СОДЕРЖАНИЕ

Номер 4, 2021

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Влияние термостабильного токсина бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* на функциональные и фенотипические особенности двух типов фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix*

Л. С. Долматова, О. А. Уланова, Н. Ф. Тимченко 341

БИОХИМИЯ

Изменение состава метаболитов целомической жидкости черного морского ежа *Mesocentrotus nudus* (Echinoidea) и морской звезды астерины гребешковой *Asterina pectinifera* (Asteroidea) в условиях гипоксийного стресса

К. А. Дроздов, А. А. Артюков, А. Л. Дроздов 354

ГЕНЕТИКА

Генетическое разнообразие горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) из некоторых рек Северо-Востока России

Л. Т. Бачевская, В. В. Переверзева, А. А. Примак, Г. А. Агапова 360

МИКРОБИОЛОГИЯ

Особенности формирования микробиомов двух типов почв под географическими культурами кедровых сосен *Pinus sibirica* Du Tour и *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.

И. Д. Гродницкая, Г. В. Кузнецова, О. Э. Пашкеева, Г. И. Антонов 373

БОТАНИКА

История растительности ближних островов алеутской гряды в голоцене

О. И. Смышляева, Е. Э. Северова, Б. Ф. Хасанов, О. А. Крылович, Е. А. Кузьмичева, А. Б. Савинецкий 389

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Gly, GlyGly и GlyAsp модулируют экспрессию генов семейства SNF2 и ДНК-метилтрансфераз в регенерантах из каллусов табака *Nicotiana tabacum*

Л. И. Федореева, Б. Ф. Ванюшин 399

ЗООЛОГИЯ

Мышечная система *Gyrocotyle urna* (Plathelminthes, Gyrocotylida)

И. В. Ястребова, М. В. Ястребов 408

ЭКОЛОГИЯ

Закономерности осенней ретранслокации тяжелых металлов из листьев древесных растений лесных экосистем

О. С. Железнова, С. А. Тобратов 423

Глобальное загрязнение территории Якутии ^{137}Cs и его содержание в кормах и тканях охотничьих животных

П. И. Собакин, Е. С. Захаров, В. М. Сафронов 435

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Параметры периферической крови двух видов глубоководных рыб семейства веретенниковых (Paralepididae)

Г. И. Пронина, А. М. Орлов, Д. В. Артеменков 444

Contents

No. 4, 2021

Cell Biology

Effect of a Heat-Stable Toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* on the Functional and Phenotypic Traits of Two Types of Phagocytes in the Holothurian *Eupentacta fraudatrix*

L. S. Dolmatova, O. A. Ulanova, and N. F. Timchenko 341

Biochemistry

Changes in the Composition of Celomic Fluid Metabolites of the Black Sea Urchin *Mesocentrotus nudus* (Echinoidea) and Sea Star *Asterina pectinifera* (Asteroidea) Under Conditions Hypoxia Stress

K. A. Drozdov, A. A. Artyukov, and A. L. Drozdov 354

Genetics

Enetic Diversity of Pink Salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) from Some Rivers of the Northeastern Part of Russia

L. T. Bachevskaya, V. V. Pereverzeva, A. A. Primak, and G. A. Agapova 360

Microbiology

Features of the Microbiomes Formation in two Types of Soils under Pine Provenance Trials *Pinus sibirica* Du Tour and *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.

I. D. Grodnitskaya, G. V. Kuznetsova, O. E. Pashkeeva, and G. I. Antonov 373

Botany

The Near Islands (the Aleutian Arc) Vegetation History in the Holocene

O. I. Smyshlyaeva, E. E. Severova, B. F. Khasanov, O. A. Krylovich, E. A. Kuzmicheva, and A. B. Savinetsky 389

Plant Physiology

Gly, GlyGly, and GlyAsp Module Expression of Genes of the SNF2 Family and DNA Methyltransferases in Regenerants from Calluses of Tobacco *Nicotiana tabacum*

L. I. Fedoreyeva and B. F. Vanyushin 399

Zoology

Muscle System of *Gyrocotyle urna* (Plathelminthes, Gyrocotylida)

I. V. Yastrebova and M. V. Yastrebov 408

Ecology

Patterns of Autumn Retranslocation of Heavy Metals from the Leaves of Woody Plants in Forest Ecosystems

O. S. Zheleznova and S. A. Tobratov 423

Global Pollution of the Territory of Yakutia ^{137}Cs and its Content in Feeds and Tissues of Game Animals

P. I. Sobakin, E. S. Zakharov, and V. M. Safronov 435

Short Communications

Peripheral Blood Parameters of Two Species of Deep-sea Fish Family Paralepididae

G. I. Pronina, A. M. Orlov, and D. V. Artemenkov 444

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 341–353

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 593.96+576.53

ВЛИЯНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ТОКСИНА БАКТЕРИИ *Yersinia pseudotuberculosis* НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДВУХ ТИПОВ ФАГОЦИТОВ ГОЛОТУРИИ *Eupentacta fraudatrix*

© 2021 г. Л. С. Долматова*, @, О. А. Уланова*, Н. Ф. Тимченко**

**Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева, ул. Балтийская, 43, Владивосток, 690041 Россия*

***Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, ул. Сельская, 1, Владивосток, 690087 Россия*

@E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 06.11.2020 г.
После доработки 13.11.2020 г.
Принята к публикации 16.12.2020 г.

Исследовано влияние термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* (TcTYp) на показатели функциональной активности и фенотип Ф1 и Ф2 фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Установлено, что Ф1 и Ф2 фагоциты отличались по уровню апоптоза и содержанию восстановленного глутатиона, а также по экспрессии поверхностных рецепторов к некоторым растительным лектинам. TcTYp (0.2-2 мкг/мл) сдвигал показатели функциональной активности и фенотип Ф1 фагоцитов в сторону преобладания таковых, характерных для Ф2 типа, обладающего меньшей бактерицидной активностью. Предполагается, что TcTYp является важным фактором перепрограммирования фагоцитов голотурий в сторону преобладания антивоспалительного типа, что может увеличивать вирулентность *Y. pseudotuberculosis* для голотурий.

DOI: 10.31857/S1026347021040056

Иммунная система живых организмов эволюционировала, прежде всего, в связи с необходимостью защиты от инфекций (Danilova, 2006). У беспозвоночных преобладает неспецифический врожденный иммунитет, хотя могут проявляться некоторые элементы иммунной памяти (Netea *et al.*, 2011). При этом иммунитет беспозвоночных демонстрирует высокие защитные способности. Вместе с тем, эволюционирует не только иммунная система, но и инфекционные агенты, в частности, бактерии, которые адаптируются к иммунитету организма хозяина (Danilova, 2006).

Иглокожие (Echinodermata), являющиеся морскими обитателями, широко распространенными в мировом океане (Dolmatova, Dolmatov, 2020), привлекают внимание иммунологов в связи с их эволюционной близостью к позвоночным. При этом многие представители класса голотурий (Holothuroidea) являются ценными коммерческими объектами и выращиваются в марикультуре (Долматова и др., 2019), в связи с чем изучение их иммунитета представляет не только теоретический, но и практический интерес.

В частности, потенциально опасным для голотурий является заражение *Yersinia pseudotuberculosis*. Возбудитель псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* является кишечной бактерией, заражение которой осуществляется через пищу и воду (Bi *et al.*, 2012). Как и многие другие бактерии, иерсинии имеют различные факторы, позволяющие им выживать как в окружающей среде, так и организме хозяина (Ценева и др., 2002). Макрофаги являются главной целью иерсиний *in vivo*, и *Y. pseudotuberculosis* может выживать и размножаться внутри макрофагов. К способствующим этому факторам относят несколько известных эффекторных белков Yops (Bi *et al.*, 2012). Меньше известна роль токсинов бактерии. При этом фактор патогенности термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* (TcTYp), белок с мол. массой 45 кДа, подавляет фагоцитоз и снижает уровень активных форм кислорода (АФК) в макрофагах перитонеального экссудата мышей, что свидетельствует об его участии в подавлении иммунитета хозяина. TcTYp продуцируется не только при высокой (37°C), но и при низкой (6–8°C) температуре, что позволяет предполагать его важную роль при выживании бактерий в окружающей среде. Известно, что *Y. pseudotuberculosis* может долго выживать в морской воде, вызывая гибель морских беспозвоночных, в частности, голотурий (Тимченко и др., 2004). При этом морские гидробионты не только

сами страдают от инфекции, но и являются факторами передачи ее возбудителя. Поэтому необходимо разработать методы защиты животных от потенциальных инфекций. Однако особенности клеточного иммунного ответа голотурий на воздействие факторов патогенности иерсиний остаются мало изученными.

Одним из перспективных для выращивания в аквакультуре видов является голотурия *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov et Baranova, 1958) (Dendrochirotida, Sclerodactylidae). Ранее с использованием градиентного центрифугирования фагоциты голотурии, являющиеся аналогами макрофагов (Chia, Xing, 1996), были разделены на две фракции, Ф1 и Ф2 фагоциты. Было показано, что при воздействии TcTYp в фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* происходит снижение уровня АФК (Dolmatova *et al.*, 2003). TcTYp также вызывает сдвиг в соотношении маркеров двух типов фагоцитов голотурии – оксида азота, высокая концентрация которого характеризует Ф1 тип фагоцитов, и активности аргиназы, высокое значение которой характерно для Ф2 типа (Долматова и др., 2019).

Известно, что у позвоночных макрофаги могут приобретать провоспалительный (М1 макрофаги, "классически" активированные) или антивоспалительный (М2 макрофаги, "альтернативно" активированные) фенотипы в ответ на различные сигналы микроокружения. Макрофаги М1 играют ключевую роль в защите от бактериальных инфекций, а М2 макрофаги вовлечены в восстановление тканей. Два типа макрофагов имеют разные метаболические пути для генерации энергии, гликолиз преобладает в М1 типе, а окислительный метаболизм в – М2 типе клеток (Dolmatova, Dolmatov, 2020), и в их регуляции большое значение имеет восстановленный глутатион (GSH) (Peterson *et al.*, 1998).

Сдвиг в соотношении активностей двух типов макрофагов в сторону преобладания активности М2 типа представляет собой стратегию подавления иммунитета хозяина, с участием некоторых бактериальных белковых токсинов, у ряда бактерий (Tsai *et al.*, 2013; Merriman *et al*, 2015), в том числе, иерсиний (Bi *et al.*, 2012).

Выявление сдвига в уровне маркеров двух типов фагоцитов голотурии при воздействии TcTYp (Долматова и др., 2019*),* позволило предположить, что, как и макрофаги позвоночных, два типа фагоцитов играют различную роль в антибактериальной защите.

Цель данного исследования - выявление особенностей влияния TcTYp на некоторые функциональные, метаболические и фенотипические показатели двух типов фагоцитов голотурии *E. fraudatrix.*

Работа написана по материалам доклада, представленного на 10-ой Европейской конференции по иглокожим, которая проходила 16–19 сентября 2019 г. в Москве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экземпляры голотурии *E. fraudatrix* с длиной тела от 4 до 6 см были собраны в зимний период в бухте Восток (залив Петра Великого Японского моря) с использованием легководолазного снаряжения. Голотурий выдерживали в аквариуме с проточной аэрируемой морской водой в течение двух недель до начала экспериментов.

Для исследований *in vitro* (четыре независимых опыта) объединяли образцы целомической жидкости от 15–20 особей, после чего наслаивали на двухступенчатый градиент, ступени которого состояли из фиколл-верографина (1.078), разведенного антикоагулирующим раствором в два или три раза (v/v), как описано ранее (Долматова, Заика, 2007). Полученные после центрифугирования при 300 g в течение 15 мин суспензии фагоцитов с меньшей (Ф1 фагоциты) и большей (Ф2 фагоциты) плотностью отмывали дважды в фосфатно-солевом буфере (pH 7.6) с добавлением 36 г/л NaCl (ФСБН) и ресуспендировали в модифицированной среде 199 как описано ранее (Dolmatova *et al.*, 2003). Концентрацию клеток определяли в камере Горяева; жизнеспособность – методом исключения трипанового синего.

TcTYp изолировали из штамма 512 I серовара *Y. pseudotuberculosis* (коллекция НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова). Выделение и очистку TcTYp проводили методами, описанными ранее (Тимченко и др., 2004).

Для исследования эффектов TcTYp в каждую лунку круглодонного планшета вносили по 1 мл суспензии фагоцитов с концентрацией 1×10^6 кл/мл. Инкубацию клеток проводили при комнатной температуре в течение 1 или 24 ч. TcTYp использовали в конечных концентрациях 0.2, 0.5 и 2 мкг/мл. В отдельной серии экспериментов исследовали влияние TcTYp (0.15 мкг/мл) на концентрацию GSH через 24 ч инкубации. В контрольные лунки вместо исследуемых препаратов вносили ФСБН.

По окончании экспериментов в части полученных суспензий клеток определяли жизнеспособность, еще одну часть суспензии замораживали при –80°C для последующего определения концентрации GSH. Из порции клеток выделяли ДНК с использованием 4М гуанидин гидрохлорида в качестве депротеинизирующего агента (Sigma-Aldrich, США) (Pramanick *et al.*, 1976).

Для последующего определения конденсации хроматина еще одну порцию осадка клеток ($0.3–0.5 \times 10^6$ кл/мл) фиксировали 4%-ным формалином и хранили при 4°C.

Кроме того, часть клеток для последующего анализа связывания растительных лектинов фик-

сировали 1%-ным глутаральдегидом в ФСБН и хранили при 4°С.

Для исследования апоптоза использовали такие маркеры, как фрагментация ДНК и конденсация хроматина. Фрагментацию ДНК изучали методом горизонтального электрофореза ДНК в 1%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере (pH 8.3) с последующим окрашиванием геля бромистым этидием. В качестве маркера мол. массы использовали синтетический ДНК-маркер ("Сибэнзим", Россия). Для учета апоптоза по конденсации хроматина проводили окрашивание отмытых от формалина клеток Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) (1 мкг/мл в ФСБН) как описано Комацу с соавт. (Komatsu *et al.*, 1998). Образцы анализировали, используя микроскоп Leica DM 4500 (Weltzlar, Германия). В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

Для определения экспрессии поверхностных рецепторов фагоцитов использовали окрашивание отмытых от глутаральдегида клеток ФИТЦ-конъюгированными растительными лектинами (ICN Biomedicals, Германия) из *Arachis hypogaea* (PNA), *Glycin max* (SBA), *Dolichos biflorus* (DBA) и *Canavalia ensiformis* (con A), которые специфично связываются с Galβ1–3GalNAc, GalNAcα1–3GalR, GalNAc и α-D-маннопиранозидами соответственно (Гнедкова и др., 2015). Окрашивание проводили по методу, описанному Мак Кензи, Престон (*McKenzie*, *Preston*, 1992). Флуоресценцию конъюгатов изучали с ипользованием микроскопа Leica DM 4500 (Weltzlar, Германия). Уровень связывания лектинов с поверхностными рецепторами фагоцитов оценивали по процентному содержанию клеток с зонами яркой зеленой флуоресценции. Ядра клеток визуализировали с помощью окраски DAPI (Merck, Германия). В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

Анализ содержания восстановленного глутатиона проводили с использованием в качестве деприватизационного реагента реактива Эллмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) по модифицированному методу Фратернале с соавт. (Fraternale *et al.*, 2013). Клетки лизировали в 120 мкл лизирующего буфера (0.1%-ный тритон X-100, 0.1 M Na_2HPO_4, 5 mM EDTA, pH 7.5), добавляли 16 мкл 0.1 н HCl и половинный объем осаждающего раствора (1.67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0.2 г Na_2EDTA, 30 г NaCl в 100 мл раствора). После центрифугирования (10000 × g, 10 мин) отбирали супернатант, разносили его в лунки 96-луночного планшета (две опытных и две контрольных параллели на каждую пробу). В каждую лунку вносили 25% (v/v) 0.3 M фосфорной кислоты и 10% по объему 1%-ного цитрата натрия (контроль) или ДТНБ (1 мМ) в 1%-ном растворе цитрата натрия (опыт). Через 5 мин измеряли оптическую плотность растворов на планшетном спектрофотометре STAT Fax 2100 (Awarness Technology Inc., США) при 402 нм. Концентрацию GSH в пробе определяли по калибровочной кривой со стандартом GSH (Sigma-Aldrich, США), построенной в диапазоне концентраций 12.5–100 мкМ.

Концентрацию белка в пробах измеряли с использованием красителя Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich).

Работа частично выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра электронной микроскопии ННЦ морской биологии ДВО РАН.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad InStat, v. 3.01 (GraphPad Software, Inc.). Полученные данные представлены как средние значения ± средняя ошибка измерений. Достоверность различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Разницу между группами считали достоверной при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Апоптоз фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* в норме и при действии TcTYp. Апоптоз макрофагов является одним из видов их смерти, ассоциированной с осуществлением микробицидной активности (Molloy *et al.*, 1994).

С помощью электрофореза ДНК в агарозном геле выявлено, что в свежевыделенных клетках фрагментация ДНК значительно более выражена в фагоцитах второго типа по сравнению с таковой в первом типе. Такое же соотношение в уровнях фрагментации ДНК сохранялось в фагоцитах и через 24 ч инкубации (рис. 1а). Оценка апоптоза по конденсации хроматина показала, что в количественном отношении уровень последней в свежевыделенных Ф2 фагоцитах превышал таковую в Ф1 клетках в 1.9 раза (рис. 1б, 1в).

Через 1 ч инкубации конденсация хроматина в Ф2 фагоцитах была выше таковой в фагоцитах Ф1 в 1.8 раза (рис. 1г, 1е). При этом добавление в среду инкубации TcTYp через 1 ч вызывало статистически значимое изменение (снижение) апоптоза в Ф1 фагоцитах только в максимальной концентрации 2 мкг/мл, а в Ф2 фагоцитах, напротив, стимулировало апоптоз, но только в концентрации 0.5 мкг/мл.

Через 24 ч также сохранялось значительное превышение (в 2.1 раза) конденсации хроматина в Ф2 по сравнению с Ф1 клетками (рис. 1д, 1ж). При воздействии TcTYp апоптоз в Ф1 снижался уже в концентрациях 0.2–0.5 мкг/мл, а при концентрации 2 мкг/мл возвращался к контрольному уровню. В Ф2 фагоцитах токсин в этот период проявил лишь тенденцию к стимулированию апоптоза во всех исследованных концентрациях.

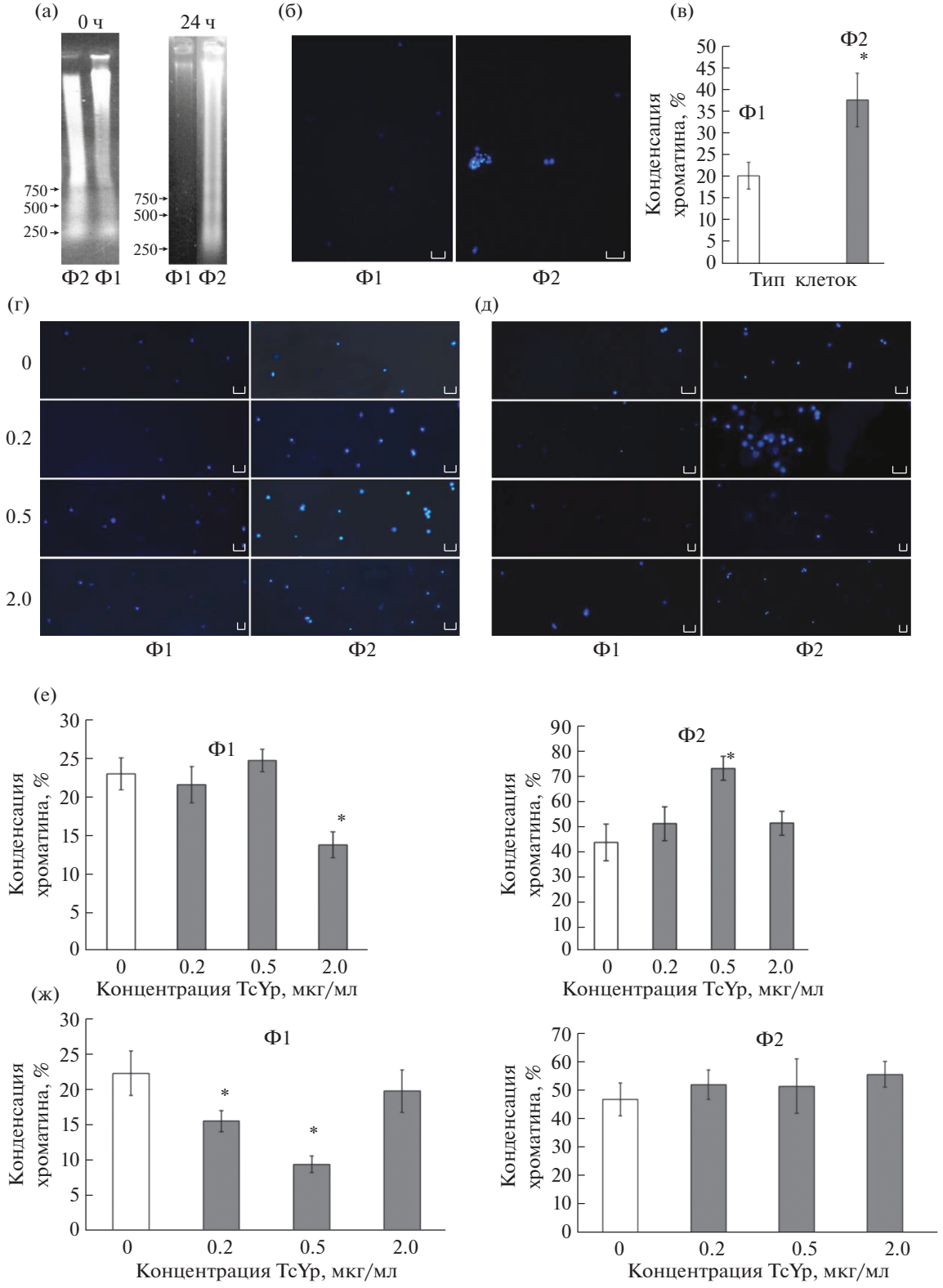

Рис. 1. Маркеры апоптоза в Ф1 и Ф2 фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* в контроле и при воздействии TcTYp *in vitro*. (а) – фрагментация ДНК в свежевыделенных (0 ч) фагоцитах и через 24 ч инкубации. Стрелочками указаны маркеры молекулярной массы ДНК (п.н.); (б) – микрофотографии ядер свежевыделенных фагоцитов, окрашенных Hoechst 33342. Левая панель – Ф1 фагоциты, правая – Ф2 фагоциты. Здесь и далее увеличение х200, масштаб: 20 мкм; (в) – % ядер с конденсацией хроматина в свежевыделенных фагоцитах; (г) и (д) – микрофотографии ядер Ф1 и Ф2 фагоцитов, окрашенных Hoechst 33342, через 1 (г) и 24 ч (д) инкубации с TcTYp (0, 0.2, 0.5, 2 мкг/мл); (е) – % ядер с конденсацией хроматина в Ф1 и Ф2 фагоцитах при воздействии TcTYp через 1 ч; (ж) – % ядер с конденсацией хроматина в Ф1 и Ф2 фагоцитах при воздействии TcTYp через 24 ч. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

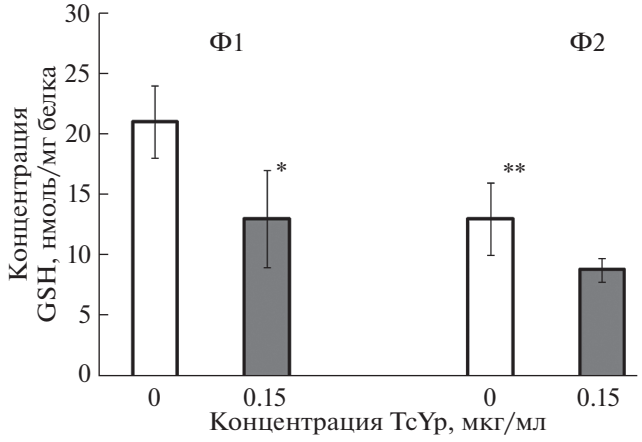

Рис. 2. Влияние TcTYp на концентрацию GSH в Ф1 и Ф2 фагоцитах через 24 ч инкубации.* – $P < 0.05$ по сравнению с контролем; ** – $P < 0.05$ по сравнению с Ф1.

