrc (дата обращения: 17.10.2022). <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3719>
- Gradolewski D., Dzialek D., Kaniecki D., Jaworski A., Skakuj M., Kulesza W.J. A Runway Safety System Based on Vertically Oriented Stereovision // *Sensors*. 2021. V. 21. 25 p. <https://doi.org/10.3390/s21041464>
- Grubh R.B., Satheesan S.M. Bird-Strike Remains Identification in India. Bird Strike Committee Europe 21, WP 6, Jerusalem, 23–27 March, 1992.
- Hoekstra J.M., Ellerbroek J. “BlueSky ATC Simulator Project: an Open Data and Open Source Approach”, Proceedings of the seventh International Conference for Research on Air Transport (ICRAT), 2016.
- Jonzen N., Hedenström A., Lundberg P. Climate Change and the Optimal Arrival of Migratory Birds // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007. V. 274. P. 269–274. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3719>
- Krebs J., Wilson J., Bradbury R., Siriwardena G. The second Silent Spring? // *Nature*. 1999. V. 400. P. 611–612. <https://doi.org/10.1038/23127>
- Parmesan C., Yohe G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems // *Nature*. 2003. V. 421. P. 37–42. <https://doi.org/10.1038/nature01286>
- Metz I.C., Ellerbroek J., Mühlhausen T., Kügler D., Hoekstra J.M. The Bird Strike Challenge // *Aerospace*. 2020. V. 7. № 26. 23 p. <https://doi.org/10.3390/aerospace7030026>
- Metz I.C., Ellerbroek J., Mühlhausen T., Kügler D., Hoekstra J.M. Analysis of Risk-Based Operational Bird Strike Prevention // *Aerospace*. 2021a. V. 8. № 32. 22 p. <https://doi.org/10.3390/aerospace8020032>
- Metz I.C., Ellerbroek J., Mühlhausen T., Kügler D., Hoekstra J.M. Simulating the Risk of Bird Strikes // *Proceedings Seventh SESAR Innovation Days*, 28th–30th November, 2017, 8 p.
- Metz I.C., Ellerbroek J., Mühlhausen T., Kügler D., Kern S., Hoekstra J.M. The Efficacy of Operational Bird Strike Prevention. // *Aerospace*. 2021b. V. 8. № 17. 15 p. <https://doi.org/10.3390/aerospace8010017>
- Metz I.C., Mühlhausen T., Ellerbroek J., Kügler D., Hoekstra J. Evaluating the Effects of a Bird Strike Advisory System. Conference: Bird / Wildlife Strike Prevention Conference, Amsterdam, the Netherlands. 2016. V. 12.
- Metz I.C., Mühlhausen T., Ellerbroek J., Kügler D., Hoekstra J. What is the Potential of a Bird Strike Advisory System? Proceedings of the 13th USA/Europe Air Traffic Management Research and Development Seminar, Vienna, Austria, 18–21 June 2019. V. 6. № 18.
- Menzel A., Sparks T.M., Estrella N., Koch E., Aasa A., Ahas R., Alm-Kübler K., Bissolli P., Braslavská O., Briede A., Chmielewski F.M., Crepinsek Z., Curnel Y., Dahl Å., Defila C., Donnelly A., Filella Y., Jateczak K., Måge F., Mestre A., Nordli Ø., Peñuelas J., Pirinen P., Remišová V., Scheiffinger H., Striz M., Susnik A., Van Vliet A. J. H., Wielgolaski F.-M., Zach S., Züst A. European phenological response to climate change matches the warming pattern // *Global Change Biology*. 2006. V. 12. P. 1969–1976. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v1i4.9154>
- Shamoun–Baranes J., Bouten W., Buurma L., De Fusco R., Dekker A., Sierdsema H., Sluiter F., Van Belle J., Van Gasteren H., Van Loon E. Avian Information Systems: Developing Web-Based Bird Avoidance Models // *Ecology and Society*. 2007. V. 13. 12 p. <https://doi.org/10.5751/ES-02578-130238>
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S., Fischman D.L., Waller R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide // *Science*. 2004. V. 306. P. 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Thorpe J. 100 years of fatalities and destroyed civil aircraft due to bird strike // *IBSC Conference*, Stavanger 25–29 June, Norway, 2012. P. 16.
- Van Gasteren H., Krijgsveld K.L., Klauke N., Leshem Y., Metz I.C., Skakuj M., Sorbi S., Schekler I., Shamoun–Baranes J. Aeroecology meets aviation safety: early warning systems in Europe and the Middle East prevent collisions between birds and aircraft // *Ecography*. 2018. V. 42. P. 1–13. <https://doi.org/10.1111/ecog.04125>
- Washburn B.E., Pullins C.K., Guerrant T.L., Martinelli G.J., Beckerman S.F. Comparing Management Programs to Reduce Red-tailed Hawk Collisions with Aircraft // *Wildlife Society Bulletin*. 2021. V. 45. P. 237–243. <https://doi.org/10.1002/wsb.1177>

Aircraft Collisions With Birds (Order *Falconiformes* and *Accipitriformes*)**O. L. Silaeva^{1, #} and A. S. Pedenko¹**¹ *Severtsov Institute of Ecology and Evolution (IPEE RAS), Leninsky prosp., 33, Moscow, 119071 Russia*[#] *e-mail: silaeva.o@gmail.com*

Statistical data on aircraft collisions with birds of prey (*Falconiformes* and *Accipitriformes*) are analysed. The basis of the analysis was the results of the IPEE RAS study. The reasons and factors attracting birds of prey to airfields are considered. In the period from 2005 to 2022 seven species of birds of prey involved in 29 collisions with aircraft were identified. The largest number of birdstrike occur with common kestrel *Falco tinnunculus* and common buzzard *Buteo buteo*. The most collisions occur on the airport or in its vicinity; there is a 4.3 times more strikes by taking off than by landing. From raptor birds' collisions suffer mainly engine and wing structure. Recommendations are given to control birds' behaviour for minimizing strikes with birds of prey at the airfield.

Keywords: birdstrike, birds of prey, identifying species after collision with aircraft, feather structure

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 597.552-1.05

ВНУТРИГОДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОРГАНОВ ИММУННОЙ
СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗОЦИМА У САМЦОВ ЩУКИ *Esox lucius* L.

© 2023 г. М. Ф. Субботкин*, @, Т. А. Субботкина*

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Ярославская обл., Некоузский р-н., пос. Борок, 152742 Россия

@E-mail: smif@ibiw.ru

Поступила в редакцию 17.02.2022 г.

После доработки 18.03.2022 г.

Принята к публикации 04.04.2022 г.

Изучали влияние физиологического состояния на концентрацию лизоцима в печени, почках, селезенке и сыворотке крови, а также общее количество фермента в органах, у самцов щуки *Esox lucius* L., 1758 в разных условиях годового цикла. Обнаружена разнонаправленная внутригодовая динамика соматических индексов органов и количественных показателей лизоцима в тканях и органах рыб, зависящая от температурного режима водоема. Несмотря на значительные изменения размеров печени и концентрации лизоцима, общее количество фермента в органе – лизоцимный индекс, оставалось постоянным. Подобный результат обнаружен и для селезенки. При минимизации влияния температурного фактора в условиях низких температур показатели печени сменились на противоположные, а в почках остались без изменений. Такой температурный режим не влиял на показатели селезенки и концентрацию фермента в сыворотке. При существенных различиях по концентрации фермента и размерам между печенью и селезенкой их лизоцимные индексы были показателями одного уровня. Стадии зрелости гонад влияли на индекс печени и количество лизоцима в почках, но корреляция фермента почек со зрелостью не достоверна. Лизоцим почек и показатели селезенки коррелировали с массой рыб без органов, хотя масса и длина рыб не были влияющими факторами. Размер почек, в отличие от селезенки, не влиял на фермент в тканях рыб. Концентрация фермента в печени и почках, и лизоцимный индекс почек были в обратной корреляции с размером печени. Выявлен сложный характер взаимосвязей фермента в органах, при котором количество лизоцима в одном органе могло влиять на количество фермента в другом. Не обнаружено связи концентрации сывороточного лизоцима с морфофизиологическими параметрами рыб в условиях стабильно низких температур водоема.

Ключевые слова: лизоцим, органы, сыворотка, соматические и лизоцимные индексы, физиологическое состояние, температура, сезон

DOI: 10.31857/S1026347023700166, **EDN:** MXSQXX

Изменения условий среды обитания или физиологического состояния вызывают комплексные изменения в организме рыб. Такие изменения обнаруживаются как на биохимическом, так и морфологическом уровнях. Это в равной степени распространяется и на иммунную систему. Арсенал иммунологических исследований богат различными методическими подходами, что позволяет анализировать иммунитет рыб по многим показателям. В экспериментальных работах оценку влияния каких-либо факторов на иммунитет проводят в сравнении с контрольными особями, которые лишены такого воздействия. Однако в длительных экспериментах контрольные рыбы также могут демонстрировать существенные изменения (Subbotkin, Subbotkina, 2018). Поэтому возникает вопрос о влиянии иных воздействий, которые не контролируются в опыте. Такие воздействия мо-

гут быть вызваны естественными физиологическими процессами развития или адаптации рыб, не зависящими от исследователя. Эти нормальные жизненные процессы сопровождаются изменениями внутренних органов, в том числе выполняющих иммунные функции.

В жизненном цикле рыб абсолютные и относительные размеры органов непостоянны и могут зависеть от размеров тела, а также внутренних физиологических процессов в разные сезоны года (Medford, Mackay, 1978; Hansson *et al.*, 2006; Bennett, Janz, 2007; Rohlenova *et al.*, 2011). Морфофизиологические различия органов иммунной системы могут быть связаны с полом рыб (Kortet *et al.*, 2003). В связи с этим возникает вопрос о влиянии изменений размеров органов, которые могут быть обусловлены естественными причи-

нами или иным воздействием на иммунологические показатели.

Фермент лизоцим — один из активно анализируемых неспецифических иммунных параметров у рыб. Он широко распространен в организме рыб и относится к одному из наиболее изученных показателей неспецифической защиты. Лизоцим — очень лабильный показатель, на флуктуации которого оказывают влияние многие внутренние и внешние факторы. В исследованиях реакции органов иммунной системы и лизоцима можно выделить направления: (а) анализ лизоцима в биологических жидкостях (сыворотка или плазма крови) и в органах (Куровская, Стрилько, 2016, Ren *et al.*, 2019; Tarnawska *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020); (б) анализ лизоцима в сыворотке или плазме крови и морфофизиологических индексов органов иммунной системы (Feng *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2013; Cornet *et al.*, 2021); (в) анализ лизоцима в сыворотке и органах иммунной системы, а также морфофизиологических индексов этих органов (Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020).

В настоящее время отсутствуют исследования, в которых изучается влияние изменений размеров органов иммунной системы на уровень лизоцима в этих органах и каких-либо биологических жидкостях. Можно предположить, что при стабильном иммунном состоянии рыб естественные физиологические изменения в органах должны влиять на показатели иммунитета. Однако пока неясно как могут быть взаимосвязаны такие процессы.

Целью настоящей работы является изучение естественной физиологической изменчивости органов иммунной системы и ее влияние на количественные показатели лизоцима рыб. Анализ сезонных изменений у диких рыб, включая половую зрелость, является адекватным подходом для таких исследований. Объектом исследований были самцы щуки Рыбинского водохранилища, отловленные в разные сезоны годового цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Самцы щуки были отловлены в прибрежной зоне Рыбинского водохранилища в районе пос. Борок и в р. Сутка, в районе с. Верхне-Никульское. В теплые месяцы образцы крови отбирали на месте, сразу же после вылова рыбы. Затем рыб помещали в термос со льдом и доставляли в лабораторию. В зимние месяцы отбор образцов проводился в лаборатории, куда рыба доставлялась в живом виде, сразу после вылова. Перед отбором крови рыбу обездвигивали резким ударом по голове. Кровь брали из хвостовых сосудов и из нее получали сыворотку. Образцы сыворотки, тканей печени, почек и селезенки до анализа хранились замороженными при -18°C в течение нескольких

суток. У рыб измеряли длину до конца чешуйного покрова, взвешивали для определения общей массы, массы тела без внутренностей, а также определяли стадии зрелости гонад (Сакун, Буцкая, 1963). Печень, почки и селезенку взвешивали по отдельности для определения их соматических индексов. Всего были проанализированы 62 самца, время сбора и морфофизиологические показатели, которых представлены в табл. 1.

Концентрацию лизоцима в печени, почках, селезенке и сыворотке крови определяли методом “диффузии в агар”, как описано нами ранее (Субботкина, Субботкин, 2003). Метод основан на способности фермента лизировать клетки *Micrococcus lysodeikticus* (Schroeter 1872), диспергированные в слое агарового геля. С помощью этого метода одинаково успешно анализируются не только прозрачные жидкости, такие как сыворотка крови, но также мутные и интенсивно окрашенные надосадочные жидкости гомогенатов тканей. Диаметр зоны просветления пропорционален логарифму концентрации лизоцима (Osserman, Lawlor, 1966). Концентрацию лизоцима в исследуемых образцах определяли по калибровочной кривой на основе стандартного препарата из белка куриных яиц и выражали в мкг/г ткани органа и мкг/мл сыворотки крови.

Соматические индексы печени (ИПеч), почек (ИПоч) и селезенки (ИСел) рассчитывали как масса органа/масса тела без внутренних органов $\times 100$.

В нашем исследовании был применен новый подход, который основан на синтезе физиологического и иммунологического анализа. Для этого мы использовали новый показатель, который назвали “лизоцимный индекс органа”.

Лизоцимные индексы печени (ЛИПеч), почек (ЛИПоч) и селезенки (ЛИСел) рассчитывали как концентрация лизоцима в мкг/г ткани органа \times индекс соответствующего органа.

Для оценки внутригодовой вариабельности общего количества лизоцима в исследуемых органах суммировали индексы органов (СИО) и лизоцимные индексы органов (СЛИО).

Роль отдельного органа оценивали как его долю от суммы индексов и рассчитывали как индекс органа/сумма индексов органов.

Данные в статье показаны как средняя \pm стандартная ошибка. В связи с небольшим количеством рыб в отдельных группах рассчитывали непараметрические критерии. Статистические различия определяли по критерию Манна–Уитни, а корреляционные связи по критерию Спирмена (r_s). Возможное влияние факторов на анализируемые показатели щуки оценивали по критерию Краскела–Уоллиса (H). Статистическую значимость критериев оценивали при $p < 0.05$.

Таблица 1. Морфофизиологические показатели рыб

| Месяцы | Температура воды, °С* | n | Стадия зрелости | Длина** (l), см | Масса рыб**, (г) | | Масса органов**, (г) | | |
|--------|-----------------------|----|------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| | | | | | общая | без внутренних | печень | почки | селезенка |
| VII | 19–23 | 9 | I, I–II | 28.5–35.8 31.4 ± 1.2 | 182–393 267.3 ± 34.3 | 160–371 248.6 ± 32.9 | 2.0–4.5 2.8 ± 0.3 | 0.9–3.5 2.0 ± 0.2 | 0.3–1.8 0.7 ± 0.2 |
| IX–X | 6–13 | 9 | II, II–III | 34–48.5 40.3 ± 2.3 | 255–970 593.3 ± 99.5 | 230–885 534.7 ± 90.3 | 2.6–10.4 6.1 ± 1.1 | 2.4–7.9 4.5 ± 0.7 | 0.4–2.1 1.2 ± 0.2 |
| XII | 0 | 15 | II, II–III, III | 45–56 51.5 ± 0.9 | 860–1820 1307.7 ± 75.1 | 760–1460 1140.5 ± 59.8 | 13.3–35.1 26.8 ± 2.1 | 5.2–12.8 9.2 ± 0.6 | 1.2–3.2 2.1 ± 0.1 |
| III | 0 | 8 | II–III, III–IV | 41.5–46 44.7 ± 0.8 | 615–1050 797.5 ± 43.6 | 560–927 720.0 ± 37.1 | 12–18.4 16.2 ± 1.4 | 5.4–6.7 6.2 ± 0.3 | 0.5–2.0 1.0 ± 0.2 |
| IV | 0–3 | 13 | III–IV, IV, IV–V | 41.4–56.5 47.3 ± 1.0 | 780–1675 993.1 ± 70.1 | 710–1465 872.5 ± 59.0 | 16–58.6 28.4 ± 3.2 | 5.7–10.5 7.3 ± 0.4 | 0.7–2.7 1.4 ± 0.2 |
| V | 7 | 8 | I, II, II–III | 36.5–57.5 43.2 ± 2.8 | 415–1575 764.4 ± 158.1 | 375–1408 688.5 ± 144.5 | 5.6–16.6 9.5 ± 1.6 | 2.6–11.3 6.3 ± 1.1 | 0.4–3.9 1.5 ± 0.4 |

* – Буторин и др. 1982; ** – в колонках: в верхней строке диапазон варьирования показателя, в нижней строке средняя ± стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наибольшая концентрация лизоцима обнаружена в почках, далее следуют селезенка > сыворотка > печень. Варьирование количества фермента между минимальными и максимальными средними значениями в течение года более всего проявлялось в сыворотке и могло достигать 11-кратных величин (рис. 1). Сезонная динамика показателя проявлялась таким образом, что в марте-апреле, перед нерестом, концентрация фермента в печени и сыворотке была самая низкая, а в почках пониженная после максимальных зимних значений. После нереста, в мае, все значения показателя возросли и максимально в сыворотке – более чем в 8 раз. В осенние месяцы, при похолодании, произошло снижение концентрации лизоцима в печени и сыворотке, которое продолжилось зимой и далее, до весны. В почках, наоборот, осенью наблюдался рост количества фермента, концентрация которого зимой повысилась до максимального уровня. Концентрация лизоцима в селезенке показала стабильный характер и не различалась во все исследованные месяцы ($p > 0.05$).

Печень, при сравнении с другими органами щуки, обладает наиболее высоким соматическим индексом, который показал самый широкий, почти 3-кратный, диапазон варибельности. Для селезенки характерен самый маленький индекс – в 3–5 раз меньше ИПоч и в 8–11 раз меньше ИПеч. У ИСел, в отличие от ИПеч, наблюдалась противоположная годовая динамика. ИПоч показал стабильность независимо от сезона ($p > 0.05$) и в отдельные периоды был сопоставим с ИПеч

(табл. 2). Следует отметить, что самые высокие соматические индексы селезенки были обнаружены у молоди.

В почках обнаружены самые высокие лизоцимные индексы, которые были в 8–12 раз выше, чем в печени, и в 7–10 раз выше, чем в селезенке. Внутригодовая динамика ЛИПоч и концентрации фермента в почках были сходными, поскольку изменения соматического индекса органа были несущественны. Неожиданным оказался сходный уровень общего количества фермента в печени и селезенке, не смотря на очень большие различия по размерам органов и концентрации лизоцима в них. У ЛИПеч и ЛИСел, напротив, внутригодовая динамика отсутствовала при наличии значительных изменений, как концентрации фермента в органах, так и соматических индексов (табл. 2).

Внутригодовая направленность суммы соматических и лизоцимных индексов органов отражает сходство изменения массы органов и общего количества фермента в некоторые периоды, но только до приближения нерестового сезона (рис. 2).

Роль отдельного органа оценивали как долю от совокупной изменчивости всех трех исследованных. Доля печени, как самого крупного органа, была преобладающей, а ее динамика совпадала с таковой ИПеч. В почках при стабильном характере соматического индекса, доля органа снижалась при увеличении доли печени. Доля селезенки повторяла динамику ИСел, но при большем диапазоне различий максимальных и минимальных значений (табл. 3).

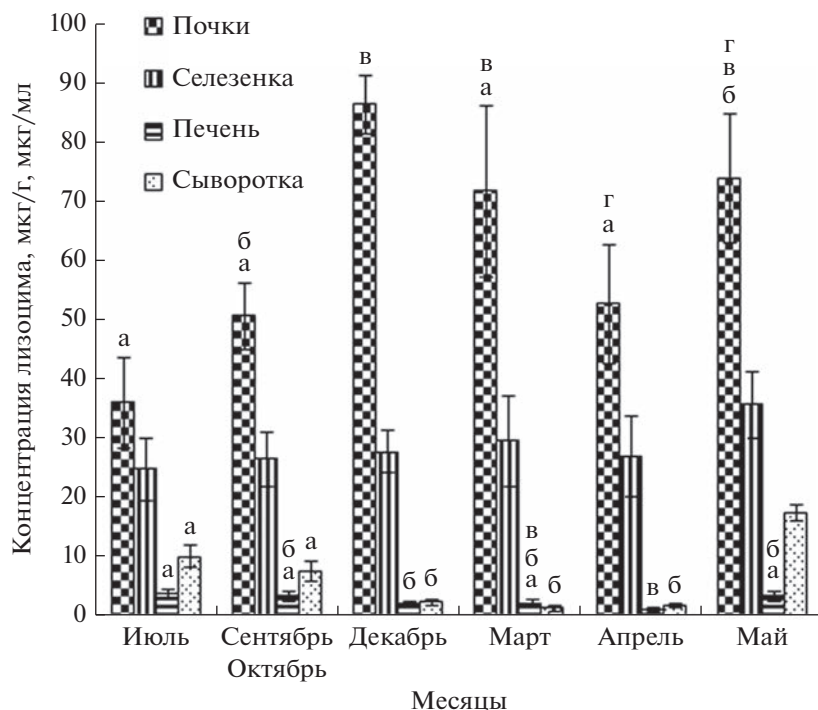


Рис. 1. Концентрация лизоцима в тканях органов и сыворотке самцов шуки. Разные буквы над столбцами обозначают достоверные различия для одного источника фермента в разные месяцы при $p < 0.05$.

Было обнаружено, что почки имеют наиболее высокую долю лизоцима, которая существенно доминирует над долями фермента в печени и селезенке. Внутригодовая динамика долей лизоцима и лизоцимных индексов соответствующих органов были сходными. Доли лизоцима в печени и селезенке, так же как лизоцимные индексы этих органов, были показателями одного уровня (табл. 3).

Прежде чем выяснить взаимосвязь количественных изменений лизоцима и внутренних органов, была выполнена оценка влияния температуры воды на анализируемые показатели. Однофакторный анализ Краскала–Уоллиса показал зависимость концентрации лизоцима в печени, почках, сыворотке и ЛИПоч от температуры воды

в водоеме при анализе всего периода наблюдений. Была обнаружена положительная корреляция концентрации фермента в печени и сыворотке с сезонной динамикой температуры воды ($r_s = 0.26$ и $r_s = 0.66$ соответственно) и отрицательная – концентрации лизоцима в почках и ЛИПоч ($r_s = -0.46$ и $r_s = -0.40$ соответственно). Температурный режим водоема не влиял на концентрацию и общее количество фермента в селезенке. ИПеч оказался в обратной зависимости от этого внешнего фактора ($r_s = -0.6$), а ИСел – в прямой ($r_s = 0.39$). Температура водоема за весь период наблюдений не влияла на ИПоч.

С целью уменьшения влияния фактора температуры, анализируемый период был ограничен

Таблица 2. Соматические и лизоцимные индексы органов

| Месяцы | n | Соматические индексы | | | Лизоцимные индексы | | |
|--------|----|----------------------|-------------|--------------------|--------------------|----------------------|-------------|
| | | печень* | почки | селезенка* | печень | почки* | селезенка |
| VII | 9 | 1.20 ± 0.11а, б | 0.84 ± 0.07 | 0.29 ± 0.04а | 4.48 ± 0.89 | 30.23 ± 7.24а | 6.77 ± 1.05 |
| IX–X | 9 | 1.14 ± 0.09а | 0.85 ± 0.02 | 0.22 ± 0.01а | 3.79 ± 0.81 | 44.23 ± 5.62б | 5.58 ± 0.69 |
| XII | 15 | 2.40 ± 0.13в | 0.80 ± 0.03 | 0.18 ± 0.01б | 5.65 ± 0.83 | 69.34 ± 4.28в | 5.37 ± 0.89 |
| III | 8 | 2.27 ± 0.14в | 0.86 ± 0.03 | 0.14 ± 0.02в | 4.86 ± 1.28 | 61.38 ± 12.30а, б, в | 4.29 ± 1.32 |
| IV | 13 | 3.19 ± 0.19 | 0.84 ± 0.02 | 0.17 ± 0.01б, в | 3.90 ± 0.93 | 44.53 ± 8.22а, б | 5.10 ± 1.71 |
| V | 8 | 1.48 ± 0.14б | 0.94 ± 0.06 | 0.20 ± 0.03а, б, в | 4.75 ± 1.24 | 71.60 ± 12.94б, в | 7.21 ± 1.38 |

* – разные буквы в колонках обозначают достоверные различия одного органа в разные месяцы при $p < 0.05$.

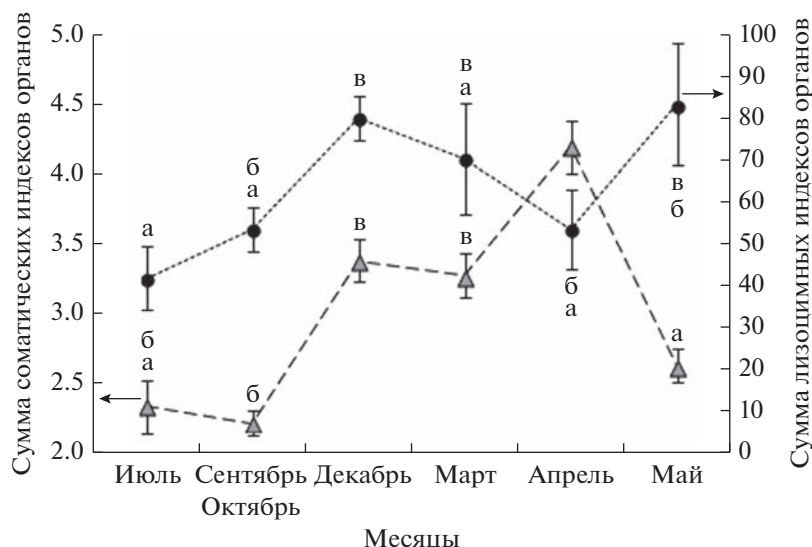


Рис. 2. Внутригодовая динамика суммы соматических и лизосимных индексов органов самцов щуки. Разные буквы в точках линии обозначают достоверные различия в разные месяцы при $p < 0.05$.

декабрем, мартом и апрелем, когда диапазон температурных колебаний минимальный (табл. 1). В это время концентрация лизоцима в почках и ЛИ-Поч также оказались зависимыми от температуры воды в водоеме, сохраняя обратную корреляцию ($r_s = -0.47$ и $r_s = -0.44$ соответственно). В связи с тем, что почки доминировали в общем количестве фермента трех органов с долей 0.61–0.86, сумма ЛИО также показала обратную связь с температурой воды ($r_s = -0.42$). Была обнаружена отрицательная корреляция концентрации лизоцима в печени с температурой воды ($r_s = -0.36$), однако критерий H не выявил непосредственного влияния температуры на иммунный показатель ($p = 0.10$).

Среди морфофизиологических индексов только ИПеч показал зависимость от температуры воды в водоеме, которая теперь была прямая ($r_s = 0.48$). В результате такого изменения СИО и доля печени также получили прямую зависимость ($r_s = 0.44$ и $r_s = 0.40$ соответственно), а доли

селезенки и почек обратную, от этого внешнего фактора ($r_s = -0.43$, $p < 0.05$, и $r_s = -0.32$, $p > 0.05$ соответственно). Доля почек в совокупной массе трех органов, не зависела от размера органа, тогда как изменение размеров печени и селезенки соответствующим образом отражалось на долях этих органов ($r_s = 0.75$ и 0.76). Изменение размера печени также оказывало существенное обратное направленное влияние на долю почек ($r_s = -0.76$).