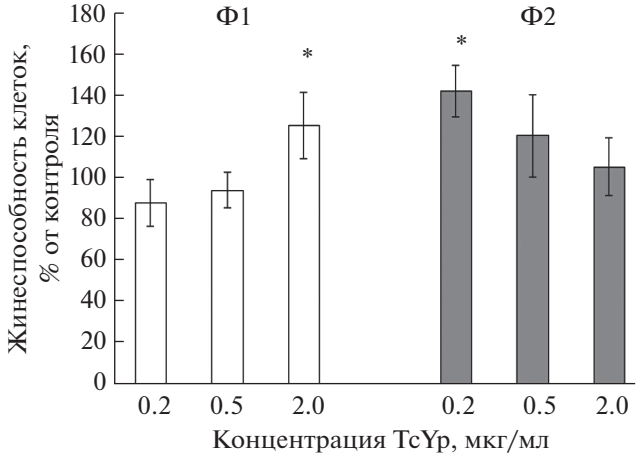

Рис. 3. Жизнеспособность Ф1 и Ф2 фагоцитов при воздействии TcTYp через 24 ч инкубации.* – $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

Влияние TcTYp на уровень GSH. Существует тесная связь между уровнем антиоксидантной защиты и развитием апоптоза (Jeong, Joo, 2016), и уровень GSH в клетках является ключевым звеном в поддержании оксидантно-антиоксидантного баланса (Fraternale *et al.*, 2017). Различный уровень GSH в макрофагах двух типов связан с регуляцией их метаболизма (Peterson *et al.*, 1998). Для выявления значения GSH в развитии апоптоза фагоцитов голотурии было определено влияние TcTYp в концентрации 0.15 мкг/мл на содержание GSH в двух типах фагоцитов. Концентрация GSH в Ф1 фагоцитах через 24 ч инкубации была в 1.6 раза выше, чем в Ф2 фагоцитах. При этом TcTYp вызывал снижение уровня GSH (в 1.6 раза) в Ф1, но не в Ф2 фагоцитах, где отмечена лишь тенденция к снижению (рис. 2).

Влияние TcTYp на жизнеспособность фагоцитов. Несмотря на различные тенденции в изменениях апоптоза в Ф1 и Ф2 фагоцитах при воздействии TcTYp через 24 ч, жизнеспособность обоих типов фагоцитов при действии TcTYp не изменялась или даже имела тенденцию к возрастанию по сравнению с контролем. Так, жизнеспособность Ф1 фагоцитов через 24 ч при концентрациях TcTYp 0.2 и 0.5 мкг/мл имела тенденцию к снижению по сравнению с контролем, а при концентрации 2 мкг/мл была достоверно повышена.

В Ф2 фагоцитах отмечено достоверное возрастание жизнеспособности по сравнению с контролем только при 0.2 мкг/мл TcTYp, а с возрастанием концентрации отмечена тенденция к снижению жизнеспособности (рис. 3).

Характеристика фенотипов фагоцитов Ф1 и Ф2 в норме и при воздействии TcTYp. Как свидетельствуют микрофотографии клеток, окрашенных ФИТЦ-мечеными лектинами (рис. 4) и результаты определения процентного содержания окрашенных лектинами клеток (рис. 5а), среди свежевыделенных фагоцитов Ф1 и Ф2 меченые con A клетки обнаружены в одинаковой пропорции. Уровни связывания con A сохранялись одинаковыми для двух типов клеток в различные сроки инкубирования, при этом они не изменялись по сравнению со свежевыделенными клетками через 1 ч, но значительно снижались, более чем в 2 раза, через 24 ч.

Для DBA в свежевыделенных фагоцитах отмечена тенденция к более низкому связыванию Ф2 фагоцитами по сравнению с таковым Ф1 клетками. В последующие сроки инкубации эта разница становилась достоверной.

Свежевыделенные Ф1 фагоциты связывали SBA в самой низкой пропорции по сравнению с другими изученными лектинами. При этом связывание в Ф2 фагоцитах было значительно выше, чем в Ф1. Уровень связывания SBA в Ф1 фагоцитах возрастал через 1 ч инкубации в 2 раза, но к 24 ч возвращался к исходному значению. В Ф2 фагоцитах уровень связывания лектина, напротив, не изменялся через 1 ч инкубации, а к 24 ч возрастал в 2.4 раза по сравнению с уровнем в свежевыделенных фагоцитах.

Для PNA также отмечена тенденция к более высому уровню связывания в свежевыделенных Ф2 фагоцитах по сравнению с таковым в Ф1. Через 1 ч эта разница становилась достоверной (четырехкратное превышение в Ф2 фагоцитах по сравнению с Ф1 клетками). Однако через 24 ч соотношение связывания PNA в Ф1 и Ф2 фагоцитах менялось на противоположное, и уровень связывания в Ф2 фагоцитах был в 1.5 раза ниже, чем в Ф1 клетках.

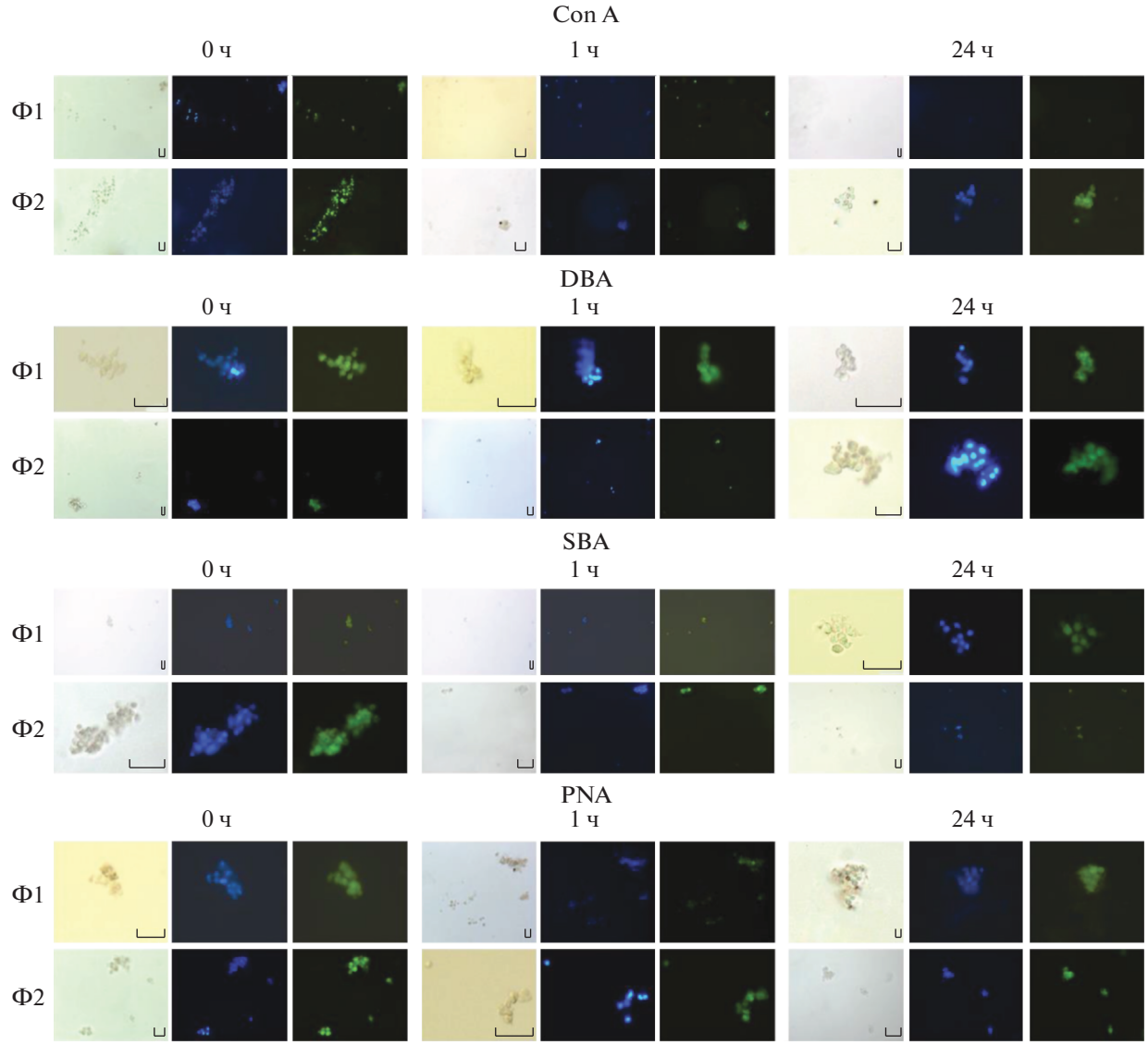

Рис. 4. Микрофотографии свежевыделенных (0 ч) и контрольных (1 и 24 ч инкубации) фагоцитов, окрашенных ФИТЦ-мечеными лектинами, в проходящем свете и при зеленой флуоресценции, а также ядер фагоцитов, окрашенных DAPI (синяя флуоресценция).

Введение в икубационную среду TcTYp вызывало изменения в связывании растительных лектинов, которое зависело как от концентрации TcTYp, так и от времени его воздействия и типа фагоцитов (рис. 5б). Так, через 1 ч TcTYp в самой низкой концентрации (0.2 мкг/мл) не оказывал влияния на связывание con A по сравнению с контролем ни в одном типе фагоцитов. В концентрации 0.5 мкг/г TcTYp в этот же период значительно снижал уровень связывания кон А также в обоих типах фагоцитов, а при концентрации 2 мкг/мл в обоих типах фагоцитов отмечена тенденция к возвращению (в Ф1) или возвращение (в Ф2) к контрольному уровню. Однако через 24 ч TcTYp стимулировал связывание con A в Ф1 фагоцитах в прямой концентрационной зависимости, но не оказывал влияния в Ф2 фагоцитах. Таким образом изменения, вызываемые TcTYp, были сходны в Ф1 и Ф2 фагоцитах через 1 ч инкубации, но через 24 ч они приобретали противоположную направленность по сравнению с одночасовым периодом в Ф1 фагоцитах, а в Ф2 типе клеток связывание con A возвращалось к контрольному уровню.

На связывание DBA TcTYp (0.2–0.5 мкг/мл) оказывал ингибирующее действие в Ф1 фагоцитах уже в концентрации 0.2 мкг/мл как через 1 ч, так и через 24 ч инкубации. На связывание DBA в Ф2 фагоцитах TcTYp не оказывал влияния ни в один из периодов инкубации.

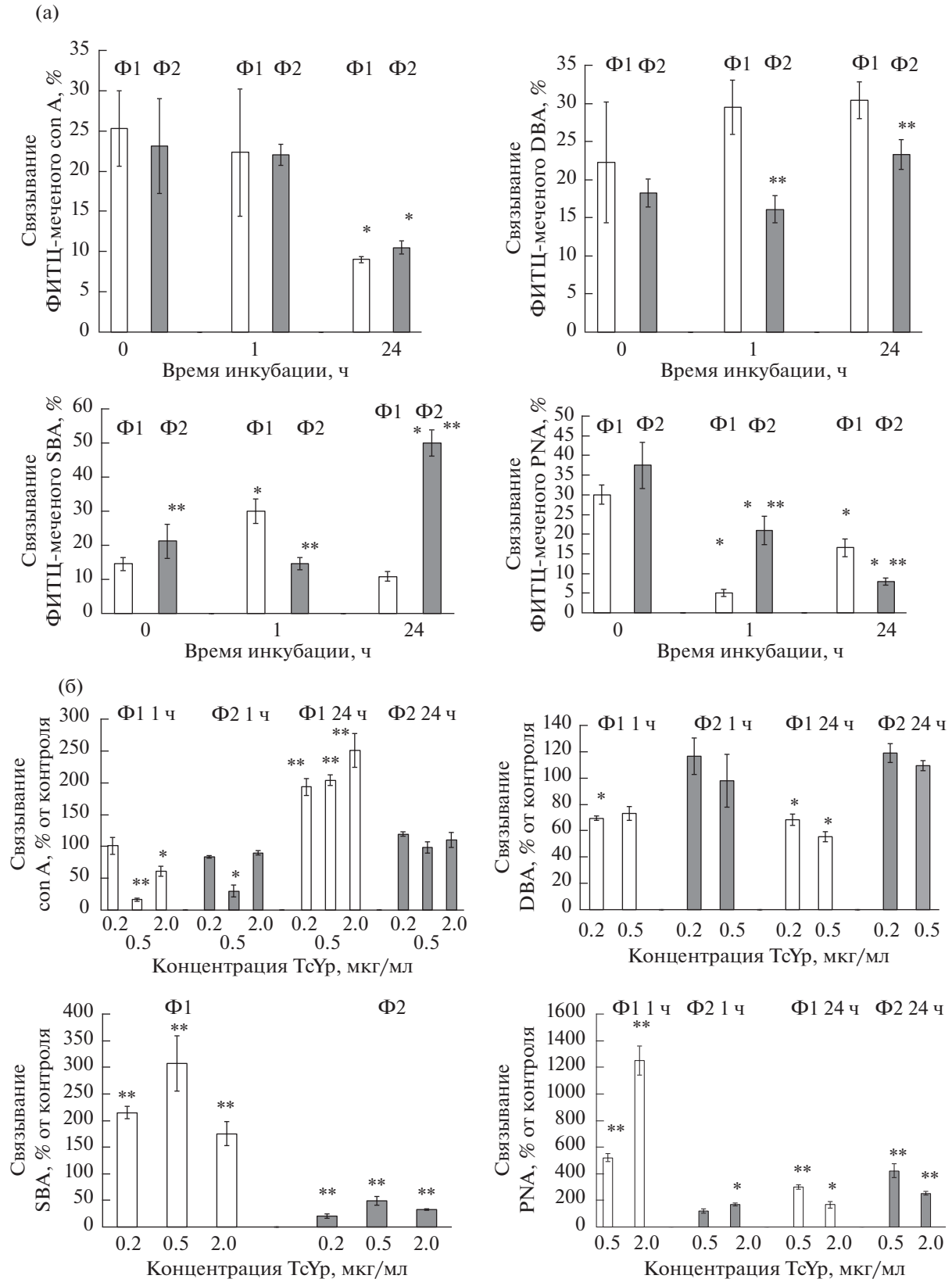

Рис. 5. (а) – доля (%) фагоцитов Ф1 и Ф2, связывающих растительные лектины con A, DBA, SBA и PNA в свежевыделенных и контрольных инкубируемых фагоцитах; (б) – доля (%) фагоцитов Ф1 и Ф2 (по отношению к контролю), связывающих растительные лектины при воздействии TcTYp после 1 и 24 ч инкубации. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем; ** – $P < 0.01$ по сравнению с контролем.

Таким образом, TcTYp влиял на экспрессию рецепторов к con A и DBA преимущественно в Ф1 фагоцитах, но не в Ф2 клетках.

При этом через 24 ч инкубации TcTYp стимулировал связывание SBA в Ф1 фагоцитах, максимально при 0.5 мкг/мл, но ингибировал в Ф2 клетках (максимально – при 0.2 мкг/мл). Таким образом, связывание в Ф1 и Ф2 фагоцитах этого лектина, по уровню которого два типа свежевыделенных и контрольных фагоцитов максимально отличались, при действии TcTYp имело противоположную направленность.

Напротив, изменения в связывании фагоцитами двух типов PNA под действием TcTYp носили однонаправленный характер. TcTYp (0.5–2 мкг/мл) вызывал в них возрастание связывания в прямой концентрационной зависимости через 1 ч и в обратной концентрационной зависимости через 24 ч инкубации. Однако интенсивность связывания лектина рецепторами Ф1 фагоцитов снижалась через 24 ч по сравнению с 1 ч, а связывание Ф2 фагоцитами через 24 ч было выше, чем через 1 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что макрофаги находятся на первой линии защиты от бактериальных инфекций, и важнейшей их реакцией является синтез продуктов, убивающих бактерии – АФК, прежде всего, супероксиданиона и оксида азота (Brune *et al.*, 2013). Однако продукция этих агрессивных молекул опасна и для самой клетки, поскольку увеличение синтеза АФК часто коррелирует с развитием апоптоза и последующей гибелью клетки. При этом в отношении влияния на апоптоз иммунных клеток хозяина бактерии используют различные стратегии выживания: у некоторых бактерий она направлена на выживание внутри клеток хозяина, и отмечена прямая зависимость вирулентности от их способности ингибировать апоптоз, у других, напротив, отмечено распространение инфекции в организме благодаря гибели макрофагов путем апоптоза. При этом отмечается, что одна и та же бактерия может использовать разные стратегии на различных стадиях инфекции (Aguiló *et al.*, 2013).

Показано, что иерсинии могут использовать стратегию колонизации новых клеток хозяина, индуцируя апоптоз (Monack, Falkow, 2000), и эффекторный белок системы секреции III типа (T3SS) фактор вирулентности YopJ может участвовать в реализации механизмов индукции апоптоза (Zhang *et al.*, 2005). Токсины иерсиний также играют роль в вирулентности бактерий (Ценева и др., 2002), но механизмы их влияния мало изучены.

Исследования фрагментации ДНК и конденсации хроматина в настоящей работе выявили, что в свежевыделенных Ф1 фагоцитах уровень апоптоза был значительно ниже, чем в Ф2 фагоцитах. Сходным образом, более низкая чувствительность к апоптозстимулирующим факторам отмечена в М1 макрофагах по сравнению с М2 типом клеток (Kurian, Cunoosamy, 2014). Такое соотношение уровней апоптоза в двух типах фагоцитов сохранялось в контроле и в последующие сроки инкубации.

Введение TcTYp в среду инкубации увеличивало разницу между уровнем апоптоза в Ф1 и Ф2 фагоцитах в пользу последних, как через 1 ч, так и через 24 ч концентрационно-зависимым образом. Особенно выражена была разница (в 5 раз) через 24 ч при концентрации TcTYp 0.5 мкг/мл. Асимметричное действие на апоптоз макрофагов, с повышением в М2 макрофагах по сравнению с таковым в М1 типе, отмечается также при действии некоторых бактерий (Atri *et al.*, 2018).

Ранее было показано, что Ф1 фагоциты голотурии обладают более высоким уровнем продукции АФК (супероксиданионрадикала и оксида азота), чем Ф2 фагоциты, а TcTYp снижал продукцию АФК именно в Ф1 фагоцитах (Долматова и др., 2019). Снижение уровня апоптоза в Ф1 клетках, обнаруженное в настоящй работе, по-видимому, учитывая связь между продукцией АФК и апоптозом (Aguiló *et al.*, 2013; Brune *et al.*, 2013), является следствием снижения оксидантного стресса в Ф1 и подтверждает ранее высказанное (Долматова и др., 2019) предположение о том, что TcTYp снижает киллерную активность наиболее микробицидного типа фагоцитов голотурии.

Известно, что *Y. pseudotuberculosis* вызывает сдвиг поляризации макрофагов по М2 пути, и в этом процессе могут участвовать YopJ или другие еще не установленные факторы. Такой сдвиг приводит к снижению бактерицидной активности макрофагов и, по-видимому, играет важную роль в иммуносупрессивной стратегии *Y. pseudotuberculosis* (Bi *et al.*, 2012). TcTYp способен вызывать сдвиг в фунциональной активности фагоцитов голотурии также в пользу преобладания менее бактерицидного типа, что свидетельствует о том, что он может быть одним из факторов, обеспечивающих вирулентность бактерии для голотурий. Кроме того, эти данные свидетельствуют в пользу высказанного ранее предположения о том, что Ф1 и Ф2 фагоциты являются аналогами М1 и М2 макрофагов (Dolmatova, Dolmatov, 2018; Долматова и др., 2019). О том, что фагоциты голотурий могут приобретать М2-подобный фенотип, свидетельствуют также данные об обнаружении стимуляции аргиназы различными стимулами в макрофагах без участия синтезируемых Th2 цитокинов IL-4/IL-13 (Dzik, 2014), что свидетельствует об эволюционно древнем механизме регуляции иммунного ответа, связанном с активацией аргиназы.

Вместе с тем, необходимо отметить, что функциональная разница между М1 и М2 макрофагами основана на разных метаболических путях получения энергии (Dolmatova, Dolmatov, 2020), в регуляции которых участвует GSH. Он является главным небелковым тиолом, отвечающим за поддержание клеточного гомеостаза и окислительно-восстановительного баланса (Morris *et al.*, 2013). При этом в М1 макрофагах концентрация GSH превышает таковую в М2 макрофагах, а снижение уровня GSH способствует поляризации макрофагов в сторону М2 типа (Peterson *et al.*, 1998).

Ранее было показано, что уровень антиоксидантной ферментативной активности значительно выше в контрольных Ф1 фагоцитах по сравнению с таковым в Ф2 типе, и также значительно выше в Ф1 фагоцитах была активность глутатионредуктазы (ГР) через 24 ч действия TcTYp (Долматова и др., 2019). Поскольку ГР обеспечивает восстановление пула GSH при оксидантном стрессе (Чеснокова и др., 2006), это свидетельствовало в пользу предположения о поддержании концентрации GSH в Ф1 фагоцитах на более высоком уровне, чем в Ф2. Проверка этого предположения в настоящей работе показала, что через 24 ч инкубации в отсутствие TcTYp уровень GSH в Ф1 фагоцитах двукратно превышал таковой в Ф2 фагоцитах, при этом TcTYp в минимальной концентрации снижал уровень GSH в Ф1 до такового в Ф2, но не влиял на содержание GSH в Ф2 по сравнению с контролем. Таким образом, фагоциты Ф1 содержат GSH в значительно большей концентрации, чем в Ф2 клетках, при этом при воздействии TcTYp этот показатель меняется до уровня, характеризующего Ф2 фагоциты, что также свидетельствует в пользу наличия метаболического сдвига Ф1 фагоцитов в сторону Ф2 клеток. Снижение уровня GSH происходит и в макрофагах при действии ряда бактерий (Morris *et al.*, 2013), что приводит к увеличению их выживаемости в клетках хозяина (Cao *et al.*, 2018).

Исследования связи между уровнем GSH и смертью клетки показали, что в различных типах клеток недостаток GSH может сопровождаться апоптозом, некрозом и аутофагией (Sun *et al.*, 2018). В настоящей работе в диапазоне концентраций TcTYp 0.2–2 мкг/мл не отмечено возрастания апоптоза через 24 ч в Ф1 фагоцитах, поэтому снижение уровня GSH, по видимому, не стимулировало гибель клеток по апоптотическому пути. В то же время значительно более низкая концентрация GSH и более высокий уровень апоптоза в Ф2 по сравнению с таковыми в Ф1 свидетельствуют в пользу ранее высказанного предположения о том, что эти клетки более чувствительны к дефициту GSH, который может влиять на возрастание в Ф2 фагоцитах апоптоза (Dolmatova, Dolmatov, 2018).

Не было выявлено также положительной корреляции между жизнеспособностью и апоптозом фагоцитов, при этом зависимость жизнеспособности от концентрации TcTYp носила в двух типах фагоцитов противоположный характер.

Необходимо принять во внимание, что различные механизмы смерти могут осуществляться в клетке одновременно и блокирование одного типа может стимулировать другой путь (Mariño *et al.*, 2014). Аутофагия и апоптоз являются функционально различными механизмами для удаления или разрушения цитоплазматических структур внутри клетки или клеток внутри организма, соответственно. Аутофагия может защищать клетки от апоптоза и способствовать очищению от апоптотических клеток путем эфероцитоза. При этом активация аутофагии приводит к поляризации макрофагов по 2-му типу (Haloul *et al.*, 2019). По аналогии с макрофагами, на основании отсутствия связи между апоптозом и уровнем GSH и жизнеспособностью, и при этом выявленной трансформацией Ф1 фагоцитов в сторону приобретения функциональных черт Ф2 типа, можно предположить, что преобладающим механизмом смерти Ф1 фагоцитов при действии TcTYp является аутофагия. Необходимы дальнейшие исследования по влиянию TcTYp на различные виды смерти клеток для понимания механизмов его действия на фагоциты.

Макрофаги М1 и М2 отличаются между собой не только функционально, но и фенотипически. М1 макрофаги имеют, в частности, такие поверхностные маркеры, как CD80, CD86, CD14, а М2 макрофаги-CD206 (Bi *et al.*, 2012; Dolmatova, Dolmatov, 2020). Инфицирование *Y. pseudotuberculosis* снижало экспрессию CD80 и CD86 макрофагами, что соответствовало представлению о преобладании М2 типа в популяции макрофагов (Bi *et al.*, 2012). По-видимому, оценка маркеров фагоцитов Ф1 и Ф2 также может быть полезной для оценки механизма действия TcTYp.

Фагоциты беспозвоночных (как и позвоночных) экспрессируют рецепторы к лигандам, находящимся на поверхности микробов. Однако проблема фенотипирования фагоцитов беспозвоночных является на сегодняшний день нерешенной, у беспозвоночных не выявлены маркеры, схожие с таковыми у позвоночных, а возможности типирования разных субпопуляций/типов фагоцитов недостаточно исследованы. Наиболее часто используемый подход к изучению маркеров поверхности фагоцитов беспозвоночных – использование меченых флуоресцентным красителем растительных лектинов, связывающихся с определенными углеводными остатками белков на поверхности клеток. Многие лектины избирательно связываются с клетками представителей разных таксонов и видов. На примере *Mytilus edulis* было установлено,

что некоторые субпопуляции фагоцитов красились разными лектинами в зависмости от размеров гранул клеток (Pipe, 1990), что указывало на возможность фенотипирования отдельных типов лейкоцитов.

При этом необходимо отметить, что связывание того или иного растительного лектина с разными типами фагоцитов не носило уникальный характер, и разные типы фагоцитов отличались лишь по степени экспрессии лигандов для этих лектинов, как это отмечено и для фенотипических маркеров М1 и М2 макрофагов (Сахно и др., 2015), что, по-видимому, связано с пластичностью состояния фагоцитов.

В данной работе показано, что у голотурии *E. fraudatrix* свежевыделенные фагоциты Ф1 и Ф2 связывают некоторые растительные лектины с разной интенсивностью, при этом доли связывающих con A и PNA Ф1 и Ф2 фагоцитов достоверно не отличались. Однако фагоциты отличались между собой по связыванию SBA (связывание в Ф2 было значительно выше, чем в Ф1) и DBA (тенденция к превышению уровня связывания в Ф1 по сравнению с Ф2 клетками). Эти данные сходны с ранее полученными результатами (Dolmatova, Dolmatov, 2018), за исключением данных об экспрессии рецепторов к SBA, которая в указанной работе была выше в Ф1 фагоцитах по сравнению с Ф2 клетками. Основываясь на этих данных, характеристики связывания DBA клетками двух типов можно считать наиболее постоянными, и соотношение в экспрессии рецепторов с GalNAc-остатками может быть использовано для маркирования двух типов фагоцитов.

При этом степень различия в экспрессии рецепторов к DBA, SBA и PNA, но не con A как между двумя типами клеток, так и по сравнению с таковыми в свежевыделенных клетках, возрастала уже через 1 ч инкубации.

При инкубации с TcTYp выраженность экспрессии поверхностных рецепторов к лектинам менялась, а направленность изменений во многих случаях носила протвоположный характер в двух типах фагоцитов. Так, для con A соотношение в долях связывания двумя типами фагоцитов изменялось только через 24 ч, с преимущественным увеличением в Ф1 фагоцитах, что свидетельствует о том, что происходил сдвиг в связывании этого лектина преимущественно Ф1 фагоцитами как по сравнению со свежевыделенными фагоцитами, так и по сравнению с одночасовым периодом воздействия TcTYp. Соотношение же долей связывания DBA в двух типах фагоцитов при действии TcTYp менялось на протвоположное по сравнению с контролем (снижение доли в Ф1 при неизменности в Ф2), менялось также на протвоположное по сравнению с контролем соотношение долей связывания SBA двумя типами фагоцитов (возрастание в Ф1 и снижение в Ф2),

Соотношение связывания PNA в двух типах фагоцитов, в отличие от такового для con A, через 24 ч не менялось, но через 1 ч носило характер, противоположный контрольному (возрастание экспрессии в Ф1, но не в Ф2). Таким образом, TcTYp индуцировал приобретение фагоцитами Ф1 фенотипических черт, свойственных Ф2 фагоцитам в отношении связывания DBA и PNA, без изменения фенотипа Ф2. При этом он вызывал приобретение обоими типами фагоцитов фенотипической особенности противоположного типа клеток в отношении связывания SBA. Ранее было показано, что при воздействии TcTYp в обоих типах фагоцитов происходило изменение уровня их маркеров (оксида азота и активности аргиназы) в сторону приобретения признаков другого типа клеток, что сопровождалось функциональной стимуляцией преимущественно фагоцитов второго типа (Долматова и др., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что TcTYp меняет не только функциональные, но и фенотипические маркеры Ф1 и Ф2 фагоцитов, стимулируя появление у Ф1 фагоцитов особенностей Ф2 клеток.

Сравнение уровней апоптоза в двух типах контрольных фагоцитов и экспрессии поверхностных рецепторов к DBA свидетельствует о том, что окраска лектином не была избирательна по отношению к апоптотическим клеткам, более того, лектин связывался в большей степени с Ф1 клетками, в которых апоптоз был менее выражен, чем в Ф2 фагоцитах. Однако изменение соотношения экспрессии поверхностных рецепторов фагоцитов к DBA при воздействии TcTYp соответствовало динамике соотношения апоптоза в обоих типах клеток, лектин связывался в большей мере с клетками с наибольшим уровнем апоптоза. В то же время экспрессия рецепторов фагоцитов к SBA была значительно больше в клетках с наиболее выраженным апоптозом в свежевыделенных фагоцитах, но при воздействии TcTYp наибольший уровень связывания лектина происходил в клетках с наименьшим уровнем апоптоза. Такие изменения в определенной мере соответствуют существующей концепции о том, что DBA является апоптотическим, а SBA-антиапоптотическим маркером клеток (Dini *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2014).

Предполагается, что рецепторы, содержащие маннановые остатки, связаны с реализацией апоптоза, а сами остатки являются маркерами апоптотических клеток (Shi *et al.*, 2017). При этом есть данные, что при реализации аутофагии также экспрессируются маннановые остатки (Lai *et al.*, 2015). Возможно, что особенности связывания con A с фагоцитами обусловлены не столько апоптозом, сколько аутофагией клеток, обеспечивающей жизнеспособность клеток. В пользу этого

предположения свидетельствует сходство динамики жизнеспособности клеток с динамикой экспресии рецепторов к con A.

Ранее Секо-Ровира с соавт. (*Seco-Rovira et al.*, 2013) выявили аффинность PNA к апоптотическим макрофагам. Однако в настоящей работе не обнаружено определенной зависимости между связыванием PNA фагоцитами двух типов и развитием в них апоптоза при действии TcTYp, что, наряду со слабой изученностью участия рецепторов с Galβ1–3GalNAc-остатками в развитии апоптоза, не позволяет сделать вывод о значении этих рецепторов в механизмах действия TcTYp в фагоцитах голотурии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе продемонстрированы особенности концентрационно-зависимого (0.2–2 мкг/мл) и зависящего от времени (1 ч и 24 ч) действия термостатабильного токсина бактерии *Y. pseudotuberculosis* на апоптоз в двух типах фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* и оценена возможая роль апоптоза в механизмазх гибели фагоцитов при действии TcTYp. Установлено, что в Ф1 фагоцитах уровень апоптоза был значительно ниже, чем в Ф2, как в свежевыделенных клетках, так и при инкубации. Добавление TcTYp вызывало разнонаправленные изменения в апоптозе Ф1 и Ф2 фагоцитов, с преимущественным ингибированием его уровня в Ф1 и возрастанием в Ф2 фагоцитах, различия были наиболее выражены через 24 ч инкубации, при концентрации TcTYp 0.5 мкг/мл. Учитывая тесную связь апоптоза с функциональной активностью клеток, эти данные свидетельствуют о преимущественной активации Ф2 фагоцитов. При этом значительное превышение содержания GSH в интактных Ф1 фагоцитах по сравнению с таковым в Ф2 типе соответствует представлениям об апоптоз-протекторной роли GSH в клетках и указывает на наличие различий в метаболизме двух типов фагоцитов. Однако при действии TcTYp снижение концентрации GSH в Ф1, но не Ф2 свидетельствовало о том, что изменения в уровне апоптоза в Ф1 клетках при воздействии токсина не зависели напрямую от уровня GSH. Сходным образом, не установлено закономерности в зависимости жизнеспособности Ф1 и Ф2 фагоцитов от колебаний апоптоза в клетках. По-видимому, TcTYp способен включать в фагоцитах другие механизмы клеточной смерти, направленные на преимущественное выживание Ф2 фагоцитов.

Исследование с помощью ФИТЦ-меченых растительных лектинов особенностей экспрессии поверхностных клеточных рецепторов интактных и контрольных фагоцитов выявило сходный уровень экспрессии рецепторов к con A и PNA в двух типах фагоцитов. Однако выявлены различия в экспрессии рецепторов к DBA и SBA, уровень которой был выше в Ф1 фагоцитах по сравнению с Ф2 для первого лектина и, наоборот, ниже в Ф1 фагоцитах для второго, что говорит о возможности использования этих лектинов для маркирования двух типов фагоцитов. Инкубация фагоцитов с TcTYp вызывала изменения в соотношении уровней экспрессии к лектинам в двух типах фагоцитов, что свидетельствует о том, что фагоциты Ф1 приобретают фенотипические признаки Ф2 фагоцитов, а в отношении экспрессии рецепторов к SBA оба типа фагоцитов приобретали фенотип, характерный для другого типа клеток. Анализ направленности изменений в связывании лектинов клетками позволяет сделать вывод о том, что TcTYp вызывал преимущественно трансформацию фенотипа Ф1 фагоцитов в Ф2 фенотип.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии функциональных и фенотипических различий между Ф1 и Ф2 фагоцитами, которые, вместе с ранее полученными данными о том, что маркером Ф1 фагоцитов является оксид азота, а Ф2 фагоцитов – активность аргиназы, позволяют сделать вывод о том, что Ф1 и Ф2 фагоциты играют различную роль в иммунном ответе, подобно M1 и M2 макрофагам позвоночных.

При этом действие TcTYp было направлено на снижение функциональной активности фагоцитов Ф1 и увеличение активности Ф2 фагоцитов без снижения их жизнеспособности, со сдвигом фенотипа Ф1 фагоцитов в сторону приобретения фенотипа, свойственного Ф2 типу клеток. Вместе с ранее установленным фактом о повышенном уровне синтеза АФК в Ф1 по сравнению с Ф2 фагоцитами, это свидетельствует о способности TcTYp снижать активность наиболее микробицидных фагоцитов и увеличивать жизнеспособность иммунных клеток хозяина, что, по аналогии с макрофагами позвоночных, связано со стратегией выживаемости бактерий. Таким образом, TcTYp является важным фактором перепрограммирования фагоцитов голотурий в сторону преобладания антивоспалительного типа, что может увеличивать вирулентность *Y. pseudotuberculosis* для голотурий.

В целом, установленные механизмы воздействия TcTYp на два типа фагоцитов голотурии свидетельствуют о наличии сходства некоторых клеточных механизмов иммуносупрессии, вызываемой *Y. pseudotuberculosis,* у голотурий и позвоночных.

Дальнейшие исследования нужны для исследования механизмов клеточной гибели у голотурий при действии TcTYp, что может быть полезно для моделирования эффектов TcTYp и разработки препаратов, таргетированных на подавление вирулентности *Y. pseudotuberculosis.*

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (АААА-А17-117030110038-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гнедкова И.А., Лисяный Н.И., Станецкая Д.Н., Розуменко В.Д., Главацкий А.Я., Шмелева А.А., Малышева Т.А., Черненко О.Г., Гнедкова М.А. Лектинсвязывающие и туморогенные свойства клеток глиомы С6 // Онкология. 2015. Т. 17. С. 4–11.

Долматова Л.С., Заика О.А. Апоптозмодулирующее действие простагландина Е2 в целомоцитах голотурии *Eupentacta fraudatrix* зависит от антиоксидантного ферментного статуса клеток // Изв. РАН. Сер. биол. 2007. № 2. С. 273–282.

Долматова Л.С., Уланова О.А., Тимченко Н. Ф. Термостабильный токсин бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* дизрегулирует функциональную активность двух типов фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 2. С. 115–126.

Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Фенотипические и функциональные особенности альтернативно активированнных макрофагов: возможное использование в регенеративной медицине // Иммунология. 2015. Т. 36. С. 242–246.

Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова–Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 219 с.

Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // КМАХ. 2002. № 3. Т. 4. С. 248–266.

Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи соврем. естествознания. 2006. № 7. С. 29–36.

Aguiló N., Marinova D., Martín C., Pardo J. ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: to be or not to be, that is the question // Front. Cell Infect. Microbiol. 2013. V. 3. P. 88.

Atri Ch., Guerfali F.Z., Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases // Int. J. Mol. Sci. 2018. 19. 1801.

Bi Y., Wang X., Han Y., Guo Z., Yang R. Yersinia pestis versus *Yersinia pseudotuberculosis*: effects on host macrophages // Scand. J. Immunol. 2012. V. 76. P. 541–551.

Brune B., Dehne N., Grossmann N., Jung M., Namgaladze D., Schmid T., von Knethen, A., Weigert A. Redox control of inflammation in macrophages // Antioxid. Redox. Signal. 2013. V. 19. P. 595–637.

Cao R., Teskey G., Islamoglu H., Abrahem R., Munjal S., Gyurjian K., Zhong L., Venketaraman V. Characterizing the effects of glutathione as an immunoadjuvant in the treatment of tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. 2018. 62:e01132–18.

Chia F.-S., Xing J. Echinoderm coelomocytes // Zool.Studies. 1996. V. 35. P. 231–254.

Danilova N. The evolution of immune mechanisms // J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). 2006. V. 306B. P. 496–520.

Dini L., Falasca L., Lentini A., Mattioli P., Piacentini M., Piredda L., Autuori F. Galactose-specific receptor modulation related to the onset of apoptosis in rat liver // Eur. J. Cell Biol. 1993. V. 61. P. 329–337.

Dolmatova L.S., Dolmatov I.Yu. Lead induces different responses of two subpopulations of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // J. Ocean Univ. China. 2018. V. 17. P. 1391–1403.

Dolmatova L.S., Dolmatov I.Yu. Different macrophage type triggering as target of the action of biologically active substances from marine invertebrates // Mar. Drugs. 2020. 18, 37.

Dolmatova L.S., Eliseykina M.G., Timchenko N.F., Kovaleva A.L., Shitkova O.A. Generation of reactive oxygen species in the different fractions of the coelomocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* in response to the thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* in vitro // Chinese J. Oceanol. Limnol. 2003. V. 21. P. 293–304.

Dzik J.M. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. Front. Immunol. 2014. V. 5. P. 544.

Fraternale A., Brundu S., Magnani M. Glutathione and glutathione derivatives in immunotherapy // Biol. Chem. 2017. V. 398. P. 261–275.

Fraternale A., Crinelli R., Casabianca A., Paoletti M., Orlandi Ch., Carloni E., Smietana M., Palamara A. Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF-kB and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 3. Article ID e57866.

Haloul M., Oliveira E.R.A, Kader M., Wells J.Z., Tominello T.R., El Andaloussi A., Yates C.C., Ismail N. mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis // Scientific Reports. 2019. 9:14050.

Jeong C.H., Joo S.H. Downregulation of reactive oxygen species in apoptosis // J. Cancer Prev. 2016. V. 21 P. 13–20.

Kim S.-M., Fujihara M., Sahare M., Minami N., Yamada M., Imai H. Effects of extracellular matrices and lectin *Dolichos biflorus* agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured *in vitro* // Reprod. Fertil. Dev. 2014. V. 26. P. 268–281.

Komatsu N., Oda T., Muramatsu T. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and Pseudomonas toxin // J. Biochem. 1998. V. 124. P. 1038–1044.

Kurian N., Cunoosamy D. Differential sensitivity of subsets of monocyte-derived macrophages to apoptosis; its impact on lung inflammation // European Respiratory J. 2014. V. 44: P1470.

Lai Y., Chuang Y., Chang C., Yeh T.M. Macrophage migration inhibitory factor has a permissive role in concanavalin A-induced cell death of human hepatoma cells through autophagy // *Cell Death Dis.* 2015. 6(12): e2008.

Mariño G., Niso-Santano M., Baehrecke E.H., Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis // Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 2014. V. 15. P. 81–94.

McKenzie A.N.J., Preston T.M. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by

lectin staining and density centrifugation // Devel. Compar. Immunol. 1992. V. 16. P. 19–30.

Merriman J.A., Klingelhutz A.J., Diekema D.J., Leung D.Y. Novel *Staphylococcus aureus* secreted protein alters keratinocyte proliferation and elicits a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo* // Biochemistry. 2015. V. 54. P. 4855–4862.

Molloy A., Laochumroonvorapong P., Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin // J. Exp. Med. 1994. V. 180. P. 1499–1509.

Monack D., Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy // Int. J. Med. Microbiol. 2000. V. 290. P. 7–13.

Morris D., Carlos Guerra C., Khurasany M., Guilford F., Saviola B., Huang Y., Venketaraman.V. Glutathione supplementation improves macrophage functions in HIV // J. Interfer.Cytokine Res. 2013. V. 33. P. 270–279.

Netea M.G, Quintin J., van der Meer J.W.M. Trained immunity: a memory for innate host defense // Cell Host Microbe. 2011. V. 9. P. 355–361.

Peterson J.D., Herzenberg L.A., Vasquez K., Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 3071–3076.

Pipe R. K. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis* // Cell Tissue Res. 1990. V. 261. P. 261–268.

Pramanick D., Forstova J., Pivec L. 4 M guanidine hydrochloride applied to the isolation of DNA from different sources // FEBS Lett. 1976. V. 62. P. 81–84.

Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Sánchez-Huertas M.M., Madrid J.F., Saez F.J., Pastor L.M. Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod // Reprod. Domest. Anim. 2013. V. 48. P. 974–983.

Shi Z., Li W.W., Tang Y., Cheng L.J. A novel molecular model of plant lectin-induced programmed cell death in cancer // Biol. Pharm. Bull. 2017. V. 40. P. 1625–1629.

Sun Y., Zheng Y., Wang Ch., Liu Y. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells // Cell Death and Disease. 2018. 9:753.

Tsai H.C., Wu R. Cholera toxin directly enhances IL-17A production from human CD4+ T cells // J. Immunol. 2013. V. 191. P. 4095–4102.

Zhang Y., Ting A.T., Marcu K.B., Bliska J.B. Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with *Yersinia* // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 7939–7949.

Effect of a Heat-Stable Toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* on the Functional and Phenotypic Traits of Two Types of Phagocytes in the Holothurian *Eupentacta fraudatrix*

L. S. Dolmatova[1, #], O. A. Ulanova[1], and N. F. Timchenko[2]

[1]*Il'yichev Pacific Oceanological Institute, st. Baltiyskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia*

[2]*Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, st. Sel' skaya 1, Vladivostok, 690087 Russia*

[#]*e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru*

The impact of a heat-stable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* (HSTYp) on the markers of functional activity and phenotypes of P1- and P2-type phagocytes was studied in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. In the control, P1 and P2 phagocytes differed in the levels of apoptosis and reduced glutathione as well as in the surface receptor binding to some plant lectins. HSTYp (0.2–2 μg/mL) caused a shift in the functional activity indices and phenotype of P1 phagocytes toward the prevalence of those characteristic of P2 type, which has less bactericidal activity. It is supposed that HSTYp is an important factor in the reprogramming of holothurian phagocytes toward the predominance of the anti-inflammatory type, which may increase the virulence of *Y. pseudotuberculosis* for holothurians.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 354–359

БИОХИМИЯ

УДК 593.9;577

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МЕТАБОЛИТОВ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕРНОГО МОРСКОГО ЕЖА *Mesocentrotus nudus* (ECHINOIDEA) И МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ АСТЕРИНЫ ГРЕБЕШКОВОЙ *Asterina pectinifera* (ASTEROIDEA) В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИЙНОГО СТРЕССА

© 2021 г. К. А. Дроздов*, А. А. Артюков*, А. Л. Дроздов, @**

**Тихоокеанский институт биоорганической химии моря им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, ул. 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток, 690022 Россия*

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

@E-mail: anatoliyld@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2020 г.
После доработки 19.11.2020 г.
Принята к публикации 13.12.2020 г.

Методом ЯМР-спектроскопии изучен состав метаболитов в целомической жидкости морской звезды *Asterina pectinifera* и морского ежа *Mesocentrotus nudus* в норме и условиях гипоксии. У морского ежа выявлено наличие анаэробного метаболизма, который интенсифицируется при стрессе в условиях гипоксии. У морской звезды подобный механизм энергетического метаболизма не обнаружен. В условиях гипоксии в составе целомической жидкости морских звезд, в отличие от морских ежей, не наблюдается значительного роста лактата. Ткани астерины в больших количествах содержат смесь каротиноидов, наиболее известным из которых является астаксантин. Морскую звезду *Asterina pectinifera* можно использовать в качестве сырья для получения новых лекарственных, косметических и пищевых продуктов.

DOI: 10.31857/S102634702104007X

Препараты на основе экстрактов из иглокожих пока не получили широкого применения в современной медицине, однако активно используются в китайской медицине для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний. Все чаще стали появляться научные работы, показывающие эффективность использования экстрактов из иглокожих при лечении различных заболеваний (Shang *et al*., 2014; Dai *et al*., 2016). В связи с этим, любые научные исследования состава метаболитов данного класса животных представляют большой научный интерес. Внутренняя полость иглокожих заполнена целомической жидкостью, омывающей внутренние органы, солевой состав которой близок к составу морской воды (Barrington, 1979), но содержат повышенную концентрацию хлористого калия, липидов, белков, сахаров и целомоцитов (Smith, 1981; Chia, Xing, 1996). Целомическая жидкость выполняет разнообразные функции, включая транспорт веществ, выделение, движение, защиту внутренних органов и гуморальный иммунитет (Chia, Xing, 1996).

Методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (^1H-ЯМР-спектроскопии) была исследована целомическая жидкость шарообразных морских ежей *Mesocentrotus nudus* и морских звезд *Asterina pectinifera*, находящихся в разных экологических условиях. Этот метод позволяет количественно определять содержание различных метаболитов во внутренних жидкостях животных (Agar *et al*, 1991, Drozdov et al., 2016).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гребешковые астерины (=патирии) *Asterina* (=*Patiria*) *pectinifera* (Asterinidae, Asteroidea) – неприхотливый вид морских звезд, широко распространенный вдоль западного побережья Тихого океана от о. Сахалин до Желтого моря (рис. 1). Это самый многочисленный вид морских звезд в заливе Петра Великого Японского моря. Нерестятся астерины при температуре воды на поверхности ~20°С. Нерест проходит с июля до середины ноября и имеет два пика. У японского острова Хонсю нерест может продолжаться с апреля до сентября (Касьянов и др., 1980).

В биотопах с астериной часто встречается черный (невооруженный) морской еж (*Mesocentrotus* (=*Strongylocentrotus*) *nudus*) (семейство Strongylocentrotidae), который свое название получил по

Рис. 1. Внешний вид гребешковой астерины *Asterina pectinifera*.

Рис. 2. Внешний вид черного невооруженного морского ежа *Mesocentrotus nudus*.

черному цвету панциря и игл и из-за отсутствия хватательных педициллярий (рис. 2). Из рода *Strongylocentrotus* был выделен на основании метода молекулярно-генетического и морфологического анализа (Vinnikova, Drozdov, 2011; World Register of Marine Species: *Mesocentrotus*). Встречается в Японском и Желтом морях на глубинах от 0 до 180 м, но обычно держится на глубине до 5 м. В заливе Петра Великого Японского моря черные невооруженные ежи нерестятся с конца июля до конца сентября с небольшим перерывом в конце августа (Касьянов и др., 1980).

Контрольных животных брали непосредственно из моря, собирая в заливе Восток залива Петра Великого Японского моря. Подопытных животных помещали в сосуды с небольшим количеством воды так, чтобы она покрывала менее четверти тела животного и выдерживали при температуре 4°С. Морских звезд выдерживали в течение суток, а морских ежей – в течение 72 ч. Животные оставались живыми (под контролем была подвижность их амбулакральных ножек). Эксперименты проводили в трех повторах, в каждом из которых использовали по 10 контрольных и опытных особей.

Целомическую жидкость для исследований брали из целомической полости морской звезды и морского ежа, фильтровали через фильтровальную бумагу, помещали в пробирки и замораживали в холодильнике до проведения анализа (рис. 3, 4).

Данные, получаемые при проведении протонной 1-D спектроскопии, представляют собой по оси ординат интенсивность сигнала от протонов в различных химических связях и состояниях. Это, в свою очередь, дает информацию о пропорциональном содержании ядер в различных химических состояниях в исследуемом образце. По оси абсцисс представлена информация о химическом сдвиге сигнала протонов относительно эталонного ноля (сигнал от тетраметилсилана SiC4H12), что дает информацию о количестве различных химических соединений. Значение химического сдвига выражается в частях на миллион от базовой частоты или ppm (от англ. parts per million).