Анализ влияния физиологического состояния рыб выявил связь количества лизоцима в почках со стадиями зрелости гонад по критерию H , однако корреляция концентрации фермента в органе и ЛИПоч с этим фактором не проявлялась. Среди соматических индексов только размер печени зависел от зрелости гонад ($r_s = 0.61$), что влияло на СИО, доли печени и почек, но не влияло на долю селезенки. Была обнаружена корреляция количественных показателей лизоцима в почках и селезенке, а также ИСел, с массой тела без внутренне-

Таблица 3. Доли соматических и лизосимных индексов органов

| Месяцы | n | Доли соматических индексов | | | Доли лизосимных индексов | | |
|--------|----|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| | | печень* | почки* | селезенка* | печень | почки* | селезенка* |
| VII | 9 | 0.51 ± 0.02a | 0.36 ± 0.01a | 0.12 ± 0.01a | 0.13 ± 0.02 | 0.69 ± 0.05a | 0.18 ± 0.03a |
| IX–X | 9 | 0.51 ± 0.02a | 0.39 ± 0.01б | 0.10 ± 0.01a, б | 0.08 ± 0.02 | 0.81 ± 0.03a, б | 0.11 ± 0.02a, б |
| XII | 15 | 0.70 ± 0.01б | 0.24 ± 0.01в | 0.05 ± 0.01в | 0.07 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01б | 0.07 ± 0.01в |
| III | 8 | 0.69 ± 0.01б | 0.27 ± 0.01в | 0.04 ± 0.01г | 0.08 ± 0.02 | 0.86 ± 0.03б | 0.07 ± 0.02в |
| IV | 13 | 0.75 ± 0.01 | 0.21 ± 0.01 | 0.04 ± 0.004г | 0.09 ± 0.03 | 0.82 ± 0.04б | 0.09 ± 0.02б, в |
| V | 8 | 0.56 ± 0.03a | 0.36 ± 0.02a, б | 0.08 ± 0.01б, в | 0.06 ± 0.01 | 0.85 ± 0.03б | 0.09 ± 0.02б, в |

* – разные буквы в колонках обозначают достоверные различия одного органа в разные месяцы при $p < 0.05$.

стей ($r_s = 0.33-0.39$), но однофакторный анализ не выявил влияния массы тела на эти показатели. Количество фермента в тканях особей и соматические индексы органов не зависели от длины рыб.

Размеры печени и почек не оказывали влияния на лизоцим в органах по критерию *H*, хотя концентрация фермента в тканях, а также ЛИПоч, показали отрицательную корреляцию с размером печени ($r_s = -0.40...-0.49$). Обнаружено влияние размера печени на физиологические показатели, такие как СИО ($r_s = 0.92$), а также доли печени и почек ($r_s = 0.76$ и $r_s = -0.76$ соответственно). Анализ по критерию *H* выявил значительное влияние размера селезенки на ЛИСел ($r_s = 0.76$) и долю лизоцима в органе ($r_s = 0.68$). Была обнаружена корреляция концентрации лизоцима в органе ($r_s = 0.51$) и доли лизоцима в почках ($r_s = -0.40$), с ИСел, но по критерию *H* непосредственное влияние размера селезенки не подтвердилось. Размер селезенки оказывал влияние на физиологические параметры, такие как ИПеч, СИО, доля печени и доля селезенки, но только в последнем случае это имело корреляционную зависимость ($r_s = 0.75$).

В период низких температур и незначительных изменений температурного режима водоема (декабрь–март) обнаружена сильная связь концентрации лизоцима в печени с его общим количеством в органе ($r_s = 0.85-0.87$). Концентрации фермента в почках и селезенке, а также лизоцимные индексы этих органов показали прямую корреляцию с концентрацией фермента в печени ($r_s = 0.39-0.45$), однако однофакторный анализ не выявил зависимость этих показателей от лизоцима печени ($p > 0.05$).

Концентрация лизоцима в почках демонстрировала максимальную связь с лизоцимным индексом органа и общим количеством фермента в трех органах ($r_s = 0.95$). Концентрации лизоцима в печени и селезенке также показали связь с концентрацией фермента в почках ($r_s = 0.48$ и $r_s = 0.53$ соответственно), однако корреляция ЛИСел с концентрацией лизоцима в почках ($r_s = 0.43$) по критерию *H* оказалась случайной ($p > 0.05$).

Концентрация лизоцима в селезенке показала связь с большинством иммунных параметров, которая в максимальной степени проявлялась с ЛИСел ($r_s = 0.85$). Концентрация фермента в почках и ЛИПоч в меньшей степени коррелировали с селезеночным ферментом ($r_s = 0.54$ и $r_s = 0.57$ соответственно). Концентрация лизоцима печени и ЛИПеч также коррелировали с концентрацией фермента в селезенке ($r_s = 0.48$ и $r_s = 0.41$ соответственно), хотя однофакторный анализ выявил связь только концентрации печеночного лизоцима с ферментом в селезенке. Между концентрацией лизоцима в селезенке и долей фермента в органе выявлена положительная корреляция ($r_s = 0.50$), но по критерию *H* такая связь не подтверждена ($p > 0.05$). В тоже

время общее количество фермента в трех органах (СЛИО) было связано с концентрацией лизоцима в селезенке ($r_s = 0.65$).

Концентрация лизоцима в печени и почках показала одинаковую корреляцию с ЛИСел ($r_s = 0.48$), однако по критерию *H* только фермент почек был непосредственно связан с общим количеством лизоцима в селезенке. Концентрация лизоцима в печени ($r_s = 0.43$) и в сыворотке оказались связанными с ЛИПоч, но в последнем случае какой-либо корреляции не обнаружено. Общее количество лизоцима в печени не влияло на концентрацию, не на лизоцимные индексы почек и селезенки. ЛИПеч и ЛИПоч показали корреляцию с ЛИСел ($r_s = 0.42$ и $r_s = 0.50$ соответственно), но если ЛИПоч был прямо связан с ЛИСел, то у печени такой связи по критерию *H* не выявлено. Общее количество лизоцима в печени и селезенке оказывало влияние на доли фермента в этих органах ($r_s = 0.71$ и $r_s = 0.67$ соответственно). Доля лизоцима в почках не зависела от общего количества фермента в органе, но показала обратную зависимость от количества лизоцима в печени ($r_s = -0.54$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время многочисленные работы по количественному анализу лизоцима отражают конечный результат в фиксированной размерности: г ткани органа, г белка жидкости, мл, л и т.п. (Субботкин, Субботкина, 2020). Фиксированная размерность не учитывает морфофизиологические различия органов в качестве целых структур, их размеры, массу, как внутри одной особи, так и у сравниваемых рыб разных размеров. В практике физиологических исследований для нивелирования размерно-массовых различий органов оценивают их морфофизиологические или соматические индексы. В целях изучения возможного влияния размеров органов иммунной системы на концентрацию лизоцима был использован новый показатель – лизоцимный индекс органа, который: (а) отражает количество лизоцима во всем органе, (б) нивелирует морфофизиологические различия органов и особей, и с этих позиций может быть более объективным количественным критерием.

Исследование показало, что в естественных условиях обитания концентрация лизоцима в органах и сыворотке, а также соматические индексы органов самцов щуки были связаны с термическим режимом водоема. В годовом цикле с диапазоном средних температур более 20°C (Буторин и др., 1982) такая связь в разных органах и тканях была различной. Концентрация лизоцима в печени и сыворотке, а также ИСел, показали прямую

зависимость от температуры, а концентрация лизоцима в почках и ИПеч обратную.

Анализ рыб при отсутствии существенных изменений низкого температурного режима показал, что почки являются наиболее стабильным органом. Соматические индексы органа не зависели от температуры в широком диапазоне варьирования в годовом цикле и более узком зимне-весеннем периоде, а количественные показатели лизоцима всегда демонстрировали обратную зависимость от этого внешнего фактора. Соматический индекс селезенки не зависел от температуры в условиях ее минимальных изменений, а концентрация фермента и его общее количество – ни в годовом цикле, ни в условиях постоянных температур. Общее количество лизоцима в печени, также оказалось несвязанным ни с каким с температурным режимом водоема. Корреляционные связи концентрации фермента и соматического индекса печени при постоянно низкой температуре сменились на противоположные, в сравнении со всем годовым периодом. Соматический индекс органа всегда оставался связанным с температурой водоема. Хуанг с соавт. (Huang *et al.*, 2016) наблюдали двукратное снижение индекса печени у молоди зеркального карпа (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) при более высоких температурах, независимо от рациона, а двухфакторный анализ показал значительное влияние температуры на размер печени рыб. Нгуен с соавт. (Nguyen *et al.*, 2019) обнаружили рост индекса печени у кобии (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) при повышении температуры воды с 30 до 34°C при совместном действии с метионином в корме. Однако повышение температуры с 28.5 до 31.5°C не влияло на индекс печени анемоновой рыбки (*Amphiprion melanopus* Bleeker, 1852) (Miller *et al.*, 2015). В условиях летних температур $21.5 \pm 1.1^\circ\text{C}$ индекс печени *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) увеличивался только под влиянием высокоэнергетического корма (Crowe *et al.*, 2021).

Обратная корреляция концентрации фермента в печени с температурой воды в зимне-весенний период не была связана с этим фактором, а вероятно обусловлена иным влиянием, таким как прямая зависимость этого показателя от общего количества лизоцима в почках. Поэтому, концентрация лизоцима в печени может быть в косвенной зависимости от термического режима водоема. Лизоцим сыворотки не был связан с температурным фактором в условиях постоянных низких температур. Концентрация сывороточного лизоцима хотя и показала зависимость от общего количества фермента в почках, но корреляция между этими показателями отсутствовала, а какая-либо связь с лизоцимом печени и селезенки не выявлена вовсе. Сан с соавт. (Sun *et al.*, 2020) показали отсутствие связи активности лизоцима в плазме и печени

при гипоксии у большеротого окуня (*Micropterus salmoides* Lacepede, 1802).

Морфофизиологические показатели, такие как абсолютные размеры особей, зрелость гонад, а также размеры органов, выраженные через соматические индексы, обычно не были факторами, влияющими на концентрацию лизоцима в органах и сыворотке самцов щуки, но концентрация лизоцима могла проявлять корреляцию с этими показателями. Это относится к обратной корреляции концентрации фермента в печени и почках с индексом печени, а также прямой корреляции лизоцима селезенки с индексом органа. Напротив, лизоцим почек и общее количество лизоцима в трех органах, как следствие доминирующей роли почек, показали связь со зрелостью гонад, однако корреляции количественных показателей фермента почек с гонадами в этих случаях не наблюдалось. Ванг с соавт. (Wang *et al.*, 2020) обнаружили повышение активности лизоцима в печени без изменений индекса органа у молоди гибрида группера (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂), когда изучали влияние замены рыбной муки на концентрат соевого белка в корме. Также было обнаружено значительное увеличение активности лизоцима плазмы у форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) под влиянием β-глюканов без изменения индекса селезенки (Cognet *et al.*, 2021). Однако при добавлении тиамин в корм молоди китайского карпа *Cyprinus carpio* var. Jian активность сывороточного лизоцима повысилась и увеличился индекс селезенки, но уменьшился индекс почек (Feng *et al.*, 2011). Повышение активности фермента в сыворотке и увеличение индекса печени наблюдали у японского морского окуня *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828) под влиянием асафетиды (Xu *et al.*, 2020).

Размеры печени и почек не оказывали никакого влияния на общее количество фермента в них, тогда как ЛИСел показал существенную зависимость от размера селезенки. Размер селезенки оказывал прямое влияние на концентрацию и общее количество лизоцима в почках. С другой стороны ЛИСел и концентрация селезеночного лизоцима коррелировали с общим количеством и концентрацией фермента в почках, но при этом почки непосредственно не влияли на показатели селезенки. Общее количество лизоцима в почках и селезенке не зависело от количества фермента в печени. Изменение общего количества лизоцима в печени и селезенке отражалось на долях фермента в органах, а доля лизоцима в почках показала обратную зависимость от количества фермента в печени. Аналогичная взаимосвязь была обнаружена и при анализе размеров органов.

Активность лизоцима в печени, почках и сыворотке показала зависимость от температуры воды в водоеме в годовой динамике и изменение ха-

рактера зависимости при минимизации действия температуры. Поэтому при оценке влияния физиологических факторов необходимо нивелировать такое воздействие внешней среды. Этот результат также указывает, что при разных условиях внешней среды ответные реакции иммунной системы у одного вида рыб могут быть неодинаковыми или противоположными (Субботкин, Субботкина, 2020). Вместе с тем корреляция концентрации лизоцима с каким-либо фактором или показателем всего организма не всегда имела непосредственную зависимость от него при однофакторном анализе, как в случае концентрации лизоцима печени с температурой в годовом цикле или почек и селезенки с массой рыб, почек с размером печени и некоторые другие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрация лизоцима как параметр, определяемый в фиксированном объеме, прямо зависит от общего количества фермента в органе, которое, в свою очередь, находилось в зависимости от его размеров. При значительных различиях концентрации лизоцима в печени и размеров органа в разные периоды годового цикла общее количество фермента, т.е. лизоцимный индекс органа, оставалось постоянным. Подобная особенность выявлена и у селезенки. Также показано, что при существенных различиях между печенью и селезенкой по концентрации лизоцима и размерам органов, общее количество фермента в них оказалось на одном уровне. В почках, напротив, обнаружена вариабельность общего количества лизоцима и обратная зависимость этого показателя от температуры воды при неизменном соматическом индексе органа. Таким образом, было обнаружено, что изменение размеров отдельного органа может не влиять на количественные показатели лизоцима в самом органе, но изменяет роль этого и других органов при совокупной оценке иммунных реакций. С другой стороны, концентрация лизоцима в разных органах оказывается зависимой от размеров этих органов. Кроме того, в результате сложных взаимосвязей, концентрация фермента в отдельном органе оказывается не только в зависимости от общего количества лизоцима в нем, но также находится под влиянием фермента других органов.

Проведенные исследования – это первая попытка оценить влияние физиологического состояния рыб, связанного с изменением размеров органов, на динамику иммунологического показателя – концентрацию лизоцима в различных тканях. Полученные результаты позволили приблизиться к пониманию сложной взаимосвязи концентрации лизоцима в органах и тканях щуки с некоторыми факторами разной природы, которые присутствуют в жизненном цикле рыб.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема: 121051100104-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буторин Н.В., Курдина Т.Н., Бакастов С.С. Температура воды и грунтов Рыбинского водохранилища. Л.: Наука, 1982. 224 с.
- Куровская Л.Я., Стрилько Г.А. Влияние pH водной среды на уровень заражения эктопаразитами, содержание белка и лизоцима у некоторых видов карповых рыб (Cyprinidae) // Рыбогосподарська наука України. 2016. Т. 35. № 1. С. 88–101.
- Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб // Рыбное хоз-во. 1963. 36 с.
- Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. Влияние заражения и инъекций субстанций различной природы на лизоцим карповых рыб (Cyprinidae) (Обзор) // Биол. внутр. вод. 2020. № 2. С. 180–191.
- Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Содержание лизоцима в органах и сыворотке крови у различных видов рыб р. Волги // Журн. эволюционной биохимии и физиол. 2003. Т. 39. № 5. С. 430–437.
- Bennett P.M., Janz D.M. Seasonal changes in morphometric and biochemical endpoints in northern pike (*Esox lucius*), burbot (*Lota lota*) and slimy sculpin (*Cottus cognatus*) // Freshwat. Biol. 2007. V. 52. P. 2056–2072.
- Cornet V., Khuyen T.D., Mandiki S.N.M., Betoulle S., Bossier P., Reyes-Lopez F.E., Tort L., Kestemont P. GAS1: A new β -glucan immunostimulant candidate to increase rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) resistance to bacterial infections with *Aeromonas salmonicida achromogenes* // Front. Immunol. 2021. V. 12. 693613.
- Crowe B.H., Harris J.O., Bansemmer M.S., Stone D.A.J. Restricted feeding and dietary energy levels affect liver structure in cultured Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*, Valenciennes) at summer water temperatures // Aquacult. Res. 2021. V. 52. P. 6074–6086.
- Feng L., Huang H.-H., Liu Y., Jiang J., Jiang W.-D., Hu K., Li S.-H., Zhou X.-Q. Effect of dietary thiamin supplement on immune responses and intestinal microflora in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) // Aquac. Nutr. 2011. V. 17. P. 557–569.
- Hansson T., Lindesjö E., Forlin L., Balk L., Bignert A., Larsson A. Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity // Aquat. Toxicol. 2006. V. 79. P. 341–355.
- Huang J.F., Xu Q.Y., Chang Y.M. Effects of temperature and dietary protein on the growth performance and IGF-1 mRNA expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*) // Aquac. Nutr. 2016. V. 22. № 2. P. 283–292.
- Kortet T.R., Taskinen J., Sinisalo T., Jkinen I. Breeding-related seasonal changes in immunocompetence, health state and condition of the cyprinid fish, *Rutilus rutilus* L. // Biol. J. Linn. Soc. 2003. V. 78. P. 117–127.
- Li X., Liu L., Zhang Y., Fang Q., Li Y., Li Y. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Chemosphere. 2013. V. 93. P. 428–433.

- Medford B.A., Mackay W.C. Protein and lipid content of gonads, liver, and muscle of northern pike (*Esox lucius*) in relation to gonad growth // J. Fish. Res. Board Can. 1978. V. 35. P. 213–219.
- Miller G.M., Kroon F.J., Metcalfe S., Munday P.L. Temperature is the evil twin: effects of increased temperature and ocean acidification on reproduction in a reef fish // Ecol. Appl. 2015. V. 25. № 3. P. 603–620.
- Nguyen M.V., Espe M., Conceição L.E.C., H.M., Yúfera M., Engrola S.A.D., Jordal A.O., Rønnestad I. The role of dietary methionine concentrations on growth, metabolism and N-retention in cobia (*Rachycentron canadum*) at elevated water temperatures // Aquac. Nutr. 2019. V. 25. № 2. P. 495–507.
- Osserman E.F., Lawlor D.P. Serum and urinary lysozyme (Muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia // J. Exp. Med. 1966. V. 124. P. 921–952.
- Qiao Q., Liang H., Zhang X. Effect of cyanobacteria on immune function of crucian carp (*Carassius auratus*) via chronic exposure in diet // Chemosphere. 2013. V. 90. № 3. P. 1167–1176.
- Ren X., Wu B., Zhao F., Qi L., Qiu X., Li R., Yang S., Liu F., Yi G., Ding X., Xia L., Sun Y. Antagonistic activity and protective effect of a *Bacillus subtilis* isolate against fish pathogen *Edwardsiella piscicida* // Fisheries Science. 2019. V. 85. P. 1011–1018.
- Rohlenova K., Morand S., Hyršl P., Tolarova S., Flajšhans M., Šimkova A. Are fish immune systems really affected by parasites? An immunocological study of common carp (*Cyprinus carpio*) // Parasit. Vectors. 2011 V. 4. P. 120.
- Subbotkin M.F., Subbotkina T.A. Effect of environment and physiological state of an organism on the activity and content of lysozyme in the fishes of the family Cyprinidae: A review // Inland Water Biol. 2018. V. 11. № 2. P. 184–194.
- Sun J.L., Zhao L.L., Liao L., Tang X.H., Cui C., Liu Q., He K., Ma J.D., Jin L., Yan T., Zhou J., Yang S. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis // Fish Shellfish Immunol. 2020. V. 98. P. 923–936.
- Tarnawska M., Augustyniak M., Łaszczyca P., Migula P., Irnazarow I., Krzyżowski M., Babczyńska A. Immune response of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to a mixture of sewage chemicals // Fish Shellfish Immunol. 2019. V.88. P. 17–27.
- Wang J., Liang D., Yang Q., Tan B., Dong X., Chi S., Liu H., Zhang S. The effect of partial replacement of fish meal by soy protein concentrate on growth performance, immune responses, gut morphology and intestinal inflammation for juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) // Fish Shellfish Immunol. 2020. V. 98. P. 619–631.
- Xu A., Shang-Guan J., Li Zh., Gao Zh., Huang Y., Chen Q. Effects of dietary asafoetida (*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen) levels on feeding attraction activity, growth performance, healthiness, and digestive enzyme activity in juvenile // Fish Physiol. Biochem. 2020. V. 46. P. 1991–2003.

The Intra-Annual Variability of Immune System Organs and Lysozyme Content in Male Pike *Esox lucius* L.

M. F. Subbotkin^{1, #} and T. A. Subbotkina¹

¹ Papanin Institute of Inland Water Biology, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii district, Yaroslavl oblast, 152742 Russia

[#]e-mail: smif@ibiw.ru

The effect of the physiological state on the lysozyme concentration in the liver, kidney, spleen and serum, as well as the total amount of the enzyme in the organs, was studied in male pike *Esox lucius* L., 1758 under different conditions of the annual cycle. Multidirectional intra-annual dynamics of organ somatic indices and quantitative parameters of lysozyme in fish tissues and organs, depending on the temperature regime of the water body, was found. Despite significant changes in liver size and lysozyme concentration, the total amount of the enzyme in the organ, the lysozymic index, remained constant. A similar result was found in the spleen. When the influence of the temperature factor at low temperatures was minimized, the liver parameters changed to the opposite ones, while those in the kidney remained unchanged. Such a temperature regime did not affect the spleen parameters and the concentration of the enzyme in the serum. With significant differences between the liver and spleen in the enzyme concentration and size, their lysozymic indices were indicators of the same level. Stages of gonad maturity affected the liver index and the amount of lysozyme in the kidney, but the correlation of the kidney enzyme with maturity was not significant. The kidney lysozyme and the spleen parameters correlated with body mass without organs, although fish weight and length were not influencing factors. The size of the kidney, unlike the spleen, did not affect the enzyme in fish tissues. The liver and kidney enzyme concentrations and kidney lysozymic index were inversely correlated with liver size. A complex nature of the enzyme relationships in organs was revealed, at which the amount of lysozyme in one organ could affect the amount of the enzyme in the other. The relationship between the concentration of serum lysozyme and the morphophysiological parameters of fish under stable low temperature conditions in the water body was not found.

Keywords: lysozyme, organs, serum, somatic and lysozymic indices, physiological state, temperature, season

УДК 574.24:581.19

АККУМУЛЯЦИЯ ЖЕЛЕЗА РАСТЕНИЯМИ ГАЛОФИТАМИ НА ЛИТОРАЛИ БЕЛОГО МОРЯ

© 2023 г. Е. Н. Теребова*, @, М. А. Павлова*, Н. В. Орешникова**

*ФГБОУВО Петрозаводский государственный университет,
Республика Карелия, пр. Ленина, 33, Петрозаводск, 185910 Россия**ФГБОУВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, д. 1, Москва, 119991 Россия

@E-mail: eterebova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 04.07.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

В работе исследовано накопление железа растениями галофитами триостренника морского (*Triglochin maritima* L.), подорожника морского (*Plantago maritima* L.), астры солончаковой (*Aster tripolium* L.) и взморника морского (*Zostera marina* L.), обитающих на литорали Белого моря. Литоральные грунты не загрязнены (6–16 г/кг), морская вода загрязнена железом (0.04–0.32 мг/л). Галофиты накапливают железо до сверхзначений (6.49–71.63 г/кг), 93% металла накапливается в корневищах растений. Обсуждаются причины этого явления. Галофиты литорали Белого моря являются участниками биогеохимического круговорота железа и основными сайтами его фиксации в системе берег–море и могут рассматриваться как потенциальные фиторемедиаторы прибрежных территорий.

Ключевые слова: галофиты, литораль, Белое море, железо, аккумуляция, триостренник, астра, подорожник, взморник

DOI: 10.31857/S1026347023700154, **EDN:** MXHYFA

На литорали Белого моря обитают галофиты – высшие растения, адаптированные к высокому содержанию солей в почве и воде. Произрастая на приливно–отливной зоне моря, галофиты испытывают на себе его динамику: два раза в сутки в течение примерно восьми часов постепенно полностью заливаются морской водой в прилив и осушаются в отлив. В зоне контакта моря и суши происходит постоянное варьирование условий среды обитания растений (содержания кислорода, инсоляции, температуры, волновой динамики, уровня солености и элементного состава морской воды и грунтов). В таких стрессовых условиях существования растения литорали успешно обеспечивают себе рост и развитие за счет анатомических (Гуляева и др., 2016) и физиологических (Кособрюхов, Марковская, 2016) приспособлений (Markovskaja *et al.*, 2020). Считается, что у галофитов функционируют физиолого–биохимические механизмы кросс–адаптации к совместному действию солей и тяжелых металлов (Wang *et al.*, 2013), поэтому галофиты более устойчивы к последним, по сравнению с гликофитами (Mapousaki, Kalogerakis, 2011).

У галофитов литорали Белого моря отмечены анатомические особенности листа: наличие у триостренника морского и подорожника морско-

го суккулентных листьев, в центре листовой пластинки триостренника морского образуется аэренхима с крупными межклетниками, а в листе подорожника морского хорошо развита водоупаивающая паренхима листа (Гуляева и др., 2016). Установлены особенности фотосинтетической функции подорожника морского: в стабильном состоянии в полный прилив и максимальный отлив растения подорожника имеют высокие функциональные показатели флуоресценции хлорофилла А (Fv/Fm 0.80, Y (II) 0.30, ETR 110, NPQ 2.5 и F₀ 120 в относит. ед. и устьичной проводимости G_s 350–450 ммоль м^{–2} с^{–1}) и открытые устьица, а в переходном состоянии, когда залиты и осушены не все части растения, отмечается частичное закрытие устьиц и ингибирование функциональной активности хлорофилла А (Fv/Fm 0.70, Y (II) 0.20–0.25, ETR 70–90, NPQ 0.5–1.5 и F₀ 70–80 в относит. ед. и G_s 50–150 ммоль м^{–2} с^{–1}) (Марковская, Гуляева, 2020). У растений триостренника морского и подорожника морского была показана высокая ионообменная способность клеточной стенки листа (2710–3700) и корня (1160–2350 ммоль г^{–1} сух вес клет. стенки) (Terebova *et al.*, 2020). Также установлено, что на литорали Белого моря в районе г. Беломорска триостренник морской активно

накапливает тяжелые металлы из среды обитания, выявлены коэффициенты биологического поглощения металлов больше единицы: (Pb (7.33) > Mn (2.99) > Fe (2.69) > Zn (2.53) > Cu (2.51) > Ni (1.79). При этом абсолютное содержание железа у триостренника было очень высоким до 22–34 г/кг, что в десятки раз превышает критические уровни металла у растений (Sonina *et al.*, 2021).

Железо – один из распространенных элементов в литосфере. Его содержание в земной коре достигает 4.65% (Виноградов, 1957). Для растений железо необходимый биофильный макроэлемент. За счет способности менять степень окисления с Fe²⁺ до Fe³⁺ и обратно, железо выполняет разнообразные функции: кофактор аденозин-5'-фосфосульфат редуктазы в ассимиляции сульфатов (Kopriva *et al.*, 2009), аминокислотопропан-1-карбоновой кислотой оксидазы в синтезе этилена (Zhou *et al.*, 2002), альтернативной оксидазы в дыхании (Albury *et al.*, 2002), кофактор ферментов системы антиоксидантной защиты – каталаз (Grigoras, 2017), пероксидаз (Rizhsky *et al.*, 2003), супероксиддисмутаза (McKersie *et al.*, 2000), компонент фотосистемы II (ферредоксин) (Hell, Stephan, 2003), в составе цитохромов и железосодержащих белков ферритинов, выполняющих также антиоксидантную защиту клеток (Briat *et al.*, 2010). В последнее время считается, что биологическая продукция мирового океана в большей степени зависит от содержания железа в нем, а не от дефицитных макроэлементов азота и фосфора. Эти выводы получены при оценке биогенного кремнезема (отложения панцирей диатомовых водорослей) в донных отложениях в областях Тихого океана и вокруг Антарктиды (Brzezinski *et al.*, 2011). В то же время железо труднодоступно для растений из-за его плохой растворимости в почве (Kim, Guerinot, 2007). Не до конца понятен окислительный статус железа в составе железо–органических комплексов почвы (Водяницкий, 2003). На основании вышеизложенного целью исследования является оценка накопления железа несколькими видами галофитов приливной–отливной зоны вдоль карельского берега Белого моря и анализ обмена железа в системе вода–грунты–растение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Район исследования

Работа выполнена на карельском берегу Белого моря в районе поселков Кереть (Лоухский район), Рабочеостровск (Кемский район) и Растьяноволк (Беломорский район) в июле 2018–2020 г. (рис. 1). На восьми пробных площадях (ПП) на литорали от линии уреза воды (во время отлива) до зоны контакта штормовых выбросов у коренного берега заложены трансекты. На пробных площадях по трансектам сделано описание рас-

тительности, грунтов литорали, собраны растения триостренника морского (*Triglochin maritima* L.) (ПП1–8), подорожника морского (*Plantago maritima* L.) (ПП1–6), астры солончаковой (*Aster tripolium* L.) (ПП4,5,6) и взморника морского (*Zostera marina* L.) (ПП4,5), штормовые выбросы (мертвые части растений моря и берега, ПП1–6), грунт под растениями и пробы морской воды. Названия маршевых почв даны по работе М.А. Цейца (Tseits *et al.*, 2005)

Основными особенностями морфологии берегов Белого моря является сильная расчлененность береговой линии, вследствие чего широко распространены фиордовые и шхерные типы берегов. Берега исследуемых районов изрезаны многочисленными заливами – “губами” и слабоизменены морем, т.к. незначительность волнений и прочность пород замедляют развитие береговых процессов. Характерным элементом рельефа данных берегов являются так называемые осушки – участки подводного берегового склона ниже уровня полного прилива, которые сохнут во время отлива (Орешникова, 2001). Карельский берег характеризуется морским равнинным ландшафтом и представлен абразионно–экзарационным шхерным мелководьем, одной из особенностей гидрологического режима является наличие стонно–нагонных изменений уровня. С почвенной точки зрения исследуемые участки, расположенные в приливно отливной зоне или в зоне заплеска, представляют собой литоральный грунт разного гранулометрического состава, который определяется по принципу преобладающей фракции (составляющей более 50%). В большинстве своем это смешанные песчано–гравийные–илистые осадки, соотношение фракций в которых обусловлено местом их седиментации.

ПП1 – в п. Кереть, губа Лебяжья (66°17'34.8" N 33°35'32.4" E) согласно классификации И.П. Бреслиной (1980), представлена песчано–каменистым рядом характерным для крутых литоралей, не защищенных от волнобоя. Грунт несортированный песчаный с прослойками камней, характеризуется подвижностью. Береговая полоса, формируемая приливной волной, ступенчато или валобразно приподнята над литоралью, характерен галечный песчано–глинистый субстрат, соотношение галка:песок:глина составляет 50/20/30. Соленость морской воды в отлив 20‰. Общее видовое богатство изученных сообществ на участке составляет 15 видов: *Triglochin maritima*, *Aster tripolium*, *Plantago maritima*, *Glaux maritima* L., *Potentilla anserina* ssp. *egedii* Wormsk., *Juncus atrofuscus* Rupr., *Agrostis straminea* Hartm., *Juncus atrofuscus* Rupr., *Festuca rubra* L., *Carex subspathacea* Wormsk. ex Hornem., *Alopecurus arundinaceus* Poir., *Ruppia maritima* L., *Fucus vesiculosus* L., *Fucus distichus* L., *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis.

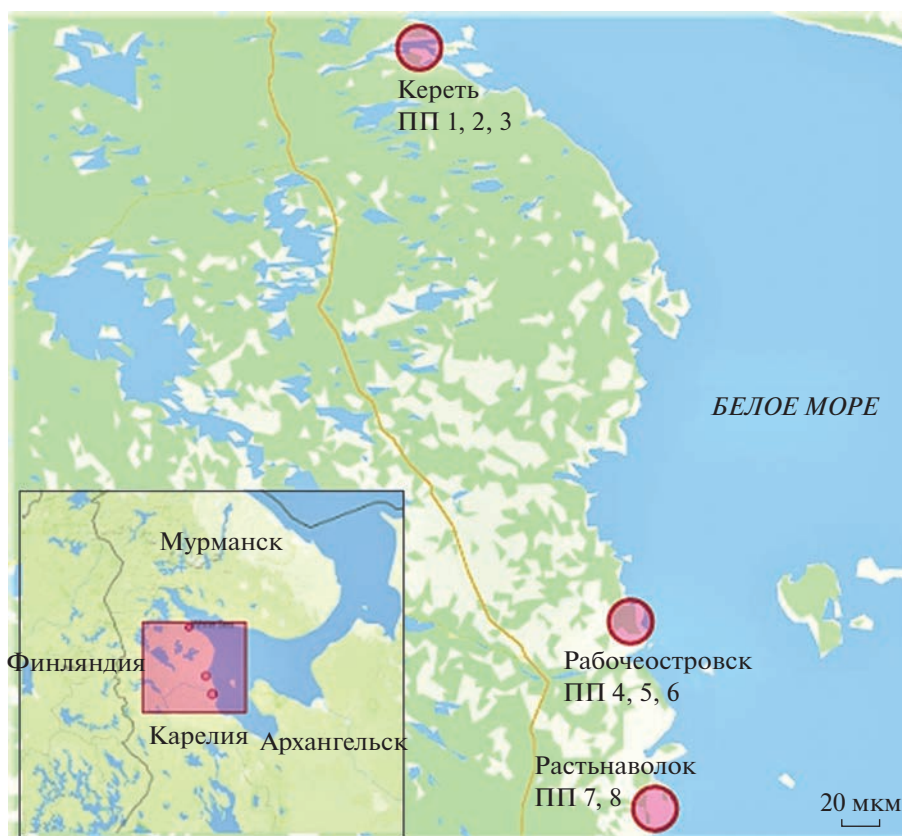


Рис. 1. Расположение пробных площадей на литорали Белого моря.

ПП2 – окрестности п. Кереть, выход из губы Лебяжья ($66^{\circ}17'34.8''$ N $33^{\circ}36'30.4''$ E), супесчаный ряд характерный для обширных пологих литоралей, достаточно защищенных от волнобоя губ, представлен глинисто–песчаный субстратом с незначительной долей гальки – 10/25/65. Соленость морской воды в отлив 7‰. Общее видовое богатство изученных сообществ близко к ПП1.

ПП3 – окрестности п. Кереть, вход в губу Керетскую ($66^{\circ}17'26.9''$ N $33^{\circ}36'35.3''$ E) грунт литорали песчаный или каменисто–песчаный, слегка заиленный. Соотношение глина:песок:галька в грунте составляет 30/50/20. Соленость морской воды в отлив 0‰. Общее видовое богатство изученных сообществ близко к ПП1.

ПП4 – окрестности поселка Рабочееостровск, западная часть о. Октябрьской революции – $65^{\circ}00'37.3''$ N $34^{\circ}48'10.6''$ E, расположена на пологом илисто–песчаном берегу с наличием валуно–галечниковых скоплений (размер валунов от 30 до 50 см) в средней части литорали. Соленость морской воды в отлив 24‰. От коренного берега до линии уреза воды маршевая примитивная супесчаная оторфованная почва сменялась маршевой примитивной супесчаной оглеенной и далее переходила в супесчаный литоральный грунт. Общее видовое богатство изученных сообществ со-

ставляет 20 видов: *Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium*, *Ruppia maritima* L., *Zostera marina*, *Eleocharis uniglumis* (Link) Schult., *Carex mackenziei* V. I. Krecz., *Atriplex nudicaulis* Boguslaw., *Alopecurus arundinaceus*, *Leymus arenarius* (L.) Hochst., *Ligusticum scoticum* L., *Cenolophium fischeri* W.D.J.Koch, *Archangelica litoralis* C. Agardh, *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla, *Juncus gerardii* ssp. *atrofusculus*, *Stellaria humifusa* Rottb., *Glaux maritima*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*, *Ascophyllum nodosum*.

ПП5 – окрестности поселка Рабочееостровск, восточный берег о. Октябрьской революции – $64^{\circ}59'43.2''$ N $34^{\circ}47'35.0''$ E. Илесто–песчаный берег завалунен, встречаются как крупные (1.5 метра), так и более мелкие валуны (около 60 см). Соленость морской воды в отлив 23‰. Грунт песчаный оглеенный литоральный. Общее видовое богатство изученных сообществ составляет на 13 видов: *Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium*, *Zostera marina*, *Carex mackenziei*, *Carex recta* Boott, *Carex subspathacea*, *Glaux maritima*, *Potentilla egedei*, *Stellaria humifusa* Rottb., *Sonchus humilis* N.I. Orlova, *Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*.

ПП6 – в поселке Рабочееостровск район порта – $64^{\circ}59'29.5''$ N $34^{\circ}47'19.4''$ E, расположена на скалистых выступах берегов, обнажающихся в отлив (луды). Поверхность осушки нередко покрыта

морскими выбросами и нанесенным приливами мусором (древесные остатки с металлическими гвоздями, пластиковые пакеты, битое стекло и др.). Соленость морской воды в отлив 26‰. Грунт слоистый заиленный песчаный литоральный. Общее видовое богатство изученных сообществ составляет 13 видов: *Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium*, *Eleocharis uniglumis*, *Puccinellia maritima* (Huds.) Parl., *Carex recta*, *Alopecurus arundinaceus*, *Sonchus humilis*, *Vicia cracca* L., *Leymus arenarius* (L.) Hochst., *Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*, *Ascophyllum nodosum*.

III7 – окрестности поселка Растьнаволок – 64°34'49.3" N 34°54'57.5" E. Исследованная территория представляет собой литоральную зону побережья с устьем небольшого ручья. Эстуарная зона (шириной 180 м) простирается до мористого каменистого вала, перекрытого песчано–илистыми отложениями. Соотношение глина:песок:галька в грунте составляет 20/20/60. Соленость морской воды в отлив 17‰. Общее видовое богатство изученных сообществ представлено 17 видами: *Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium*, *Zostera marina*, *Glaux maritima*, *Ruppia maritima* L., *Carex mackenziei*, *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla., *Juncus atrofuscus* Rupr., *Eleocharis uniglumis* (Link) Schult., *Alopecurus arundinaceus*, *Sonchus humilis*, *Atriplex nudicaulis* Boguslaw., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*, *Ascophyllum nodosum*.

III8 – окрестности поселка Растьнаволок – 64°36'19.3" N 34°58'23.4" E. Грунт песчаный оглеенный литоральный. Соотношение песок:галька в грунте составляет 90/10. Соленость морской воды в отлив 20‰. Общее видовое богатство изученных сообществ составляет 17 видов: *Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium*, *Zostera marina*, *Ruppia maritima*, *Lathyrus aleuticus* (Greene) Pobed., *Atriplex nudicaulis*, *Elytrigia repens* L., *Glaux maritima*, *Cenolophium fischeri*, *Calamagrostis canescens* (Weber) Roth, *Ligusticum scoticum*, *Polygonum aviculare* L., *Rumex crispus* L., *Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*, *Ascophyllum nodosum*.

Донные отложения Белого моря характеризуются наличием коричневого или черного окисленного слоя миллиметровой толщины в грунтах, обогащенного оксигидроксидами марганца и железа. Этот слой подстилается плотными серыми алевроитово–пелитовыми илами. Содержание железа Fe(III) в этом слое может достигать до 7.5%. (Розанов, Волков, 2009).

Объекты исследования

Объекты исследования – виды приморского галофитного комплекса триостренник морской (*Triglochin maritima* L.), подорожник морской (*Plantago maritima* L.), астра солончаковая или морская

(*Aster tripolium* L.) и взморник морской (*Zostera marina* L.)

Triglochin maritima – относится к семейству Ситниковидные (*Juncaginaceae*) эвгалофит, евразийский бореальный вид; травянистый поликарпик; подземно–столонное слабо–розеточное растение, образующее небольшие дерновины с толстым корневищем, являющийся пионером зарастания илистых маршевых осушек. Листья триостренника морского прикорневые, мясистые, узколинейные, желобчатые, с параллельным жилкованием, покрыты слоем кутикулы. Мезофилл имеет центрическое строение. В центре листовой пластинки образуется аэренхима с крупными межклетниками.

Plantago maritima представитель семейства Подорожниковые (*Plantaginaceae*) эвгалофит, евразийский гипоарктический вид; травянистый поликарпик; многолетник с моноподиальным корневищем и разветвленным и партикулирующим каудексом. Предпочитает осушки, защищенные от волновой эрозии. Листья подорожника морского собраны в прикорневую розетку, мясистые, узколанцетные, цельные или по краю редкозубчатые, покрыты слоем кутикулы. Мезофилл листа изопалисадный, слабо дифференцирован на палисадный и губчатый мезофилл. Хорошо развита водозапасающая паренхима листа (Гуляева и др., 2016).

Aster tripolium относится к семейству Астровые (*Asteraceae*), эвгалофит, евроазиатский бореальный вид. Двулетнее травянистое растение с ветвистым, только в верхней части полым стеблем. Листья широколанцетные, цельные, прилегающие к стеблю. Мезофилл листа дифференцирован на полисадный и губчатый мезофилл. Астра имеет хорошо развитое короткое корневище. Растение предпочитает илистые осушки в устьях всех рек и является пионером при их зарастании.

Zostera marina представитель семейства Взморниковые (*Zosteraceae*), вторично–водное растение, облигатный травянистый гидрофит, полностью погруженный в морскую воду, прикрепленный безрозеточный, корневище длинное ползучее. В листе хорошо развит губчатый мезофилл с аэренхимой. В северных широтах обитает на мелководьях или на глубине 1–4 м (редко 10 м и более), преимущественно на мягком песчаном или илистом дне в спокойных водах бухт и заливов (Сергиенко и др., 2015).

Растения не имели внешних признаков токсического действия железа (хлорозы, некрозы, пятна).

Методы исследования

Определение солености воды проводили рефрактометром RHS-10АТС.

Содержание железа определяли атомно–абсорбционным методом (атомно–абсорбционный

Таблица 1. Содержание железа (мг/л) в морской воде, выбросах и грунтах (мг/кг сух. массы) пробных площадей на литорали Белого моря

| Пробная площадь | Fe, мг/л вода | Отношение к ПДК | Минерализация, вода, г/л | Соленость вода, ‰ | Fe, мг/кг штормовые выбросы | Fe, мг/кг грунты |
|-------------------------------|---------------|-----------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| п. Кереть | | | | | | |
| ПП1 | 0.16 ± 0.001 | 3.2 | 13.46 | 20 | 5789.9 ± 125 | 16 131.25 ± 3525.12 |
| ПП2 | 0.14 ± 0.001 | 2.8 | 12.48 | 7 | 5272.5 ± 541 | 9149.45 ± 2014.80 |
| ПП3 | 0.28 ± 0.002 | 5.6 | 1.14 | 0 | 8414.7 ± 210 | 11 794.26 ± 3112.10 |
| п. Рабочееостровск | | | | | | |
| ПП4 | 0.32 ± 0.017 | 6.4 | 12.4 | 24 | 10215.3 ± 1584 | 9534 ± 2532.39 |
| ПП5 | 0.04 ± 0.0001 | 0.8 | 7.8 | 23 | 9481.4 ± 874 | 10 111 ± 1172.81 |
| ПП6 | 0.05 ± 0.0001 | 1 | 11.8 | 26 | 8254.2 ± 327 | 13426 ± 1124.40 |
| п. Растьнаволок | | | | | | |
| ПП7 | 0.06 ± 0.0001 | 1.2 | 27.6 | 17 | – | 6011.96 ± 980.14 |
| ПП8 | 0.13 ± 0.001 | 2.6 | 26.1 | 20 | – | 13791.62 ± 8598.94 |
| ПДК ¹ морская вода | 0.05 мг/л | | | | | |
| Фон морская вода | 0.01 мг/л | | | | | |

1 – Приказ министерства сельского хозяйства РФ от 13 декабря, 2016 г., № 552 // Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. ПДК – предельно допустимая концентрация железа в морской воде.

спектрофотометр AA–7000 (Shimadzu, Япония) на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”. В работе представлены валовые средние арифметические значения содержания железа в грунтах, корневищах, надземных органах, целом растении и морской воде. Перед проведением количественного анализа проводили десорбцию металла с поверхности растений (корневища, листья, стебли промывали дистиллированной водой). Грунт отбирали как отдельно вне обитания растений, так и в зоне непосредственного существования корней для расчета коэффициента биологического поглощения (КБП). Расчет содержания железа производили на сухую массу грунтов, выбросов и частей растений.

Коэффициент биологического поглощения металлов рассчитывали, как отношение содержания железа в растении к сумме его содержания в воде и грунте. КБП металлов характеризует способность растений поглощать тяжелые металлы из среды. Считается, что если коэффициент больше единицы, то растение активно накапливает металлы. Растения галофиты отбирали в средней ча-

сти литорали на каждой пробной площади ($n = 5$) и делили на подземную (корневище, корни) и надземную часть (стебель, листья, соцветия).

Статистическая обработка данных. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия Фишера (Fisher's LSD test), и корреляционного анализа с учетом объема сравниваемых совокупностей и порога доверительной вероятности 0.95 (программа Statgraphics 2.1 для Windows).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание железа в морской воде карельского берега Белого моря представлено в табл. 1. Фоновое содержание железа в морской воде составляет 0.01 мг/л, ПДК 0.05 мг/л. Морская вода загрязнена железом на всех пробных площадях от 0.8 до 6.4 значения ПДК. Наибольшее загрязнение установлено в районе п. Рабочееостровск на ПП4.

Почвы и грунты литорали карельского берега Белого моря содержат от 6000 до 16000 мг/кг железа. По сравнению с лесными почвами это невысокие значения. Содержание железа в штормовых выбросах Белого моря в среднем составляло 7904 мг/кг.

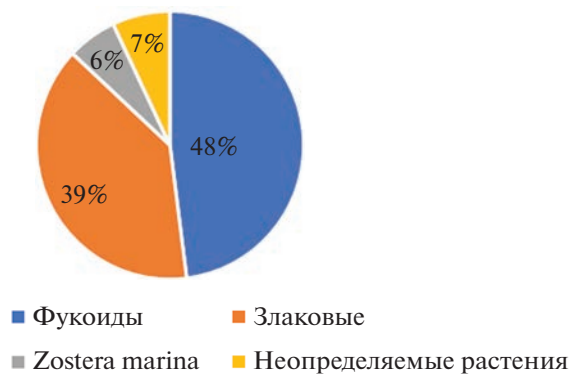


Рис. 2. Состав штормовых выбросов литорали Белого моря в районе п. Кереть и п. Рабочеостровск.

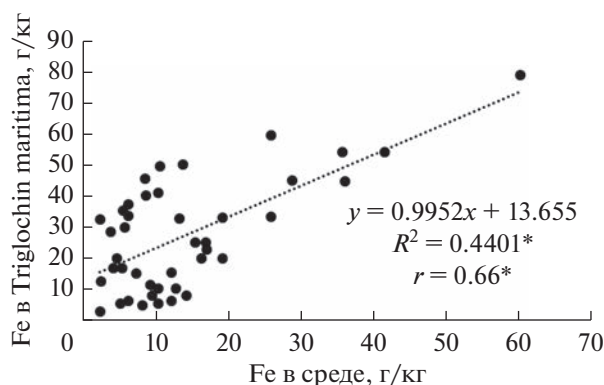


Рис. 3. Зависимость содержания железа у *Triglochin maritima* (г/кг сух. массы) от уровня содержания железа в среде обитания (грунт + вода морская, г/кг).

Состав выбросов литорали представлен на рис. 2. Основная масса выбросов представлена бурыми водорослями *Fucus* sp. 48% (*Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*), на втором месте растения из сем. *Poaceae* (злаки) 39%, остатки взморника морского (*Zostera marina*) составляют 6%.

Галофиты обитали в условиях загрязненной железом морской воды и незначительным содержанием железа в литоральном грунте. Анализ накопления данного металла корневищами, надземной массой и целым растением триостренника морского, подорожника морского, астры солончаковой и взморника морского представлен в табл. 2.

Триостренник морской обитал на всех пробных площадях карельского берега Белого моря. Среднее содержание железа в целом растении триостренника составляло 35.94, 33.41 г/кг в корневище и 2.52 г/кг в надземных органах триостренника. Подземные органы накапливают 93% железа от его общего содержания в целом растении триостренника. Минимальное количе-

ство железа у триостренника выявлено в районе п. Кереть на ПП3 – 12.15 г/кг, а максимальное 71.63 г/кг в районе п. Рабочеостровск на ПП6.

Коэффициент биологического поглощения железа триостренником в среднем на пробных площадях был равен 4.64 целым растением, 0.30 надземными органами и 4.34 корневищем. Максимальный КБП был 11.62 у триостренника на ПП4 в районе поселка Рабочеостровск. На рис. 3 представлен график зависимости содержания железа в целом растении триостренника морского в зависимости от уровня железа в среде обитания (грунте и морской воде). Коэффициент корреляции средний 0.66. Установлено, что наиболее часто растения триостренника депонируют до 50 г/кг железа при уровне металла в среде до 20 г/кг. Также зафиксированы единичные случаи накопления триостренником железа от 45 до 60 г/кг при его уровне в среде от 25 до 80 г/кг.

Подорожник морской собран на литорали в районе п. Кереть и п. Рабочеостровск. Среднее накопление железа на ПП1–ПП6 составляло 21.32 г/кг целым растением, 19.68 г/кг корневищем и 1.65 г/кг надземными органами подорожника. Максимальное количество железа в растениях было встречено на ПП6, п. Рабочеостровск – 60.40 г/кг. 92% железа накапливали корневища растений. КБП железа подорожником были ниже, чем у триостренника в среднем 1.31 для целого растения, 1.17 для подземных и 0.15 для надземных органов. На литорали ПП4 КБП железа был максимальным 3.18.

Астра солончаковая проанализирована на литорали только в п. Рабочеостровск. Среднее содержание железа в астре установлено на уровне 22.90 г/кг в целом растении, 21.17 – в корневищах и 1.73 в надземных органах астры. Максимальное количество металла астра накапливала на ПП6 – 32.90 г/кг. Также как и у других видов растений 93% железа накапливалось в корневищах астры солончаковой. КБП для целого растения астры составлял 1.90, для подземных 1.76, для надземных органов – 0.13.

Взморник морской исследован только на литорали в районе п. Рабочеостровск. В надземных органах содержание железа составило 10.60–19.33 г/кг. Анализ корневищ взморника не проводился. КБП железа надземной частью взморника составил 1.43–1.54.

Таким образом, исследованные галофиты литорали карельского берега Белого моря активно накапливали (КБП > 1) очень высокие уровни железа от 6.49 до 71.63 г/кг, в основном подземными органами растений до 93% железа от общего его содержания в растениях.

Таблица 2. Содержание (г/кг сух. массы) и коэффициент биологического поглощения (КБП) железа в растениях на литорали Белого моря *Triglochin maritima* L.

| Fe г/кг | п. Кереть | | | п. Рабочееостровск | | | п. Расть-наволоок | | | ПП1-ПП8 | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|---------|-------|
| | ПП1 | ПП2 | ПП3 | ПП4 | ПП5 | ПП6 | ПП7 | ПП8 | М | min | max |
| M _{раст} | 29.45 ± 1.8 | 19.47 ± 2.1 | 12.15 ± 0.9 | 48.07 ± 3.6 | 35.27 ± 2.7 | 71.63 ± 6.8 | 37.48 ± 2.9 ^c | 33.96 ± 2.7 ^c | 35.94 100% | 12.15 | 71.63 |
| M _{надз} | 4.83 ± 0.3 | 2.50 ± 0.9 ^a | 2.40 ± 0.8 ^a | 1.00 ± 0.2 ^b | 1.53 ± 0.1 ^b | 1.67 ± 0.3 ^d | 1.37 ± 0.2 ^d | 4.88 ± 0.5 | 2.52 7% | 1.00 | 4.88 |
| M _{подз} | 24.62 ± 2.6 | 16.98 ± 1.1 | 9.75 ± 2.7 | 47.07 ± 3.9 | 33.74 ± 3.2 | 69.96 ± 7.4 | 36.11 ± 4.0 | 29.08 ± 1.5 | 33.41 93% | 9.75 | 69.96 |
| КБП _{раст} | 1.91 | 3.14 | 0.86 | 11.62 | 2.76 | 5.23 | 6.09 | 5.53 | 4.64 | 0.86 | 11.62 |
| КБП _{надз} | 0.31 | 0.40 | 0.17 | 0.24 | 0.12 | 0.12 | 0.22 | 0.79 | 0.30 | 0.12 | 0.79 |
| КБП _{подз} | 1.60 | 2.74 | 0.69 | 11.38 | 2.64 | 5.11 | 5.87 | 4.73 | 4.34 | 0.69 | 11.38 |
| <i>Plantago maritima</i> L. | | | | | | | | | | | |
| Fe г/кг | п. Кереть | | | п. Рабочееостровск | | | п. Рабочееостровск | | | ПП1-ПП6 | |
| | ПП1 | ПП2 | ПП3 | ПП4 | ПП5 | ПП6 | ПП6 | ПП6 | М | min | max |
| M _{раст} | 25.29 ± 1.2 | 6.49 ± 1.2 ^a | 8.27 ± 0.8 ^a | 17.02 ± 2.6 | 10.47 ± 3.4 | 60.40 ± 6.5 | 60.40 ± 6.5 | 60.40 ± 6.5 | 21.32 100% | 6.49 | 60.40 |
| M _{надз} | 2.96 ± 0.5 | 2.42 ± 0.9 ^b | 2.37 ± 0.6 ^b | 0.76 ± 0.1 ^d | 1.03 ± 0.9 ^d | 0.36 ± 0.2 | 0.36 ± 0.2 | 0.36 ± 0.2 | 1.65 8% | 0.36 | 2.96 |
| M _{подз} | 22.33 ± 2.3 | 4.08 ± 0.8 ^a | 5.90 ± 0.9 ^a | 16.26 ± 2.9 | 9.44 ± 2.7 | 60.05 ± 8.4 | 60.05 ± 8.4 | 60.05 ± 8.4 | 19.68 92% | 4.08 | 60.05 |
| КБП _{раст} | 1.50 | 0.54 | 0.87 | 3.18 | 1.02 | 0.76 | 0.76 | 0.76 | 1.31 | 0.54 | 3.18 |
| КБП _{надз} | 0.18 | 0.20 | 0.25 | 0.14 | 0.10 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.15 | 0.01 | 0.25 |
| КБП _{подз} | 1.32 | 0.34 | 0.62 | 3.04 | 0.92 | 0.76 | 0.76 | 0.76 | 1.17 | 0.34 | 3.04 |
| <i>Aster tripolium</i> L. | | | | | | | | | | | |
| Fe г/кг | п. Рабочееостровск | | | п. Рабочееостровск | | | п. Рабочееостровск | | | М | |
| | ПП4 | ПП5 | ПП6 | ПП4-ПП6 | ПП4 | ПП5 | ПП4 | ПП5 | М | ПП4-ПП5 | М |
| M _{раст} | 20.28 ± 0.7 | 15.50 ± 2.0 | 32.90 ± 2.6 | 22.90 100% | — | — | — | — | 22.90 100% | — | — |
| M _{надз} | 2.56 ± 0.3 | 1.16 ± 0.2 ^a | 1.47 ± 0.3 ^a | 1.73 7% | 10.60 ± 1.5 | 19.33 ± 1.8 | 10.60 ± 1.5 | 19.33 ± 1.8 | 1.73 7% | — | 14.96 |
| M _{подз} | 17.73 ± 1.5 ^b | 14.35 ± 1.5 ^b | 31.43 ± 5.0 | 2.1.17 93% | — | — | — | — | 2.1.17 93% | — | — |
| КБП _{раст} | 1.06 | 2.13 | 2.50 | 1.90 | — | — | — | — | 1.90 | — | — |
| КБП _{надз} | 0.13 | 0.16 | 0.11 | 0.13 | 1.54 | 1.43 | 1.54 | 1.43 | 0.13 | 1.48 | 1.48 |
| КБП _{подз} | 0.93 | 1.98 | 2.39 | 1.76 | — | — | — | — | 1.76 | — | — |

Примечание. М – среднее арифметическое значение, min – минимальное значение, max – максимальное значение содержания железа, подз – в корневищах, надз – в надземных органах, раст – в целом растении. ПП – пробные площади. Сравнивали содержание железа в растениях по пробным площадям (в колонках), значения с одинаковыми латинскими буквами (a, b, c, d) достоверно не отличаются согласно $p \leq 0.05$ Fisher's LSD test.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На карельском берегу Белого моря в районе поселков Кереть, Рабочеостровск и Растьяново обитают растения эугалофиты триостренник морской, подорожник морской, астра солончаковая и взморник морской. Нами установлено, что содержание железа в почвах и грунтах литорали невелико (от 6 000 до 16 000 мг/кг). Для сравнения: кларк железа по Виноградову в земной коре 4.6% или 46500 мг/кг (Виноградов, 1957). Серые лесные почвы Карелии содержат в среднем 17000–20000 мг/кг железа (Федорец и др., 2015). Штормовые выбросы литорали, состоящие в основном из бурых водорослей *Fucus* sp. и растений из сем. *Rosaceae*, содержали до 10000 мг/кг железа, что довольно значительно для растений. Известно, что при разложении органического вещества, например, штормовых выбросов, железо может накапливаться в органогенных горизонтах маршевых почв и литоральных грунтов и возвращаться в биогеохимический цикл с побережья в океан (Добровольский, 1998).