Для подавления сигналов воды был использован метод преднасыщения протонов воды перед проведением основного ЯМР исследования (Braun *et al.*, 1998). Удаление из спектра сигналов от белков достигали путем детерминации по разнице времен Т2-релаксации низкомолекулярных и белковых соединений (Nicholson, Wilson, 1989; Колоколова и др., 2008).

Рис. 3. Целомическая жидкость гребешковой астерины *Asterina pectinifera*. 1 – интактная особь, 2 – через сутки после нахождения в условиях гипоксии.

Рис. 4. Целомическая жидкость черного невооруженного морского ежа *Mesocentrotus nudus.* (а) – интактная особь; (б) – через 48 ч после нахождения в условиях.

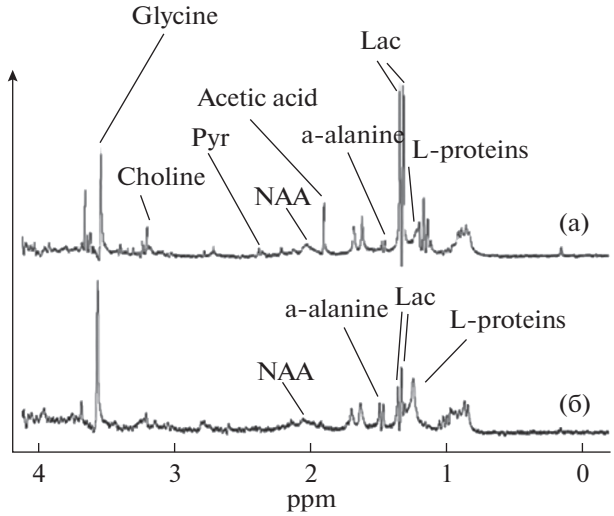

Рис. 5. ^{1}H ЯМР-спектр целомической жидкости морского ежа *Mesocentrotus nudus.* (а) – находившегося течение 4-х сут в условиях гипоксии при 4°С, (б) – интактного; acetic acid – уксусная кислота, a-alanin – аланин, lac – лактат, L-proteins – липопротеины, NAA – ацетиласпартат. По оси абсцисс – химический сдвиг сигнала (ppm), по оси ординат – интенсивность сигнала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что состав метаболитов у животных сильно зависит от характера пищи. Травоядные и плотоядные представители одного отряда насекомых демонстрируют значительные различия в составе метаболитов (Drozdov *et al.*, 2016). Несмотря на то, что морские ежи и морские звезды принадлежат к одному и тому же типу и являются близкими родственниками, они питаются разной пищей: морские звезды – хищники, а морские ежи питаются водорослями.

Сравнительный анализ спектров целомической жидкости контрольных морских звезд и морских ежей, выдержанных при пониженной температуре в условии гипоксии, позволил установить, что в обоих случаях происходит изменение состава целомической жидкости. Животные по-разному реагировали на условия гипоксии. Морские ежи относительно хорошо переносили недостаток кислорода, и после 4 дней содержания в условиях гипоксии у морских ежей не было зарегистрировано ни одной смерти. Морские звезды *A. pectinifera* более чувствительны к стрессу, вызванному гипоксией: мертвые особи были обнаружены уже на второй день.

Состав метаболитов контрольных и подопытных животных значительно различался как у морских звезд, так и у морских ежей, но изменения были разными. Из рис. 5 видно, что в целомической жидкости морских ежей, находившихся в условиях гипоксии, происходит существенное возрастание содержания лактата – более чем в три раза. Это свидетельствует об увеличении интенсивности анаэробного расщепления глюкозы. Концентрация лактата в морской звезде не изменилась, но было обнаружено увеличение содержания пирувата и пропионовой кислоты (рис. 6).

Отсутствие значительного роста лактата в условиях гипоксии в составе целомической жидкости морских звезд, который наблюдается у морских ежей, а также у грызунов и людей, может быть связано с тем, что морские звезды не имеют механизма адаптации к отсутствию кислорода, а изменения в составе метаболитов вызваны некрозом тканей. Также возможно, что морские звезды имеют принципиально иной механизм поддержания жизнедеятельности в условиях стресса, вызванного недостатком кислорода. Существенным отличием в биохимии морских звезд и морских ежей является наличие в морских ежах пигментов нафтохинонового ряда – спинохромов, которые отсутствуют у морских звезд.

Присутствие нафтохиноновых пигментов является одной из характерных биохимических синапоморфий морских ежей, вызванных генами, кодирующими ферменты поликетидсинтазы, которые необходимы для биосинтеза спинохрома (Drozdov *et al.*, 2017; Hou Yakun *et al.*, 2018). У обычных глобулярных морских ежей, например,

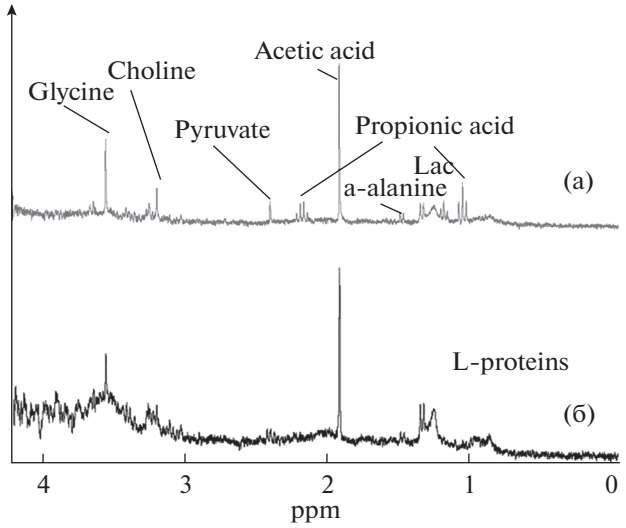

Рис. 6. ^1H ЯМР-спектр целомической жидкости морской звезды *Asterina pectinifera*. (а) – интактной; (б) – находившейся течение суток в условиях гипоксии при 4°C. alanin – аланин, choline – холин, glycine – глицин, lac – лактат, L-proteins – липопротеины, NAA – ацетиласпартат, propionic acid – пропионовая кислота, pyruvate – пируват. По оси абсцисс – химический сдвиг сигнала (ppm), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Strongylocentrotus purpuratus, пигменты нафтохинона появляются уже на стадии бластулы.

Изучение выживания различных представителей типа иглокожих в условиях гипоксии и окислительного стресса связано с исследованиями механизмов стресс-устойчивости их клеток, влияющих на фактическое долголетие этих видов. Геномные отличия, различия в содержании и разнообразии антирадикальных и антиоксидантных веществ в тканях, микробиоме и целомических жидкостях иглокожих существенно отражаются на продолжительности жизни и количестве данных гидробионтов на одной территории морского дна. Различия в питании морских ежей и звезд изначально дают основания предполагать, что у морских ежей преобладает путь получения энергии за счет утилизации углеводов (глюкоза как энергетический субстрат), а звезды получают энергию. в основном, за счет утилизации жирных кислот и лишь частично за счет глюкозы.

Геном морского ежа *S. purpuratus* содержит более 400 генов, связанных с защитой этих водных организмов от различных стрессовых факторов, включая гипоксию. Эти гены кодируют детоксифицирующие белки и ферменты, а также факторы транскрипции, белки теплового шока, рецепторы ядерных факторов и т.д. Также в геноме присутствуют гены арильного рецептора (AHR), пероксисомы (PPAR), фактора, индуцирующего гипоксию (HIF) и другие. Антиоксидантную защиту обеспечивают ферменты супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (Cats), пероксидазы (GPX) и тиоредоксины (TRX) (Goldstone *et al.*, 2006).

Полигидроксинафтохиноны, характерные только для морских ежей (Hou Yakun *et al.*, 2018), являются соответствующими лигандами вышеуказанных рецепторов и ядерных факторов, которые запускают их функционирование в клетках. Один из представителей полигидроксинафтохинонов (эхинохром А, EchA) обладает способностью взаимодействовать со всеми типами кислорода (O_2, супероксид-анион O_2- и синглетный кислород) и превращать их в пероксид водорода (H_2O_2) (Lebedev *et al.*, 1999; Novikov *et al.*, 2018).

$$EchA + O_2 \rightarrow EchA^* + H_2O_2.$$

EchA* является окисленной формой эхинохрома А. Как видно из уравнений, эхинохром А выполняет важную функцию дисмутации супероксиданта до H_2O_2, который катализируется ферментами супероксиддисмутазами (СОД) SOD1, SOD2 и SOD3 в организме. Увеличение количества супероксиддисмутаз и их функциональных миметиков подавляет окислительный стресс в организмах и способствует увеличению продолжительности жизни морских ежей и других животных.

Панцирь и иглы морских ежей *M.s nudus* полностью покрыты клетками, контактирующими с морской водой и содержащими подобный эхинохрому А полигидроксинафтохинон спинохром Е (spin E). Морские ежи имеют поверхностное дыхание, поэтому все виды кислорода, поступающие из морской воды будут превращаться этими клетками в пероксид водорода H_2O_2. Уменьшение поступления кислорода в организм за счет этого активирует в морских ежах батарею генов, связанных с функционированием фактора HIF. Этот фактор индуцибильной гипоксии, активный в морских ежах, обладает антистрессорным действием и отвечает за жизнеобеспечение и долголетие. Образующаяся из-за полигидроксинафтохинонов перекись водорода H_2O_2 частично поступает в организм морских ежей по аквапориновым каналам, разлагается ферментом каталазой на кислород и воду, контролируется глутатион-пероксидазами и тиоредоксинами, обеспечивая морским ежам анаэробное существование. Так как углеводы являются основными элементами питания морских ежей *M. nudus* , основным процессом энергообеспечения будет являться анаэробный гликолиз, характерный высоким содержанием лактата и небольшим количеством пирувата. Эти соединения в подобном соотношении и обнаруживаются в целомической жидкости морских ежей *M. nudus* до гипоксии.

Морские звезды *A. pectinifera* в своем составе не содержат полигидроксинафтохиноны. Основными антиоксидантами этих гидробионтов являются

каротиноиды (производные астаксантина), главными функциями которых является цитопротекция за счет подавления перекисного окисления липидов плазматических мембран и образования цветных комплексов с определенными белками (цветовая окраска многих морских и наземных организмов). Эти антиоксиданты нейтрализуют только свободные радикалы и частично синглетный кислород. Взаимодействие с обычным кислородом для них нехарактерно и каротиноиды не являются миметиками супкроксиддисмутаз. Таким образом, возможно, морские звезды могут тоже функционировать в анаэробных условиях, но их энергообеспечение происходит за счет каких-то других энергосубстратов, нежели у морских ежей. Так как основными энергосубстратами в живой природе являются жирные кислоты, дающими в митохондриях ацетилкоэнзим А, то в целомической жидкости морской звезды *A. pectinifera* нами было обнаружено высокое содержание ацетата и пропионовой кислоты (рис. 6). Эти соединения способны утилизироваться в митохондриях в виде ацетилкоэнзима А и ацилкоэнзима А, образуя в результате АТФ. Пропионовая кислота свободно включается в цикл Кребса и используется как энергетический продукт. При этом она полностью окисляется до углекислого газа и воды с выделением энергии в количестве 4957 кал/г (Прудникова, Росляков, 1994). Происхождение пропионовой кислоты в целомической жидкости морской звезды может быть объяснено окислением жирной кислоты С18:0 (основной энергосубстрат) сначала по механизму альфа-окисления, а затем в процессе бета-окисления:

$$\text{C18:0(альфа-окисл.)} \rightarrow \text{C17:0(бета-окисл.)} \rightarrow$$
$$\rightarrow 7\text{C2:0(ацетат)} + \text{C3:0(пропионовая кислота)}.$$

Другим объяснением наличия пропионовой кислоты в целомической жидкости морской звезды *A. pectinifera* может быть присутствие в ее микробиоме симбионтной грамм-положительной бактерии факультативного анаэроба *Propionibacterium* spp. Эти микроорганизмы в анаэробных условиях производят из различных субстратов (глюкоза, лактат, глицерин) пропионовую кислоту и ацетат. Пропионовая кислота, помимо энергетических свойств, обладает ингибирующим действием по отношению к *Aspergillus flavus*, аэробной *Bacillus*, *Salmonella* и дрожжей (Liu *et al*., 2012). Это свойство имеет немаловажное значение в симбионтных взаимоотношениях микробиома морской звезды. В отличие от обитающих в Японском море видов морских звезд из семейства Asteriidae (*Asterias amurensis, Lysastrosoma anthosticta*, *Distolasterias nipon* и др.), астерины, относящиеся к семейству Asterinidae, приобретают яркую окраску, варьирующую от синей до красной. По-видимому это обусловлено тем, что они питаются не только тканями животных, но и цианобактериями и микроводорослями, обрастающими твердые субстраты. Скопления богатого каротиноидами микробентоса особенно обильны на марикультурных коллекторах с растущими двустворчатыми моллюсками: гребешками, мидиями и устрицами. Ткани астерины в больших количествах содержат смесь каротиноидов, наиболее известным из которых является астаксантин. Каротиноиды – это натуральные жирорастворимые пигменты. Синтез каротиноидов осуществляется только растениями, в том числе водорослями фитопланктона, в частности микроводорослями *Haematococcus*. Морские звезды получают их из своего рациона питания. Каротиноиды определяют образование цвета от желтого (лютеин, зеаксантин) до розовато-красного (астаксантин, кантаксантин) и действуют как антиоксиданты. Они защищают клетки и ткани от окислительного стресса, предотвращают ишемическую болезнь сердца, укрепляют кровеносные сосуды и иммунную систему организма, препятствуют развитию некоторых опухолей. Наиболее известной физиологической ролью каротиноидов является активность провитамина. Синтетический астаксантин высокотоксичен и нестабилен.

В связи с развитием марикультуры, астерины массово накапливаются возле морских садков. Необходимость сбора и уничтожения этих хищников позволяет одновременно обеспечить достаточные ресурсы для производства каротиноидных препаратов. Разработанная нами ранее технология комплексной переработки морских звезд *A. pectinifera* (Артюков и др., 2012) позволяет получать биологически активные пептиды коллагена и препараты каротиноидов, обогащенные астаксантином, проявляющие иммуномодулирующее, противовоспалительное и антиоксидантное действие. Их можно использовать в качестве сырья для получения новых лекарственных, косметических и пищевых продуктов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Артюков А.А., Руцкова Т.А., Купера Е.В., Маханьков В.В., Глазунов В.П., Козловская Э.П. Способ получения каротиноидного комплекса из морских звезд // Патент РФ № 2469732(2012 г.)

Касьянов В.Л., Медведева Л.А., Яковлев С.Н., Яковлев Ю.М. Размножение иглокожих и двустворчатых моллюсков. М. Наука, 1980. 208 с.

Колоколова Т.Н., Савельев О.Ю., Сергеев Н.М. Метаболический анализ биологических жидкостей с помощью спектроскопии-ЯМР-^1H // Журн. аналитической химии. 2008. Т. 63. № 2. С. 118–136.

Прудникова Т.Н., Росляков Ю.Ф. Пропионовая кислота в метаболизме живых организмов. Известия Вузов. Пищевая технология. 1994. № 5–6. С. 23–27.

Agar N.S., Rae C.D., Chapman, B.E., Kuchel P.W. ^1H-NMR spectroscopic survey of plasma and erythrocytes from selected marsupials and domestic animals of Australia // Comp. Biochem. Physiol. 1991. V. 99. P. 575–597.

Barrington E.J.W. Invertebrate structure and function. 2-nd edn. London: Nelson. 1979. xiv, 765 p.

Braun S., Kalinowski H.-O., Berger S. 150 and More Basic-NMR Experiments: a Practical Course. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. 520 p.

Chia F., Xing J. Echinoderm coelomocytes // Zool. Stud. 1996. V. 35. P. 231–254.

Dai Y., Prithiviraj N., Gan J., Zhang X.A., Yan J. Tissue Extract Fractions from Starfish Undergoing Regeneration Promote Wound Healing and Lower Jaw Blastema Regeneration of Zebrafish // Scient. Rep. 2016. V. 6. Article number: 38693, doi: ; https://www.nature.com/articles/srep38693
https://doi.org/10.1038/srep38693

Drozdov K.A., Vshivkova T.S., Kholin S.K., Drozdov A.L. Comparative analysis of caddisfly (insecta, trichoptera) herbivores and predators metabolites by NMR // 3rd International symposium of Benthological society of Asia, Vladivostok, Russian Federation, Aug. 24–27, 2016: Abstr. book. Vladivostok : Dalnauka, 2016. P. 51. ISBN 978-5-8044-1610-3.

Drozdov A.L., Artyukov A.A., Elkin Yu.N. Cells and Epidermis of Sand Dollar *Scaphechinus mirabilis* // Russian J. Devel. Biol. 2017. V. 48. № 4. P. 257–262.

Goldstone J.V., Hamdoun A., Cole B.J., Howard-Asby M., Nebert D.W., Scally M., Dean M., Epel D., Hahn M.E., Stegeman J.J. The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome // Dev. Biol. 2006. V. 300. P. 366–384.
https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.066

Hou Yakun, Vasileva E.A., Carne A., McConnell M., Bekhit A., El-Din A., Mishchenko N.P. Naphthoquinones of the spinochrome class: occurrence, isolation, biosynthesis and biomedical applications // Royal Society Chemistry Advances. 2018. V. 8. P. 32637–32650.

Lebedev A.V., Ivanova M.V., Krasnovid N.L. Interaction of natural polyhydroxy-1,4-naphthoquinones with superoxide anion-radical // Biochemistry. 1999. V. 64. P. 1273–1278.

Liu L., Zhu Y., Li J., Wang M., Lee P., Du G., Chen J. Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives // Crit. Rev. Biotech. 2012. V. 32. № 4. P. 374–381.

Nicholson J.K., Wilson I.D. High resolution proton NMR spectroscopy of biological fluids // Prog. NMR Spectrosc. 1989. V. 21. P. 449–501.

Novikov V.L., Shestak O.P., Mishchenko N.P., Fedoreev S.A., Vasileva E.A., Glazunov V.P., Artyukov A.A. Oxidation of 7-ethyl-2,3,5,6,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone (echinochrome A) by atmospheric oxygen. 1. Structure of dehydroechinochrome // Rus. Chem. Bulletin. 2018. V. 67. P. 282–290.

Shang X.H., Liu X.Y., Zhang J.P, Gao. Y., Jiao B.H., Zheng H., Lu X.L. Traditional Chinese medicine–sea urchin // Mini. Rev. Med. Chem. 2014. V. 14. № 6. P. 537–542.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24873818

Smith V.J. The echinoderms // Invertebrate Blood Cells. Mol. 2. Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.). London: Academic Press. 1981. P. 513–562.

Vinnikova V.V., Drozdov A.L. The Ultrastructure of Spines in Sea Urchins of the Family Strongylocentrotidae // Biology Bulletin. 2011. Vol. 38, Issue 9. P. 861–867.

Original Russian Text © V.V. Vinnikova, A.L. Drozdov, 2011, published in Zoologicheskii Zhurnal, 2011. № 5. P. 573–579.
https://doi.org/10.1134/S1062359011090093

World Register of Marine Species: *Mesocentrotus.*
htpp://www.marinespesies.org

Changes in the Composition of Celomic Fluid Metabolites of the Black Sea Urchin *Mesocentrotus nudus* (Echinoidea) and Sea Star *Asterina pectinifera* (Asteroidea) Under Conditions Hypoxia Stress

K. A. Drozdov[1], A. A. Artyukov[1], and A. L. Drozdov[2, #]

[1]*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, pr. 100 Let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia*

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

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

The composition of metabolites in the coelomic fluid of the starfish *Asterina pectinifera* and sea urchin *Mesocentrotus nudus* was studied under normal and hypoxic conditions using NMR spectroscopy. Their change after keeping animals under hypoxia was shown. Sea urchins revealed the presence of anaerobic metabolism, which intensifies under stress in conditions of hypoxia. A starfish has not found a similar mechanism of energy metabolism. Under conditions of hypoxia, a significant increase in the lactate, which is observed as in sea urchins, is not observed in the composition of the coelomic liquid of starfish. *Asterine* tissues in large quantities contain a mixture of carotenoids, the most famous of which is astaxanthin. Starfish *Asterina pectinifera* can be used as a raw material for new medicinal, cosmetic and food products.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 360–372

ГЕНЕТИКА

УДК 575.17:597.553.2

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОРБУШИ *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) ИЗ НЕКОТОРЫХ РЕК СЕВЕРО-ВОСТОКА РОССИИ

© 2021 г. Л. Т. Бачевская*, @, В. В. Переверзева*, А. А. Примак*, Г. А. Агапова*

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

@E-mail: gekki54@mail.ru

Поступила в редакцию 30.07.2019 г.
После доработки 08.06.2020 г.
Принята к публикации 21.06.2020 г.

Получены данные об изменчивости нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК горбуши из смежных поколений. Между выборками из рек разных регионов в четной линии лет отмечен более высокий уровень дивергенции, чем в смежном поколении. В то же время некоторые географически близкие популяции статистически значимо отличаются генетическими параметрами. Рассчитанная доля межгрупповой генетической дисперсии свидетельствует о том, что дивергенция смежных поколений горбуши произошла в относительно недавнем историческом прошлом. Анализ генетической изменчивости горбуши показал, что уровень дифференциации североохотоморских популяций, относящихся к разным промысловым районам, ниже наблюдаемого между локальностями внутри каждого из них. В первичной структуре белка Cytb горбуши отмечены аминокислотные замены, свидетельствующие о влиянии положительного вектора стабилизирующего отбора.

DOI: 10.31857/S1026347021040032

Горбуша *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) наиболее массовый по численности вид рода тихоокеанских лососей. Она имеет один из самых обширных ареалов среди представителей этого рода. Для внутривидовой структуры горбуши, как и для всех видов рода тихоокеанских лососей, отмечен иерархический характер, который поддерживается у этого вида жестким двухлетним циклом репродуктивно изолированных поколений линии четных и нечетных лет нереста, различающихся некоторыми биологическими, генетическими, фенетическими и экологическими особенностями.

Изучение внутривидовой организации горбуши проводится несколько десятилетий. Несмотря на длительный период изыскательских работ до настоящего времени нет единого мнения по вопросу внутривидовой структуры горбуши. Некоторые ученые считают, что горбуша дифференцирована на ряд изолированных друг от друга группировок, приуроченных к районам нереста (Алтухов и др., 1983, 1997; Алтухов, 1989, 2003; Beacham *et al.,* 1985; Омельченко, Вялова, 1990; Гордеева, 2012, 2014). Другие склоняются к тому, что она имеет слабую межпопуляционную дифференциацию в результате периодически возникающих крупномасштабных межрегиональных миграций (Глубоковский, Животовский, 1986; Глубоковский, 1995; Животовский, 2013). Третьи полагают, что стада горбуши регулярно обмениваются большим количеством мигрантов (Aspinwall, 1974). Обоснованный выбор между моделями локальных и флуктуирующих стад может быть сделан только на основе сбора многолетних данных из каждой линии горбуши четных и нечетных лет (Животовский, 2013). Проводимые исследования позволили накопить к настоящему времени большой массив данных по внутривидовой структуре горбуши из различных частей ареала и, хотя дискуссия попрежнему продолжается, большинство исследователей едины в том, что для этого вида характерны линии четных и нечетных лет, каждая из которых является самовоспроизводящейся единицей. Основная доля межпопуляционной генетической изменчивости вида связана с различием двух репродуктивно изолированных поколений (Aspinwall, 1974; Глубоковский, Животовский, 1986; Глубоковский, 1995, Алтухов и др., 1997; Калабушкин и др., 1998; Гордеева и др., 2006; Салменкова и др., 2006; Пустовойт, 2011; Гордеева, 2012, 2014).