Железо – один из распространенных элементов в литосфере. Его содержание в земной коре достигает 5.1%, это четвертое место после кислорода (49.4%), кремния (28.6%) и алюминия (8.32%). Главными источниками накопления железа в почвах являются первичные минералы почвообразующих пород. В результате выветривания и почвообразования железо из них высвобождается и переходит в коллоидальные окисленные и восстановленные соединения особенно во вторичные (глинистые) минералы. Из аморфного железа, появляющегося в результате разрушения первичных и вторичных минералов, образуются такие гидроокисные минералы, как гематит, гетит, маггемит и др. Гидрооксид железа может образовывать с органическими кислотами подвижные формы комплексных соединений, способных перемещаться по профилю почвы. Одной из важных особенностей железа для генезиса почв является его способность менять валентность. Присутствие железа в почвах в виде Fe^{3+} и Fe^{2+} обуславливается почвенными режимами. В аэробных условиях оно трехвалентно (Fe_2O_3 – практически нерастворимый в почвенных водах оксид), а в анаэробных – двухвалентно (FeO – наиболее растворим и подвижен) (Водяницкий, 2003). Существуют следующие формы железа в донных отложениях литорали: Fe_2O_3 , FeO , $FeSxH_2O$ (гидротроилит), FeS_2 (пирит), $Fe(OH)_3$ (продукт анаэробной денитрификации), органические гуматные формы, которые поступают с речными стоками и формируются в процессе осадконакопления (Розанов, Волков, 2009).

Морская вода в районе исследования значительно загрязнена железом (0.04–0.32 мг/л) до 6.4 ПДК. Наибольшее содержание железа в морской воде установлено в районе п. Рабочеостровск

на ПП4, западной части острова Октябрьской революции. Вероятно, существует несколько причин такого высокого его уровня в морской воде Белого моря: 1 – повышенный природный фон железа в донных отложениях; 2 – интенсивный поток металла со стоковыми течениями рек. Донные отложения Белого моря характеризуются наличием коричневого или черного окисленного слоя миллиметровой толщины в грунтах, обогащенного оксигидроксидами марганца и железа, этот слой подстилается плотными серыми алевритово–пелитовыми илами. Так, содержание железа $Fe(III)$ в этом слое может достигать до 7.5%, что в полтора раза превышает средние концентрации железа в земной коре (Розанов, Волков, 2009). А высвобождение железа из отложений континентального шельфа является ключевым источником как растворенного, так и взвешенного железа в морских районах (Lenstra *et al.*, 2018). Известно, что содержание растворенного железа в иловой воде подповерхностных горизонтов донных отложений Белого моря составляет 20 мкМ, что является значительной величиной (Розанов, Волков, 2009). В бассейн Белого моря входят крупные реки Онега, Северная Двина, Кемь, Нижний Выг, Верхний Выг, Кереть. Объем сброса сточных вод в поверхностные водные объекты бассейна Белого моря в 2019 г. составил 73.87 млн m^3 (в 2018 г. – 70.13 млн m^3), в том числе 14.98 млн m^3 сточных вод хвостохранилища горнодобывающего предприятия ОАО “Карельский окатыш”, добывающего железную руду. В сточных водах комбината железо составляет 0.043–0.101 мг/л (Terebova *et al.*, 2017). Среди загрязняющих веществ, сброшенных в водные объекты бассейна Белого моря в 2019 г., железо составляет 30.51 т. Помимо техногенного поступления металлов с течениями рек в воды Белого моря, высокий уровень железа обусловлен природными факторами. Это особенности водосборного бассейна Белого моря, заключающиеся, в первую очередь, в широком распространении болот и поступлении в реки подземных вод. Например, в стоках Северной Двины установлено 0.289–0.453 мг/л железа (2015–2019 гг.). Это в 5 раз выше фоновой концентрация Fe (0.066 мг/л) в реках мира (Джамалов и др., 2019; Gordeev *et al.*, 2021). В результате общий поток железа с водами рек в Белое море составляет до 150 мкМ/(m^2 сут) (Пахомова и др., 2004), по другим данным до 5 мг/л морской воды (Rozanov *et al.*, 2006).

В условиях описанного выше присутствия железа в среде обитания, растения галофиты литорали карельского берега Белого моря активно накапливали данный металл от 6.49 до 71.63 г/кг. Считается, что критический уровень железа, вызывающий токсический эффект у растений, составляет от 500 мг/кг (0.5 г/кг) (Pendias, 2010). Средние уровни железа у некоторых видов растений представлены в табл. 3. В условиях ненарушен-

Таблица 3. Содержание железа (мг/кг) у растений в ненарушенных условиях обитания

| Вид растения | орган | условия обитания | Содержание, мг/кг | Источник |
|--------------------------------|----------------|---|-------------------|--------------------------|
| <i>Pinus sylvestris</i> L. | Хвоя | Ненарушенный фитоценоз, Республика Карелия | 50–180 | Теребова, 2002 |
| <i>Picea obovata</i> Ledeb. | Хвоя | Ненарушенный фитоценоз, Мурманская область | 10–30 | Теребова, 2002 |
| <i>Betula pendula</i> Roth | Лист | Ненарушенный фитоценоз, Республика Карелия | 300–500 | Галибина, Теребова, 2014 |
| <i>Plantago major</i> L. | Лист | Естественная флора центральной России | 1120.4 ± 50.0 | Свириденко, Пырх, 2016 |
| <i>Achillea millefolium</i> L. | Лист | | 312.5 ± 10.0 | |
| <i>Zostera marina</i> L. | Лист | Северный Каспий | 200–300 | Имантаев и др., 2020 |
| <i>Hordeum vulgare</i> L. | Корень + побег | Выращивание на дерново-подзолистой почве (контроль) в лабораторных условиях | 112 ± 11 | Якконен, 2009 |
| <i>Zea mays</i> L. | Корень + побег | | 400 ± 76 | |

ной среды обитания и контрольного лабораторного выращивания содержание железа в растениях значительно ниже, чем в галофитах литорали. Так, в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) может накапливаться железа до 180 мг/кг, ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) до 30 мг/кг (Теребова, 2002), в листе березы повислой (*Betula pendula* Roth) до 500 мг/кг (Галибина, Теребова, 2014), в целом растении кукурузы сахарной (*Zea mays* L.) – 400 мг/кг (Якконен, 2009). Также известно, что галофиты *Salicornia europaea* L., *Suaeda maritima* (L.), *Salsola soda* L. и *Halimione portulacoides* (L.) Aellen с засоленных морских территорий могут накапливать до 2.3 г/кг железа всем растением и в корнях 1.3 г/кг (Milić *et al.*, 2012). Считается, что если растение накапливают металл до значений более чем, 1000 мг/кг (1000 мкг/г, 1 г/кг), то его относят к гипераккумуляторам, а если до значений <500 мг/кг – то к не гипераккумуляторам или вторичным аккумуляторам этого металла (Naila *et al.*, 2019). Растения гипераккумуляторы должны накапливать металлы в надземных органах в больших концентрациях, чем в корнях (Krämer, 2010). Виды галофитов, изученные нами, накапливают железа в 13–43 раза выше критического уровня растений. Их по праву можно назвать “железными” растениями. Следует отметить, что у исследованных галофитов основное накопление железа (до 93%) происходит в корневищах. Это связано с тем, что галофиты многолетние корневищные растения, надземная масса растений обновляется каждый год, а корневище зимует на литорали и много лет депонирует металлы. Однако содержание железа в надземных органах соответствует уровню гипераккумуляции металлов у растений (>1 г/кг) и установлено в диапазоне для *Triglochin maritima* 1.00–4.88 г/кг, *Plantago maritima* 0.36–2.69 г/кг, *Aster tripolium* 1.16–2.56 г/кг и

Zostera marina 1.93–1.54 г/кг (табл. 2). Некоторые авторы отмечают гипераккумуляцию металлов в подземных органах растений на фоне невысоких концентраций в листьях. Например, было установлено, что корни псевдометаллофита *Agrostis tenuis* Sibth., обитающего в зоне действия металлургического производства, содержат более высокие концентрации меди и свинца по сравнению с листьями в 85 раз (Dahmani-Muller *et al.*, 2000).

В целом, у растений существуют молекулярные механизмы детоксикации тяжелых металлов. К ним относятся связывание ионов металлов клеточной стенкой (Terebova *et al.*, 2020), хелатирование металлов в цитозоле, антиоксидантные защитные механизмы (Bose *et al.*, 2014) и связывание металлов в вакуолях (Gargouri *et al.*, 2013, Kushwaha *et al.*, 2016). Токсическое действие ионов металлов в цитозоле может быть устранено специфическим высокоаффинным лигандами, такими как фитохелатины (PC) (Zhang *et al.*, 2010), растворимые белки (Luo *et al.*, 2011) и пролин (Wali *et al.*, 2016, Liang *et al.*, 2017). Например, у галофита *Suaeda salsa* (L.) Pall. был обнаружен ген фитохелатинсинтазы (PCS) – основного фермента синтеза фитохелатинов у растений. Он имел большую экспрессию в корнях, чем в листьях, которая при этом усиливалась при действии свинца и ртути (Song *et al.*, 2016). На 7%, оставшихся в надземных органах галофитов, приходится содержание железа на уровне 1.65–2.52 г/кг, что также в 3–5 раз превышает критический уровень у растений. Эти данные подтверждаются и КБП растений галофитов. Коэффициенты биологического поглощения показывают во сколько раз содержание элемента в растении больше, чем в среде обитания. Нами установлено, что КБП железа растениями литорали корнями и целым растением больше 1.

Наибольшие значения коэффициентов были у триостренника морского (КБП_{сред} 4.64 и КБП_{max} 11.62).

Существует две стратегии поглощения железа растениями из внешней среды (I и II). Для двудольных и не злаковых однодольных растений характерна стратегия I. Она заключается в образовании в корне растений хелатных комплексов из органических кислот и ионов железа, которые при попадании на плазмалемму восстанавливаются из Fe³⁺ в Fe²⁺ с помощью Fe-хелатредуктазы (кодируется генами FRO1 и FRO2). Затем Fe²⁺ – транспортер (белок AtIRT1 из семейства ZIP-белков) переносит железо через плазматическую мембрану клеток корня (Lucena, 2017).

В хорошо аэрируемых почвах железо недоступно для растений из-за низкой растворимости оксидов и солей железа в воде. Чтобы сделать доступным нерастворимое железо в почве, корни растений проводят ацидофикацию среды, выделяя в ризосферу первичные метаболиты – цитраты и малаты, а также вторичные метаболиты – фенолы и флавины (Lucena, 2017). После попадания железа в клетки корня, оно транспортируется по растению в хелатной форме. Сначала происходит загрузка металла в ксилему, затем во флоэму, и железо транспортируется по ним. В перичикле корня *Arabidopsis thaliana* выявлен белок FRD3, участвующий в транспорте комплекса Fe³⁺ с цитратом в сосуды ксилемы (Durrett *et al.*, 2007). После происходит разгрузка этих тканей, и уже по симпласту железо направляется к месту “спроса”. Показана роль белков AtYSL1, AtYSL2 и AtYSL3 в транспорте железа из апопласта в симпласт. (Conte, Walker, 2011). Главными потребителями железа в растительной клетке являются хлоропласты и митохондрии. 80–90% всего железа находится именно в хлоропластах. У растений известны хлоропластный транспортер железа – протеин PIC1, ответственный за распределение железа внутри хлоропласта, и протеин FRO7 – железо-хелатредуктаза, выполняющая перевод железа из транспортной формы. Они также локализованы в хлоропластах. Растения-мутанты *Arabidopsis thaliana* с выключенным геном FRO7 демонстрировали сильный хлороз и нарушение фотосинтеза, а содержание железа в них падало приблизительно на 33% (Kobayashi, Nishizawa, 2012). В рамках механизмов детоксикации металлов, металлы депонируются в вакуоль для снижения токсичного влияния на клетки растений (Zhang *et al.* 2010; Gargouri *et al.*, 2013; Kushwaha *et al.*, 2016). Однако эти металлы могут потребоваться растению во время роста. У *Arabidopsis thaliana* идентифицированы протеины AtNRAMP3 и AtNRAMP4, локализованные в тонопласте. Их основная функция – мобилизация вакуолярных запасов железа во время прорастания (Conte, Walker, 2011). Вакуолярный переносчик железа 1 (VIT1) *Arabidopsis thaliana*

переносит железо из цитозоля обратно в вакуоль. Известно, что цинк может вытеснять железо с его сайтов связывания, вызывая тем самым искусственно дефицит железа. Протеин MTP3 (Metal Tolerance Protein 3) *Arabidopsis thaliana* специфичен к цинку и активно экспрессируется во время дефицита железа и переносит цинк в вакуоли, изолируя его в них (Kobayashi, 2012). У растений большой пул железа находится в апопласте и в виде железных бляшек на поверхности корня. Апопласт и железные бляшки могут быть как источником железа во время дефицита, так и “стоком” для излишнего железа во время его избытка. Ремобилизация железа из подобных запасов может проходить с помощью фенолов, которые образуют хелаты, тем самым растворяя железо и облегчая его перенос в ксилему (Kobayashi, Nishizawa, 2012). Нами ранее было показано, что клеточная стенка корня триостренника морского и подорожника морского характеризуется высокой ионообменной способностью (Terebova *et al.*, 2020), и может связывать железо.

Растения литорали подвергаются действию приливно-отливной динамики моря. Во время прилива они постепенно полностью заливаются морской водой в среднем на 3–4 часа два раза в сутки. В это время растения испытывают условия пониженной аэрации – гипоксии, поток кислорода в морской воде 10–50 мМ/м² сут (Розанов, Волков, 2009) и в среднем содержание кислорода в морской воде Белого моря составляет 0.0007–0.001% (Качество морских..., 2021). Можно предположить, что в условиях гипоксии при заливании морской водой для растений галофитов становится более доступным железо Fe²⁺ из FeO комплексов литоральных грунтов, чем Fe³⁺ (FeO более подвижен и растворим в воде, чем Fe₂O₃) и непосредственно железо уже растворенное в морской воде, которое галофиты активно поглощают подземными органами согласно известной стратегии I поглощения металла.

Таким образом, активное депонирование железа галофитами литорали Белого моря связано с повышенным содержанием железа в морской воде Белого моря, высокой химической активностью металла в грунтах и доступностью для растений Fe²⁺ по сравнению с Fe³⁺ в условиях гипоксии, а также с многолетним функционированием корневых галофитов. За счет аккумуляции металла галофиты являются основными сайтами фиксации железа в системе берег–море. Тем самым многолетняя галофитная растительность, с хорошо развитыми корневиками при последующем разложении органического вещества возвращает железо в биогеохимический цикл с океана на побережье и наоборот. Участие галофитов в цикле обмена железа на побережье моря хорошо иллюстрируется обратной зависимостью содержания металла в рас-

тениях и в грунтах при удалении от берега в глубь моря. Нами ранее было показано, что чем дальше от берега моря, тем меньше содержание металлов в литоральных грунтах и выше в триостреннике морском. Например, у берега (3 зона литорали) содержание железа у растений $22\,107 \pm 127$ мг/кг, в грунтах 6145 ± 982 мг/кг, в глубине моря (1 зона литорали): $33\,961 \pm 7$ и $17\,115 \pm 4524$ мг/кг соответственно (Sonina *et al.*, 2021).

Растения гипераккумуляторы используются в фиторемедиации – очистке от загрязняющих веществ среды обитания растений и человека (Stoltz, Greger, 2002). При этом для очистки почвы используются и древесные виды, например рода *Salix* (Terebova *et al.*, 2017), и травянистые растения. Известно использование растений сем. *Asteraceae* (*Auremia absinthium* L., *Auremia annua* L., *Agropyron pectinatum* (M. Vieb.) P. Beauv. и др.) для фиторемедиации почв хранилищ хлорорганических пестицидов в районе г. Алматы (Нуржанова, 2007). Предлагается использование галофитов *Atriplex portulacoides* L., *Salicornia dolichostachya* Moss, *Tripolium rannonicum* (Jacq.) Dobrocz. для фиторемедиации воды морских аквапонных систем (Buhmann *et al.*, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На карельском берегу Белого моря обитают растения галофиты (*Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium* и *Zostera marina*), которые в условиях пониженной аэрации и загрязненной железом морской воды накапливают железо до сверхзначений. Аккумуляция металла галофитами связана с особенностями их метаболизма и среды обитания растений. Можно предположить, что в условиях избытка железа в морской воде при недостатке кислорода для растений галофитов становится более доступным железо Fe^{2+} из FeO комплексов литоральных грунтов, чем Fe^{3+} из Fe_2O_3 и непосредственно железо уже растворенное в морской воде, которое галофиты активно поглощают корневищем согласно известной стратегии I поглощения металла. За счет аккумуляции железа галофиты литорали Белого моря являются участниками биогеохимического круговорота железа и основными сайтами его фиксации в системе берег–море и могут рассматриваться как потенциальные фиторемедиаторы прибрежных территорий.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0752-2020-0007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бреслина И.П. Приморские луга Кандалакшского залива Белого моря // Биолого-флористические ис-

следования в связи с охраной природы в Заполярье. Сборник статей. Апатиты, 1980. С. 132–143.

Виноградов А.П. Геохимия редких и рассеянных химических элементов в почвах. М.: Изд-во АН СССР, 1957. 238 с.

Водяницкий Ю.Н. Химия и минералогия почвенного железа. М.: Изд-во Почвенного ин-та им. В.В. Докучаева РАСХН, 2003. 238 с.

Галибина Н.А., Теребова Е.Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Ученые записки ПетрГУ. Петрозаводск: ПетрГУ, 2014. № 4(141). С. 1924.

Гуляева Е.Н., Морозова К.В., Марковская Е.Ф., Николаева Н.Н., Запелова Д.С. Анатомо–морфологическая характеристика листьев доминантных видов на побережье Баренцева моря // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2016. № 2(155). С. 13–19.

Джамалов Р.Г., Мироненко А.А., Мягкова К.Г. Пространственно-временной анализ гидрохимического состава и загрязнения вод в бассейне Северной Двины // Водные ресурсы. 2019. Т. 46. № 2. С. 149–160.

Добровольский В.В. Основы биогеохимии. Учеб. пособие для геогр., биол., геолог., с.-х. спец. вузов. М.: Высш. школа, 1998. 413 с.

Имантаев А.Б., Чеснокова Н.Ю., Чаплыгин В.А. Содержание микроэлементов в высшей водной растительности дельты Волги и Северного Каспия // Инновационные подходы в решении научных проблем: Сборник трудов по материалам Международного конкурса научно-исследовательских работ. Уфа, 2020. С. 27–33.

Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2020 // Под ред. Коршенко А.Н. М.: “Наука”, 2021. 230 с.

Кособрюхов А.А., Марковская Е.Ф. Адаптация фотосинтетического аппарата триостренника морского на приливно-отливной зоне Белого моря // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2016. № 12. С. 235–237.

Марковская Е.Ф., Гуляева Е.Н. Роль устьиц в адаптации растений *Plantago maritima* L. к приливно-отливной динамике на литорали Белого моря // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 1. С. 75–83.

Нуржанова А.А. Эколого-генетические аспекты токсичности и мутагенеза пестицидов. Алматы, 2007. 172 с.

Орешникова Н.В. Почвы приморских лугов таежной зоны на примере западной части побережья Белого моря: Дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Москва: МГУ, 2001, 169 с.

Пахомова С.В., Кононец М.Ю., Юдин М.В., Вершинин А.В., Розанов А.Г. Исследование потоков растворенных форм металлов через границу раздела вода–дно в вислинском заливе Балтийского моря // Океанология, 2004. Т. 44(4). С. 516–523.

Приказ министерства сельского хозяйства РФ от 13 декабря, 2016 г., № 552 // Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных

- веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. <https://docs.cntd.ru/document/420389120>. 12.10.2021
- Розанов А.Г., Волков И.И. Донные осадки Кандалакшского залива Белого моря: марганцевый феномен // Геохимия. 2009. № 10. С. 1067–1085.
- Свириденко В.Г., Пырх О.В. Лекарственные растения флоры Гомельской области как источник антиоксидантов // Агропромышленные технологии Центральной России. 2016. № 1. С. 81–87.
- Сергиенко Л.А., Стародубцева А.А., Смолькова О.В., Марковская Е.Ф. Виды рода *Zostera* L. (сем. *Zosteraceae*) во флоре западного побережья Белого моря // Фундаментальные исследования. 2015. № 2. С. 2606–2613.
- Теребова Е.Н. Азотные и фосфорные соединения хвойных растений при аэротехногенном загрязнении в условиях Северо-Запада России // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Петрозаводск: Петрозаводск, 2002. 24 с.
- Федорец Н.Г., Бахмет О.Н., Медведева М.В., Новиков С.Г., Ткаченко Ю.Н., Солодовников А.Н. Тяжелые металлы в почвах Карелии. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. 222 с.
- Якконен К.Л. Устойчивость злаков и двудольных растений к дефициту микроэлементов (Fe, Zn, Mn) при высокой концентрации карбоната кальция в почве: Автореф. дис. канд. биол. наук. СПб.: СПбГУ, 2009. 20 с.
- Albury M.S., Affourtit C., Crichton P.G., Moore A.L. Structure of the plant alternative oxidase: Site-Directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology // Journal of Biological Chemistry. 2002. V. 277(2). P. 1190–1194.
- Bose J., Rodrigo-Moreno A., Shabala S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance // J. Experimental Botany. 2014. V. 65(5). P. 1241–1257.
- Briat J.F., Duc C., Ravet K., Gaymard F. Ferritins and iron storage in plants // Biochim Biophys Acta. 2010. V. 1800(8). P. 806–814.
- Brzezinski M.A., Baines S.B., Balch W. Co-limitation of diatoms by iron and silicic acid in the equatorial Pacific // Deep-Sea Res. 2011. V. 58. P. 493–511.
- Buhrmann A.K., Waller V., Wecker B., Papenbrock J. Optimization of culturing conditions and selection of species for the use of halophytes as biofilter for nutrient-rich saline water // Agricultural Water management. 2015. V. 149. P. 102–114.
- Cong M., Zhao J., Lü J., Ren Z., Wu H. Homologous cloning, characterization and expression of a new halophyte phytochelatin synthase gene in *Suaeda salsa* // Chinese J. Oceanology and Limnology. 2016. V. 34(5). P. 1034–1043.
- Conte S., Walker E. Transporters Contributing to Iron Trafficking in Plants // Molecular plant. 2011. V. 4. P. 464–76.
- Dahmani-Muller H., van Oort F., Gélie B., Balabane M. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter // Environ Pollut. 2000. V. 109(2). P. 231–238.
- Durrett T.R., Gassmann W., Rogers E.E. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation // Plant Physiol. 2007. V. 144. P. 197–205.
- Gargouri M., Magne C., Dauvergne X., Ksouri R., El Feki A., Metges M.-A. G., Talarmin H. Cytoprotective and antioxidant effects of the edible halophyte *Sarcocornia perennis* L. (swampfire) against lead-induced toxicity in renal cells // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013. V. 95. P. 44–51.
- Gordeev V.V., Kochenkova A.I., Starodymova D.P., Pokrovsky O.S. Major and Trace Elements in Water and Suspended Matter of the Northern Dvina River and Their Annual Discharge into the White Sea // Oceanology. 2021. V. 61. P. 994–1005.
- Grigoras A.G. Catalase immobilization – A review // Biochemical Engineering J. 2017. V. 117(B). P. 1–20.
- Hell R., Stephan U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants // Planta. 2003. V. 216(4). P. 541–551.
- Kim S.A., Guerinot M.L. Mining iron: iron uptake and transport in plants // FEBS Lett. 2007. V. 581(12). P. 2273–2280.
- Kobayashi T., Nishizawa N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants // Annual review of plant biology. 2012. V. 63. P. 131–152.
- Kopriva S., Mugford S.G., Matthewman C., Koprivova A. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization // Plant Cell Rep. 2009. V. 28(12). P. 1769–1780.
- Krämer U. Metal hyperaccumulation in plants // Annu Rev Plant Biol. 2010. V. 61. P. 517–534.
- Kushvaha A., Rani R., Kumar S., Gautam A. Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: Implications for phytoremediation // Environmental Reviews. 2016. V. 24(1). P. 39–51.
- Lenstra W.K., Egger M., van Helmond N.A.G.M., Kritzberg E., Conley D.J., Slomp C.P. Large variations in iron input to an oligotrophic Baltic Sea estuary: impact on sedimentary phosphorus burial // Biogeosciences. 2018. V. 15. P. 6979–6996.
- Liang L., Liu W., Huo X., Li S., Zhou Q. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Saline Soils Using Halophytes: Current Progress and Future Perspectives // Environmental Reviews. 2017. V. 25. P. 269–281.
- Lucena J.J., Hernandez-Apaolaza L. Iron nutrition in plants: an overview // Plant Soil. 2017. V. 418. P. 1–4.
- Luo H., Li H., Zhang X., Fu J. Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress // Ecotoxicology. 2011. V. 20(4). P. 770–778.
- Manousaki E., Kalogerakis N. Halophytes – an emerging trend in phytoremediation // Int J Phytoremediation. 2011. V. 13(10). P. 959–969.
- Markovskaya E. F., Terebova E.N., Androsova V.I., Pavlova M.A. Ecological and physiological features of metal accumulation of halophytic plants on the White Sea coast // Handbook of bioremediation: Physiological, Molecular and Biotechnological Interventions / Eds Mirza Hasanuzzaman, Majeti Narasimha Vara Prasad: Academic Press, 2020. P. 295–327.
- McKersie B.D., Murnaghan J., Jones K.S., Bowley S.R. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa

- increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance // *Plant Physiol.* 2000. V. 122(4). P. 1427–1437.
- Milić D., Luković J., Ninkov J., Zeremski–Škorić T., Zorić L., Vasin J., Milić S. Heavy metal content in halophytic plants from inland and maritime saline areas // *Cent. Eur. J. Biol.* 2012. V. 7(2). P. 307–317.
- Naila A., Meerdink G., Jayasena V., Sulaiman A.Z., Ajit A.B., Graziella Berta G. A review on global metal accumulators—mechanism, enhancement, commercial application, and research trend // *Environmental Science and Pollution Research.* 2019. V. 26. P. 26449–26471.
- Pendias A. *Trace Elements in Soils and Plants* (4th ed.) // CRC Press. 2010. 548 p.
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. The Water–Water Cycle Is Essential for Chloroplast Protection in the Absence of Stress // *The J. Biological Chemistry.* 2003. V. 278. № 40. P. 38921–38926.
- Rožanov A.G., Volkov I.I., Kokryatskaya N.M., Yudin M.V. Manganese and iron in the White Sea: Sedimentation and diagenesis // *Lithol Miner Resour.* 2006. V. 41(5). P. 483–501.
- Sonina A.V., Terebova E.N., Dyachkova T.Yu., Morozova K.V., Elkina N.A. Ecological and biological features of *Triglochin maritima* L. in the biotopes of the littoral zone with different degree of flooding on the coast of the White sea // *Czech Polar Reports.* 2021. V. 11(2). № 2. P. 233–252.
- Stoltz E., Greger M. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings // *Environ. Exp. Bot.* 2002. V. 47. P. 271–280.
- Terebova E.N., Markovskaya E.F., Androsova V.I., Galibina N.A., Kaipainen E. Potential for *Salix schwerinii* E. Wolf to uptake heavy metals in the contaminated territories of mining industry in the north-west Russia // *Siberian J. Forest Science.* 2017. V. 1. P. 74–86.
- Terebova E.N., Markovskaya E.F., Androsova V.I., Pavlova M.A., Oreshnikova N.V. Cell wall functional activity and metal accumulation of halophytic plant species *Plantago maritima* and *Triglochin maritima* on the White Sea littoral zone (NW Russia) // *Czech Polar Reports.* 2020. V. 10(2). P. 169–188.
- Tseits M.A., Dobrynin D.V. Classification of marsh soils in Russia // *Eurasian Soil Sci.* 2005. V. 38, suppl. 1. P. S44–S48.
- Wali M., Gunse B., Lugany M., Corrales I., Abdelly C., Poschenrieder C., Ghnaya T. High salinity helps the halophyte *Sesuvium portulacastrum* in defense against Cd toxicity by maintaining redox balance and photosynthesis // *Planta.* 2016. V. 244(2). P. 333–346.
- Wang Y.J., Zhou L.M., Zheng X.M., Qian P., Wu Y.H. Influence of *Spartina alterniflora* on the mobility of heavy metals in salt marsh sediments of the Yangtze River Estuary, China // *Environmental Science and Pollution Research.* 2013. V. 20(3). P. 1675–1685.
- Zhang Z.-C., Chen B.-X., Qiu B.-S. Phytochelatin synthesis plays a similar role in shoots of the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* as in non-resistant plants // *Plant Cell Environmental.* 2010. V. 33(8). P. 1248–1255.
- Zhou J., Rocklin A.M., Lipscomb J.D., Que L.Jr., Solomon E.I. Spectroscopic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: molecular mechanism and CO(2) activation in the biosynthesis of ethylene // *J Am Chem Soc.* 2002. V. 124(17). P. 4602–4609.

Iron Accumulation of Halophytes on the White Sea Littoral Zone

E. N. Terebova^{1, #}, M. A. Pavlova¹, and N. V. Oreshnikova²

¹ Petrozavodsk State University, Republic of Karelia, Lenin St., 33, Petrozavodsk, 185910 Russia

² Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

#e-mail: eterebova@gmail.com

The accumulation of iron in halophytic species *Triglochin maritima* L., *Plantago maritima* L., *Aster tripolium* L. and *Zostera marina* L. was studied in this research. Littoral soils are not contaminated with iron (6–16 g/kg). Seawater, on contrary, contains high concentrations of iron (0.04–0.32 mg/l). Halophytes accumulate iron to supervalues (6.49–71.63 г/кг), 93% of metal is found in rhizomes. The reasons for this phenomenon are discussed. Halophytes of the White Sea littoral zone are involved in the biogeochemical iron cycle as the main fixation sites of iron in the system “coast–sea”. They have phytoremediation potential on the coastal territories.

Keywords: halophytes, littoral zone, the White Sea, iron, accumulation, *Triglochin maritima*, *Aster tripolium*, *Plantago maritima*, *Zostera maritima*

УДК 574.583+574.1

РАЗНООБРАЗИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ СООБЩЕСТВА ПЛАНКТОННЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ ПРОТИСТОВ В ЭСТУАРНОЙ ЗОНЕ ПРИТОКА КРУПНОГО РАВНИННОГО ВОДОХРАНИЛИЩА: МЕТАБАРКОДИНГ ГЕНА 18S-РИБОСОМНОЙ РНК

© 2023 г. М. В. Уманская*, @, М. Ю. Горбунов*, С. В. Быкова*, Н. Г. Тарасова*

*Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, ул. Комзина, 10, Тольятти, 445003 Россия

@E-mail: mvumansk67@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 21.10.2022 г.

Принята к публикации 21.10.2022 г.

Представлены первые данные о составе и разнообразии летнего сообщества планктонных протистов Усинского залива и прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища, полученные с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 18S рибосомной РНК. В составе сообщества протистов обнаружено 1150 ОТЕ, среди которых преобладают представители супергруппы SAR (Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria). В полной библиотеке по числу ОТЕ преобладают Stramenopiles, представленные, в порядке убывания, Chrysophyceae (8.5%), Opalozoa (8.3%), Diatomea (4.7%) и Oomycetes (Peronosporomycetes) (3.7%), а по количеству нуклеотидных последовательностей – Alveolata (62.0%) и в первую очередь, Ciliata (56.9%). Выделяются четыре взаимосвязанных сообщества протистов: речного участка, собственно залива, устьевой зоны, и водохранилища вне влияния залива (выше устья). Наиболее контрастными по составу являются сообщества речного участка и участка водохранилища выше устья. В целом, исследованная эстуарная система имеет черты как экотона, так и экотона. Основное влияние на развитие фототрофного компонента эукариотического планктона оказывают конкурентные взаимоотношения с цианобактериями. “Цветение” цианобактерий оказывает влияние и на структуру гетеротрофной части сообщества, хотя это влияние проявляется менее ярко. Развитие Archaeplastida, Rhizaria и минорных групп протистов положительно коррелирует с долей последовательностей Metazoa в пробах, которая отражает интенсивность прессы метазоопланктона. Среди полученных последовательностей обнаружены принадлежащие к таким редким для пресных вод таксонам, как Bolidophyceae и Rhodelphida. Эти находки расширяют биогеографию этих групп, которые пока обнаружены в очень немногих пресноводных водоемах.

Ключевые слова: протисты, планктон, высокопроизводительное секвенирование, таксономический состав, пространственное распределение, Куйбышевское водохранилище, река Уса

DOI: 10.31857/S102634702260039X, EDN: TORNMA

Трансформация планктонных сообществ в эстуарных зонах наиболее хорошо изучена в морских и океанических эстуариях, где ведущим фактором, влияющим на состав и структуру сообществ, является градиент солености воды (Attrill, Rundle, 2002; Telesh, Khlebovich, 2010). В значительно меньшей степени исследованы зоны впадения притоков в крупные пресные водоемы, образующие сходные геоморфологические структуры, так называемые “пресноводные эстуарии” (Herdendorf, 1990; Loken *et al.*, 2016). Это касается эстуарных зон притоков не только крупных пресных озер, где преобладают градиенты гидрологических, а не гидрохимических факторов (Fujimoto *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2019), но и крупных искусственных водоемов (водохранилищ), в которых из-за функцио-

нирования гидротехнических сооружений создается сложная динамика уровней воды и течений (Жариков, 2000; Nowak, Ptak, 2018; Obodovskiy *et al.*, 2020), оказывающая своеобразное искусственное приливно-отливное воздействие на эти участки.

Независимо от ведущего фактора, экологические условия по продольному профилю любой эстуарной системы значительно изменяются, что приводит к изменению интенсивности развития и разнообразия водных сообществ (Nowak, Ptak, 2018; Li *et al.*, 2018; Obodovskiy *et al.*, 2020 и др.). Поэтому, наряду с анализом пространственных изменений абиотических факторов, отправной точкой для понимания функционирования эстуарных экосистем, как, впрочем, и любых экосистем вообще (Singer *et al.*, 2021), является опреде-

ление биологического разнообразия и выявление особенностей пространственного распределения отдельных таксономических групп организмов. Протисты (микробные эукариоты, микроэукариоты) составляют существенную часть общего биоразнообразия и играют ключевую роль в структуре и функционировании водных экосистем (Likens, 2010). Они характеризуются очень высоким морфологическим и функциональным разнообразием (Zhao *et al.*, 2020; Singer *et al.*, 2021).

Возможности оценки разнообразия протистов классическими микроскопическими методами довольно ограничены в связи с их малыми размерами, отсутствием ярко выраженных морфологических признаков и сложностями культивирования в лабораторных условиях. Поэтому анализ их состава и разнообразия чаще всего ограничивается фитопланктоном и, несколько реже, инфузориями. Остальные группы (например, “гетеротрофные нанофлагелляты”) чаще всего определяются либо “все вместе”, без таксономического разделения, либо качественно (Косолапов и др., 2016, 2017). Поэтому большое значение для оценки реального разнообразия протистов имеет метод метабаркодинга, основанный на анализе маркерных последовательностей их ДНК (Debroas *et al.*, 2017; Boenigk *et al.*, 2018; David *et al.*, 2021).

Куйбышевское водохранилище – крупнейшее в каскаде водохранилищ р. Волги, бассейн которой охватывает значительную часть Восточной Европы. В пределах водохранилища находится несколько глубоко врезанных заливов, образованных затопленными руслами притоков; наиболее крупными из них являются Свяжский, Черемшанский и Усинский, которые по своей структуре представляют собой типичные пресноводные эстуарии. Фитопланктон и сообщества инфузорий Куйбышевского водохранилища, включая эстуарные участки, в частности Усинский залив, подробно исследовались морфологическими методами (Ротарь, 1995; Фитопланктон Нижней Волги..., 2006; Корнева, 2015; Горохова, Зинченко, 2018; Андреева и др, 2021; Быкова, 2021; Тарасова, Уманская, 2021). Однако только в последнее время появились первые сообщения о метабаркодинговых исследованиях планктонных протистов реки Волга и ее водохранилищ (Тихоненков и др., 2021).

Целью данной работы являлось получение первых данных о составе и разнообразии летнего эукариотического планктона Усинского залива и прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 18S рибосомной РНК (18S рРНК), а также анализ трансформации сообщества планктонных протистов в системе река-залив-водохранилище.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб и методы анализа факторов среды. Пробы воды объемом 0.5 л были отобраны в стерильные пластиковые бутылки на шести станциях 30.06.–05.07.2021 г. (табл. 1). На каждой станции пробы отбирали с шагом в один метр по глубине и объединяли в равных объемах в интегральную пробу. Поскольку глубины станций в основной части залива и на речном участке не превышали 10 м, то на более глубоких станциях в устье залива и в водохранилище пробы отбирали только до 10 м включительно. Одновременно портативными приборами были определены основные физико-химические показатели – температура, концентрация растворенного кислорода (оксиметр HI9143, Hanna Instruments, ЕС), pH, Eh (pH-Eh-метр Эксперт-001-4, Россия), электропроводность (кондуктометр CD-4302, Lutron, КНР). Сестон из интегральных проб был осажден последовательным фильтрованием – вначале без давления на нитроцеллюлозные фильтры с номинальным порогом пропускания 3–4 мкм, а затем под давлением 0.5–0.7 атм. – на фильтры с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры с осадками, полученными из одной пробы, были перенесены в одну общую стерильную пробирку, фиксированы 3 мл 80% (v/v) этанола и хранились при –20°C. Таким образом каждая проба сестона содержала все эукариоты, размер которых превышал 0.2 мкм.

Выделение ДНК и высокопроизводительное секвенирование было выполнено в компании Синтол (Москва, Россия). Пробы с консервантом центрифугировали; ДНК из полученных осадков выделяли с помощью набора реагентов “Сорб-ГМО-Б” (Синтол, Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрации выделенной ДНК определяли по флуоресценции набором для определения малых количеств двухцепочечной ДНК в растворе ds DNA на приборе Quantus, Promega (США). Для амплификации переменного участка V4 гена 18S рРНК эукариот использовали праймеры Ek-NSF573 (5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCA-3') и Ek-NSR951 (5'-TTGGYRAATGCTTTCCGC-3') (Mangot *et al.*, 2013) со стандартными адаптерами Illumina.

Индексирование ампликонов проводили с помощью набора реагентов Nextera XT Index Kit (Illumina), последующую очистку продуктов – на магнитных частицах AMPure XP Beads в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию полученной ДНК определяли, как указано выше для общей выделенной ДНК, образцы объединяли в эквимольные количества. Парноконцевое секвенирование полученных библиотек ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2, 500 циклов. Полученные последова-

Таблица 1. Характеристика станций отбора проб

| № станции | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Координаты (с.ш., в.д.) | 53.3749, 48.6466 | 53.2653, 48.9260 | 53.2752, 49.1160 | 53.3771, 49.2490 | 53.3969, 49.2834 | 53.3988, 49.1818 |
| Участок | Река | Залив | Залив | Залив | Водохр. | Водохр. |
| Описание | Ниже с. Шигоны | У пос. Миронов | У г. Междуреченск | Район устья | Ниже устья залива | Выше устья залива |
| Глубина, м | 1 | 3.3 | 6.5 | 15.1 | 17.9 | 17.4 |
| Прозрачность, м | 0.6 | 0.55 | 0.45 | 0.8 | 1.0 | 2.3 |
| Концентрация O ₂ , мг/л | 6.9 | 9.5 | 9.25 | 10 | 8.07 | 7.14 |
| Электропроводность, µSm/cm | 569 | 335 | 316 | 316 | 317 | 340 |
| pH | 8.09 | 9.22 | 8.31 | 9.2 | 9.84 | 8.4 |
| Eh | 200 | 158 | 154 | 155 | 131 | 175.3 |
| Температура, °C | 20.6 | 24.8 | 25.2 | 28.2 | 28.8 | 26.2 |

Примечание. Химические показатели приведены для поверхностного слоя.

тельности депонировали в NCBI Sequence Read Archive (биопроект PRJNA825541).

Биоинформатический анализ. Контроль качества полученных последовательностей Illumina был проведен с помощью программы FastQC (v. 0.11.7) (Wingett, Andrews, 2018). Для обработки полученных сырых данных использовали программу Usearch 11.0.67 (Edgar, 2013). Объединение парных последовательностей проводили, используя команду `-ufastq_mergepairs` с параметрами `-fastq_minovlen 20` и `-fastq_minmergelen 300`, т.е. ограничивали длину области перекрытия – не менее 20 нуклеотидов (нк) и длину объединенной последовательности – не менее 300 нк, поскольку при номинальной длине целевого фрагмента около 380 нк некоторые эукариоты (например, инфузории класса Litostomatea) имеют в данной области крупные делеции. Таким образом, выделялись объединенные последовательности длиной 300–480 нк. Из полученной объединенной библиотеки командой `-fastq_filter` с опцией `-maxee 1.0` были исключены последовательности с ожидаемым числом ошибок >1 , после чего командой `-fastx_unique` была проведена дерепликация. Полученные уникальные последовательности были кластеризованы на уровне 97% с помощью команды `-cluster_otus` со стандартными параметрами. В процессе кластеризации были удалены “de novo” химерные последовательности. Дополнительную фильтрацию химерных последовательностей с помощью “бесхимерных баз” не проводили.

Таксономическую принадлежность полученных операционных таксономических единиц (ОТЕ) определяли с помощью элайнера SINA v. 1.2.11 (Pruesse *et al.*, 2012) с использованием базы данных SILVA SSU v. 138.1 (Quast *et al.*, 2013) с порогом сходства 0.8 и базы данных PR2 v. 4.14.0.

Последняя классификация, после коррекции систематики в соответствии с последней сводкой Международного общества протистологов (Adl *et al.*, 2019) была принята за основу. Для уточнения таксономического положения ОТЕ в случае разночтений дополнительно использовали алгоритм BLAST на платформе NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Поскольку целью работы являлся анализ сообщества протистов, последовательности, принадлежащие Metazoa (составлявшие около половины всех полученных последовательностей) и небольшое число последовательностей высших растений были исключены из дальнейшего рассмотрения. Чтобы исключить дублирование, были отброшены также последовательности нуклеоморфных 18S рРНК криптофитов.

В качестве доминирующих ОТЕ были выделены те, которые хотя бы в одной пробе составляли не менее 3% последовательностей, принадлежащих протистам.

Статистический анализ. Другие вычисления, включая статистический анализ результатов и их графическое представление, были выполнены в программах MS Office 2019, Past (v.3.04) и в программной среде R с использованием библиотек Vegan, Caroline и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Район исследования и экологические условия в период отбора проб (табл. 1). Река Уса – правый приток р. Волги, впадает в Куйбышевское водохранилище, образуя Усинский залив, представляющий собой пресноводный эстуарий. В период исследования наибольший прогрев воды был зарегистрирован в устье залива и в Приплотинном плесе Куйбышевского водохранилища ниже впа-

Таблица 2. Альфа-разнообразии исследованных сообществ планктонных протистов в р. Уса, Усинском заливе и прилегающих участках Куйбышевского водохранилища

| № станции | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Река | Залив | Водохр. | Всего |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|---------|--------|
| Район | Река | Зал. | Зал. | Зал. | Вод. | Вод. | | | | |
| Всего, включая Metazoa и высшие растения | | | | | | | | | | |
| Число последовательностей | 104069 | 115533 | 104202 | 103034 | 105168 | 96366 | 104069 | 322769 | 201534 | 628372 |
| Число ОТЕ | 865 | 439 | 406 | 421 | 435 | 356 | 865 | 627 | 507 | 1261 |
| Только протисты, включая истинные грибы | | | | | | | | | | |
| Число последовательностей | 80560 | 74508 | 80261 | 32210 | 22946 | 16515 | 80560 | 186979 | 39461 | 307000 |
| Число ОТЕ | 784 | 392 | 367 | 384 | 405 | 327 | 784 | 568 | 469 | 1150 |
| Индексы (только протисты, включая истинные грибы): | | | | | | | | | | |
| Chao1 | 793.6 | 422.0 | 393.7 | 421.0 | 465.3 | 370.1 | 793.6 | 598.1 | 509.0 | 1150 |
| Шеннона (H, log ₂) | 6.57 | 5.54 | 5.23 | 5.79 | 5.48 | 4.94 | 6.57 | 5.71 | 5.47 | 6.8 |
| Выровненности Писелу (E) | 0.68 | 0.64 | 0.61 | 0.67 | 0.63 | 0.59 | 0.68 | 0.62 | 0.62 | 0.67 |
| Доминирования Симпсона (S) | 0.03 | 0.05 | 0.06 | 0.04 | 0.07 | 0.11 | 0.03 | 0.04 | 0.08 | 0.02 |
| Доминирования Бергера-Паркера | 0.123 | 0.111 | 0.166 | 0.128 | 0.217 | 0.304 | 0.123 | 0.112 | 0.254 | 0.08 |

дения р. Усы, а минимальный – на речной станции (табл. 1). Прозрачность воды по диску Секки изменялась в широких пределах, ее наименьшая величина была зарегистрирована в средней части Усинского залива, а наибольшая – в Приплотинном плесе, выше впадения р. Усы (табл. 1). Вода на всех станциях была хорошо аэрирована (табл. 1), до глубины трех прозрачностей насыщение воды растворенным кислородом составляло $101 \pm 14\%$, а глубже оно несколько снижалось ($87 \pm 12\%$). Содержание Хл *a* в интегральных пробах изменялось от 2.9 мкг/л (ст. 3) до 146.5 мкг/л (ст. 5). По данным микроскопического анализа, цианобактерии вносили основной вклад в численность (88–99.8%) и биомассу (36–98%) фитопланктона (Уманская и др., 2021), что позволяет рассматривать их в качестве экологического фактора для планктонных протистов.

Общая характеристика выделенных ОТЕ, альфа-разнообразие планктонных протистов. Полученная объединенная библиотека “сырых” последовательностей содержала 778889 парных чтений. В результате биоинформатического анализа из них было выделено 1261 ОТЕ, объединяющих 628372 последовательностей (табл. 2). После исключения ОТЕ, относящихся к Metazoa и высшим растениям, осталось 307000 последовательностей и 1150 ОТЕ, принадлежащих протистам, включая истинные грибы (Fungi). Количество последовательностей и число ОТЕ протистов заметно варьировало от станции к станции (табл. 2).

Наибольшее количество ОТЕ, максимально возможное видовое богатство и наименее выраженное доминирование (табл. 2) зарегистрировано на речной станции, а наименьшее разнообразие и максимально выраженное доминирование – на станции в водохранилище выше устья залива. В целом таксономическое разнообразие снижалось, а степень доминирования – возрастала в направлении от речного участка к водохранилищу (табл. 2).

Среди выделенных ОТЕ протистов только 93 ОТЕ (8.1%) были общими для всех шести проб, еще 305 ОТЕ (26.5%) были встречены не менее, чем в половине образцов (3–5 проб), а 752 ОТЕ были уникальными, т.е. встречались только в одной (586 ОТЕ; 51%) или двух пробах (166 ОТЕ; 14.4%). Наименьшее количество общих ОТЕ было обнаружено между рекой и водохранилищем. Интересно отметить, что среди уникальных ОТЕ 490 были обнаружены в пробе из речной станции, на остальных станциях их число было существенно меньше и составляло 13–37 ОТЕ.

Судя по индексу Chao1, октавному анализу (оценке ожидаемого полного числа ОТЕ в предположении о логнормальном распределении их численностей) и кривым разрежения (табл. 2, рис. 1), число ОТЕ, обнаруженных в объединенной библиотеке, близко к реально существующему, а в каждой из индивидуальных проб недоучтено от 1 до 15% их общего количества (от 10 до 43 ОТЕ). Однако, поскольку использованный алгоритм выделения операционных таксономических единиц

по умолчанию предполагает отбрасывание синглов, нельзя исключать, что реальное разнообразие планктонных протистов может быть еще выше.

Таксономический анализ сообщества простейших затрудняется тем, что их современная система (Adl *et al.*, 2019) является безранговой, поэтому трудно избежать смешения таксонов, находящихся на разных уровнях иерархии. В полученной нами библиотеке как по количеству последовательностей, так и по числу ОТЕ, преобладают *Biconta* (*Diaphoretickes*), преимущественно представители супергруппы SAR (рис. 2). Среди последних по числу ОТЕ преобладают *Stramenopiles* (в основном, *Chrysophyceae* (8.5%), *Opalozoa* (8.2%), *Diatomea* (4.7%) и *Oomycetes* (*Peronosporomycetes*) (3.7%)), но по количеству последовательностей — *Alveolata* (*Ciliata* (56.9%)) (рис. 2). Выраженное преобладание *Ciliata* по числу последовательностей вполне ожидаемо, поскольку инфузории имеют макронуклеусы с высокой степенью полиплоидизации и содержат в своих клетках как минимум на порядок больше копий гена 18S рРНК, чем любые другие простейшие, за исключением, возможно, многоядерных фораминифер (Gong *et al.*, 2013; Weber, Pawlowski, 2013). *Rhizaria* формируют 11.6% ОТЕ и 3.2% последовательностей и представлены в основном *Secozoa*, около четверти ОТЕ принадлежит к неклассифицируемому. Поскольку амебофлагелляты в составе *Rhizaria* представляют собой один из основных таксонов пресноводных “гетеротрофных нанофлагеллят”, этот факт, безусловно, является поводом для дальнейшего исследования. Остальные представители *Diaphoretickes* (*Archaeplastida*, *Cryptista* и *Haptista*) составляют небольшую долю как по числу ОТЕ, так и по числу последовательностей (рис. 2).

Представители *Amorphea* составляют около трети обнаруженных ОТЕ, но довольно небольшую часть обнаруженных последовательностей (рис. 2), причем основной вклад среди них вносят *Fungi*.

Обнаружены лишь единичные последовательности, относящиеся к *Discoba* (3 ОТЕ и 13 последовательностей), хотя по данным микроскопического анализа (Уманская и др., 2021) в планктоне присутствовали, во всяком случае, фототрофные *Euglenida* (*Euglenophyceae*). Известно, что большинство праймеров к V4-участку 18S рРНК малоэффективны в отношении *Excavata*, в т. ч. *Discoba*, из-за большой длины этого участка (Geisen *et al.*, 2019). Мы обнаружили также, что использованный праймер Ek-NSR951 имеет низкое покрытие последовательностей 18S рРНК большинства *Discoba*. Таким образом, обилие *Discoba* действительно недоучитывается в полученной нами библиотеке.

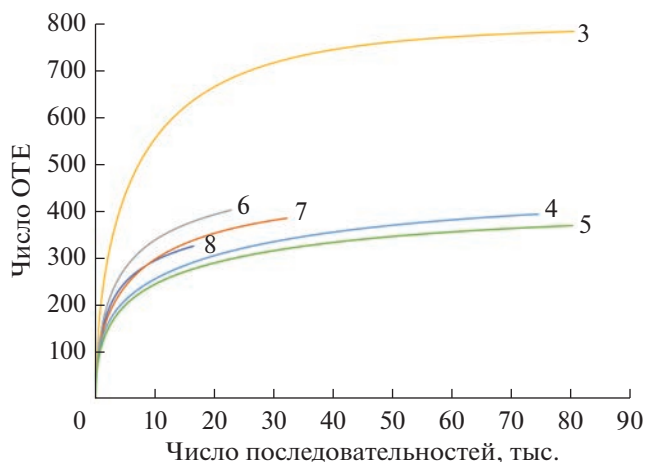


Рис. 1. Кривые разрежения последовательностей 18S рРНК, обнаруженных в исследованных пробах. Числами у кривых обозначены номера проб.

Только 4.3% ОТЕ не удалось классифицировать до типа, причем все они были минорными, составляя суммарно менее 0.4% всех последовательностей в библиотеке, и, таким образом, не оказывали значительного влияния на структуру планктонных протистов в экосистеме эстуарной зоны р. Уса.