На современном этапе все чаще применяются молекулярно-генетические методы, которые позволяют расширить представления о генетической структуре горбуши и более точно оценить уровень внутривидовой дифференциации. Среди них большую ценность приобретает изучение строения митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК (Полякова и др., 1992, 1996; Брыков и др., 1999; Гордеева и др., 2006; Салменкова и др., 2006; Шпигальская и др., 2009; Гордеева, 2012, 2014, 2018; Beacham *et al.* 2012; Бачевская, Пе-

реверзева, 2013; Гордеева, Салменкова, 2017). Проводимые исследования не всегда дают однозначные результаты. Анализ рестрикционного полиморфизма фрагментов митохондриальной ДНК горбуши о. Сахалин, Курильских о-вов и Камчатки показали значительные различия в неперекрывающихся поколениях как по уровню изменчивости мтДНК, так и по величине внутривидовой структурированности (Брыков и др., 1999). В то же время исследования разнообразия горбуши по микросателлитным локусам ядерной ДНК позволили выявить относительно невысокий уровень генетической дифференциации репродуктивно изолированных линий четных и нечетных лет данного вида (Салменкова и др., 2006; Гордеева, 2012; Beacham *et al.*, 2012). Исследования популяционной структуры горбуши с применением главного комплекса гистосовместимости показали значительный полиморфизм по локусу MHC I-A1. С помощью этого молекулярно-генетического маркера обнаружена отчетливая пространственная дифференциация популяций вида (Гордеева, 2012; Гордеева, Салменкова, 2017). Отмечена перспективность указанного маркера для определения более полной картины адаптивной генетической структуры и эффективного разделения стад горбуши в смешанных уловах (Гордеева, 2012, 2018; Гордеева, Салменкова, 2017). При этом отмечено, что пространственная генетическая дифференциация дальневосточных и североохотоморских популяций линии нечетных лет проявляется слабее, чем в четные годы (Бачевская, Переверзева, 2013; Гордеева, 2014). Многие исследователи полагают, что неодинаковая степень дивергенции популяций внутри каждой из линий могут быть связаны с разным историческим возрастом происхождения смежных поколений, которые независимо эволюционируют уже длительное время (Churikov, Gharrett, 2002; Hawkins *et al.*, 2002; Бачевская, Переверзева, 2013; Гордеева, 2014).

Несмотря на накопленную базу данных, в прогнозах подходов горбуши случаются сбои. На основании этого был сделан вывод о недостаточности данных по популяционной организации горбуши и необходимости тестирования различных моделей ее популяционной структуры, для чего следует привлечь большой набор ДНК маркеров, создать банк множественных выборок по основным районам воспроизводства вида (Животовский, 2013). В последнее время для определения генетического разнообразия тихоокеанских лососей применяется скрининг нуклеотидных последовательностей генома, дающий более полную информацию о его строении. Подобный подход в исследовании митохондриальной ДНК (мтДНК) у горбуши представляется весьма перспективным, особенно если учесть, что целый ряд популяций, заходящих на нерест в реки материкового побережья Охотского моря, Камчатки и Чукотки, в этом плане мало изучены. Цель данного исследования – определение полиморфизма гена цитохрома *b* мтДНК (*cytb* мтДНК) горбуши из смежных поколений и сравнительный анализ генетического разнообразия исследованных популяций вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для молекулярно-генетических исследований был собран материал (мышечная ткань) от производителей репродуктивно изолированных генераций горбуши четной и нечетной линии лет (2008–2011 гг.). Район сбора материала представлен на рис. 1. Исследованы популяции вида из девяти рек. Даты сбора материала и количество изученных образцов отражены в табл. 1 Выделение и очистку тотальной ДНК проводили модифицированным методом Флеминга–Кука (*Fleming–Cook*, 2002). Амплификацию нуклеотидной последовательности гена *cytb* мтДНК горбуши проводили с использованием праймеров L 15436 (5'-CCT GCT CGG ACT TTA ACC GAA ACT-3') и H15149ad (5'-CICCTCARAATGAYA TTTGTCCT-3') (Russell *et al.*, 2000). Амплифицированный участок мтДНК был очищен и подготовлен к секвенированию по стандартной методике с применением набора реагентов Diatom™ DNA Clean-Up (“Лаборатория Изоген”, Москва). Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированного участка мтДНК было проведено по стандартной методике с применением наборов для циклического секвенирования ДНК BigDye Terminator (AppliedBiosystems, США) и генетического анализатора ABI-Prism 3500xL (AppliedBiosystems). Полученные нуклеотидные последовательности гена *cytb* мтДНК горбуши депонированы в GenBank (JF313905, JF313906, JF313909, JF313911, JF313912, JF313914–JF313917, JF313920, JF313922, JN227671–JN227679, JX185434–JX185440). Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием пакета программ MEGA 6.0.2.74 (Tamura *et al.*, 2013) и ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Полученные данные анализировали с использованием раздела AMOVA (Analysis of Molecular Variance) в пакете программ ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005). Подход, применяемый в этом разделе, аналогичен подходу, основанному на анализе дисперсии частот генов, но учитывает количество мутаций между гаплотипами. Иерархический анализ дисперсии делит общую дисперсию на ковариационные компоненты на основе внутрипопуляционных, межпопуляционных различий, а также различий в группе и/или между группами (Excoffier *et al.*, 2005). Соответствие характера нуклеотидных замен гипотезе нейтральности (для использованного маркера) в выборках горбуши определяли с помощью тестов *D* Таджимы и *Fs* Фу (Tajima, 1989; Fu, Li, 1993; Fu, 1997). Для

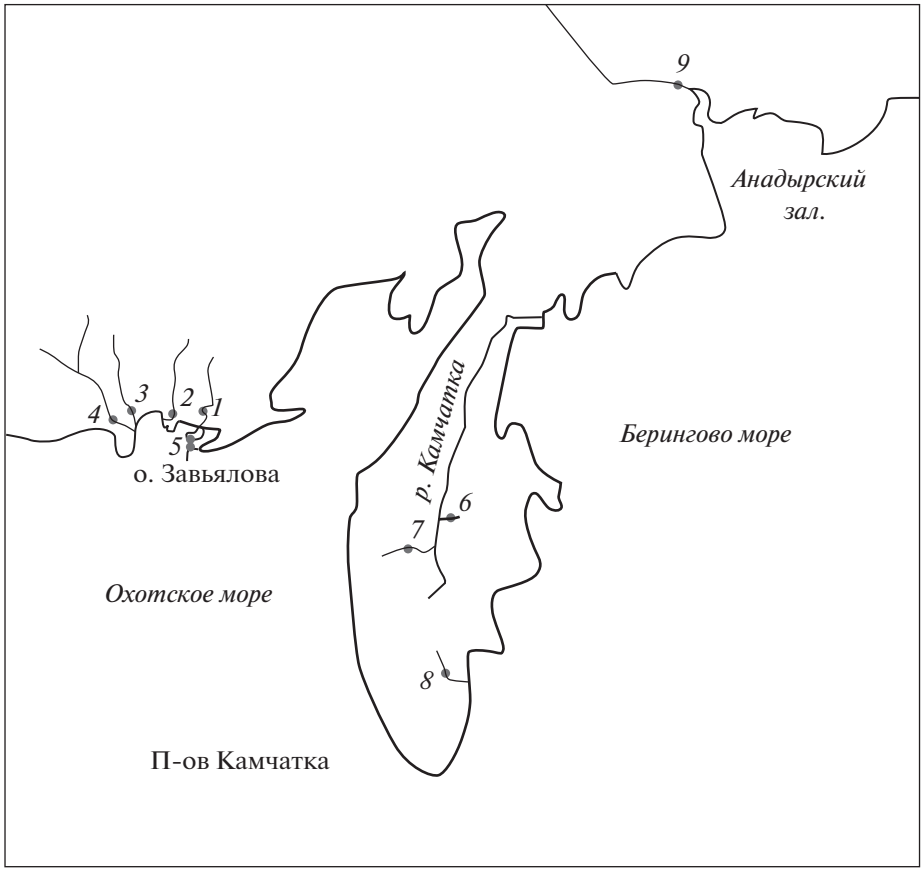

Рис. 1. Карта-схема района сбора материала. *1* – р. Ола, 2 – р. Армань, *3* – р. Яна, *4* – р. Тауй, *5* – руч. Рассвет, *6* – р. Большая Клюквенная, *7* – р. Кирганик, *8* – р. Асача, *9* – р. Анадырь.

построения медианных сетей применяли алгоритм MJ (Median-Joining) программы Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999). Оценку значимости аминокислотных замен и типа отбора проводили с применением *z*-теста модели MM01 в программе TreeSAAP 3.2 (Woolley *et al.*, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получены нуклеотидные последовательности участка гена *cytb* мтДНК горбуши, заходящей на нерест в девять рек северо-востока России. Всего исследовано тринадцать выборок. Идентифицированный фрагмент гена *cytb* содержит 425 пар нуклеотидов (пн) и соответствует положению 15504–15928 пн полного генома мтДНК горбуши. Обнаруженные нуклеотидные замены в гаплотипах анализируемого фрагмента *cytb* мтДНК вида из исследованных локальностей представлены на рис. 2. Позиции вариабельных нуклеотидов приведены в сравнении с нуклеотидной последовательностью гаплотипа горбуши (GenBank, JF313905) (Бачевская, Переверзева, 2013). Известно, что у разных видов величина соотношения транзиции/трансверсии может достигать высоких значений и, как правило, первые происходят значительно чаще последних (Nei, 1987). В процессе анализа нуклеотидных последовательностей гена *cytb* мтДНК горбуши было показано, что трансверсии встречаются в несколько раз реже, чем транзиции (рис. 2). В исследованных локальностях отмечено 7.7% вариабельных позиций от длины исследованного фрагмента и 2.9% от общей длины гена *cytb* мтДНК. Позиции нуклеотидных замен и их доля в указанном фрагменте гена приведены в (табл.2). Было обнаружено, что у горбуши, как и у других видов тихоокеанских лососей (кеты, кижуча, нерки), число замен в третьем положении кодона гена *cytb* в несколько раз превышает их количество в первом положении (Бачевская и др., 2011, 2015, 2017). Известно, что третий нуклеотид большинства кодонов в транслируемых участках гена наиболее вариабелен из-за вырожденности кода (Zardoya, Meyer, 1996). В нуклеотидном составе фрагмента гена *cytb* мтДНК горбуши зафиксировано значительное смещение в сторону пиримидинов относительно пуринов (58, 21:41, 79). Однако проведенные расчеты с применением критерия хи-квадрат показали, что наблюдаемое отклонение от ожидаемого не имеет

Таблица 1. Частота распределения гаплотипов гена *cytb* мтДНК в исследованных выборках горбуши

Локальность (река)	Анадырь	Асача	Клюквенная	Кирганик	Армань	Ола			Яна		Рассвет	Тауй
Дата	2011	2010	2010	2010	2011	2008	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Объем выборки (шт.)	15	15	25	11	50	46	52	52	52	53	42	42
Гаплотип	Частота гаплотипов											
G1	0.800	1	1	0.909	0.320	0.478	0.365	0.462	0.269	0.358	0.227	0.595
G2	0	0	0	0	0.580	0.435	0.615	0.364	0.636	0.395	0.635	0.333
G5	0	0	0	0	0	0	0	0.039		0.076	0	0
G7	0	0	0	0	0	0.087	0	0.058	0.019	0.076	0	0.024
G8	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0.019	0	0
G10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.046	0
G11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.046	0
G12	0	0	0	0	0	0	0	0.039	0	0	0	0
G13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0
G16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.046	0
G17	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0	0	0
G18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0
G22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.024
G23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.024
G24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0
G25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0
G26	0	0	0	0	0.020	0	0	0	0.019	0	0	0
G27	0	0	0	0	0.040	0	0	0	0.019	0	0	0
G28	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0	0
G29	0	0	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0	0
G30	0	0	0	0	0	0	0.020	0	0	0	0	0
G31	0.200	0	0	0.091	0	0	0	0	0	0	0	0
G32	0	0	0	0	0.020	0	0	0	0	0	0	0
G33	0	0	0	0	0.020	0	0	0	0	0	0	0

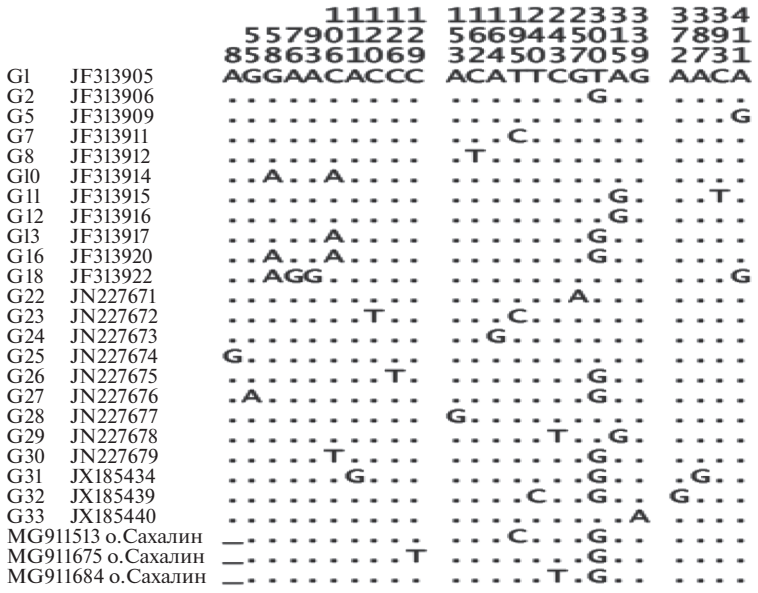

Рис. 2. Нуклеотидные последовательности гена цитохрома *b* мтДНК горбуши из рек Северо-Востока России и варианты, депонированные в GenBank. Сайты замен показаны от начала гена *cytb* мтДНК.

статистически значимых величин. Тем не менее, полученные результаты не противоречат ранее высказанной гипотезе о необходимости поддержания гидрофобности соответствующих полипептидов (Naylor *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004; Kartavtsev *et al.*, 2007).

Рассматриваемые выборки горбуши из исследованных локальностей были представлены 24 гаплотипами. Частота их распределения приведена в табл. 1. В выборках производителей из репродуктивно изолированных линий обнаружено 4 общих гаплотипа. В каждой из смежных генераций горбуши отмечено по 10 вариантов гена *cytb* мтДНК, которые наблюдались только в линии четных или нечетных лет (табл. 1). Ранее было показано, что в популяциях вида, заходящих на нерест в реки материкового побережья Охотского моря, наиболее распространены гаплотипы G1 и G2. При этом подчеркивалось, что гаплотип G1 чаще встречался в генерациях четной линии лет, а вариант G2 более распространен в поколениях линии нечетных лет (Бачевская, Переверзева, 2013). Проведенные исследования показали, что в популяциях горбуши преобладают указанные гаплотипы. Исключение составляют выборки из рек Кирганик, Большая Клюквенная и Анадырь. В них зарегистрирован только гаплотип G1, а вариант G2 не обнаружен (табл. 1). Если предположить, что это связано с небольшим количеством изученных образцов, характеризующих анадырскую и камчатские выборки, то возникает некоторое противоречие. Оно обусловлено наличием в них редкого (табл. 1) и в то же время более архаичного (рис. 3) гаплотипа G31. Возможно, что гаплотип G2 не характерен для рассматриваемых камчатских и анадырской локальностей. Подтвердить или опровергнуть сделанное предположение возможно только в результате расширения и детализации исследований генетического разнообразия горбуши из этих популяций.

В исследованных локальностях наименьшее количество гаплотипов обнаружено в выборках камчатской и анадырской горбуши, которые характеризуются всего двумя вариантами гена *cytb* мтДНК (табл. 1). По гаплотипическому составу более разнообразны выборки, характеризующие североохотоморскую горбушу из рек Ола, Яна, Армань и Тауй. В период анадромной миграции производители горбуши заходят в Тауйскую губу Охотского моря, далее они распределяются по

Таблица 2. Доля типов и позиций нуклеотидных замен в гене цитохрома *b* горбуши из исследованных выборок

Тип нуклеотидной замены	Транзиция			Трансверсия
Позиция замены в кодоне	Первая	Вторая	Третья	Первая
Суммарная доля нуклеотидных замен	0.16	0.12	0.68	0.04
Доля несинонимичных нуклеотидных замен	0.16	0.12	0	0.04

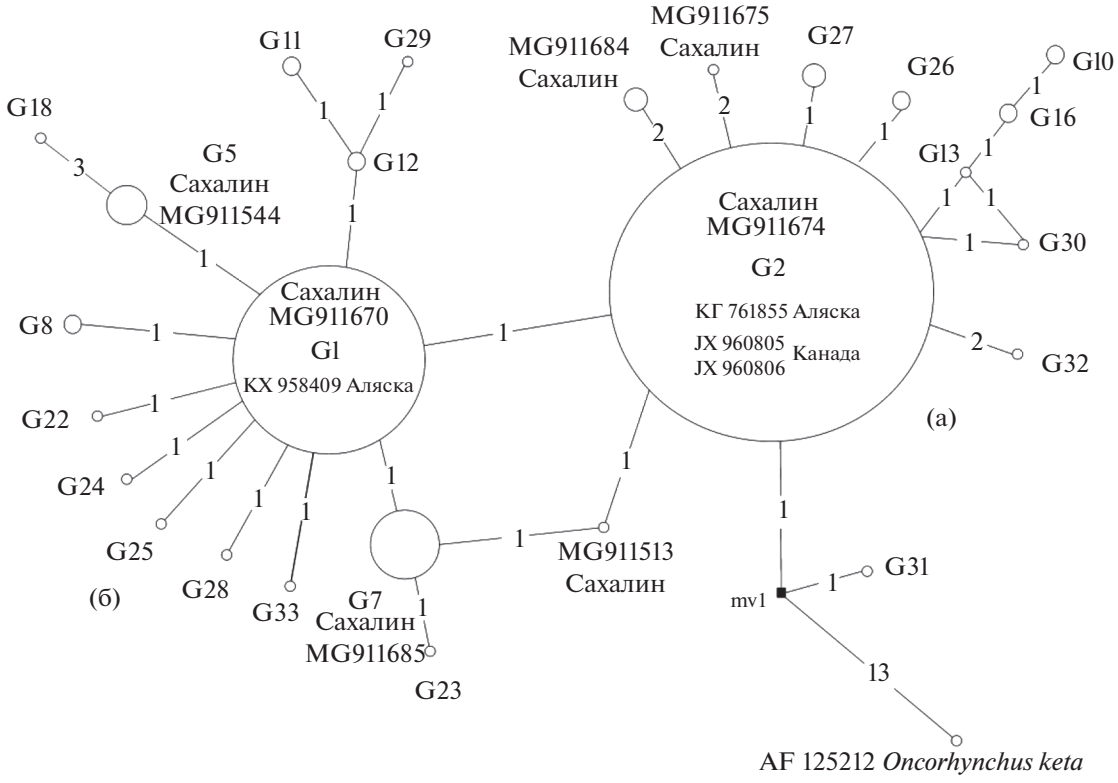

Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов гена *cytb* мтДНК горбуши. На ветвях сети цифрами обозначено число мутаций; медианный вектор (mv1) представляет собой гипотетический гаплотип; размеры кружков соответствуют числу гаплотипов. (а), (б) – гаплогруппы. Внешняя группа – кета *Oncorhynchus keta*, GenBank, AF125212.

нерестилищам указанных рек, которые могут рассматриваться как географически близко расположенные друг к другу. Несмотря на географическую близость указанных рек, в которые заходят на нерест исследованные популяции, последние имеют характерный для каждой набор гаплотипов гена *cytb* мтДНК (табл. 1). Отмечено, что по изученному маркеру, горбуша из р. Яна обладает большим количеством гаплотипов среди североохотоморских популяций. Обе янские выборки из смежных поколений представлены тринадцатью вариантами гена *cytb* мтДНК, из которых только три общие. В целом для янской горбуши отмечено шесть уникальных гаплотипов (встречаются только в выборках горбуши р. Яна).

На основании полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *cytb* в исследованных выборках горбуши рассчитаны индексы молекулярного разнообразия: нуклеотидного (π) и гаплотипического (*h*) (табл. 3). Данные по изменчивости этих параметров необходимы для анализа популяционных различий и истории становления изученных локальностей. Среди исследованных популяций шесть представлены поколением линии четных лет. При этом надо отметить, что в целом для этой линии характерен более высокий уровень генетического разнообразия (табл. 3). Такая особенность наблюдается и в популяциях из рек Британской Колумбии (Beacham *et al.*, 2012). Наиболее высокий уровень гаплотипического и нуклеотидного разнообразия характерен для янской выборки четной линии лет. Вероятнее всего, это обусловлено относительной стабильностью указанной локальности (при высокой численности) на протяжении длительного исторического периода ее существования (Avise, 1994). Проведенный тест на нейтральность (Tajima, 1989; Fu, 1997) дал достоверно высокие отрицательные значения *Fs*-параметра Фу и *D*-параметра Таджимы (табл. 3), что свидетельствует об отсутствии эффекта прохождения ею через “бутылочное горлышко”. Однако необходимо заметить, что отрицательные значения этого параметра могут быть также результатом быстрой популяционной экспансии или разной скорости мутирования отдельных сайтов (Tajima, 1989; Fu, 1997). Более низкие значения генетического разнообразия зарегистрированы у горбуши из рек Камчатки (табл. 3). Известно, что популяции с низкими значениями *h* и π являются исторически более молодыми (Avise, 1994). Наблюдаемое своеобразие генетического облика таких популяций, по-видимому, в значительной мере определяется эффектом “основателя” (Кимура, 1985; Avise, 1994). Проведенный тест на нейтраль-

Таблица 3. Показатели разнообразия гена *cytb* мтДНК в исследованных выборках горбуши

Река, год (четная и нечетная линия)	*N*	*V*	*Pi* ± sd	π ± *sd*	*h* ± *sd*	Fu *Fs*, (*P*)	Tajima's *D*, (*P*)
Большая Клюквенная, 2010	25	0	0± 0	0 ± 0	0 ± 0	0, (*P* = 1)	0, (*P* = 1)
Кирганик, 2010	11	2	0.3636 ± 0.3777	0.0009 ± 0.0010	0.1818 ± 0.1436	0.506, (*P* = 0.404)	−1.423*, (*P* = 0.027)
Асача, 2010	5	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0, (*P* = 1)	0, (*P* = 1)
Ола, 2008	46	2	0.6647 ± 0.5207	0.0004 ± 0.0014	0.5874 ± 0.0346	0.953, (*P* = 0.698)	0.839, (*P* = 0.843)
Ола, 2010	52	6	0.8469 ± 0.6107	0.0019 ± 0.0015	0.6592 ± 0.0424	−2.523, (*P* = 0.062)	−0.915, (*P* = 0.213)
Яна, 2010	53	10	1.0755 ± 0.7207	0.0024 ± 0.0018	0.7146 ± 0.0404	−3.677*, (*P* = 0.020)	−1.449*, (*P* = 0.048)
Армань, 2010	50	6	0.7163 ± 0.5350	0.0017 ± 0.0014	0.5798 ± 0.0522	−2.158, (*P* = 0.088)	−1.210, (*P* = 0.111)
Тауй, 2010	42	4	0.6434 ± 0.5106	0.0014 ± 0.0013	0.5459 ± 0.0553	−1.465, (*P* = 0.175)	−0.7265, (*P* = 0.25)
Армань, 2011	50	6	0.6963 ± 0.5360	0.0016 ± 0.0014	0.5698 ± 0.0528	−1.958, (*P* = 0.078)	−1.223, (*P* = 0.111)
Анадырь, 2011	5	2	0.8000 ± 0.6812	0.0019 ± 0.0019	0.4000 ± 0.2373	1.040, (*P* = 0.607)	−0.973, (*P* = 0.186)
Ола, 2009	52	2	0.5113 ± 0.4393	0.0011 ± 0.0011	0.4970 ± 0.0404	0.447, (*P* = 0.571)	0.274, (0.683)
Яна, 2009	52	7	0.6795 ± 0.5271	0.0015 ± 0.0013	0.5333 ± 0.0614	−3.359, (*P* = 0.025) *	−1.474*, (*P* = 0.037)
Ручей Рассвет, 2009	42	4	0.7515 ± 0.5656	0.0018 ± 0.0017	0.5626 ± 0.1034	−1.048, (*P* = 0.251)	−0.889, (*P* = 0.194)

Примечание: *N* количество особей в выборке; *V* – число вариабельных сайтов в исследуемом участке *cytb* мтДНК; *Pi* – среднее число попарных различий между гаплотипами; π – нуклеотидное разнообразие; *h* – гаплотипическое разнообразие; *sd* – стандартное отклонение, *D* – коэффициент теста Tajima, *Fs* – коэффициент теста Fu, *P* – статистическая значимость различий, $*P < 0.05$.

ность для выборки из р. Кирганик (Tajima, 1989; Fu, 1997) показал отрицательное значение *D*-параметра Таджимы (табл. 3). Однако следует отметить, что статистическая сила этого теста может ограничиваться за счет вкладов отбора и демографических событий (Fu, Li,1993; Simonsen *et al.*, 1995). Тест Фу показал положительное значение *Fs*-параметра, что указывает на положительное действие отбора или его отсутствие (Tajima, 1989; Fu, 1997). Именно в этой популяции обнаружен редкий архаичный гаплотип G31. В выборках горбуши из двух других камчатских рек этот вариант гена *cytb* мтДНК не обнаружен. Возможно, он был утрачен в процессе резкого снижения численности этих популяций. Косвенным подтверждением высказанного предположения является положительное значение *D*-параметра Таджимы и *Fs*-параметра Фу (табл. 3), указывающего на эффект "горлышка бутылки".

Горбуша пяти рек представлена поколением линии нечетных лет (табл. 3). Наиболее высокие значения показателей нуклеотидного разнообразия зарегистрированы в выборках из р. Анадырь и ручья Рассвет (о. Завьялова). При этом анадырская горбуша имеет самое низкое значение гаплотипического разнообразия (табл. 3). Возможно, этот факт обусловлен некоторыми природными процессами, происходившими в недавнем геологическом прошлом Северотихоокеанского региона. Регрессия океана и неоднократно возникавшие на ее фоне покровные и горнодолинные оледенения (Линдберг, 1972) могли привести к сокращению и разрыву ареала горбуши. В то же время известно, что Анадырский залив существовал без особых изменений с середины плейстоцена (Hopkins,

1972; Черешнев, 1996) и мог служить рефугиумом для тихоокеанских лососей, размножавшихся в речных системах северной части Анадырского залива. В позднем плейстоцене указанный участок побережья Чукотки не подвергался воздействию оледенения и трансгрессий моря. Это гарантировало успех размножения производителей тихоокеанских лососей и выживания их молоди (Черешнев, 1998). Можно предположить, что сохранившиеся в рефугиумах популяции горбуши в дальнейшем стали источником для реколонизации вида в реки Камчатки. В результате произошло распространение в водоемах региона носителей гаплотипа G31, который не обнаружен в североохотоморских популяциях горбуши.

Ольская горбуша представлена выборками из последующих генераций (родители–дети) и из смежных поколений. Они статистически достоверно отличаются между собой (Бачевская, Переверзева, 2013). Ранее было отмечено, что причиной различий между дочерними и родительскими поколениями может быть приток мигрантов, а различия между смежными поколениями, в основном, зависят от соотношения частот наиболее распространенных гаплотипов (Бачевская, Переверзева, 2013). При этом ольская горбуша (2008 и 2009 гг.) имеет положительное значение показателя *D* Таджимы и *Fs*-параметра Фу (табл. 3), что указывает на критическое снижение ее численности в недавнем прошлом. Действительно горбуша р. Ола неоднократно испытывала демографические катаклизмы и была подвержена смене доминирующего по численности поколения. Известно, что численность смежных линий ольской горбуши различалась в десятки раз (Марченко и др., 2004).

Согласно опубликованным данным, на северном побережье Охотского моря выделяют несколько рыбопромысловых районов горбуши. Ольскую и тауйскую группы рек, в которые заходит на нерест горбуша, ранее считали единым промысловым районом. Производители вида из этих групп рек различаются биологическими показателями, величиной подходов и динамикой численности (Марченко, Голованов, 2001). На этом основании ольский и тауйский промысловые районы были выделены как самостоятельные. В процессе генетических исследований использована программа AMOVA (Analysis of Molecular Variance) (Excoffier *et al.*, 2005). Проведен анализ генетической изменчивости с учетом выделенных промысловых районов. Это позволило включить в одну группу все ольские выборки, в другую объединили исследованную горбушу из рек Тауй, Яна, Армань. Доли внутрипопуляционной, межпопуляционной и межгрупповой изменчивости составили 95.95, 5.92 и –1.88% соответственно. Из этого следует, что более высокий уровень дифференциации наблюдается между выборками внутри групп, а не между сопоставляемыми группами горбуши из двух промысловых районов. По-видимому, это является причиной отрицательного значения показателя межгрупповой генетической изменчивости. В то же время нельзя исключать другую возможную причину, связанную со статистическим отклонением, приводящим к отрицательному результату (Weir, 1996).

Определена величина внутрипопуляционной, межпопуляционной и межгрупповой доли изменчивости с учетом географической привязки всех исследованных популяций и соответствия выборок из них четному или нечетному поколению. Важно подчеркнуть, что доля внутрипопуляционной генетической изменчивости во всех случаях была выше межгрупповой и межпопуляционной. Однако нельзя не отметить, что при выделении групп с учетом приуроченности популяций к конкретному региону доля межгрупповой изменчивости была относительно высокой и составила 25.3%. При объединении популяций в группы по географическому признаку и, в то же время, с учетом четности-нечетности поколений было рассмотрено два варианта. Первый позволил объединить в одну группу североохотоморские популяции четной линии лет, а в другую были включены все камчатские популяции. Анадырская горбуша в этом случае не учитывалась, так как представлена выборкой из смежного поколения. При таком варианте группировки исследованных популяций доли внутрипопуляционной, межпопуляционной и межгрупповой изменчивости составили 65.72, –0.86 и 35.14% соответственно. Второй вариант позволил включить североохотоморскую горбушу нечетного поколения в первую группу, а анадырскую выборку во вторую. При этом доли внутрипопуляционной, межпопуляционной и межгрупповой изменчивости составили 77.39, 3.78 и 18.83%. Полученные результаты свидетельствует о более высоком уровне дивергенции популяций горбуши из разных регионов в четной линии лет по сравнению со смежным поколением. Возможно, это определяется возрастом и историей формирования репродуктивно изолированных линий горбуши. В то же время некоторые из исследованных популяций, относящиеся к единому региону, по генетическим параметрам значимо отличаются между собой (табл. 4). При этом нельзя не отметить, что в большинстве случаев это обусловлено их приуроченностью к одному из генеративных поколений. Относительно умеренная доля межгрупповой генетической дисперсии свидетельствует о том, что дивергенция смежных поколений горбуши произошла в относительно недавнем историческом прошлом. После разделения на четное и нечетное поколения их эволюция протекала независимо друг от друга, что позволило накопить характерные для каждой генеративной линии мутации гена *cytb* мтДНК.

Таблица 4. Генетические различия между парами выборок горбуши из рек Северо-Востока России

№	Река, год	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	Ола, 2008	0	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	Ола, 2010	–	0	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	Яна, 2010	–	–	0	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	Армань, 2010	–	–	+	0	+	+	–	+	+	+	+	+	+
5.	Тауй, 2010	–	+	–	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
6.	Кирганик, 2010	+	+	+	+	+	0	–	–	+	+	+	–	+
7.	Асача, 2010	+	+	+	–	+	–	0	–	–	–	–	–	–
8.	Большая Клюквенная, 2010	+	+	+	+	+	–	–	0	+	+	+	–	+
9.	Ола, 2009	+	+	+	–	+	+	–	+	0	–	–	–	–
10.	Армань, 2011	+	+	+	+	+	+	+	+	–	0	–	–	–
11.	Яна, 2009	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	0	–	–
12.	Анадырь, 2011	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	0	–
13.	Рассвет, 2009	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–	0

Примечание. Выше диагонали обозначены символом “+” достоверные различия ($P < 0.05$) по частотам гаплотипов, ниже диагонали – по нуклеотидным заменам.

На основании полученных и имеющихся в GenBank (JX960805, JX960806, KX958409, KU761855, MG911513, MG911675, MG911684, MG911694) нуклеотидных последовательностей гена *cytb* мтДНК горбуши (Crete-Lafreniere *et al.*, 2012; Rodgers, Mock, 2017; Podlesnykh *et al.*, 2018) построена медианная сеть (Bandelt *et al.*, 1999). В качестве внешней группы использован образец нуклеотидной последовательности кеты (GenBank, AF125212) (Lee *et al.*, 2016). Анализ медианной сети (рис. 3) показал, что гипотетический вариант mv1 дает начало гаплотипам G2 и G31, которые можно считать более архаичным по сравнению с другими (рис. 3). При этом следует отметить, что последний относится к редким митотипам. Он обнаружен только в выборках из рек Анадырь и Кирганик. Гаплотип G2 (в отличие от последнего) часто встречается в исследованных нами локальностях, а также в популяциях вида, заходящих для нереста в реки Сахалина, Аляски и Канады. Варианты гена *cytb* мтДНК горбуши, входящие в гаплогруппу А (рис. 3), произошли путем единичных замен от гаплотипа G2. Они не относятся к числу массовых, в отличие от гаплотипа G1, имеющего высокую частоту распределения в исследованных выборках (табл. 1). Гаплогруппа Б (рис. 3) представлена митотипами, которые являются производными от G1. Носители этих гаплотипов совершают анадромные миграции в реки материкового побережья Охотского моря, Камчатки, Сахалина и Аляски. Каждый из более распространенных гаплотипов (G1, G2) образует в медианной сети картину “звездчатой” радиации (рис. 3). Митотип G1 является производным от варианта G2, что свидетельствует об общности их происхождения, в то же время показывает, что последний более архаичный, так как расположен в медианной сети ближе к гипотетическому предку (mv1), от которого произошли (путем единичных замен) гаплотипы G2 и G31(рис. 3).

При исследовании первичной структуры белка Cytb горбуши были обнаружены замены в аминокислотной последовательности, произошедшие в процессе эволюции. Зафиксировано девять модификаций полипептида (рис. 4). Большая часть вариантов белка Cytb (FG2, FG5, FG6, FG8, FG9) отмечена в линии четного поколения горбуши. В смежной генерации горбуши обнаружено всего три (FG3, FG4, FG7) модификации исследованного полипептида. Варианты FG2, FG3, FG4, FG5, FG6, FG7– уникальны, т.е. зафиксированы только в одной из исследованных популяций, что является характерной особенностью для каждой из них. Для определения консервативности и радикальности аминокислотных замен был использованы методы Снита, Бачинского и Грэнтсема (Grantham, 1974; Бутвиловский и др., 2009). С помощью этих методов было определено, что в большинстве случаев обнаруженные аминокислотные замены

Рис. 4. Аминокислотные замены в модификациях (FG1– FG9) фермента цитохрома *b* у горбуши из рек Северо-Востока России. Цифры – сайты замен от начала полной аминокислотной последовательности полипептида Cytb F1.

являются консервативными. В то же время вариант белка Cytb FG8, кодируемый гаплотипом G22, содержит радикальную аминокислотную замена Y55C. В этом полипептиде произошла замена тирозина (ароматический радикал с гидроксильной группой) на цистеин (алифатический радикал с тиольной группой). Тиольная группа цистеина влияет на четвертичную структуру белка, а также изменяет его окислительно-восстановительные свойства. В другом варианте белка Cytb FG9, кодируемого гаплотипом G24, также обнаружена радикальная аминокислотная замена G86E, изменившая заряд белка. Поскольку в полипептиде Cytb были обнаружены замены подобного характера, то появилась необходимость оценить статистическую значимость отмеченных изменений физико-химических свойств аминокислот. Для определения степени радикальности или консервативности каждой из обнаруженных аминокислотных замен, был использован z-тест модели MM01 в программе TreeSAAP 3.2 (Woolley *et al.*, 2003). Данная программа, опираясь на предположение о случайном характере аминокислотных замен в условиях селективной нейтральности, дает возможность сопоставлять наблюдаемое и ожидаемое распределения изменений физико-химических свойств аминокислот. Согласно модели MM01, в программе TreeSAAP консервативные аминокислотные замены характеризуются mc = 1, 2 и 3, $z > 3.09$, $p < 0001$ (где z – значимость аминокислотных замен по Фишеру, mc – категория значимости) (McClellan, McCracken, 2001; Woolley *et al.*, 2003). Если положительный отбор проявляется в более радикальных категориях значимости (mc = 6, 7 и 8, $z > 3.09$, $p < 0.001$), то предполагали, что свойства аминокислот изменялись под влиянием направленного отбора (McClellan, McCracken, 2001; Woolley *et al.*, 2003). Результаты TreeSAAP-анализа показали, что изменения физико-химических свойств (в отмеченных нами позициях аминокислотных замен) оказались не столь значительными ($z < 3.09$, при $p = 0.001$, mc = 3). Они свидетельствуют о влиянии положительного направления стабилизирующего отбора, обеспечивающего стабильность структуры белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе изучения генетической изменчивости горбуши отмечено, что уровень полиморфизма гена цитохрома *b* мтДНК в исследованных популяциях не одинаков. Для группы популяций, заходящих на нерест в реки североохотоморского побережья, он более высокий. Обнаруженный гаплотипический состав популяций показал, что для каждой характерен набор уникальных (встретившихся только в одной из них) митотипов гена *cytb* мтДНК горбуши. Анализ генетического разнообразия свидетельствует о том, что горбуша линии четных лет характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости по сравнению с выборками из смежного поколения. Кроме того, полученные результаты указывают на более высокий уровень дивергенции популяций горбуши из разных регионов в поколении четной линии лет. Возможно, это определяется возрастом и историей формирования репродуктивно изолированных линий горбуши. Следует однако признать, что в данной работе проведен анализ случайных выборок, которые неодинаково представляют обе изолированные генерации вида. Возможно, дальнейшее накопление данных внесет свои дополнения в представление об уровне и возрасте их дивергенции в условиях полной изоляции.

При исследовании первичной структуры белка Cytb горбуши обнаружены замены в аминокислотной последовательности, произошедшие в процессе эволюции. Для выяснения вопроса о том, были обнаруженные замены адаптивными или нет, проводили анализ изменений физико-химических свойств аминокислот в процессе кладогенеза. Полученные результаты показали отсутствие сигналов молекулярной адаптации и свидетельствуют о влиянии положительного вектора стабилизирующего отбора, направленного на сохранение структуры исследованного полипептида.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ДВО РАН (грант 15-I-6-015o) и РФФИ (грант 15-04-01418).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Ефанов В.И. Генетическая дифференциация и популяционная структура горбуши Сахалино-Курильского региона // Биология моря. 1983. № 2. С. 46–51.

Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1989. 328 с.

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.

Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.

Бачевская Л.Т., Переверзева В.В., Малинина Т.В. Генетическая структура популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) по данным об изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК // Генетика. 2011. Т. 47. № 11. С. 1481–1490.

Бачевская Л.Т., Переверзева В.В. Изменчивость гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) из рек материкового побережья Охотского моря и острова Завьялова // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 1. С. 15–23.

Бачевская Л.Т., Переверзева В.В., Иванова Г.Д, Пилганчук О.А., Агапова Г.А., Шпигальская Н.Ю. Генетическое разнообразие нерки (*Oncorhynchus nerka*) из некоторых рек Восточной Камчатки и материкового побережья Охотского моря по данным полиморфизма гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК // Исследования биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2015. Вып. 38. С. 49–56.

Бачевская Л.Т., Иванова Г.Д, Переверзева В.В., Агапова Г.А. Генетическая структура кижуча Oncorhynchus kisutch из рек Северо-Востока России по данным о полиморфизме гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК // Изв. РАН. Серия биол. 2017. № 6. С. 13–19.

Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Алтухов Ю.П., Кухлевский А.Д., Пудовкин А.А., Гаррет А. Популяционно-генетическая структура горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК: динамика изменчивости в поколениях // Генетика. 1999. Т. 35. № 5. С. 657–665.

Бутвиловский А.В., Барковский Е.В., Бутвиловский В.Э., Давыдов В.В. Основные методы молекулярной эволюции. Мн.: Белпринт, 2009. 216 с.

Глубоковский М.К., Животовский Л.А. Популяционная структура горбуши: система флуктуирующих стад // Биология моря. 1986. № 2. С. 39–44.

Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука, 1995. 343 с.

Гордеева Н.В., Салменкова Е.А., Алтухов Ю.П. Исследование генетической дивергенции горбуши, вселенной на Европейский Север России, с использованием микросателлитных и аллозимных локусов // Генетика. 2006. Т. 42. № 3. С. 349–360.

Гордеева Н.В. Высокие оценки дифференциации популяций горбуши по локусу главного комплекса гистосовместимости MHC I-A1 поддерживают гипотезу “локальных стад” // Вопр. Ихтиол. 2012. Т. 52. № 1. С. 72–81.

Гордеева Н.В. Оценки дифференциации популяций по микросателлитным маркерам у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* могут быть занижены вследствие ее высокой численности // Вопр. Ихтиол. 2014. Т. 54. № 3. С. 332–343.

Гордеева Н.В., Салменкова Е.А. Генетические маркеры адаптивных процессов у дальневосточной горбуши *Oncorhynchus gorbuscha*: аллельное разнообразие в локусе главного комплекса гистосовместимости MHC I-*A1* // Генетика. 2017. Т. 53(11). С. 1311–1319.

Гордеева Н.В. Микрогеографическая и временная изменчивость в локусе MHC I-*A1* у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Южного Сахалина // Вопр. Ихтиол. 2018. Т. 58. № 3. С. 358–364.

Животовский Л.А. Методологии исследования популяционной организации вида по генетическим маркерам (на примере горбуши *Oncorhynchus gorbuscha*) // Вопр. Ихтиол. 2013. Т. 53. № 3. С. 371–376.

Калабушкин Б.А., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная структура и генные миграции горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Сахалино-Курильского региона // Генетика. 1998. Т. 34. № 12. С. 1675–1685.

Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир, 1985. 398 с.

Линдберг Г.У. Крупные колебания уровня океана в четвертичный период. Л.: Наука, 1972. 548 с.

Марченко С.Л., Голованов И.С. 2001. Локальные стада горбуши северного побережья Охотского моря // Сб. науч. тр. Магаданского НИИ рыбн. хоз-ва. и океанографии. Магадан: Магадан НИРО, 2001. Вып. 1. С. 144–151.

Марченко С.Л., Голованов И.С., Хованский И.Е. Эффективность воспроизводства горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) р. Ола (северное побережье Охотского моря) // Сб. науч. тр. Магаданского НИИ рыбн. хоз-ва. и океанографии. Магадан: Магадан НИРО, 2004. Вып. 2. С. 227–236.

Омельченко В.Т., Вялова Г.П. Популяционная структура горбуши // Биология моря. 1990. № 1. С. 3–13.

Полякова Н.Е., Малинина Т.В., Галеев А.В. Изменчивость митохондриальной ДНК у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // Генетика. 1992. Т. 28. № 12. С. 122–129.

Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д. Популяционно-генетическая структура горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК. Сравнение неперекрывающихся поколений четных и нечетных лет // Генетика. 1996. Т. 32. № 9. С. 1256–1262.

Пустовойт С.П. Основные итоги генетического мониторинга североохотоморских популяций горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 3. С. 475–484.

Салменкова Е.А., Гордеева Н.В., Омельченко В.Т. и др. Генетическая дифференциация горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum в азиатской части ареала // Генетика. 2006. Т. 43. № 10. С. 1371–1387.

Черешнев И.А. Биологическое разнообразие пресноводной ихтиофауны Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 1996. 198 с.

Черешнев И.А. Биогеография пресноводных рыб Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 1998. 130 с.

Шпигальская Н.Ю., Брыков В.А., Кухлевский А.Д. Полиморфизм мтДНК горбуши Камчатки и острова Сахалин // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыбн. Хоз-ва. и океанографии. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2009. Вып. 13. С. 74–87.

Aspinwall N. Genetic analysis of North American population of the pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, possible evidence for the neutral mutation-random drift hypothesis // Evolution. 1974. V. 28. P. 295–305.

Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. N.Y.: Chapman Hall, 1994. 511 p.

Bandelt H.-J., Forster P., Rőhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evolution. 1999. V. 16. P. 37–48.

Beacham T.D., Withler R.E., Gould A.P. Biochemical stock identification of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha)* in Southern British Columbia and Puget Sound // Can. J. Fish. Aqat. Sci. 1985. V. 42. P. 1474–1483.

Beacham T.D., McIntosh B., MacConnachie C., Brian S., Bruce A. White. Population structure of pink salmon (Oncorhynchus gorbuscha) in British Columbia and Washington, determined with microsatellites // Fish. Bull. 2012. V. 110. P. 242–256.

Churikov D., Gharrett A.J. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 1077–1101.

Crete-Lafreniere A., Weir L.K., Bernatchez L. JX960805, JX96086 // GenBank. 2012.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinform. Online. 2005. V. 1. P. 47–50.

Fleming M.A., Cook J.A. Phylogeography of endemic ermine (Mustela erminea) in southeast Alaska // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 795–807.

Fu Y., Li W. Statistic test of neutrality of mutations. Genetics. 1993. V. 133. P. 693–709.

Fu Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 1997. V. 147. P. 915–925.

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution // Science. 1974. V. 185. № 4154. P. 862–864.

Hawkins S.L., Varnavskaya N.V., Matzak V.V. Efremov C.M., Guthrie III R.L., Wilmot H., Mayama F., Yamazaki A.J., Gharrett A.J. Population structure of odd-brood line Asian pink salmon and its contrast to the even- brood line structure // J. Fish. Biol. 2002. V. 60. P. 370–388.

Hopkins D.M. The paleogeography and climatic history of Beringia during late Cenozoic time // Internord. 1972. V. 12. P. 121–150.

Kartavtsev Y.P., Park T.J., Vinnikov K.A., Ivankov V.N., Sharina S.N., Lee J.S. Cytochrome *b* (*Cyt-b*) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights // Marine Biology. 2007. V. 152. P. 757–773.

Kim H.S., Choi E.S., Shin J.A., Jang Y.K., Park S.D. Regulation of Swi6/HPl-dependent heterochromatin assembly by cooperation of components of the mitogen-activated protein kinase pathway and a histone deacetylase Clr6. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 850–859.

Lee H.J., Kim W.J., Lee J.H., Min K.S., Yoo M.A., Lee W.H. Park J.Y. AF125212 // GenBank. 2016.

McClellan D.A., McCracken K.G. Estimating the influence of selection on the variable amino acid sites of the cytochrome B protein functional domains // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. P. 917–925.

Naylor G.J., Collins T.M., Brown W.M. Hydrophobicity and phylogeny // Nature. 1996. V. 373. P. 565–566.

Nei M. Molecular evolutionary genetics // N.Y.: Columb. Univ. Press, 1987. 512 p.

Podlesnykh A.V., Kukhlevskiy A.D., Brykov V.A. MG911513, MG 911544, MG911675, MG911684, MG911685 // GenBank. 2018.

Rodgers T.W., Mock K.E. KX958409, KU761855 // GenBank. 2017.

Russell V.J., Hold G.L., Pryde S.E. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species // J. Agric. Food Chem. 2000. № 48. P. 2184–2188.

Simonsen K.L., Churchil G.A., C.F. Aquadro Properties of test of neutrality for DNA polymorphism data. // Genetics. 1995. V.141. P. 413–429.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Gen. Soc. Am. 1989. P. 585–595.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipsri A., Kumar S. MEGA-6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.2.74 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.

Weir B.S. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data // Sunderland. Massachusetts: Sinauer Ass, 1996. 445 p.

Woolley S., Johnson M.J., Smith M.J. TreeSAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 671–672.

Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. P. 933–942.

Enetic Diversity of Pink Salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) from Some Rivers of the Northeastern Part of Russia

L. T. Bachevskaya[1, #], V. V. Pereverzeva[1], A. A. Primak[1], and G. A. Agapova[1]

[1] *Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

[#] *e-mail: gekki54@mail.ru*

The data on the variability of the nucleotide sequence of cytochrome *b* mtDNA of pink salmon from adjacent generations was obtained. There was a higher level of divergence between even-line year samples from rivers in different regions than in the adjacent generation. At the same time, some geographically close populations have significantly different statistic genetic parameters. The calculated share of intergroup genetic dispersion indicates that the divergence of adjacent generations of pink salmon occurred in a relatively recent historical past. An analysis of the genetic variability of pink salmon, carried out taking into account the isolated fishing areas, showed that the level of differentiation of the North Okhotsk Sea populations belonging to different fishing areas is lower than that observed between the localities within each of them. In the primary structure of the Cytb protein, pink salmon has amino acid substitutions indicating the effect of a positive stabilizing selection vector.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 373–388

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 632.4+630.228.7:630.2321.32

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБИОМОВ ДВУХ ТИПОВ ПОЧВ ПОД ГЕОГРАФИЧЕСКИМИ КУЛЬТУРАМИ КЕДРОВЫХ СОСЕН *Pinus sibirica* Du Tour И *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.

© 2021 г. И. Д. Гродницкая*, @, Г. В. Кузнецова*, О. Э. Пашкеева*, Г. И. Антонов*

**Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 Россия*

@E-mail: igrod@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 15.07.2019 г.
После доработки 14.06.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Проведено сравнение влияния географических культур кедровых сосен *Pinus sibirica* Du Tour, *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc., созданных в Красноярском и Хабаровском краях, на химические и биологические показатели серой лесной и бурой лесной почв в ризосфере и между рядами посадок. Показано, что межвидовая гетерогенность кедровых сосен оказывала влияние на химический состав почвы, ферментативную и микробиологическую активность, формирование прокариотных микробиомов. Отмечено, что биоразнообразие прокариот в большей степени определили типовые особенности почвы, чем меж- и внутривидовая гетерогенность кедровых сосен и влияние их корней. Установлено, что доминируют бактерии фил *Proteobacteria, Acidobacteria* и *Actinobacteria*, совместно составляющие 75–85% общего числа типоспецифичных последовательностей генов 16S рРНК в каждой почве.