В целом, подобный характер соотношения крупных таксонов довольно часто наблюдается в пресноводных речных и озерных экосистемах (Debroas *et al.*, 2017; Boenigk *et al.*, 2018; Cruaud *et al.*, 2019; David *et al.*, 2021; Singer *et al.*, 2021), а также в некоторых солоноватоводных эстуариях (Li *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020).

Трофическая специализация. В литературе выделяют многочисленные трофические стратегии, присущие протистам; так, гетеротрофные формы можно разделить на сапротрофов (типичный пример — истинные грибы), собирателей (амебы, большинство мелких жгутиконосцев); фильтраторов (хоанофлагелляты и др. сидячие формы, многие инфузории) и активно преследующих добычу рапторов (многие инфузории кл. *Litostomatea* и *Prostomatea*). Подавляющее большинство фототрофов способно питаться сапротрофно, а многие, кроме того, и фаготрофно (Saad *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2015; Chakraborty *et al.*, 2017; Singer *et al.*, 2021). Реально многие виды протистов используют несколько трофических стратегий либо одновременно, либо на разных стадиях жизненного цикла.

Поэтому мы ограничились самой общей классификацией полученных ОТЕ по их преимущественной трофической стратегии, разделив их на фототрофные, гетеротрофные, в том числе паразитические, и “неопределенные”. Поскольку у *Chrysophyceae* и *Dinoflagellata* известна неодно-

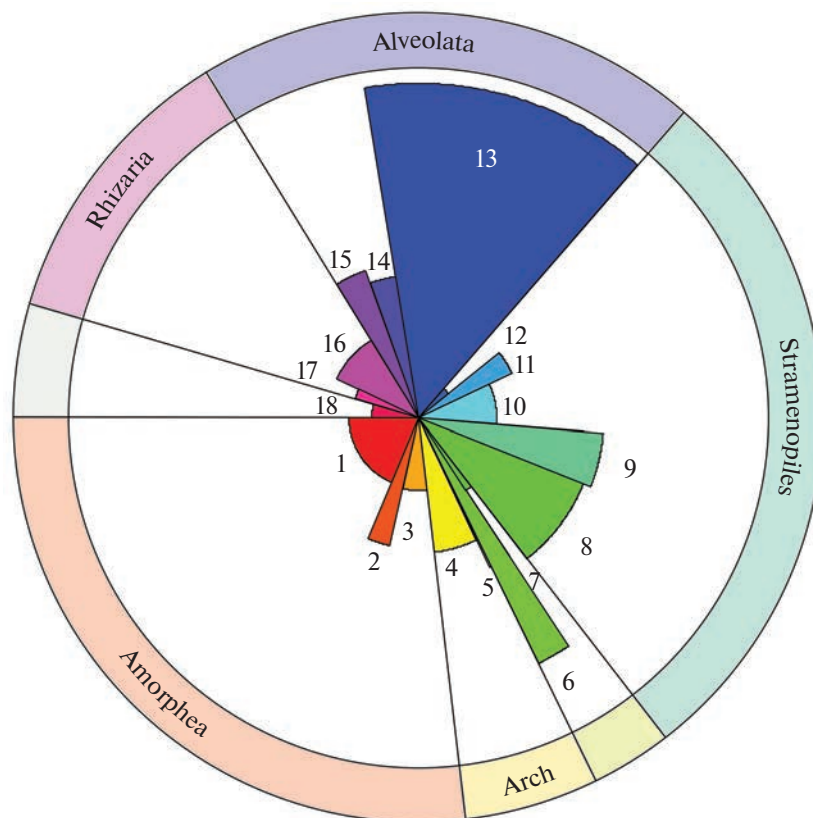


Рис. 2. Распределение числа последовательностей и ОТЕ протистов по таксономическим группам в объединенной библиотеке. Площадь сектора пропорциональна числу последовательностей, а угол отражает вклад в суммарное число ОТЕ в объединенной библиотеке. Обозначения таксонов: 1, Fungi; 2, Choanoflagellida; 3, прочие Amorphea; 4, Chlorophyta; 5, прочие Archaeplastida; 6, Cryptista; 7, Haptista (Centroplasthelida); 8, Chrysophyceae; 9, Diatomea; 10, Opalozoa; 11, Oomycetes; 12, прочие Stramenopiles; 13, Ciliophora; 14, Dinoflagellata; 15, прочие Alveolata; 16, Cercozoa; 17, прочие Rhizaria; 18, прочие и неопределенные.

кратная потеря фототрофии в части эволюционных ветвей и у отдельных видов, трофические стратегии ОТЕ, принадлежащих к этим группам, были определены по результатам построения филогенетических деревьев, причем ОТЕ, имеющие низкое сходство с известными последовательностями и не принадлежащие к эволюционным ветвям с определенной стратегией, были отнесены к “неопределенным”. К последним были отнесены также все ОТЕ, относящиеся к неклассифицированным эукариотам, неклассифицированным Stramenopiles и Alveolata.

Фототрофы, которые способны к фаготрофии, были выделены в группу миксотрофов, к которой отнесли всех фототрофных представителей Dinoflagellata, Cryptophyta, Dictyochophyceae и Chrysophyceae, исключая Synurales (табл. 3). Поскольку далеко не во всех случаях есть консенсус относительно отнесения ряда известных видов к миксотрофным или облигатно фототрофным (Charvet *et al.*, 2012; Stockner *et al.*, 2017; Dorrell *et al.*, 2019; Bock *et al.*, 2022; Suzuki *et al.*, 2022), то в настоящей работе доля миксотрофных протистов в планк-

тонном сообществе исследованного района оценена как потенциальная, без учета интенсивности фаготрофии конкретных видов в реальных условиях.

Приобретенная миксотрофия за счет фототрофных симбионтов или клеттопластии известна у многих видов инфузорий; однако в полученной нами библиотеке ОТЕ, близкие к известным видам, содержащим зоохлореллы или клеттопласты, отсутствовали.

В объединенной библиотеке среди планктонных протистов преобладали гетеротрофы (77.9% последовательностей), в том числе паразитические протисты – 3.0%. Фототрофы составляли 18.2% от общего числа последовательностей, включая 8,7% миксотрофных, а “неопределенные” – 3.9%. Доли фото-, миксо- и гетеротрофов, а также их таксономический состав, менялись от станции к станции (табл. 3). Интересно отметить, что среди миксотрофов на речной станции больший вклад вносили представители Chrysophyceae, тогда как в заливе и в водохранилищных станциях – Cryptophyta (табл. 3).

Таблица 3. Изменение таксономической и функциональной структуры сообщества планктонных протистов вдоль длинной оси Усинского залива (в % от общего числа последовательной в пробе)

| Группа | станция 3 река | станция 4 залив | станция 5 залив | станция 6 устье залива | станция 7 водохранилище ниже устья | станция 8 водохранилище выше устья |
|----------------|--|---|--|--|---|--|
| Фототрофы | 30.2 Diatomea (18.6) Chrysophyceae† (8.5) Chlorophyta (2.3) Cryptophyta† (0.7) Dinoflagellata† (0.2) | 16.7 Cryptophyta† (9.0) Dinoflagellata† (3.8) Chlorophyta (3.1) Diatomea (0.6) Chrysophyceae† (0.2) | 10.0 Cryptophyta† (4.5) Dinoflagellata† (2.7) Chlorophyta (2.4) Diatomea (0.2) Chrysophyceae† (0.2) | 13.5 Chlorophyta (6.9) Dinoflagellata† (2.9) Cryptophyta† (1.6) Diatomea (1.1) Chrysophyceae† (0.9) | 12.4 Chlorophyta (3.9) Cryptophyta† (3.2) Dinoflagellata† (2.6) Diatomea (2.2) Chrysophyceae† (0.5) | 23.2 Diatomea (10.5) Chlorophyta (7.3) Cryptophyta† (3.8) Dinoflagellata† (1.0) Chrysophyceae† (0.6) |
| Гетеротрофы | 57.1 Ciliates (30.1). в т.ч.: <i>Oligohymenophorea</i> (18.4) <i>Litostomatea</i> (4.5) <i>Phyllopharyngea</i> (2.7) <i>Spirotrichea</i> (2.1) <i>Prostomatea</i> (1.8) Chrysophyceae (10.7) Chytridiomycota* (3.9) Oomycetes (3.7) Cercosozoa (2) Dikarya (1.8) Choanoflagellata (0.9) Blastocladiomycota (0.7) Bicosoecida (0.5) | 82.7 Ciliates (68.7). в т.ч.: <i>Spirotrichea</i> (39.0) <i>Oligohymenophorea</i> (20.6) <i>Litostomatea</i> (5.7) <i>Prostomatea</i> (1.7) <i>Colpodea</i> (1.4) Choanoflagellata (2.0) Kathablepharidae (1.9) Cercosozoa (1.1) Chytridiomycota* (0.9) Oomycetes (0.8) Chrysophyceae (0.8) Perkinsidae* (0.8) Bicosoecida (0.5) Centroploasthelida (0.5) | 89.4 Ciliates (75.6). в т.ч.: <i>Spirotrichea</i> (37.8) <i>Oligohymenophorea</i> (29.2) <i>Litostomatea</i> (6.1) <i>Prostomatea</i> (1.6) <i>Colpodea</i> (1.0). Choanoflagellata (2.6) Cercosozoa (1.7) Chytridiomycota* (1.1) Tubulinea (1.0) Chrysophyceae (1.0) Kathablepharidae (0.9) Bicosoecida (0.9) MAST-12 (0.6) Vampyrellidae (0.5) | 85.6 Ciliates (59.7). в т.ч.: <i>Spirotrichea</i> (25.8) <i>Oligohymenophorea</i> (22.6) <i>Litostomatea</i> (7.2) <i>Colpodea</i> (3.4) <i>Prostomatea</i> (0.7) Chrysophyceae (4.0) Cercosozoa (3.9) Chytridiomycota* (2.7) Kathablepharidae (2.7) MAST-12 (2.7) Chaoanoflagellata (1.5) Bicosoecida (1.1) Oomycetes (0.8) Perkinsidae* (0.7) Tubulinea (0.7) | 85.9 Ciliates (53.0). в т.ч.: <i>Oligohymenophorea</i> (30.2) <i>Spirotrichea</i> (17.3) <i>Litostomatea</i> (4.1) <i>Colpodea</i> (0.8) <i>Prostomatea</i> (0.5) Cercosozoa (8.5) Chrysophyceae (3.0) Kathablepharidae (2.6) MAST-12 (2.3) Bicosoecida (2.1) Chytridiomycota* (2.1) Perkinsidae* (2.0) Choanoflagellata (1.2) Oomycetes (1.0) Tubulinea (0.5) | 75.3 Ciliates (43.8). в т.ч.: <i>Oligohymenophorea</i> (34.1) <i>Spirotrichea</i> (6.7) <i>Litostomatea</i> (2.8) Cercosozoa (9.5) Perkinsidae* (5.2) Bicosoecida (3.8) Kathablepharidae (2.5) Choanoflagellata (1.9) Chytridiomycota* (1.3) Dikarya (1.1) Chrysophyceae (0.7) MAST-12 (0.5) |
| Неопределенные | 12.7 | 0.6 | 0.6 | 0.9 | 1.7 | 1.5 |

Примечание. **Жирным** шрифтом выделены суммарные доли трофических групп, в скобках даны доли отдельных таксонов. * – паразитические группы, † – потенциально миксотрофные таксоны.

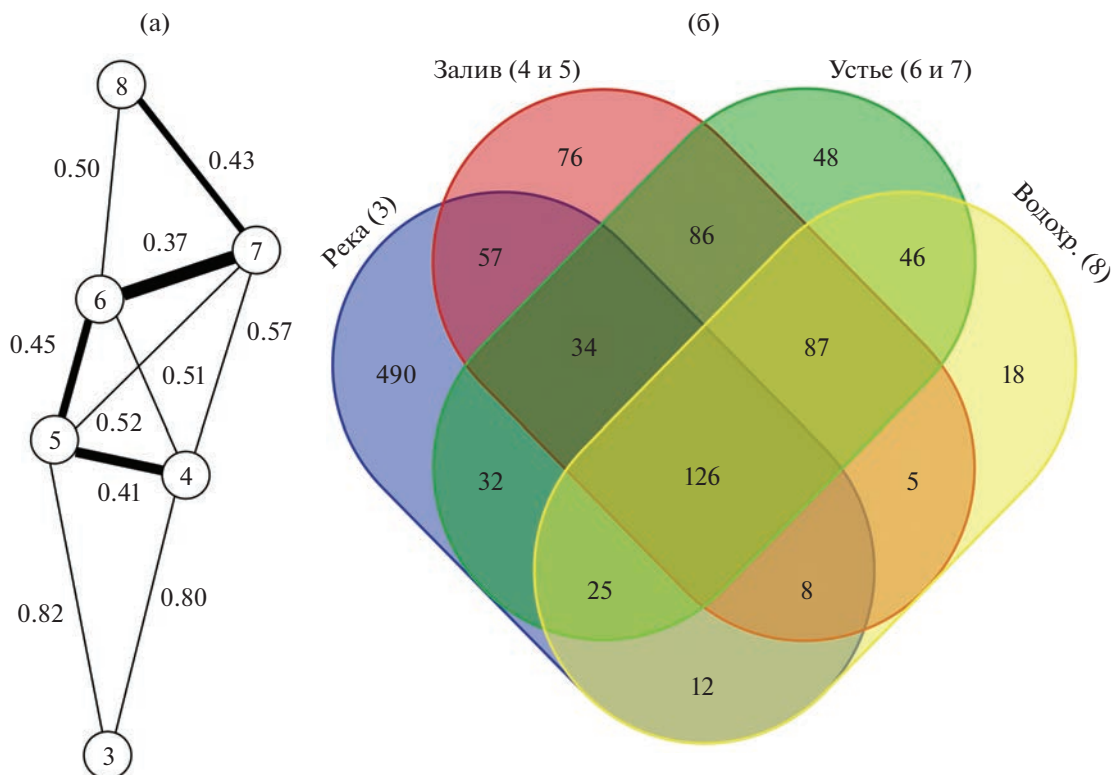


Рис. 3. (а) – граф различий между станциями по коэффициенту Жаккара. Жирными линиями показаны связи с расстоянием Жаккара менее 0.5. (б) – число общих и различных ОТЕ, обнаруженных на выделяемых с помощью кластерного анализа участках исследуемой акватории (диаграмма Венна).

Трансформация сообщества протистов в эстуарной системе р. Уса. Даже на уровне количества выделенных ОТЕ как оценки “видового богатства” очевидна линейная трансформация сообществ простейших вдоль длинной оси залива (табл. 2). Анализ изменения сообщества протистов с помощью качественного индекса Жаккара позволил объединить станции в несколько взаимосвязанных групп (рис. 3а). Станции 4–7 по своему составу образуют достаточно единую группу, однако различия по индексу Жаккара (1-*J*) между ними все же составляют не менее 37%. Особенно выделяется “речная” ст. 3, которая на этой диаграмме должна находиться не в плоскости всех остальных, а над ней, поскольку не показанные на схеме (рис. 3а) расстояния между ней и ст. 6–8 также составляют 81–85%. Наиболее близки по индексу Жаккара ст. 4 и 5 (41%), и, что довольно неожиданно, ст. 6 в устье залива и ст. 7 водохранилища ниже устья (37%). Мы предполагаем, что последнее связано с процессом водообмена между ними, обусловленным недельными и суточными колебаниями уровня водохранилища из-за работы Жигулевской ГЭС (Жариков, 2000), однако это предположение требует дополнительных подтверждений. При этом, траектория наименьших различий соответствует порядку станций вдоль оси

залива (рис. 3а). Таким образом, было выявлено четыре группы проб: речной участок (ст. 3), собственно залив (ст. 4 и 5), устьевой участок (ст. 6 и 7) и водохранилище вне влияния залива (ст. 8).

Выводы о закономерном изменении сообщества протистов вдоль длинной оси залива подтверждаются анализом уникальных и общих ОТЕ в этих четырех группах проб (диаграмма Венна, рис. 3б). Как видно из диаграммы, речной участок чрезвычайно сильно отличается от всех остальных. Более половины зарегистрированных в нем ОТЕ не встречены на остальных станциях, в то время как на остальных участках количество уникальных ОТЕ почти на порядок меньше.

Для количественной оценки β -разнообразия были рассчитаны коэффициенты различия Брея–Кёртиса и взвешенные UniFrac-расстояния (Lozupone, Knight, 2005) между исследованными пробами. Оба метода дали практически одинаковые результаты, выявив те же самые 4 группы сообществ (рис. 4а), которые выделяются и при кластерном анализе по качественному индексу Жаккара. Необходимо отметить, что концентрация Хл *a* и биомасса цианобактерий были максимальными на станциях собственно залива, а доля последовательностей Metazoa – на станциях устья залива и водохранилища (рис. 4б). В целом эти показате-

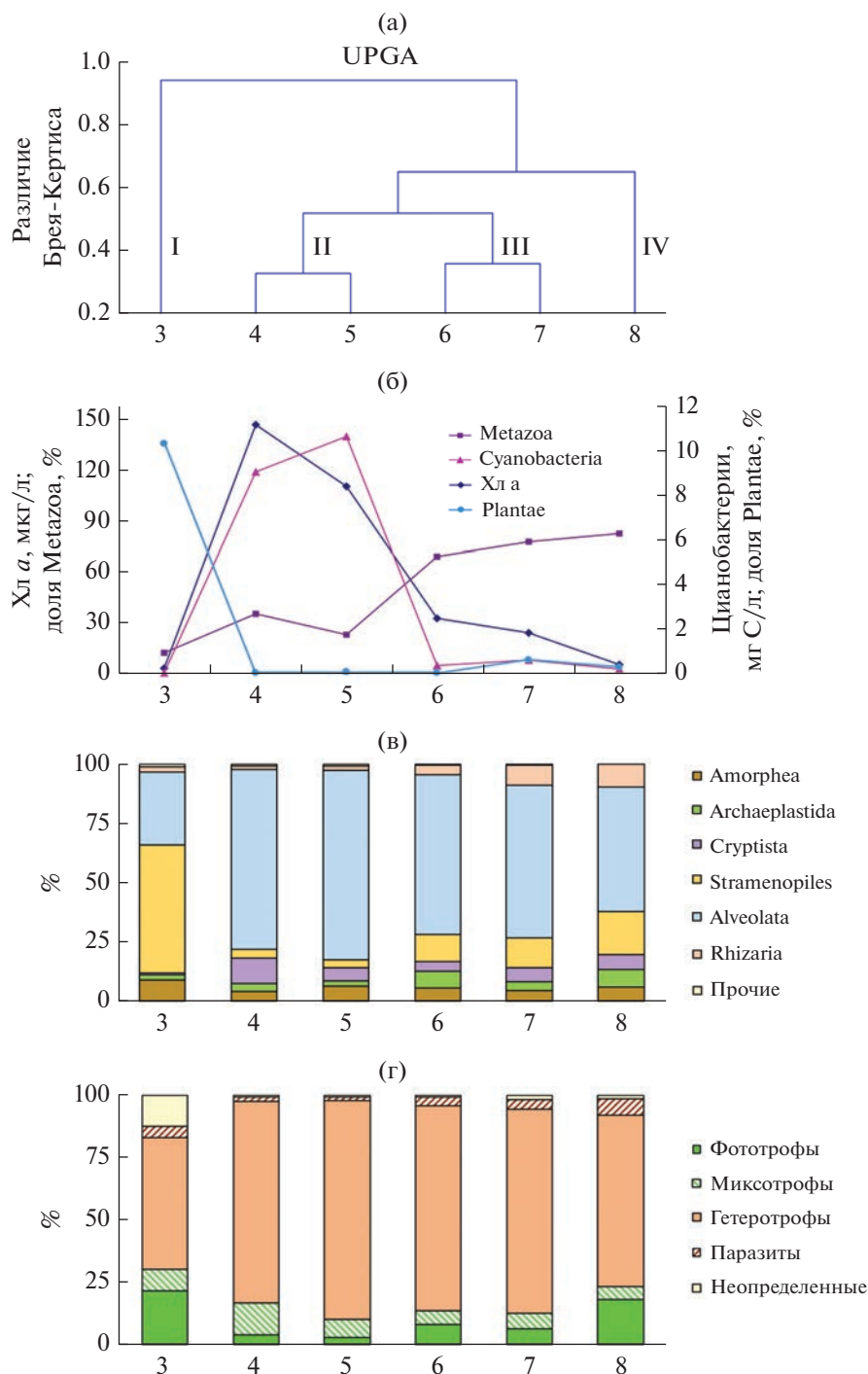


Рис. 4. Трансформация сообщества протистов в системе река–залив–водохранилище: (а) дендрограмма различия исследованных сообществ по индексу Брея-Кертиса методом невзвешенного среднего (UPGMA); (б) изменение экологических факторов, влияющих на сообщества протистов, в эстуарной системе; изменение таксономической (в) и функциональной (г) структуры сообществ протистов на разных станциях. По оси X здесь и на рис. 4 – номера станций (см. табл. 1). Номера кластеров указаны римскими цифрами.

ли, влияющие на сообщество протистов, закономерно меняются вдоль эстуарной системы, а их величины заметно различаются в разных кластерах (рис. 4а, 4б).

Сообщество протистов речного участка (I кластер) отличалось наибольшим числом ОТЕ и наибольшим разнообразием по индексу Шеннона, выровненности (индексу Пилоу) и индексу раз-

Таблица 4. Таксономическая принадлежность доминирующих ОТЕ (* – таксон указан с учетом поиска в базе данных Genbank) и доли (%) принадлежащих к ним последовательностей на исследованных станциях

| ОТЕ | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Таксономическая принадлежность |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| ОТЕ-3 | 0.025 | 11.1 | 10.5 | 12.8 | 11.9 | 4.70 | Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia |
| ОТЕ-4 | 0.024 | 4.14 | 16.6 | 5.64 | 3.73 | 3.38 | Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Epistylis* |
| ОТЕ-5 | 0.011 | 0.027 | 3.55 | 6.58 | 21.7 | 30.4 | Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Vorticella |
| ОТЕ-6 | 0.006 | 10.9 | 4.79 | 0.031 | 0.022 | 0.200 | Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia; Rimostrombidium |
| ОТЕ-7 | 0.009 | 3.71 | 8.63 | 3.48 | 1.94 | 0.061 | Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia |
| ОТЕ-9 | 12.3 | 0.005 | 0.002 | 0.012 | 0.004 | 0.018 | Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Epistylis* |
| ОТЕ-10 | 0.39 | 5.86 | 2.91 | 1.03 | 1.91 | 2.50 | Cryptophyceae; Cryptomonadales; Cryptomonas |
| ОТЕ-13 | 0.009 | 7.38 | 4.57 | 7.74 | 3.57 | 0.061 | Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Vorticella |
| ОТЕ-14 | 0.011 | 2.78 | 2.85 | 3.25 | 1.97 | 0.309 | Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia; Tintinnidium* |
| ОТЕ-15 | 0.53 | 4.79 | 4.86 | 1.12 | 0.296 | 0.206 | Ciliata; Spirotrichea; Hypotrichia |
| ОТЕ-17 | 0.002 | 1.94 | 4.14 | 2.24 | 1.58 | 2.65 | Ciliata; Litostomatea; Haptoria |
| ОТЕ-18 | 0.087 | 3.73 | 2.05 | 0.900 | 0.318 | 0.085 | Ciliata; Oligohymenophorea |
| ОТЕ-21 | 6.20 | 0.015 | 0.025 | 0.258 | 0.558 | 0.085 | Chrysophyceae |
| ОТЕ-22 | 5.84 | 0.020 | 0.001 | 0.016 | 0 | 0.006 | Diatomea; Coscinodiscophytina; Melosirids; Melosira |
| ОТЕ-23 | 5.15 | 0.003 | 0.001 | 0.006 | 0.013 | 0.012 | Chrysophyceae |
| ОТЕ-24 | 0.004 | 1.78 | 1.06 | 3.01 | 0.314 | 0.018 | Ciliata; Spirotrichea |
| ОТЕ-34 | 0.037 | 2.28 | 1.92 | 3.24 | 0.989 | 1.01 | Chlorophyta; Chlorophyceae; Chlamydomonadales; Phacotus |
| ОТЕ-37 | 1.14 | 0.221 | 0.078 | 0.351 | 1.28 | 9.70 | Diatomea; Bacillariophytina; Mediophyceae; Stephanodiscus* |
| ОТЕ-47 | 4.58 | 0.008 | 0.001 | 0.040 | 0.057 | 0.006 | Chrysophyceae |
| ОТЕ-49 | 0.005 | 0.148 | 0.096 | 1.02 | 3.09 | 0.012 | Rhizaria; Cercozoa; Paracercomonadidae; Paracercomonas |
| ОТЕ-53 | 0.004 | 0.007 | 0 | 1.251 | 3.02 | 7.00 | Rhizaria; Cercozoa; Thecofilosea; Cryomonadida |
| ОТЕ-60 | 0.001 | 0.076 | 0.052 | 0.472 | 1.43 | 3.65 | Perkinsea; Perkinsidae |
| ОТЕ-414 | 0.002 | 0.464 | 0.238 | 2.21 | 3.64 | 1.30 | Colpodellida |

нообразия Симпсона, хотя индекс Бергера-Паркера (доля первого по рангу ОТЕ) и не был минимальным (табл. 2). Основной вклад, в порядке убывания числа последовательностей в этом кластере вносили Stramenopiles, Alveolata и Amorphea (рис. 4в). Среди Stramenopiles преобладали хризифиты (31% общего числа последовательностей) и диатомей (18.6%). Среди хризифитов наибольший вклад вносили ОТЕ с неясной трофической стратегией (11.9%), причем в их число входят и два доминирующих ОТЕ (ОТЕ-21 и ОТЕ-47), поскольку они принадлежат к группе, содержащей как миксотрофные, так и гетеротрофные виды, но одинаково далеки и от тех, и от других (табл. 3, 4, 5, рис. 5). К гетеротрофным принадлежали 10.6% ОТЕ Chrysophyceae, доля фототрофов (в подавляющем большинстве способных к миксотрофии) была еще ниже (8.5%). Почти треть последовательностей диатомей (5.8%) составляла единственная ОТЕ-22, идентичная по нуклеотидной последовательности *Melosira varians* (табл. 4, 5). Alveolata были представлены почти исключительно инфузориями, среди которых доминировали Oligohymenophorea (18.4%). Около 3/4 всех после-

довательностей Amorphea составляли истинные грибы (Fungi), причем наряду с Chytridiomycota в заметных количествах присутствовали преимущественно наземные *Dicarya*. Вороничковые жгутиконосцы, Choanoflagellata, были немногочисленны в сравнении с другими станциями (табл. 3, рис. 5).

В отличие от речного участка (I кластер), в остальных кластерах основной вклад в количество последовательностей вносили Alveolata (табл. 3, рис. 4, 5).

Сообщества станций собственно залива (кластер II) характеризовались наиболее сильным доминированием Alveolata, среди которых преобладали инфузории (рис. 4в, 5). В отличие от I кластера, доминирование в составе инфузорий перешло от Oligohymenophorea, среди которых доминировали сидячие эпифитные формы, к эупланктонным Spirotrichea. В составе фототрофных противосто преобладали криптофитовые, динофитовые и, в меньшей степени, зеленые водоросли, а диатомовые были очень немногочисленны (табл. 3, рис. 5). Stramenopiles в целом были представлены небольшим числом последовательностей, но довольно разнообразны (рис. 5). В их составе преоб-

Таблица 5. Последовательности в базе данных Genbank, ближайшие к доминирующим ОТЕ

| ОТЕ | Ближайший культивируемый вид, штамм | | Ближайший изолят или некультивируемый клон | |
|-----------|---|------------|--|--------------------------------|
| | название | % сходства | название | № в Genbank |
| Ciliata | | | | |
| ОТЕ-3 | <i>Strobilidium caudatum</i> | 91.52 | AY143573 | Rimostrombidium sp. FU44-33 |
| ОТЕ-4 | <i>Epistylis foissneri</i> WT2019052101 | 97.9 | MW172838 | <i>Epistylis</i> sp. 4 PS-2016 |
| ОТЕ-5 | <i>Vorticella campanula</i> 17S1S2 | 100 | JN120219 | |
| ОТЕ-6 | <i>Rimostrombidium lacustris</i> 10ZS18 | 100 | LS999904 | |
| ОТЕ-7 | <i>Tintinnidium fluviatile</i> CBO42 | 100 | JQ408163 | |
| ОТЕ-9 | <i>Epistylis vaginula</i> WT2018120601 <i>Epistylis foissneri</i> WT2019052101 | 98.2 | MW172840 MW172838 | eukaryote OD_euk_21 |
| ОТЕ-13 | <i>Vorticella citrina</i> 80SmallVor | 99.7 | JN120226 | |
| ОТЕ-14 | <i>Strobilidium caudatum</i> | 93.53 | AY143573 | clone AY2009E19 |
| ОТЕ-15 | <i>Urosoma salmasira</i> DJY2015111406 | 98.83 | MH393884 | clone 2-40 |
| ОТЕ-17 | <i>Pseudoholophrya terricola</i> | 96.36 | KT246085 | ciliate clone NPS05-106 |
| ОТЕ-18 | <i>Cinetochilum margaritaceum</i> CMFAC | 90.77 | MW405096 | ciliate isolate 3ZS18 |
| ОТЕ-24 | <i>Oxytricha elegans</i> | 92.98 | AM412767 | ciliate clone C-24 |
| Cryptista | | | | |
| ОТЕ-10 | <i>Cryptomonas rostriformis</i> CPCC343 <i>Cryptomonas ovata</i> UTEX LB2783 <i>Cryptomonas tetrapyrenoidosa</i> CCAP979/26 <i>Cryptomonas lucens</i> CCAP979/35 <i>Cryptomonas curvata</i> CNUCRY 90 | 100 | MK828441 MK828421 MK828416 MK828413 KF907377 | |

Таблица 5. Окончание

| ОТЕ | Ближайший культивируемый вид, штамм | | № в Genbank | | Ближайший изолят или некультивируемый клон | |
|----------------|--|------------|--|--------------------------------|--|-------------|
| | название | % сходства | № в Genbank | название | % сходства | № в Genbank |
| Archaeplastida | | | | | | |
| ОТЕ-34 | <i>Phacotus lenticularis</i> | 100 | X91628 | | | |
| Stramenopiles | | | | | | |
| ОТЕ-21 | <i>Urostipulosphaera notabilis</i> U12-1 | 94.22 | MK153247 | isolate P506 | 99.42 | MH008994 |
| ОТЕ-23 | <i>Chrysophaerella brevispina</i> S 74.D5 | 86.48 | HF549059 | freshwater eukaryote K7MAR2010 | 100 | AB622324 |
| ОТЕ-47 | <i>Urostipulosphaera notabilis</i> U12-1 | 94.22 | MK153247 | clone tf1-1-29 | 99.71 | MT813497 |
| ОТЕ-22 | <i>Melosira varians</i> CHMP7 | 100 | AY569590 | | | |
| ОТЕ-37 | <i>Stephanodiscus</i> cf. <i>akanensis</i> TNS AL-56510 <i>Stephanodiscus hantzschii</i> UTCC 267 <i>Stephanodiscus minutulus</i> D03_012 <i>Stephanodiscus parvus</i> TCC355 <i>Cyclostephanos dubius</i> Waco5 <i>Peridiniopsis niei</i> Donghu | 100 | AB831893 GQ844874 FR873265 KT072953 HQ912575 JX141779 | | | |
| Rhizaria | | | | | | |
| ОТЕ-49 | <i>Metabolomonas insania</i> HFCC 922 | 87.85 | HM536167 | isolate OTU494 | 100 | MK350854 |
| ОТЕ-53 | <i>Protaspis grandis</i> | 93.24 | DQ303924 | clone KRL01E39 | 100 | JN090899 |
| Protalveolata | | | | | | |
| ОТЕ-60 | <i>Peridinium umbonatum</i> FACHB 329 | 81.48 | GU001637 | Perkinsidae clone OTU71 | 97.94 | MH022910 |
| ОТЕ-414 | <i>Amphidinium herdmanni</i> CCCM 532 | 90.78 | AF274253 | clone KRL09E06 | 97.68 | KC315835 |

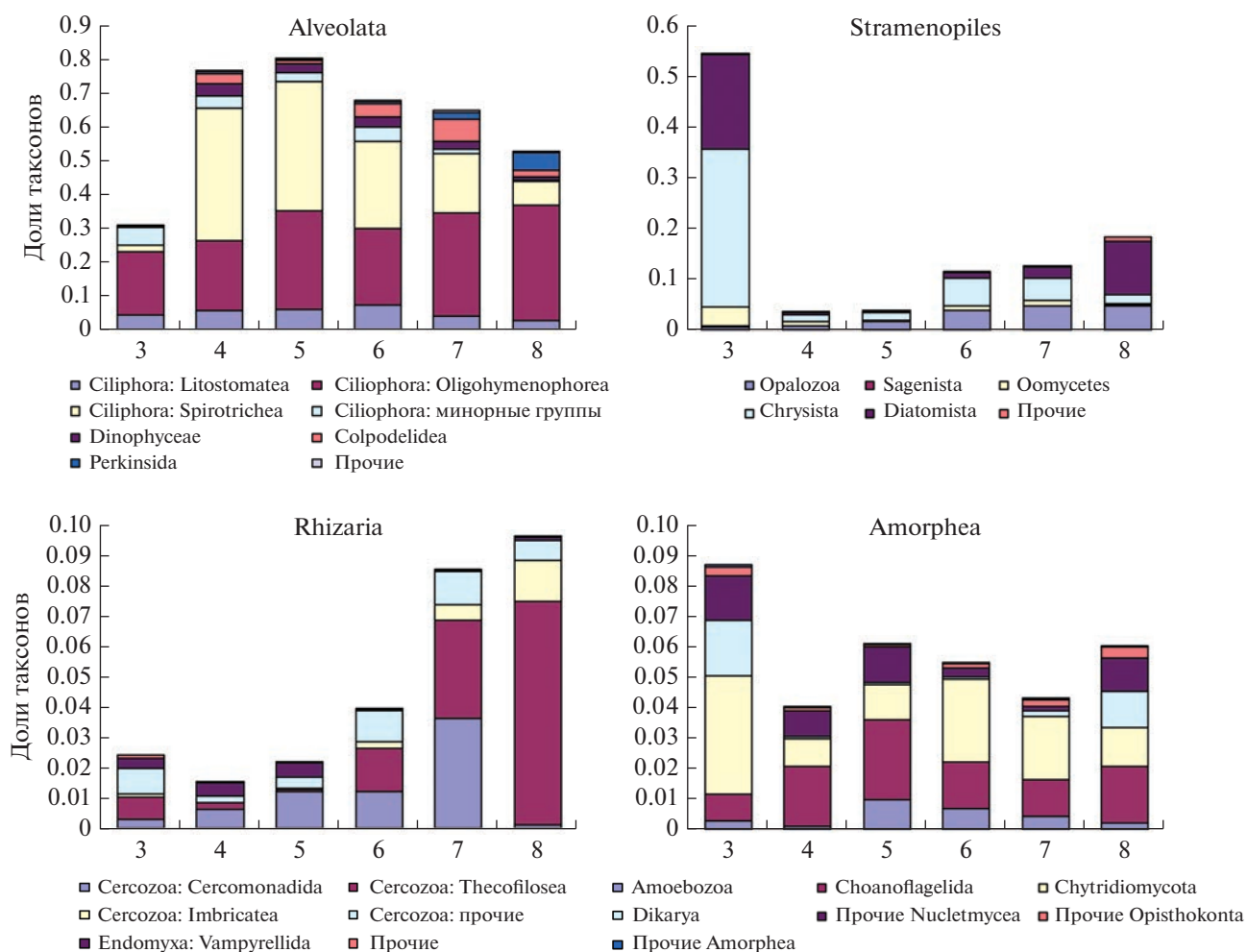


Рис. 5. Доли таксонов (от общего числа последовательностей), принадлежащих к доминирующим группам протистов на разных станциях исследованного района.

ладали гетеротрофы, причем наряду с хризифитовыми, заметную долю составляли жгутиконосцы Vicosoecida (Opalozoa) и оомицеты. Однако доминирующей группой среди гетеротрофных жгутиконосцев являлись Choanoflagellata (Amorphea: Opisthokonta). Относительно высоким также был вклад Katablepharida (Cryptista); на ст. 4 они были второй по числу последовательностей группой гетеротрофных жгутиконосцев (табл. 3, рис. 5).

В сообществах кластера III основной вклад, в порядке убывания числа последовательностей вносили Alveolata, Stramenopiles, Rhizaria и Archaeplastida (рис. 4в). Устьевой участок залива (ст. 6) заметно отличался от станций собственно залива (ст. 4 и 5) и был близок по составу протистов к ст. 7, расположенной в водохранилище ниже устья залива (рис. 4, 5). В этом кластере среди инфузорий так же, как в заливе преобладали Oligohymenophorea и Spirotrichea, однако их соотношение несколько изменилось. Для этих двух станций характерна большая, по сравнению с заливом, доля Rhizaria и

Stramenopiles. Кроме того, здесь увеличены доли Chlorophyta, Colpodelleida и Chrysisita, а среди Rhizaria преобладали Cercomonadida и Thecofilosea (рис. 4в, 5, табл. 3).

Надо отметить, что в кластере II, с наибольшим развитием цианобактерий, доля миксотрофов примерно в 3 раза превышала долю “чистых” фототрофов, тогда как в кластере III их вклады были сопоставимы (табл. 3, рис. 4б, 4г).

Течения в прилегающей к заливу части водохранилища направлены в сторону гидроузла, от ст. 8 к ст. 7, а преобладающие ветра способствуют ветровому транспорту из залива в водохранилище, поэтому ст. 8 оказывается наиболее изолированной от залива. Состав протистов этой станции (IV кластер) вполне ожидаемо сильно отличался от остальных кластеров (табл. 3, рис. 4, 5). Среди супергруппы SAR здесь преобладали инфузории (преимущественно Oligohymenophorea). Как и в кластере I, доля фототрофных протистов была повышена (рис. 4г), и среди них преобладали ди-

атомеи; однако состав доминирующих ОТЕ существенно отличался от речного участка (табл. 3, 4 и 5). В целом, в кластере IV состав Stramenopiles был значительно более, а Rhizaria – менее разнообразен, чем на речной станции (рис. 5). В то же время, по обилию последовательностей Plantae (рис. 4б) и наземных Diptera (рис. 4в, 5), она сравнима с речной станцией, что, видимо, свидетельствует о существенном влиянии на нее наземной части водосбора, вероятно, из-за вышележащего строительства автомобильного моста через Климовскую узость водохранилища. Возможно, именно это антропогенное воздействие приводит к определенному сближению состава протистов станций кластеров I и IV на уровне высших таксонов, однако на уровне видов (ОТЕ) это сближение отсутствует (табл. 4).

Исследованная нами эстуарная система несет отдельные черты как экоклина, так и экотона (Attrill, Rundle, 2002). Безусловно, наиболее выраженные, и при этом разнонаправленные, для разных групп протистов изменения происходят при переходе от речного, лотического, участка к лентическим. На лентических станциях доли таких групп, как Rhizaria, инфузории кл. Oligohymenophorea и Litostomatea, а также Protalveolata относительно монотонно изменялись вдоль длинной оси залива по направлению к водохранилищу (рис. 4в, 5). Так, например, вклад Rhizaria закономерно увеличивался от ст. 4 к ст. 8.

Однако другие группы достигают выраженных локальных максимумов или минимумов в средней части залива: Stramenopiles и ряд принадлежащих к ним таксонов – минимума, а Choanoflagellata и инфузории кл. Spirotrichea, наоборот, максимума (рис. 4в, 5), что более характерно для экотона. Очень отличается от монотонного и изменение отдельных таксонов Rhizaria (рис. 5).

Все наши данные свидетельствуют о том, что залив в целом и станция водохранилища ниже устья залива образуют относительно связную систему, причем конечные точки – река (ст. 3) и участок водохранилища выше устья (ст. 8) – наиболее контрастны по составу протистов. Станции кластеров II и III довольно близки между собой, что указывает на существенную связь устьевой части залива с водохранилищем. Причиной этого, вероятно, является гидрологическая взаимосвязь между заливом и водохранилищем из-за циркуляционных течений, ветровых нагонов и течений, вызванных работой ГЭС.

Влияние экологических факторов на планктонных протистов эстуарной зоны р. Уса. Судя по результатам канонического корреляционного анализа, развитие Archaeplastida, Rhizaria и минорных групп протистов положительно коррелировало с долей Metazoa в общем составе эукариот, которое может рассматриваться как грубый показатель интенсив-

ности выедания (рис. 6). Развитие Stramenopiles и Amorphaea было положительно связано с долей последовательностей высших растений, вероятно, служащей индикатором влияния водосборной территории, поскольку, судя по отсутствию хлоропластных последовательностей в полученной параллельно библиотеке 16S РНК (не показ.), они были представлены в наших пробах только морт-массой и пылью. Остальные крупные группы, Haptista, Cryptista и Alveolata, были отрицательно связаны как с выеданием, так и с влиянием водосбора, и слабо положительно связаны с интенсивностью цветения цианобактерий (рис. 6). Основное влияние на развитие фототрофного компонента эукариотического планктона оказывают конкурентные взаимоотношения с цианобактериями; развитие последних приводит не только к подавлению развития эукариотических водорослей, но и к изменению их структуры, в том числе к увеличению доли миксотрофных видов. “Цветение” цианобактерий оказывает влияние и на структуру гетеротрофной части сообщества, хотя это влияние выражено менее ярко.

Доминирующие ОТЕ, интересные и неожиданные находки. Всего было выделено 23 доминирующих ОТЕ (табл. 4, 5). Из них более половины, 12 ОТЕ, принадлежали Ciliata; остальные относились к Chrysophyta (3 ОТЕ), Diatomea, Rhizaria и Protalveolata (по 2 ОТЕ), Chlorophyta и Cryptophyceae (по 1 ОТЕ). За исключением ОТЕ-18 и ОТЕ-24, представители Ciliata, Chlorophyta и Cryptophyceae уверенно классифицируются по крайней мере до рода (сходство с изолятами валидных видов >95–96%). Проблему составляет скорее низкое разрешение для баркодинга выбранного участка 18S рРНК. Так, в случае ОТЕ-9, ОТЕ-10 и ОТЕ-37 идентичные последовательности, совпадающие или очень близкие к обнаруженным в наших пробах имели изоляты сразу нескольких разных видов (табл. 5). В то же время, доминирующие ОТЕ Chrysophyta, Rhizaria и Protalveolata имели низкое сходство с последовательностями валидно описанных видов, и, следовательно, относились к новым и неописанным таксонам.

Наряду с доминирующими видами, большой интерес представляют и малочисленные, в т.ч. единичные, находки.

Две из обнаруженных в библиотеке ОТЕ (ОТЕ-754 и ОТЕ-1077) принадлежат к классу Volidophyceae (=Parmales). Эта группа, сестринская по отношению к диатомовым, до последнего времени считалась исключительно морской (Kuwata *et al.*, 2018), хотя с начала 21 века ее представители были зарегистрированы в нескольких пресных озерах (Richards *et al.*, 2005). После недавнего обнаружения Volidophyceae в оз. Байкал было выдвинуто предположение об их медленном проникновении из морских местообитаний в длительно существу-

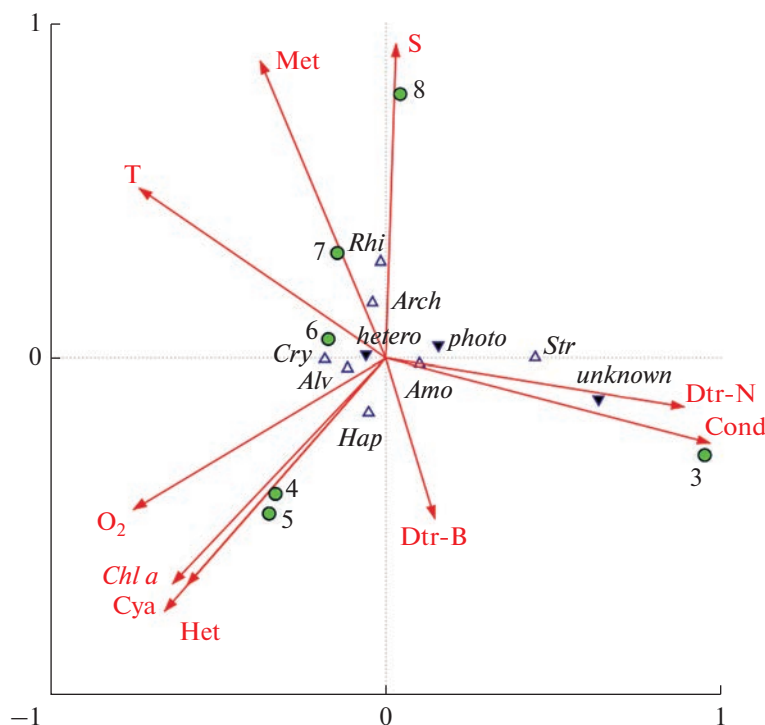


Рис. 6. Результаты канонического корреляционного анализа основных биотических и абиотических факторов и таксономического склад сообщества протистов на исследованных станциях Усинского залива и прилегающего участка Куйбышевского водохранилища. Факторы: Met – Metazoa, S – прозрачность, T – температура, O₂ – концентрация растворенного кислорода, Chl a – концентрация хлорофилла a, Cya – биомасса цианобактерий, Het – биомасса гетеротрофных бактерий, Dtr-B – масса детритных частиц, Dtr-N – количество детритных частиц, Cond – электропроводность. Трофическая специализация протистов: Hetero – гетеротрофные, Photo – фототрофные, Unknown – “неопределенные”. Макротаксоны: Amo – Amorphea, Arc – Archaeplastida, Str – Stramenopiles, Alv – Alveolata, Rhi – Rhizaria, Cry – Cryptista, Nap – Naptista, Oth – прочие. Станции: 3–8.

ющие “реликтовые” водоемы (Anpenkova *et al.*, 2020). Однако наше обнаружение представителей Bolidophyceae в Куйбышевском водохранилище показывает, что распространение этой группы в пресных водоемах вовсе не требует длительного стабильного существования водных экосистем, а вероятно, вообще несколько более широко, чем представлялось.

В качестве других интересных находок можно отметить обнаружение в составе Archaeplastida ОТЕ-626, принадлежащей к недавно обнаруженной гетеротрофной группе Rhodelphida (Gawryluk *et al.*, 2019). Ее сходство с *Rhodelphis limneticus* Colp-38 (МК966713) составляет 94.2%. В составе Rhizaria присутствует ОТЕ-642, вероятно принадлежащая к р. *Paulinella* (сходство с последовательностью KX927958 *Paulinella micropora* KR04 – 94.4%). Возможно, этот организм содержит цианеллы и является фототрофом, поскольку последовательности, сходные с цианеллами близкого вида, *Paulinella chromatophora*, присутствуют в библиотеке прокариотических последовательностей исследованных станций, анализ которой будет опубликован позднее. Обе ОТЕ представлены небольшим количеством последовательностей и встречены только

на речной станции; они, вероятно, относятся к новым видам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным метабаркодинга 18S рРНК, в составе сообщества протистов эстуарного участка р. Усы и близлежащего участка Куйбышевского водохранилища обнаружено 1150 ОТЕ, среди которых преобладают представители SAR-супергруппы, Stramenopiles на речном участке и Alveolata – на остальных станциях. Все доминирующие по числу последовательностей ОТЕ принадлежат к группе Diaphoretikes, причем более половины из них составляют инфузории. Среди полученных последовательностей обнаружены принадлежащие к редким для пресных вод таксонам, в частности, Bolidophyceae (фототрофные строменилы, родственные диатомовым) и Rhodelphida (гетеротрофная группа, сестринская по отношению к Rhodophyta). Эти интересные находки расширяют биогеографию этих групп, которые в пресных водах обнаружены в очень небольшой части водоемов, и в основном молекулярно-генетическими методами.

Наблюдается очевидная трансформация сообществ простейших вдоль длинной оси исследованного района от речного участка до собственно водохранилища. Наиболее выражена она при переходе от речных к озерным условиям; однако прослеживается и в пределах лентического участка. Всего можно выделить 4 взаимосвязанных сообщества протистов: речного участка, собственно залива, устьевой зоны и водохранилища вне влияния залива. Наиболее контрастными по составу являются сообщества речного участка и участка водохранилища выше устья. В целом, исследованная нами эстуарная система несет черты как экотона, так и экотона. Основное влияние на развитие фототрофного компонента эукариотического планктона оказывают конкурентные взаимоотношения с цианобактериями; развитие последних приводит не только к подавлению развития эукариотических водорослей, но и к изменению структуры их сообщества. “Цветение” цианобактерий оказывает влияние и на структуру гетеротрофной части сообщества, хотя это влияние проявляется менее ярко.

Представленные нами данные могут служить отправной точкой для сравнения исследованного района с другими участками водохранилищ Волжско-Камского каскада и в целом с водоемами бассейна Волги.

Работа выполнена в рамках Государственного Задания по теме “Изменение, устойчивость и сохранение биологического разнообразия под воздействием глобальных изменений климата и интенсивной антропогенной нагрузки на экосистемы Волжского бассейна” (тема № 122032500063-0) и при частичной финансовой поддержке Губернского гранта в области науки и техники, утвержденного распоряжением Губернатора Самарской области от 30.06.2021 № 202-р. (грант № 38).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.А., Быкова С.В., Уманская М.В., Тарасова Н.Г.* Свободноживущие инфузории Усинского залива (Куйбышевское водохранилище) в разгар цианобактериального “цветения” // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2021. Т. 23. № 5(103). С. 127–134.
- Быкова С.В.* Структура и пространственное распределение инфузорий в планктоне водохранилищ Средней и Нижней Волги // Биология внутренних вод. 2021. № 4. С. 353–366.
- Горохова О.Г., Зинченко Т.Д.* Фитопланктон равнинной р. Уса и ее притоков (бассейн Куйбышевского водохранилища) // Поволжский экологический журн. 2018. № 4. С. 391–403.
- Жариков В.В.* Специфика водохранилищ Волги как среды обитания гидробионтов (на примере свободноживущих инфузорий) // Теоретические проблемы экологии и эволюции (3-и Люблинские чтения). Тольятти: ИЭВБ РАН, 2000. С. 64–72.
- Корнева Л.Г.* Фитопланктон водохранилищ бассейна Волги. Кострома: Костромской печатный дом, 2015. 284 с.
- Косолапов Д.Б., Копылов А.И., Косолапова Н.Г.* Гетеротрофные жгутиконосцы в водной толще и донных отложениях Рыбинского водохранилища: видовой состав, численность, биомасса, роль в потреблении бактерий // Биология внутренних вод. 2017. № 2. С. 76–87.
- Косолапов Д.Б., Копылов А.И., Мильникова З.М., Косолапова Н.Г.* Структура микробного планктонного сообщества Шекснинского водохранилища // Тр. ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН. 2016. № 74(77). С. 5–20.
- Ротарь Ю.М.* Планктонные инфузории Куйбышевского водохранилища: Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1995.
- Тарасова Н.Г., Уманская М.В.* Видовой состав и эколого-географическая характеристика альгофлоры планктона реки Уса (Самарская область) // Фиторазнообразие Восточной Европы. 2021. Т. 15. № 4. С. 115–135.
- Тихоненков Д.В., Загуменный Д.Г., Беляев А.О., Плотников А.О., Герасимов Ю.В.* Метабаркодинговые исследования протистов реки Волги / Биология водных экосистем в XXI в.: факты, гипотезы, тенденции: Тезисы докладов Всерос. конф. Ярославль: Филигрань, 2021. С. 181.
- Уманская М.В., Быкова С.В., Горбунов М.Ю., Краснова Е.С., Тарасова Н.Г.* Трансформация одноклеточного планктона в системе река–залив–равнинное водохранилище в начальной фазе цианобактериального цветения // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2021. Т. 23. № 5(103). С. 144–151.
- Фитопланктон Нижней Волги: водохранилища и низовье реки. СПб.: Наука, 2006. 229 с.
- Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukeš J., Schoch C.L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M.W., Burki F., Cardenas P., Cepicka I., Chistyakova L., del Campo J., Dunthorn M., Edvardson B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A.A., Hoppenrath M., James T.Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D.J.G., Lara E., Gall L. Le, Lynn D.H., Mann D.G., Massana R., Mitchell E.A.D., Morrow C., Park J.S., Pawlowski J.W., Powell M.J., Richter D.J., Rueckert S., Shadwick L., Shitmano S., Spiegel F.W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q.* Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes // J. Eukaryot. Microbiol. 2019. V. 66. № 1. P. 4–119.
- Andersen K.H., Aksnes D.L., Berge T., Fiksen Ø., Visser A.* Modelling emergent trophic strategies in plankton // J. Plankton Res. 2015. V. 37. № 5. P. 862–868.
- Annenkova N.V., Giner C.R., Logares R.* Tracing the origin of planktonic protists in an ancient lake // Microorganisms. 2020 V.8. № 4. P. 543.
- Attrill M.J., Rundle S.D.* Ecotone or ecocline: ecological boundaries in estuaries // Estuar. Coast. Shelf Sci. 2002. V. 55. № 6. P. 929–936.
- Bock C., Olefeld J.L., Vogt J.C., Albach D.C., Boenigk J.* Phylogenetic and functional diversity of Chrysophyceae in