DOI: 10.31857/S1026347021030061

Специфика изменений растений и их приспособление к новым условиям существования зависят от сочетания природно-климатических факторов. Для изучения географической изменчивости наследственных свойств видов древесных растений и факторов, влияющих на их устойчивость и выживаемость в различных почвенно-климатических условиях, создают географические культуры – уникальные экспериментальные объекты для разносторонних исследований (Ирошников, 1977; Кузнецова, 2010). Главную роль в адаптационных процессах растений играют эдафические (механический и химический состав почвы, ее водный и температурный режим) и биологические (биохимические процессы, структура и активность микробных сообществ) факторы. Химические показатели почвы – довольно "консервативная" составляющая, в то время как биологические (микробиологические) меняются достаточно быстро – микробиота активно участвует в круговороте органического вещества и питательных элементов. Микробные сообщества являются уникальным источником генетического и фенотипического разнообразия, важным фактором биологической устойчивости почв, интенсивности и направленности биохимических процессов, а также инструментом почвенной биодиагностики (Чернов и др., 2015).

Основной источник углерода и энергии для большей части почвенных микроорганизмов – растительный материал, поступающий с наземным и корневым опадом и корневыми выделениями. Количество и качество растительного материала зависят от меж- и внутривидовой гетерогенности, продукционных, физиологических и биохимических особенностей основных видов фитоценоза, а также от их изменения под воздействием внешних факторов (патогенов, рекреационной нагрузки и т.п.) (Hobbie *et al.*, 2010; Hansson *et al.*, 2011). Разграничить влияние почвы на растения и наоборот влияние растений на почву довольно сложно. В этой связи актуально изучение влияния химических и микробиологических процессов, происходящих в почве, на древесные виды растений и влияния этих растений на биодинамику почв.

В географических культурах кедровых сосен, созданных в удаленных географических точках, предоставляется возможность изучения влияния меж- и внутривидовой генотипической изменчивости деревьев на химические и микробиологические свойства почвы в системе почва–растение, описания структуры почвенных микробиомов с использованием молекулярно-генетических методов анализа метагеномной ДНК (Kakirde *et al.*, 2010; Гродницкая и др., 2016; Першина и др., 2016; Наумова и др., 2018).

Цель исследования – сравнение влияния географических культур кедра корейского и сибирского на химические, биохимические, респираторные показатели, а также на структуру и состав прокариотных микробиомов серой лесной и бурой лесной почв в зоне ризосферы и между рядами посадок кедровых сосен в двух местах тестирования – Красноярском и Хабаровском регионах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Обследовали почву под посадками географических культур кедровых сосен *Pinus sibirica* Du Tour и *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc. в двух местах тестирования: на юге Красноярского края и в Хабаровском крае. Перед закладкой географических культур в обоих районах землю распахивали, т.е. почва на исследуемых участках антропогенно-трансформированная. В Красноярском крае географические культуры *P. sibirica* и *P. koraiensis* расположены в Ермаковском лесничестве, в предгорье смешанных лесов Алтае-Саянской провинции, на высоте 500 м над уровнем моря (у.м.) (53°10′ с.ш. и 95°20′ в.д.). Культуры были созданы в 1983 г. и представлены ермаковским (Е) климатипом кедра сибирского (Красноярский край), а также облученским (О) (Еврейская автономная область (ЕАО)) и чугуевским (Ч) (Приморский край) климатипами кедра корейского (Кузнецова, 2010). Тип леса осочково-вейниковый, почва перед закладкой опыта была определена как серая лесная неоподзоленная, легкосуглинистая, мощная (Классификация..., 1977), а в настоящее время – как агросерая гетерогенная (Parg-AEL-BEL-BT-C) (Классификация..., 2004), по международной классификации Phaeozems (Anthric) (WRBSR, 2015); далее по тексту – серая лесная почва.

В Хабаровском крае географические культуры были заложены в 1977 г. (Штейникова, Ковалева, 1982) в Парковом лесничестве Хехцирского лесхоза (далее по тексту – Хехцирское лесничество) на равнинных участках и холмисто-увалистых предгорьях (высота от 100 до 300 м над у.м.) (48°16′ с.ш. и 135°02′ в.д.). Культуры представлены также ермаковским (Е) климатипом кедра сибирского (Красноярский край) и двумя климатипами кедра корейского: облученским (О) и чугуевским (Ч). Хехцирское лесничество по своим лесорастительным условиям входит в зону хвойно-широколиственных лесов. Участок лесных культур до закультивирования представлял собой вырубку 1930–1935 гг. и расположен на юго-восточном склоне крутизной 2–3°. Тип леса до рубки – разнокустарниковый кедровник с липой и дубом. Перед закладкой опыта почва была определена как бурая лесная оподзоленная (Классификация..., 1977), в настоящее время – агробурозем гетерогенный (Parg-BM-C) (Классификация..., 2004), материнская порода – сланцы, по WRB – Cambisols (Anthric) (WRBSR, 2015); далее по тексту – бурая лесная почва. Хвойные породы занимают в лесхозе 36% покрытой лесами площади, из них 10% приходится на кедр корейский; средний бонитет кедра III, 6.

В Красноярском крае потомство каждого климатипа занимает по одной делянке на трех соседствующих участках. В Хабаровском крае опыт в настоящее время проводят в одной повторности.

Методы исследования. Почву для агрохимического, микробиологического и ферментативного анализов отбирали из органогенного слоя 0–15...0–20 см (сразу под подстилкой) между рядами посадок (далее междурядья), на расстоянии 60 см от ряда, в пределах подкроновой зоны и в зоне ризосферы кедровых сосен (Weber, Bardgett, 2011). Один смешанный образец почвы составляли из 5–6 монолитов, отобранных случайным образом по делянке климатипа. Ризосферную почву отбирали непосредственно снятием с корней и в прикорневой зоне растений (Zao *et al.*, 2010). Температуру почвенных слоев измеряли непосредственно в момент отбора образцов на опытных участках портативным цифровым термометром HANNA ChekTemp1 с выносным датчиком. После доставки образцов в лабораторию в них были измерены значения pH портативным потенциометром Аквилон–410, для чего 1 г почвы заливали 10 мл дистиллированной воды и настаивали в течение 1 ч.

В образцах почвы определяли содержание $C_{орг}$ по методике И.В. Тюрина в модификации В.М. Никитина колориметрическим методом (Методы..., 2003). Содержание гумуса высчитывали из содержания $C_{орг}$. Общий азот в почве определяли сжиганием в смеси серной и хлорной кислот с последующей отгонкой. Фракционный состав азота определяли титриметрическим методом с помощью ступенчатого щелочного гидролиза способом Корнфильда: в чашках Конвея из почвы последовательно извлекали трудногидролизуемые соединения азота с помощью 6H NaOH, а затем с помощью 1H NaOH – легкогидролизуемые соединения (Методы..., 2003).

Качественный состав почвенных бактерий. Идентификацию прокарит определяли молекулярно-генетическими методами (NGS – метагеномный сиквенс). Геномную ДНК выделяли из 250 мг почвы с помощью набора FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США). Полученную общую ДНК амплифицировали с использованием универсальных бактериальных праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Секвенирование ампликонов и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей выполняли в ЦКП "Геномика" СО РАН (г. Новосибирск) с по-

мощью секвенатора MiSeq Illumina (Ilumina Inc., San Diego, California, США).

Полученные ПЦР-продукты очищали от ПЦР-смеси, определяли их концентрацию и визуализировали в агарозном геле. Для приготовления библиотеки ДНК использовали 300 нг каждого образца.

Детализация родового/видового состава основных представителей микробных сообществ почв была проведена на основе секвенирования генов 16S рРНК, выявление доминантных и минорных видов бактерий – качественной оценкой их соотношений. Полученные в результате секвенирования сходные нуклеотидные последовательности (сиквенсы) гена 16S рРНК объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ), которые затем относили к филогенетическим таксонам различного уровня (типы, классы, роды). Уровень сходства нуклеотидных последовательностей варьировал от 97 до 99%

Индексы видового богатства. Для оценки разнообразия прокариот применяли различные индексы – показатели, которые рассчитывали на основании числа таксонов в сообществе и числа особей (сиквенсов) в разных таксонах. Индекс видового разнообразия Бергера–Паркера (d) определяли по формуле (Количественные ..., 2005)

$$d = N/N_{max},$$

где N – общее число особей, N_{max} – число особей доминирующего вида.

Индекс разнообразия Шеннона (H_N) определяли по формуле (Количественные ..., 2005; Алексанов, 2017)

$$H_N = -\sum (n_i/N)\log_2(n_i/N),$$

где N – общее число особей, n_i – доля особей i-го вида.

Индекс разнообразия Симпсона (D) определяли по формуле (Количественные..., 2005)

$$D = 1 - \sum (n_i/N)^2,$$

где n_i – оценка значимости каждого вида (масса, число), N – сумма оценок значимости.

Индексы видового богатства, не учитывающие относительное обилие таксонов, Маргалефа (D_{Mg}) и Менхиника (D_{Mn}), определяли по формулам (Алексанов, 2017)

$$D_{Mg} = (S-1)/\log_2 N, \quad D_{Mn} = S/\sqrt{N},$$

где S – число выявленных видов, N – общее число особей всех S видов.

Ферментативную активность почвы определяли разными методами (Хазиев, 2005). С использованием фотоэлектроколориметра КФК-3 определяли активность гидролитических ферментов (инвертазу, протеазу, уреазу) при компостировании в термостате при 30–38°С и экспозиции от 3–24 ч. Активность ферментов окислительно-восстановительной группы (ПО – пероксидаза, ПФО – полифенолоксидаза) определяли колориметрическими методами с предварительным получасовым компостированием при 30°С. Активность инвертазы выражали в мг глюкозы/г почвы за 3 ч, протеазы – мг глицина/г почвы за 24 ч, уреазы – мг $N\text{-}NH_4$/г почвы за 24 ч, пероксидазы и полифенолоксидазы – мг 1.4-бензохинона/г почвы за 30 мин. По соотношению активности ПФО и ПО рассчитывали коэффициент гумификации ($K_г$), позволяющий судить об интенсивности процессов минерализации гумуса (Методы..., 2003; Хазиев, 2005).

Респираторную активность – микробную биомассу ($C_{мик}$), базальное дыхание (БД), микробный респираторный коэффициент (QR) почвенных микробоценозов – определяли методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД) (Anderson, Domsch, 1978; Sparling, 1995). СИД почвы оценивали по скорости начального максимального дыхания микроорганизмов после добавления в почву глюкозоминеральной смеси (ГМС, мг/мл: глюкоза (200); K_2HPO_4 (20); $(NH_4)_2SO_4$ (20) (Методы..., 1991). В стеклянные флаконы (250 мл) помещали 2 г почвы и добавляли 0.1 мл ГМС. Конечная концентрация глюкозы в почве – 10 мг/г. Флаконы герметично закрывали пробками, фиксировали время и инкубировали при 25°С. Спустя 3 ч после закрытия флакона регистрировали СИД: пробу воздуха из флакона (1 мл) отбирали шприцем и вводили в газовый хроматограф Agilent Technologies 6890 N Network GC (США), снабженный пламенно-ионизационным детектором и метанатором (Hewlet-Packard, США). Во время анализа использовали колонку Supelco 10182004 из нержавеющей стали (внутренний диаметр 3.175 мм, длина 1828.8 мм, адсорбент 80/100 Porapak Q).

Скорость СИД выражали в мкг $C\text{–}CO_2$/(г почвы · ч) (Anderson, Domsch, 1978). $C_{мик}$ почвенного образца определяли (Sparling, 1995) путем пересчета скорости СИД по формуле $C_{мик}$ (мкг С/г почвы) = 50.4 · СИД (мкг $C\text{–}CO_2$/(г почвы · ч). Фоновое БД измеряли по скорости выделения CO_2 почвой за 24 ч ее инкубации при 25°С. Скорость продуцирования CO_2 определяли хроматографически, как описано для определения СИД, только вместо ГМС в почву вносили воду. Скорость БД выражали в мкг $C\text{–}CO_2$/(г почвы · ч). По соотношению БД и СИД рассчитывали дыхательный коэффициент QR (Anderson, Domsch, 1990; Ананьева, 2003).

Вклад микробного углерода в общее органическое вещество рассчитывали следующим образом: $C_{мик}(\%) \times 100/C_{орг}$.

Таблица 1. Химические свойства почв в ризосфере (числитель) и междурядьях (знаменатель) под географическими культурами кедровых сосен в Ермаковском (Красноярский край) и Хехцирском (Хабаровский край) лесничествах

Климатип сосны кедровой	Гумус, %	$C_{орг}$, %	$N_{вал}$	$N_{ЛГ}$	$N_{ТГ}$	$N_{НГ}$	C : N	$pH_{вод}$	Влажность, %	*T*, °C	$C_{мик}/C_{орг}$, %
			смоль (экв)/кг								
Ермаковское лесничество, серая лесная почва											
Е	10.7 7.0	6.2 4.1	101.6 102.2	5.1 6.1	4.7 4.2	91.8 91.9	61 40	6.66 6.59	22.1 19.3	13.7 13.7	0.36 0.27
О	5.5 3.9	3.2 2.3	82.7 81.1	4.4 4.4	2.8 3.1	75.5 73.6	39 28	6.36 6.42	22.6 19.6	13.1 13.3	0.22 0.27
Ч	3.1 2.2	1.8 1.3	71.4 69.2	3.3 3.9	2.8 3.9	65.3 61.4	38 19	6.26 6.30	22.0 20.5	13.4 13.4	0.36 0.49
Хехцирское лесничество, бурая лесная почва											
Е	10.9 7.1	6.3 4.1	102.5 115.6	10.3 9.0	3.0 5.7	86.7 85.2	71 41	4.66 4.73	41.2 33.9	8.8 9.2	0.63 0.54
О	11.0 5.6	6.4 3.2	102.8 97.3	16.2 8.4	9.6 6.5	74.2 85.0	72 38	4.91 4.68	32.2 31.6	7.7 8.0	0.39 0.51
Ч	11.0 5.9	6.4 3.4	95.0 100.2	13.3 7.1	8.6 4.0	78.0 88.8	79 40	4.64 4.67	22.6 23.3	7.1 7.7	0.47 0.82

Примечание. $N_{ЛГ}$ – легкогидролизуемый азот; $N_{ТГ}$ – трудногидролизуемый азот; $N_{НГ}$ – негидролизуемый азот; $C_{мик}/C_{орг}$ – доля $C_{мик}$ в $C_{орг}$; для табл. 1, 4.
Е, О, Ч – ермаковский, облученский, чугуевский климатипы соответственно; для табл. 1–3, 5.

Статистический анализ. Для выявления взаимосвязей между активностью микробиологических и ферментативных показателей с гидротермическими и химическими параметрами почв (ризосферной и междурядной) был проведен корреляционный анализ; рассматривали коэффициенты корреляции (*r*), статистически значимые при $p \le 0.05$. С помощью кластерного анализа определяли различия прокариотного микробиома двух типов почв по индексам биоразнообразия. Для подтверждения различий между химическими, микробиологическими и биохимическими параметрами исследуемых почв использовали метод главных компонент (PCA). При обработке полученных данных использовали программы Microsoft Excel 2007, Statistica 12, Past 3.25.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Агрохимические и микробиологические характеристики серой лесной и бурой лесной подзолистой почв. Исследования географических культур кедровых сосен показали, что в новых условиях произрастания темп роста климатипов обусловлен не только наследственными особенностями, но и адаптивной реакцией растений на местный климат. Наиболее существенное влияние оказывали два климатических фактора: сумма эффективных температур выше 5°C ($r = 0.32$) и продолжительность вегетационного периода в местах их произрастания ($r = 0.31$) (Гродницкая и др., 2016; Кузнецова, Грек, 2016).

Химические анализы показали, что серая лесная почва (юг Красноярского края) под посадками разных климатипов кедровых сосен, отличалась от бурой лесной (Хабаровский край) меньшими значениями содержания гумуса (в 1.7–4.3 раза), валового азота (1.2–1.4 раза), гидролизуемого азота (в 1.4–3 раза), а также меньшей кислотностью (на 1.4–2.0 ед.). Серая лесная почва характеризовалась как слабокислая, а бурая лесная – как сильнокислая с более высоким содержанием гумуса и азота в верхних горизонтах (табл. 1).

Виды кедровых сосен оказывали разное влияние на химический состав почвы. В серой лесной почве под посадками *P. sibirica* и *P. koraiensis* между рядами и в зоне ризосферы были отмечены различия содержания гумуса и азота. Так, содержание гумуса под сосной сибирской в среднем превышало таковое под сосной корейской в 1.8–3.5, а содержание валового и подвижного азота –

в 1.3–1.5 раза. Однако процессы минерализации органических веществ под климатипами сосны корейской проходили интенсивнее, чем под сосной сибирской, о чем свидетельствуют более узкие диапазоны соотношения C : N и меньшее содержание трудногидролизуемого и негидролизуемого азота (табл. 1).

В бурой лесной почве между рядами посадок *P. sibirica* формируется больше гумуса, чем под корейскими климатипами (в 1.2–1.3 раза), а в ризосфере содержание гумуса практически одинаковое с *P. koraiensis*. Валового азота, как и гидролизуемых форм, также больше под сосной сибирской (табл. 1). Содержание органического вещества почвы, судя по отношению C : N, в бурой лесной почве практически одинаковое под сибирским и корейскими климатипами (табл. 1), что может отражать схожую интенсивность минерализационных процессов.

Химический состав и тип почвы влияли на активность микробиологических процессов, поскольку деятельность почвенных микроорганизмов тесно связана с химическими, биохимическими и почвообразовательными процессами (Singh, Shekhar, 1986).

Качественный состав прокариот микробиомов почв. Тип почвы и климатические особенности в местах произрастания кедровых сосен оказывали влияние на формирование качественного состава микробных сообществ и их функциональные особенности. В почвенном микробиоме компоненты биоразнообразия – число таксонов и их относительное обилие, т.е. вклад конкретных таксонов (филоспецифичных нуклеотидных последовательностей) в общее число особей сообщества (Першина и др., 2016; Наумова и др., 2018).

Оценка и сравнение биоразнообразия прокариот микробных сообществ исследуемых почв проведены на уровне типов (фил), по отдельным классам и родам. Отмечено, что микробные сообщества двух типов почв сбалансированы, имеют довольно высокое видовое разнообразие, о чем свидетельствуют индексы таксономического обилия (Шеннона, Маргалефа) и структуры (относительное обилие) прокариот (Бергера–Паркера, Симпсона) (табл. 2). Большее, чем в зоне ризосферы, разнообразие (по классам и родам) прокариот в обоих типах почв формировалось между рядами посадок кедровых сосен независимо от их вида (табл. 2). По числу выделенных ОТЕ под разными климатипами серая лесная почва превосходит бурую в 3 раза (табл. 3). Однако наиболее таксономически сложное сообщество почвенных прокариот наблюдали в бурой подзолистой почве (в ризосфере и между рядами посадок), при этом под *P. koraiensis* формировалось более разнообразное сообщество прокариот, чем под *P. sibirica* в обоих лесничествах, о чем свидетельствуют индексы

Таблица 2. Индексы разнообразия прокариотных сообществ в ризосфере (числитель) и междурядьях (знаменатель) двух типов почв Ермаковского и Хехцирского лесничеств

Почва под климатипами	H	d	D_{Mg}	D_{Mn}	D
Ермаковское лесничество					
Е	2.43 / 2.43	0.28 / 0.28	3.49 / 4.42	0.27 / 0.31	0.94 / 0.93
О	2.14 / 2.24	0.38 / 0.39	3.24 / 3.30	0.21 / 0.25	0.93 / 0.95
Ч	2.33 / 2.40	0.32 / 0.32	3.80 / 3.98	0.24 / 0.24	0.88 / 0.92
Хехцирское лесничество					
Е	3.37 / 3.29	0.17 / 0.17	10.41 / 10.58	2.0 / 1.85	0.87 / 0.87
О	3.27 / 3.38	0.19 / 0.12	8.61 / 10.17	1.58 / 1.83	0.82 / 0.81
Ч	2.93 / 3.17	0.28 / 0.22	10.03 / 9.86	1.56 / 1.52	0.85 / 0.85

Примечание. H, d, D_{Mg}, D_{Mn}, D – индексы Шеннона, Бергера–Паркера, Маргалефа, Менхиника, Симпсона соответственно; для табл. 2 и 6.

таксономического обилия (Шеннона, Менхиника, Маргалефа). В серой лесной почве отмечено заметное уменьшение разнообразия и увеличение степени доминирования нескольких (одного) родов, особенно под *P. sibirica*, что демонстрировали более высокие значения индексов Бергера–Паркера и Симпсона (табл. 2). Таким образом, отмечено, что в серой лесной почве формируется большее по численности, а в бурой лесной почве – большее родовое/видовое разнообразие прокариот.

Кластерный анализ на основании индексов биологического разнообразия, проведенный методом Варда, с использованием в качестве меры различия евклидова расстояния, подтвердил различия прокариотного микробиома (по классам) двух типов почв (рис. 1). Кластеры разделились по географическому положению посадок кедра, а также по видовой принадлежности кедровых сосен. Так, в серой лесной почве *P. sibirica* (ризосфера и междурядье) формирует отличное от *P. koraiensis* прокариотное сообщество. В бурой лесной почве (Хехцирское лесничество) больший вклад в биологическое разнообразие вносит происхождение климатипа. Существует тесная связь (дистанция 0.43) между ризосферной и междурядной почвой облученского и чугуевского климатипов, в то время как *P. sibirica* ермаковского климатипа формирует отличный от *P. koraiensis* прокариотный микробиом (рис. 1).