- inland waters // *Organisms Diversity & Evolution*. 2022. V. 22. № 2. P. 327–341.
- Boenigk J., Wodniok S., Bock C., Beisser D., Hempe C., Grossmann L., Lange A., Jensen M. Geographic distance and mountain ranges structure freshwater protist communities on a European scale // *Metabarcoding and Metagenomics*. 2018. № 2. P. e21519.
- Chakraborty S., Nielsen L.T., Andersen K.H. Trophic strategies of unicellular plankton // *Am. Nat.* 2017. V. 189. № 4. P. E77–E90.
- Charvet S., Vincent W.F., Lovejoy C. Chrysophytes and other protists in High Arctic lakes: molecular gene surveys, pigment signatures and microscopy // *Polar Biol.* 2012. V. 35. P. 733–748.
- Cruaud P., Vigneron A., Fradette M.S., Dorea C.C., Culley A.I., Rodriguez M.J., Charette S.J. Annual protist community dynamics in a freshwater ecosystem undergoing contrasted climatic conditions: The Saint-Charles River (Canada) // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 2359.
- David G.M., Moreira D., Reboul G., Annenkova N.V., Galindo L.J., Bertolino P., López-Archilla A.I., Jardillier L., López-García P. Environmental drivers of plankton protist communities along latitudinal and vertical gradients in the oldest and deepest freshwater lake // *Env. Microbiol.* 2021. V. 23. № 3. P. 1436–1451.
- Debroas D., Domaizon I., Humbert J. F., Jardillier L., Lepère C., Oudart A., Taïb N. Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017. V. 93. № 4. P. fix023.
- Dorrell R.G., Azuma T., Nomura M., de Kerdrel G.A., Paoli L., Yang S., Bowler C., Ishii K.-I., Miyashita H., Gillian H., Gile G.H., Kamikawa R. Principles of plastid reductive evolution illuminated by nonphotosynthetic chrysophytes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019. V. 116. № 14. P. 6914–6923.
- Edgar R. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 10. P. 996–998.
- Fujimoto M., Cavaletto J., Liebig J.R., McCarthy A., Vanderploeg H.A., Deneff V.J. Spatiotemporal distribution of bacterioplankton functional groups along a freshwater estuary to pelagic gradient in Lake Michigan // *J. Great Lakes Res.* 2016. V. 42. № 5. P. 1036–1048.
- Gawryluk R.M., Tikhonenkov D.V., Hehenberger E., Husnik F., Mylnikov A.P., Keeling P.J. Non-photosynthetic predators are sister to red algae // *Nature*. 2019. V. 572. № 7768. P. 240–243.
- Geisen S., Vaulot D., Mahé F., Lara E., de Vargas C., Bass D. A user guide to environmental protistology: primers, metabarcoding, sequencing, and analyses // *BioRxiv*. 2019. P. 850610.
- Gong J., Dong J., Liu X., Massana R. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates // *Protist*. 2013. V. 164. № 3. P. 369–379.
- Herdendorf C.E. Great lakes estuaries // *Estuaries*. 1990. V. 13. № 4. P. 493–503.
- Kuwata A., Yamada K., Ichinomiya M., Yoshikawa S., Tragin M., Vaulot D., Lopes dos Santos A. Bolidophyceae, a sister picoplanktonic group of diatoms – a review // *Front. Mar. Sci.* 2018. V. 5. P. 370.
- Li R., Jiao N., Warren A., Xu D. Changes in community structure of active protistan assemblages from the lower Pearl River to coastal Waters of the South China Sea // *Eur. J. Protistol.* 2018. V. 63. P. 72–82.
- Likens G.E. (Ed.) *Plankton of inland waters*. Academic Press, 2010. 412 p.
- Loken L.C., Small G.E., Finlay J.C., Sterner R.W., Stanley E.H. Nitrogen cycling in a freshwater estuary // *Biogeochemistry*. 2016. V. 127. № 2. P. 199–216.
- Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities // *Applied and environmental microbiology*. 2005. V. 71. № 12. P. 8228–8235.
- Mangot J.F., Domaizon I., Taïb N., Marouni N., Duffaud E., Bronner G., Debroas D. Short-term dynamics of diversity patterns: evidence of continual reassembly within lacustrine small eukaryotes // *Environ. Microbiol.* 2013. V. 15. № 6. P. 1745–1758.
- Nowak B.M., Ptak M. The effect of a water dam on Lake Powidzkie and its vicinity // *Bull. Geogr. Phys. Geogr. Ser.* 2018. V. 15. № 1. P. 5–13.
- Obodovskiy O., Habel M., Szatten D., Rozlach Z., Babiński Z., Maerker M. Assessment of the Dnieper Alluvial Riverbed stability affected by intervention discharge downstream of Kaniv Dam // *Water*. 2020. V. 12. № 4. P. 1104.
- Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 1823–1829.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41(D1). P. D590–D596.
- Richards T.A., Vepritskiy A.A., Gouliamova D.E., Nierzwicki-Bauer S.A. The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. № 9. P. 1413–1425.
- Saad J.F., Schiaffino M.R., Vinocur A., O'Farrell I., Tell G., Izaguirre I. Microbial planktonic communities of freshwater environments from Tierra del Fuego: dominant trophic strategies in lakes with contrasting features. // *J. Plankton Res.* 2013. V. 35. № 6. P. 1220–1233.
- Singer D., Seppely C. V., Lentendu G., Dunthorn M., Bass D., Belbahri L., Blandenier Q., Debroas D., Arjen de Groot G.A., de Vargas C., Domaizon I., Duckert C., Izaguirre I., Koenig I., Mataloni G., Schiaffino M.R., Mitchell E.A.D., Geisen S., Lara, E. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems // *Environ. Int.* 2021. V. 146. P. 106262.
- Stoecker D.K., Hansen P.J., Caron D.A., Mitra A. Mixotrophy in the marine plankton // *Ann. Rev. Marine Sci.* 2017. V. 9. P. 311–335.
- Suzuki S., Matsuzaki R., Yamaguchi H., Kawachi M. What happened before losses of photosynthesis in cryptophyte algae? // *Molecular biology and evolution*. 2022. V. 39. № 2. P. msac001.
- Telesh I.V., Khlebovich V.V. Principal processes within the estuarine salinity gradient: a review // *Mar. Pollut. Bull.* 2010. V. 61. № 4–6. P. 149–155.

- Wang J., Fu Z., Qiao H., Liu F. Assessment of eutrophication and water quality in the estuarine area of Lake Wuli, Lake Taihu, China // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 650. P. 1392–1402.
- Weber A.A., Pawlowski J. Can abundance of protists be inferred from sequence data: a case study of Foraminifera // *PloS one.* 2013 V. 8. № 2. P. e56739.
- Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control // *F1000Research.* 2018. V. 7. P. 1338.
- Xu H., Zhang S., Ma G., Zhang Y., Li Y., Pei H. 18S rRNA gene sequencing reveals significant influence of anthropogenic effects on microeukaryote diversity and composition along a river-to-estuary gradient ecosystem // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 705. P. 135910.
- Zhao F., Filker S., Xu K., Huang P., Zheng S. Microeukaryote communities exhibit phyla-specific distance-decay patterns and an intimate link between seawater and sediment habitats in the Western Pacific Ocean // *Deep-Sea Res. I: Oceanogr. Res. Pap.* 2020. V. 160. P. 103279.

Diversity and Transformation of the Freshwater Planktonic Protist Community Along the Estuarine Tributary Zone of the Large Plainland Reservoir: 18S RRNA Gene Metabarkoding

M. V. Umanskaya^{1, #}, M. Yu. Gorbunov¹, S. V. Bykova¹, and N. G. Tarasova¹

¹ Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of Volga River Basin RAS, 10, Komzin str., Togliatti, 445003 Russia

[#]e-mail: mvumansk67@gmail.com

The first data on the composition and diversity of summer planktonic protist community in the Usinsky Bay and the adjacent water area of the Kuibyshev Reservoir, obtained using high-throughput sequencing of the 18S ribosomal RNA gene, are presented. In the structure of the protist community, 1150 OTUs were found, among which representatives of the SAR supertaxon (Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria) predominate. In the jointed library, OTUs are dominated by Stramenopiles, represented, in descending order, by Chrysophyceae (8.5%), Opalozoa (8.3%), Diatomea (4.7%), and Oomycetes (Peronosporomycetes) (3.7%), and by the number of sequences, by Alveolata (62.0%) and, first of all, Ciliata (56.9%). Four interconnected communities of protists were distinguished: the river section, the bay itself, the mouth zone, and the reservoir outside the influence of the bay (above the mouth). The most contrasting were the communities of the river area and the area of the reservoir above the mouth. In general, the studied estuarine system has the features of both an ecocline and an ecotone. The development of the phototrophic component of eukaryotic plankton is mainly influenced by competitive relationships with cyanobacteria. Cyanobacterial “bloom” also affects the structure of the heterotrophic part of the community, although this effect is less pronounced. The development of Archaeplastida, Rhizaria, and minor groups of protists positively correlates with the proportion of Metazoa sequences in samples, which reflects the intensity of metazooplankton pressure. Some of the obtained sequences belong to taxa rarely found in freshwater, such as Bolidophyceae and Rhodelphida. These finds expand the biogeography of these groups, which have so far been found in very few freshwater reservoirs.

Keywords: protists, plankton, high-throughput sequencing, taxonomic composition, spatial distribution, Kuibyshev reservoir, Usa River

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.553.2:577.15

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭЛЛАГОТАНИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ
КИШЕЧНИКА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

© 2023 г. Д. В. Микряков*, А. Ф. Тарлева*^{*, @}

*ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Ярославская область, Борок, 109, 152742 Россия

[@]E-mail: ns_tarleva@ibiw.ru

Поступила в редакцию 04.07.2022 г.

После доработки 24.08.2022 г.

Принята к публикации 24.08.2022 г.

Изучено влияние эллаготанинов на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса форели. Опытным группам рыб давали корм с добавкой на основе эллаготанинов (с содержанием активного вещества 0.38, 0.76 и 1.14 г/кг корма). Отбор проб проводили у 8 особей из каждой группы перед началом эксперимента, на 15, 30, 45 и 60 сутки. Исследование показало, что эллаготанины, оказывают стимулирующий эффект на активность пептидаз. Максимальное увеличение ферментативной активности в опытных группах по сравнению с контрольной зафиксировано на 45 сут эксперимента. Установлено более значительное увеличение активности пептидаз слизистой оболочки кишечника, по сравнению с химусом. Сделан вывод, что эллаготанины стимулируют первоначальный этап расщепления белковых компонентов пищи.

Ключевые слова: форель, эллаготанины, пептидазы, слизистая оболочка кишечника, химус

DOI: 10.31857/S1026347023700178, **EDN:** MXSXVU

В последнее время проводится много исследований влияния препаратов растительного происхождения на физиологические параметры организма рыб. Показано, что добавление в корм растительных препаратов улучшает рост, иммунную активность и выживаемость рыб (Immanuel *et al.*, 2009; Aly Salah Masalhy *et al.*, 2010; Tkachenko *et al.*, 2018), усиливает защиту от возбудителей различных заболеваний (Sahu *et al.*, 2007, 2008; Won Kyung *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2009; Nya, Austin, 2009; Ramasamy *et al.*, 2009; Nya *et al.*, 2010; Дегтярик и др., 2016).

Кормовые добавки на основе эллаготанинов — одни из многочисленных препаратов природного происхождения. Эти вещества способны связываться с белками, благодаря обратимым ионным и слабым водородным связям. В отличие от другой группы танинов — конденсированных, содержащихся в большинстве травянистых и древесных растений, не обладают антипитательными свойствами (Использование эллаготанинов в рационах аквакультуры — 2020. — URL: <https://apknews.su/article/213/2594/> (дата обращения 04.08.2021). Ранее проведенные исследования показали положительное влияние на рост, массонакопление, иммунную систему, антибактериальные и антиоксидантные свойства и, как следствие, выживаемость рыб в условиях аквакультуры (Coccia *et al.*, 2019; Miş

Yonar Serpil 2019; Зеков и др., 2021). Усиление роста и увеличение массы тела, по-видимому, связано с изменением интенсивности процессов пищеварения за счет улучшения усвоения организмом белковых компонентов пищи. Однако в доступной литературе нет данных о влиянии эллаготанинов на протеолитическую активность пищеварительного тракта рыб. Проведение таких исследований позволит выявить за счет каких механизмов происходит усиление ферментативных процессов в пищеварительной системе рыб. Полученные данные помогут в разработке современных методик кормления, направленных на улучшение процессов роста и массонакопления у рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры. Это будет способствовать увеличению производства рыбной продукции, что отражено в Концепции развития рыбохозяйственного комплекса Российской Федерации (Федеральный закон об аквакультуре № 148 от 02.07.2013 19) и служить гарантом продовольственной безопасности.

Цель работы — исследование влияния эллаготанинов на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса радужной форели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в апреле-июне в аквариальной Института биологии внутренних вод

им. И.Д. Папанина Российской академии наук на годовиках радужной форели *Parasalmo mykiss irideus* (Walbaum, 1972). Рыб для исследования доставили из форелевого хозяйства “Ярославская форель”, которое находится на озере Глубокое. После транспортировки форель (средней массой 75.00 ± 6.38 и полной длиной (TL) 18.17 ± 0.50) поместили в проточный бассейн с принудительной аэрацией объемом 16 м^3 где содержали в течение 14 сут для акклиматизации. Далее с помощью сетчатых вставок бассейн разделили на 4 части и случайным образом разместили по одинаковому числу особей (контрольная группа и 3 опытных). За время эксперимента температура воды повысилась от $13\text{--}16^\circ\text{C}$ в первый месяц до $17\text{--}19^\circ\text{C}$ во второй месяц эксперимента. В зависимости от температуры постепенно снижалось содержание кислорода в воде, от 8 мг/л в начале до 6.5 мг/л в конце опыта. Уровень pH колебался в пределах $8.3\text{--}8.5$, а концентрация аммиака и аммония не превышала нормы.

Форель кормили полноценным продукционным кормом для рыб фирмы “Alltech® Coppens”, гранула размером 3–4 мм. В ходе эксперимента использовали одинаковые корма одной серии. В контрольной группе давали только корм, а в трех опытных к корму добавляли препарат АКВАТАН на основе эллаготанинов (с содержанием активного вещества 0.38 , 0.76 и 1.14 г/кг корма) производства компании “Танин” г. Севница (Словения) на основе эллаготанинов. Введение кормовой добавки в готовые гранулированные корма осуществляли в виде суспензии водного раствора. В предварительно подготовленные объемы растворителя добавлялся препарат в соответствующих концентрациях и распределялся по всему объему корма при помощи перемешивания. Отбор проб проводили перед началом эксперимента, на 15, 30, 45 и 60 сут. Материал для исследования отбирали у 8 особей из каждой группы. Для получения ферментативно активных препаратов у рыб вскрывали брюшную полость, изымали кишечник и замораживали.

Кишечник рыб, помещали на стекло ледяной бани, освобождали от жира, осушали фильтровальной бумагой и разрезали вдоль. Химус собирали при помощи пластмассового скребка и небольшого (5 мм) стеклянного шпателя. Затем снимали слизистую оболочку кишечника. Навески химуса и слизистой оболочки кишечника гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 mM NaCl , 1.9 mM KCl , 0.45 mM CaCl_2 , 1.4 mM MgSO_4 , pH 7.4) при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$. Использовали гомогенаты слизистой оболочки кишечника и химуса в разведении $1 : 99$ (раствор Рингера, pH 7.4). В пробирки добавляли по 0.5 мл гомогената и субстрата (1% раствор казеина pH 7.4) и инкубировали 30 мин. Все операции проводили

при 20°C и непрерывном перемешивании в 5-ти повторностях с учетом фона и выражали в единицах скорости реакции, $\text{мкмоль}/(\text{г} \cdot \text{мин})$. Активность пептидаз (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина при 20°C (Kuz'mina *et al.*, 2019). О ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани, $\text{мкмоль}/(\text{г} \cdot \text{мин})$. Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре, $\lambda = 670 \text{ нм}$.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica 10, MS Excel 2010. При сравнении результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали значимыми при $p \leq 0.01$ и 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса форели изменялась в течение всего эксперимента (табл. 1). Во все сроки наблюдения исследуемый показатель во всех группах был ниже, чем у рыб перед началом опыта, за исключением данных активности пептидаз химуса на 15 сут эксперимента у особей 3 группы. Из табл. 1. видно, что практически во все сроки наблюдения активность пептидаз слизистой и химуса у опытных групп превышала показатели контрольных особей. Исключение составили данные форели первой и второй опытных групп на 15 сут эксперимента. У этих особей отмечено снижение активности пептидаз слизистой на 8% в первой и 1% второй группе, а также на 4.5% химуса в первой группе. Максимальное увеличение активности на $16\text{--}21\%$ исследуемых ферментов слизистой и химуса зафиксировано на 45 сут во всех трех группах по сравнению с контрольными значениями. На 60 сут эксперимента стимулирующий эффект эллаготанинов снизился до 0.4 и 6.5% . Стоит отметить, что большинство значимых отличий между опытными и контрольными группами зафиксированы в слизистой, а в химусе только на 30 сут в 3 группе (табл. 1). Достоверные значения положительного эффекта эллаготанинов на активность пептидаз слизистой установлены у всех опытных рыб к концу первого месяца эксперимента, за исключением особей 3 опытной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Переваривание белковых компонентов пищи у рыб – комплексный процесс, включающий их деполимеризацию ферментами организма асси-

Таблица 1. Воздействие эллаготанинов поступающих с пищей на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса радужной форели

| Группы | Активность пептидаз мкмоль/(г · мин) | |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | Слизистая | Химус |
| Контроль перед опытом | 13.45±0.66 | 15.30±0.65 |
| Контроль (15 сутки) | <u>12.60 ± 0.33</u> 100% | <u>13.62 ± 0.41</u> 100% |
| Опыт с добавкой гр. (15 сутки) | <u>11.60 ± 0.23</u> -7.9% | <u>13.01 ± 0.35</u> -4.5% |
| Опыт с добавкой 2 гр. (15 сутки) | <u>12.48 ± 0.23</u> -1.0% | <u>13.53 ± 0.24</u> +4.0% |
| Опыт с добавкой 3 гр. (15 сутки) | <u>12.70 ± 0.35</u> +1.0% | <u>15.31 ± 0.50</u> +17.7% |
| Контроль (30 сутки) | <u>10.10 ± 0.11</u> 100% | <u>12.10 ± 0.18</u> 100% |
| Опыт с добавкой 1 гр. (30 сут) | <u>11.62 ± 0.20*</u> +15.1% | <u>13.37 ± 0.34</u> +10.5% |
| Опыт с добавкой 2 гр. (30 сутки) | <u>11.74 ± 0.38*</u> +16.2% | <u>13.68 ± 0.42</u> +13.1% |
| Опыт с добавкой 3 гр. (30 сутки) | <u>10.10 ± 0.4</u> - | <u>13.90 ± 0.25*</u> +14.9% |
| Контроль (45сутки) | <u>10.11 ± 0.41</u> 100% | <u>10.85 ± 0.21</u> 100% |
| Опыт с добавкой 1 гр. (45 сутки) | <u>11.74 ± 0.22**</u> +16.1% | <u>13.10 ± 0.17</u> +20.7% |
| Опыт с добавкой 2 гр. (45 сутки) | <u>11.83 ± 0.21**</u> +17.0% | <u>12.73 ± 0.14</u> +17.3% |
| Опыт с добавкой 3 гр. (45 сутки) | <u>12.18 ± 0.15**</u> +20.5% | <u>12.75 ± 0.20</u> +17.5% |
| Контроль (60 сутки) | <u>11.16 ± 0.28</u> 100% | <u>13.10 ± 0.68</u> 100% |
| Опыт с добавкой 1 гр. (60 сут) | <u>11.74 ± 0.20*</u> +5.2% | <u>13.68 ± 0.2</u> +4.4% |
| Опыт с добавкой 2 гр. (60 сутки) | <u>11.68 ± 0.20*</u> +4.7% | <u>13.85 ± 0.19</u> +5.7% |
| Опыт с добавкой 3 гр. (60 сутки) | <u>11.89 ± 0.20*</u> +6.5% | <u>13.15 ± 0.43</u> +0.4% |

Примечание. Группы 1, 2, 3 получали эллаготанины в концентрации 0,38, 0,76 и 1,14 г/кг корма, соответственно. Над чертой – уровень ферментативной активности, под чертой – изменение активности пептидаз, % от контроля, принятого за 100. * – значимые различия между опытом и контролем при $p \leq 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$.

милятора, энтеральной микробиоты и объектов питания за счет всех известных в настоящее время типов пищеварения. Пептидазы, разлагающие белки и другие белковые компоненты, доминирующие в пище рыб, имеют большое значение для

жизнедеятельности рыб (Шульман, 1972; Шатуновский, 1980; Кузьмина, 2005, 2015, 2018). Высокие показатели активности пептидаз, зафиксированные у особей перед началом опыта, вероятно, связаны с тем, что рыбы начали активно питаться

после зимовки. Известно, что во время продолжительного голодания снижается общая протеолитическая активность (Abolfathi *et al.*, 2012), а после возобновление питания значительно увеличивается (Caruso *et al.*, 2014).

На начальном этапе пищеварения в просвет кишечника происходит секреция различных ферментов. С их помощью в желудочно-кишечном тракте рыб проводится предварительная обработка пищевого комка. В результате их действия происходит расщепление белковых компонентов. В кишечнике рыб функционируют преимущественно сериновые эндопептидазы панкреатического происхождения. Трипсин (КФ 3.4.21.4) гидролизует пептидную связь лизин-изолейцин в пептидах, амидах и некоторых сложных эфирах, химотрипсин (КФ 3.4.21.1) – предпочтительно по карбоксильным группам ароматических аминокислот тирозина, триптофана и фенилаланина (Антонов, 1983). Помимо этих ферментов, в кишечнике функционируют эластаза (КФ 3.4.21.36), аминопептидазы (КФ 3.4.11) карбоксипептидазы (КФ 3.4.16). Аминопептидазы отщепляют N-концевые аминокислоты пептидов, карбоксипептидазы – C-концевые аминокислоты пептидов. Завершают гидролиз белков кишечные дипептидазы, функционирующие на мембранах и в цитозоле энтероцитов (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015, 2018).

Анализ результатов показал, что под влиянием эллаготанинов активность пептидаз слизистой оболочки кишечника увеличилась больше, по сравнению с химусом. Эллаготанины стимулируют первоначальный этап расщепления белковых компонентов пищи, что позволяет увеличить интенсивность процессов пищеварения. Это, по-видимому, приводит к увеличению всасывания организмом рыб количества белков.

Незначительные различия активности пептидаз между контрольной и опытными группами в конце эксперимента, скорее всего, связаны со снижением стимулирующего эффекта эллаготанинов вследствие длительного применения. Также возможно, это связано с ухудшением условий содержания рыб. Повышение температуры воды и снижение содержания кислорода оказывают негативное влияние на организм форели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате двухмесячного эксперимента зафиксировано стимулирующее влияние эллаготанинов на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса радужной форели. Положительное воздействие зафиксировано на 30 сут и возрастало до максимума к 45 сут. К концу эксперимента эффективность постепенно снизилась, что вероятно связано с длительностью

применения препарата. Наиболее значительное влияние эллаготанины оказали на первоначальный этап пищеварения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств гранта РФ (проект № 22-26-20111) и частично в рамках государственного задания №№ 121050500046-8 и 121051100100-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983. 367 с.
- Дегтярик С.М., Гребнева Е.И., Слободницкая Г.В., Бенецкая Н.А., Максимьюк Е.В., Беспалый А.В. Влияние растительных экстрактов на возбудителей аэромоназов и псевдомоназов рыб // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. 2016. № 32. С. 249–261.
- Зеков Д.Д., Ульянов М.В., Микряков Д.В., Суворова Т.А. Определение эффективных норм введения кормовой добавки Акватан в рацион радужной форели с биологической оценкой влияния на рыбохозяйственные показатели // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2021. № 11. С. 66–77.
- Кузьмина В.В. Процессы экзотрофии у рыб. Организация. Регуляция. Адаптации. М.: Полиграф-Плюс. 2015. 260 с.
- Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М. Наука. 2005. 300 с.
- Кузьмина В.В. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы. Ярославль: Филигрань, 2018. 300 с.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоздат, 1993. 238 с.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 288 с.
- Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 368 с.
- Abolfathi M., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Zamani A. Compensatory growth in juvenile roach *Rutilus caspius*: effect of starvation and re-feeding on growth and digestive surface area // J. Fish Biol. 2012. V. 81. № 6. P. 1880–1890.
- Aly S.M., El Naggat G.O., Mohamed M.F., Mohamed W.E. Effect of garlic, echinacea, organic green and vet-yeast on survival, weight gain, and bacterial challenge of overwintered Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*) // J. Appl. Aquacult. 2010. V. 22. № 3. P. 210–215.
- Caruso G., Denaro M.G., Caruso R., De Pasquale F., Genovese L., Maricchiolo G. Changes in digestive enzyme activities of red porgy *Pagrus pagrus* during a fasting–re-feeding experiment // Fish Physiol Biochem. 2014. V. 40. № 5. P. 1373–1382.
- Coccia E., Siano F., Grazia Volpe M., Varricchio E., Tufan Eroldogan O., Paolucci M. Chestnut. Shell Extract modulates immune parameters in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // Fishes. 2019. V. 4(1). P. 18. <https://doi.org/10.3390/fishes4010018>

- Harikrishnan R., Chellam B., Subramanian D., Yong-Gun M., Man-Chul K., Ju-Sang K., Moon-Soo H.* Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans* // *Aquacult. Res.* 2009. V. 40. № 10. P. 1170–1181.
- Immanuel G., Uma R.P., Iyapparaj P., Citarasu T., Punitha Peter S.M., Michael Babu M., Palavesam A.* Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus* // *J. Fish Biol.* 2009. V. 74. № 7. P. 1462–1475.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V.* Role of peptidases of the enteric microbiota and prey in temperature adaptations of the digestive system in boreal carnivorous fish // *Inland Water Biol.* 2019. V. 12. № 2. P. 231–239.
- Ramasamy H., Chellam B., Subramanian D., Yong-Gun M., Man-Chul K., Ju-Sang K., Moon-Soo H.* Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans* // *Aquacult. Res.* 2009. V. 40. № 10. P. 1170–1181.
- Nya E.J., Dawood Z., Austin B.* The garlic component, alliin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // *J. Fish Diseases.* 2010. V.33. № 4. P. 293–300.
- Nya E.J., Austin B.* Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // *J. Fish Diseases.* 2009. V. 32. № 11. P. 963–970.
- Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Sarangi N.* Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila* // *J. Appl. Ichthyol.* 2007. V. 23. № 1. P. 80–86.
- Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Samal S.K., Sarangi N.* Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila* // *Aquacult. Res.* 2008. V. 39. № 16. P. 1720–1730.
- Mişe Yonar S.* Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid // *Fish and Shellfish Immunology.* 2019. V. 95. P. 391–398.
- Tkachenko H., Buyun L., Kasiyan O., Terech–Majewska E., Osadowski Z.* The antibacterial activity of the ethanolic leaf extract of *Ficus Pumilla* L. (MORACEAE) against Fish Bacterial Patogens // *Scientific J. Far East State Technical Fisheries University.* 2018. № 2. V. 45. P. 20–30.
- Won Kyoung M.* Effect of the residuum extract of Siberian ginseng *Eleutherococcus senticosus* on non-specific immunity in olive flounder *Paralichthys olivaceus* / M. Won Kyoung, Kim Pyong K., Lee Sung H., Park Soo I. // *Fish. Sci.* 2008. V. 74. № 3. P. 635–641.

Effects of Ellagotannins on Intestinal Peptidase Activity in Rainbow Trout

D. V. Mikryakov¹ and A. F. Tarleva^{1, #}

¹ Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, st pos. Borok, Nekouz district, Yaroslavl region, 152742 Russia

[#] e-mail: ns_tarleva@ibiw.ru

The effect of ellagotannins on the activity of peptidases of the intestinal mucosa and chyme of trout was studied. Experimental groups of fish were fed with an additive based on ellagitannins (with an active substance content of 0.38, 0.76 and 1.14 g/kg of food). Sampling was carried out in 8 individuals from each group before the experiment, at 15, 30, 45 and 60 days. The study showed that ellagotannins, has a stimulating effect on the activity of peptidases. The maximum increase in the enzymatic activity in the experimental groups compared with the control group was recorded on day 45 of the experiment. A more significant increase in the activity of peptidases of the intestinal mucosa compared with chyme was established. It is concluded that ellagotannins stimulate the initial stage of cleavage of protein components of food.

Keywords: trout, ellagotannins, peptidases, intestinal mucosa, chyme