Таблица 3. Наиболее многочисленные (по числу последовательностей гена 16S рРНК) филы доменов *Bacteria* и *Archaea* под кедровыми соснами в ризосфере (числитель) и междурядьях (знаменатель) серой лесной и бурой лесной почвах (0–10 см)

Филогенетическая принадлежность (филум или тип)	Доля филоспецифичных ОТЕ, % общего числа полученных последовательностей					
	Ермаковское лесничество			Хехцирское лесничество		
	Е	О	Ч	Е	О	Ч
Число ридов	17428 / 21580	27040 / 26226	29627 / 30872	8232 / 10344	8358 / 9195	7967 / 8813
Proteobacteria	43.9 / 43.3	50.4 / 43.9	46.0 / 44.1	21.2 / 22.9	28.8 / 24.8	32.3 / 31.6
Acidobacteria	22.6 / 22.6	18.7 / 19.7	26.2 / 21.7	32.6 / 31.1	34.3 / 32.2	31.0 / 31.7
Actinobacteria	15.5 / 15.1	16.7 / 16.8	13.3 / 14.1	6.7 / 8.7	11.9 / 11.3	10.4 / 10.1
Verrucomicrobia	6.0 / 10.7	4.4 / 10.9	5.7 / 11.3	5.5 / 4.1	6.6 / 6.2	6.5 / 6.9
Bacterioidetes	8.8 / 5.4	6.5 / 5.6	4.5 / 4.7	2.3 / 2.9	2.3 / 3.1	2.8 / 4.2
Chloroflexi	1.2 / 1.1	1.6 / 1.2	2.1 / 1.2	26.9 / 26.4	12.7 / 18.4	13.3 / 10.5
Gemmatimonadetes	0.94 / 0.77	0.40 / 0.68	0.79 / 1.11	1.17 / 0.93	1.4 / 1.07	0.74 / 1.36
Firmicutes	0.37 / 0.51	0.20 / 0.75	0.65 / 0.90	0.30 / 0.28	0.10 / 0.25	0.21 / 0.27
Saccharibacteria (TM7)	0.40 / 0.35	0.22 / 0.42	0.33 / 0.46	0.30 / 0.41	0.41 / 0.60	0.56 / 0.84
Planctomycetes	0.11 / 0.24	0.17 / 0.19	0.29 / 0.27	0.27 / 0.24	0.31 / 0.45	0.56 / 0.42
Chlamydiae	0.006 / 0.03	0.007 / 0.01	0.02 / 0.01	0.00 / 0.02	0.00 / 0.01	0.00 / 0.01
Cyanobacteria/ Chloroplast	0.05 / 0.13	0.80 / 0.06	0.06 / 0.07	0.09 / 0.46	0.14 / 0.08	0.14 / 1.02
Nitrospirae	0.00 / 0.05	0.00 / 0.03	0.003 / 0.07	0.92 / 0.58	0.20 / 0.38	0.53 / 0.52
Armatimonadetes	0.02 / 0.06	0.04 / 0.03	0.04 / 0.01	0.18 / 0.05	0.04 / 0.12	0.09 / 0.10
BRC1	0.02 / 0.00	0.004 / 0.01	0.00 / 0.02	0.04 / 0.02	0.01 / 0.03	0.05 / 0.00
Crenarchaeota	0.00 / 0.01	0	0.01 / 0	0	0	0
Euryarchaeota	0.00 / 0	0	0.00 / 0.02	0.04 / 0	0.01 / 0.01	0.03 / 0
Thaumarchaeota	0	0	0	0.26 / 0.08	0.05 / 0.13	0.18 / 0.03
Latescibacteria (WS3)	0.13 / 0.12	0.00 / 0.12	0.003 / 0.12	0.85 / 0.69	0.49 / 0.63	0.34 / 0.32

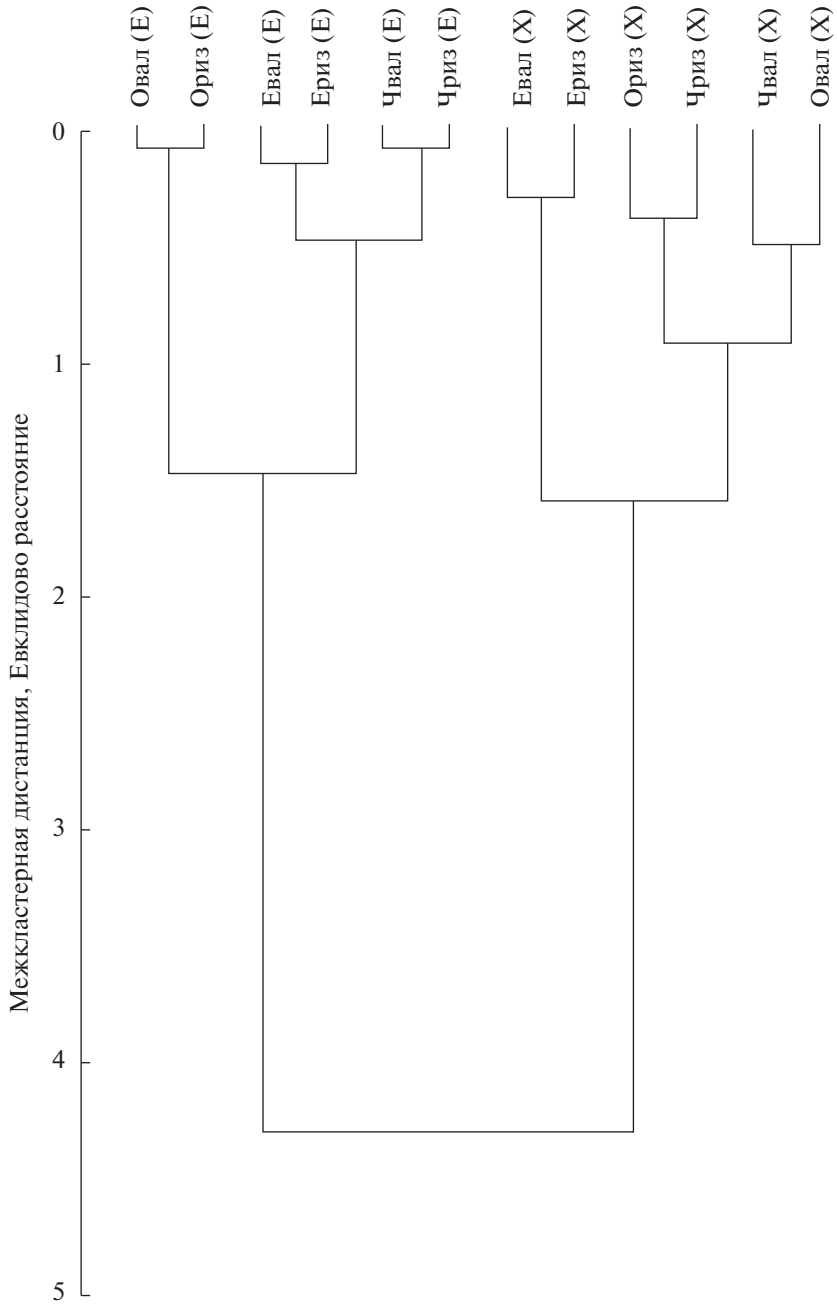

Рис. 1. Вертикальная древовидная диаграмма кластерного анализа по индексам разнообразия прокариотных сообществ в двух типах почв Ермаковского (Е) и Хехцирского (Х) лесничеств. Ериз(Е), Ориз(Е), Чриз(Е) – ермаковский, облученский, чугуевский климатипы соответственно, ризосфера; Емежд(Е), Омежд(Е), Чмежд(Е) – ермаковский, облученский, чугуевский климатипы соответственно, междурядья; Ериз(Х), Ориз(Х), Чриз(Х) – ермаковский, облученский, чугуевский климатипы соответственно, ризосфера; Емежд(Х), Омежд(Х), Чмежд(Х) – ермаковский, облученский, чугуевский климатипы соответственно, междурядья; для рис. 1 и 4.

Данные метагеномного анализа почв исследуемых лесничеств свидетельствуют о том, что в трансформации углерода, азота и других важных элементов принимает участие значительное число прокариот, в основном из домена Bacteria (99.9%), представители домена Archaea выделены в “минорном” числе (≥1%). Качественная характеристика и количественное соотношение последовательностей гена 16S рРНК (ОТЕ) бактерий по их типам (филам) представлены в табл. 3.

В серой лесной почве под посадками всех климатипов кедровых сосен формируется больше бактерий, чем в бурой лесной в среднем: в ризосфере – в 3, междурядьях – в 2.8 раза (табл. 3). В

то же время число выделенных классов прокариот бурой лесной почвы в ризосфере составляло 37–46, в междурядьях – 46–47, а в серой лесной почве в зоне ризосферы было выделено 34–40, в междурядьях – 43–45 классов.

Минорные представители прокариотного микробиома археи (Archaea) были обнаружены в единичных количествах в обоих типах почв. В серой лесной почве были выявлены археи класса *Thermoprotei* (*Crenarcheota*), их присутствие отмечено в ризосфере чугуевского и между рядами посадок ермаковского климатипов (по 0.01%) (табл. 3). Бактерии класса *Thermoprotei* часто встречаются в лесных почвах, способны к метаболизму даже при низких температурах (до –2°C), многие из них хемолитоавтотрофы, которые получают энергию в процессе анаэробного серного дыхания (Bates *et al.*, 2011). В бурой почве археи фил *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota* были отмечены в зоне ризосферы всех климатипов, особенно много под *P. sibirica*, и между рядами посадок, за исключением *Euryarchaeota* (табл. 3).

Доминантными представителями микробоценозов исследованных почв являются бактерии трех фил: *Proteobacteria, Acidobacteria* и *Actinobacteria*, на долю которых в серой лесной почве в зависимости от климатипа приходится 80–85%, а в бурой лесной почве – 60–75% общего числа последовательностей гена 16S рРНК. Содоминантами были представители фил *Verrucomicrobia* и *Bacterioidetes*, доля которых в зависимости от климатипов составляла 10–16% в серой лесной и 7–18% в бурой лесной почвах (табл. 3). Представители фил *Bacterioidetes, Latescibacteria* (ранее WS3) и *Chlorobi,* члены суперфилума *Fibrobacteres–Chlorobi–Bacteroidetes* (FCB), участвуют в трансформации углерода сложных органических полимеров. У *Latescibacteria* были обнаружены анаэробный ферментативный режим метаболизма, способность разлагать полисахариды (пектин, альгинат, ульван, фукан) и богатые гидроксипролином гликопротеины клеточных стенок зеленых (*Charophyta* и *Chlorophyta*) и коричневых (*Phaeophycaea*) водорослей, а также молекулы крахмала и трегалозы, внеклеточные полимерные вещества (Youssef *et al.*, 2015).

Максимальное число прокариот филы *Proteobacteria* обнаружено в серой лесной почве. Особую роль, на наш взгляд, играли азотфиксирующие микроорганизмы – клубеньковые бактерии (класс *Alphaproteobacteria*), которые в исследованных почвах были представлены родами *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* и *Mesorhizobium*. В серой лесной почве доля этих бактерий в общем числе последовательностей составляла 6.4–6.8% в ризосфере и 5.6–7.2% в междурядьях. В бурой лесной почве их было значительно меньше: в ризосфере кедровых сосен 0.66–1.23%, в почве междурядий 0.95–1.23%. При этом в обоих типах почв *P. koraiensis* формировал большее число последовательностей ризобактерий (в серой лесной – в 1.1–1.3, в бурой лесной – в 1.1–1.7 раза), чем *P. sibirica*. Таким образом, отмечено, что сосна корейская, активно растущая как в привычных для нее условиях Хабаровского края, так и при интродукции в Красноярском крае, стимулирует более интенсивное развитие азотфиксаторов в своей ризосфере, чем сосна сибирская.

В трансформации азота в почвах под климатипами кедровых сосен принимают участие также представители фил *Nitrospirae* и *Thaumarchaeota* Представители филы *Nitrospirae* участвуют в процессах нитрификации, причем, по мнению многих авторов, бактерии *Nitrospirae* способны осуществлять два этапа нитрификации, вплоть до полного окисления аммиака до нитрата. Ранее (van Kessel *et al.*, 2015) было показано, что нитроспиры – хемолитоавтотрофы, для экономии энергии они кодируют в своих геномах все ферменты, необходимые для полного окисления аммиака через нитрит в нитрат. В серой лесной почве бактерии *Nitrospirae* представлены в незначительных количествах (0.03–0.007% в междурядьях), в то время как в бурой лесной почве их доля повышается до 0.58% (междурядья) и 0.92% (ризосфера), т.е. увеличивается в среднем более чем в 80 раз. При этом наибольшее их число встречается под ермаковским климатипом в ризосфере и между рядами посадок кедровых сосен (табл. 3). Кроме того, в бурой лесной почве под всеми климатипами в междурядьях и ризосфере отмечено присутствие архей рода *Nitrososphaera* филы *Thaumarchaeota* (табл. 3), которые играют главную роль в биологическом окислении аммония (AOA) (Stieglmeier *et al.*, 2014). Число последовательностей представителей *Nitrososphaera* в почве междурядий и в ризосфере под кедровыми соснами коррелировало с содержанием $C_{орг}$ ($r = -0.88$), $N_{ЛГ}$ ($r = 0.72$ и -0.99), pH ($r = -0.81$), а также с ферментами уреазой ($r = 0.91$ и 0.79) и протеазой ($r = -0.91$), что согласуется с ранее опубликованными данными (Bates *et al.*, 2011; Stieglmeier *et al.*, 2014; Oton *et al.*, 2016).

Важную роль в минерализации органики играют представители филы *Acidobacteria*. В бурой лесной почве ацидофильные микроорганизмы доминируют, они характеризуются бóльшим числом и разнообразием, чем в серой лесной почве. Представители выявленных 20 классов (34 рода) в ризосферной почве кедровых сосен составляли 31–34%, а в междурядьях – 32–32%, в то время как в серой лесной почве были выявлены 18 классов (20 родов), доля которых в ризосфере составляла 19–26%, а в междурядьях – 20–22%.

Еще одна особенность бурой лесной почвы в Хабаровском крае – присутствие значительного числа споровых почкующихся бактерий из класса

Ktedonobacteria (*Chloroflexi*) (Наумова и др., 2018). В обоих типах почв было выявлено 4–5 родов, из которых доминирующими были *Ktedonobacter* и *Thermosporothrix*. Для этих бактерий оптимальными условиями развития были повышенные значения влаги и температуры в почве. Поэтому их особенно много (26.4–26.9%) в почве под сосной сибирской ермаковского климатипа (из-за затапливаемости их участков), в то время как под сосной корейской формируется 10.5–18.4% (междурядье) и 12.7–13.3% (ризосфера) общего числа последовательностей. Кроме того, под *P. sibirica* также было отмечено повышенное содержание представителей филы *Latescibacteria* (табл. 3). Полагаем, что наличие в почве значительного числа вышеназванных бактерий может быть индикатором неблагоприятных для роста и развития кедровых сосен условий.

В процессах разложения органики в почвах немаловажную роль играют представители фил *Actinobacteria* и *Firmicutes*, обладающие мощным ферментативным аппаратом. Актиномицеты трансформируют и разрушают сложные органические соединения, не доступные многим другим микроорганизмам (целлюлозу, гумус, хитин, лигнин и др.), играют важную роль в процессах почвообразования и создания плодородия почв. По разнообразию и численности серая лесная почва более богата актиномицетами, чем бурая лесная (табл. 3). Представители трех классов составляли 62–76% общего числа актинобактерий (*Actinobacteria*, *Thermoleophilia*, *Acidimicrobiia*). В бурой лесной почве доминировали представители четырех классов, доля которых в общем числе актинобактерий составляла 75–84% (*Rubrobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, *Thermoleophilia*).

Прокариоты филы *Firmicutes* в серой лесной почве представлены классами *Bacilli* (15 родов), *Clostridia* (6 родов), *Negativicutes* (р. *Veillonella* – единичное присутствие). Под всеми климатипами кедровых сосен доминировали споровые бактерии из родов *Bacillus, Paenibacillus, Tumebacillus, Cohnella* и *Clostridium* sensu stricto – 83–89% всех фирмикутов. При этом под посадками *P. koraiensis* формировалось в 3.2 раза больше всех выделенных последовательностей как в ризосфере, так и междурядьях по сравнению с таковыми под посадками *P. sibirica*. В бурой лесной почве Хехцирского лесничества представителей *Firmicutes* было существенно меньше, они встречались единично (табл. 3). Споровые бактерии из классов *Bacilli* (роды *Bacillus* и *Paenibacillus*) и *Clostridia* (роды *Acetivibrio*, *Clostridium*) были выявлены только в почве междурядий кедровых сосен. Бактерии класса *Negativicutes* (роды *Sporomusa, Megasphaera, Megamonas*) были обнаружены единично в ризосфере ермаковского климатипа *P. sibirica*.

Олиготрофная группа микроорганизмов представлена в почвах в основном неспорообразующими грамотрицательными бактериями часто необычной морфологии – многие из них имеют различные придатки, образуют выросты, простеки. К ним относится группа бактерий суперфилума PVC, состоящая из представителей трех фил, *Planctomycetes–Verrucomicrobia–Chlamydiae.* В серой лесной почве группа PVC представлена бóльшим разнообразием и количеством ОТЕ (табл. 3). Это аэробные и факультативно-анаэробные бактерии, вовлеченные в углеродные и азотные циклы, обладающие высоким гликолитическим потенциалом и участвующие в деградации полимеров растительного происхождения, экзоскелетов насекомых, а также экзополисахаридов, продуцируемых другими бактериями (Pilhofer *et al.*, 2008; Pinos *et al.*, 2016). В исследуемых почвах самая многочисленная фила *Verrucomicrobia* с доминирующими родами *Spartobacteria* и Subdivision3 (genera _incertae_sedis) “неопределенного положения”. В серой лесной почве бактерий *Verrucomicrobia* в ризосфере кедровых сосен выявлено в 2.4–3.3, а в междурядьях – в 5.6–5.9 раза больше, чем в бурой лесной почве. На долю *Spartobacteria* в серой лесной почве приходится 80.3–83.5% (ризосфера) и 91.3–93.1% (междурядья), Subdivision3 – 15.5–19.1% (ризосфера) и 6.5–8.2% (междурядья), а доля представителей родов *Opitutus* и *Verrucomicrobium* вместе составила >1% выявленных *Verrucomicrobia*. В бурой лесной почве на долю рода *Spartobacteria* приходится 68–84% (ризосфера) и 76–83% (междурядья), бактерий Subdivision3 – 30–18% (ризосфера) и 21–23% (междурядья), доля представителей рода *Opitutus* была более значима, чем в серой лесной почве – 2.6–2.5% (ризосфера) и 2.7–2.1% (междурядья). При этом отмечено, что под *P. sibirica* доминируют бактерии родов *Opitutus* и Subdivision3, а под *P. koraiensis* – *Spartobacteria* и *Verrucomicrobium*.

Таким образом, установлено, что тип почвы и межвидовая гетерогенность кедровых сосен оказывали влияние на формирование количественного и качественного состава прокариотных микробиомов в исследуемых почвах двух лесничеств.

Дыхательная активность почв под кедровыми соснами. Интенсивность выделения почвенными микроорганизмами углекислого газа указывает на энергию процесса разложения органических соединений и характеризует актуальную биологическую активность почв. Важнейшие показатели дыхательной активности почв – показатели микробного (базального) дыхания (БД) и микробной биомассы (МБ ($C_{мик}$)). Сезонная динамика дыхания почвенных микроорганизмов контролируется (прямо или косвенно) температурой и влажностью почвы, фенофазами растительности (Sarathchandra *et al.*, 1989; Raich, Schlesinger, 1992).

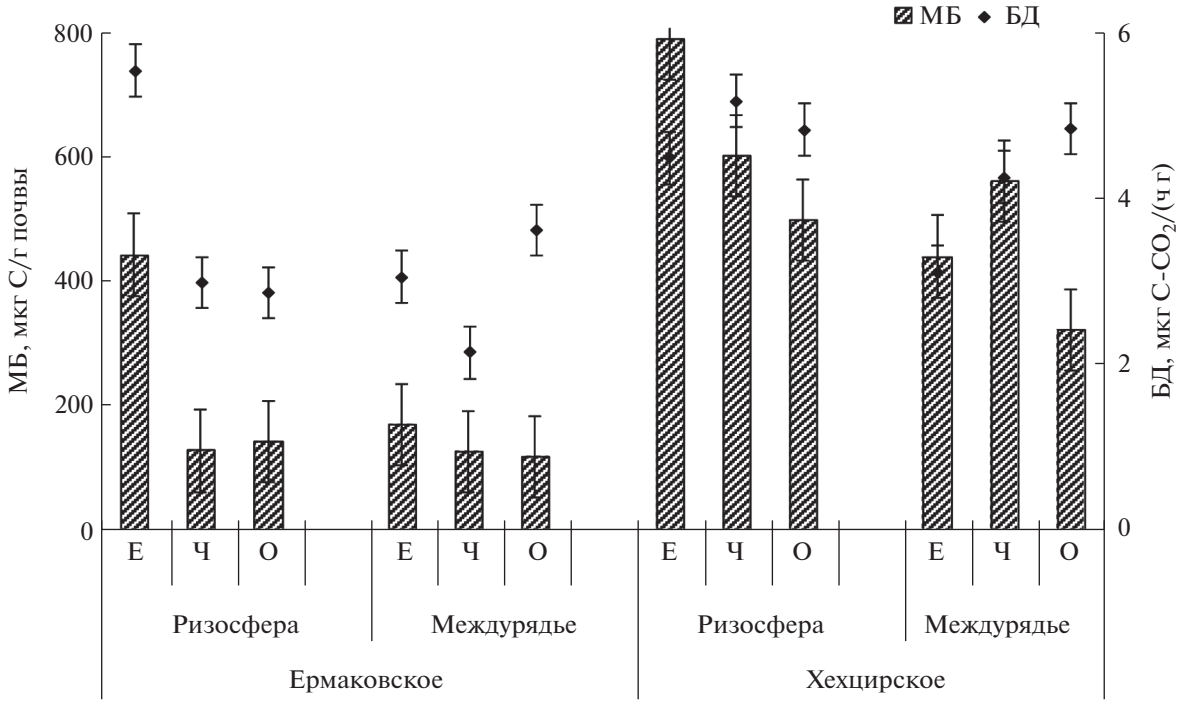

Рис. 2. Микробные биомассы (МБ) и базальное дыхание (БД) микроорганизмов в ризосфере и междурядьях под кедровыми соснами в зависимости от географических климатипов (Ч – чугуевский, О – облученский, Е – ермаковский) и типа почв в Ермаковском и Хехцирском лесничествах; для рис. 2 и 3.

Сравнительная характеристика респираторной активности почвенных микроорганизмов позволила обнаружить, что, несмотря на повышенную кислотность бурой лесной почвы, значения МБ и БД в ней под всеми климатипами были значительно выше, чем в серой лесной почве юга Красноярского края. Судя по скорости выделения CO_2, процессы минерализации органического вещества протекали интенсивнее в бурой лесной почве: в ризосфере – в 1.5, а в междурядьях – в 1.4 раза (рис. 2).

Корневые выделения кедра сибирского формировали большее содержание микробной биомассы, чем кедра корейского в обоих типах почв (серая лесная – в 3.1–3.4, бурая лесная – в 1.3–1.6 раза) (рис. 2). В почве между рядами посадок такой тенденции не обнаруживается, содержание МБ под климатипами различалось недостоверно (рис. 2).

Отмечено, что в серой лесной почве значения МБ и скорости БД зависели от pH и температуры, причем значения МБ в ризосфере и между рядами посадок положительно коррелировали с $C_{орг}$, $N_{вал}$, C : N. В бурой лесной почве значимые корреляционные зависимости в ризосфере были найдены между МБ и температурой почвы, $C_{орг}$ и $N_{ЛГ}$. В почве междурядий значимые корреляционные зависимости были отмечены между БД и pH, БД и температурой и влажностью, между МБ и C : N (табл. 4).

Вклад микроорганизмов в углеродный пул в исследуемых почвах различен. В среднем в бурой лесной почве в ризосфере кедровых сосен доля $C_{мик}$ в $C_{орг}$ составляла 0.5, в междурядьях – 0.62, а в серой лесной почве в ризосфере – 0.32, в междурядьях – 0.34%. Следовательно, вклад углерода микробной биомассы в общий органический углерод был выше в бурой лесной, чем в серой лесной почве в 1.6 (ризосфера) и в 1.9 (междурядья) раза (табл. 1).

Значения микробного метаболического коэффициента (QR), критерия устойчивости микробных сообществ и индикатора эффективности использования субстрата (Anderson, Domsch, 1990; Ананьева, 2003), были довольно низкими в обоих типах почв (QR < 0.5) (рис. 3). В бурой лесной почве значения QR были ниже, чем в серой лесной почве в 1.9 (междурядья) и 2.3 раза (ризосфера). Отмечено, что в серой лесной почве различия во влиянии разных климатипов кедров на удельную дыхательную активность микробных сообществ достоверны как в ризосфере, так и в почве междурядий. В бурой лесной почве такие различия отсутствуют, под всеми климатипами минерализация органики происходит практически с одинаковой скоростью и более интенсивно, чем в

Таблица 4. Коэффициенты корреляции (r) зависимостей базального дыхания (БД), микробной биомассы (МБ), метаболического коэффициента (QR) от физико-химических показателей серой и бурой лесных почв под климатипами кедровых сосен в ризосфере (числитель) и между рядами посадок (знаменатель) в разных местах тестирования, $n = 3$ ($p < 0.05$)

Показатель	pH	T, °C	$C_{орг}$	$N_{вал}$	$N_{ЛГ}$	C : N
Ермаковское лесничество, серая лесная почва						
МБ	0.98 / 0.96	0.85 / 0.93	0.96 / 0.78	0.94 / −0.73	0.82 / 0.69	0.999 / 0.84
БД	0.96 / 0.27	0.88 / −0.38	0.94 / 0.62	0.91 / 0.68	0.77 / 0.72	0.997 / 0.54
QR = БД/СИД	−0.995 / 0.06	−0.65 / −0.56	−0.999 / 0.44	−0.999 / 0.82	−0.95 / 0.56	−0.96 / 0.36
Хехцирское лесничество, бурая лесная почва						
МБ	−0.73 / −0.16	0.75 / −0.22	−0.94 / 0.21	0.13 / 0.14	−0.99 / −0.67	−0.27 / 0.65
БД	−0.07 / −0.88	−0.99 / −0.85	0.87 / −0.99	−0.85 / −0.98	0.51 / −0.48	0.92 / −0.93
QR = БД/СИД	0.60 / −0.27	−0.85 / −0.21	0.98 / −0.60	−0.30 / −0.55	0.95 / 0.30	0.43 / −0.91

Примечание. СИД – субстратиндуцированное дыхание, БД – базальное дыхание, МБ – микробная биомасса, QR – микробный дыхательный коэффициент.

серой лесной почве, что подтверждается высокими значениями МБ и БД (рис. 2, 3).

Зависимости QR от содержания $C_{орг}$ и $N_{вал}$, а также от температуры, pH и влажности почвы различались по типам почв и зонам (табл. 4). В ризосфере климатипов серой лесной почвы дыхательная активность достоверно обратно коррелировала со всеми показателями, в бурой же, напротив, с большинством параметров корреляция была положительной (табл. 4). В целом значения

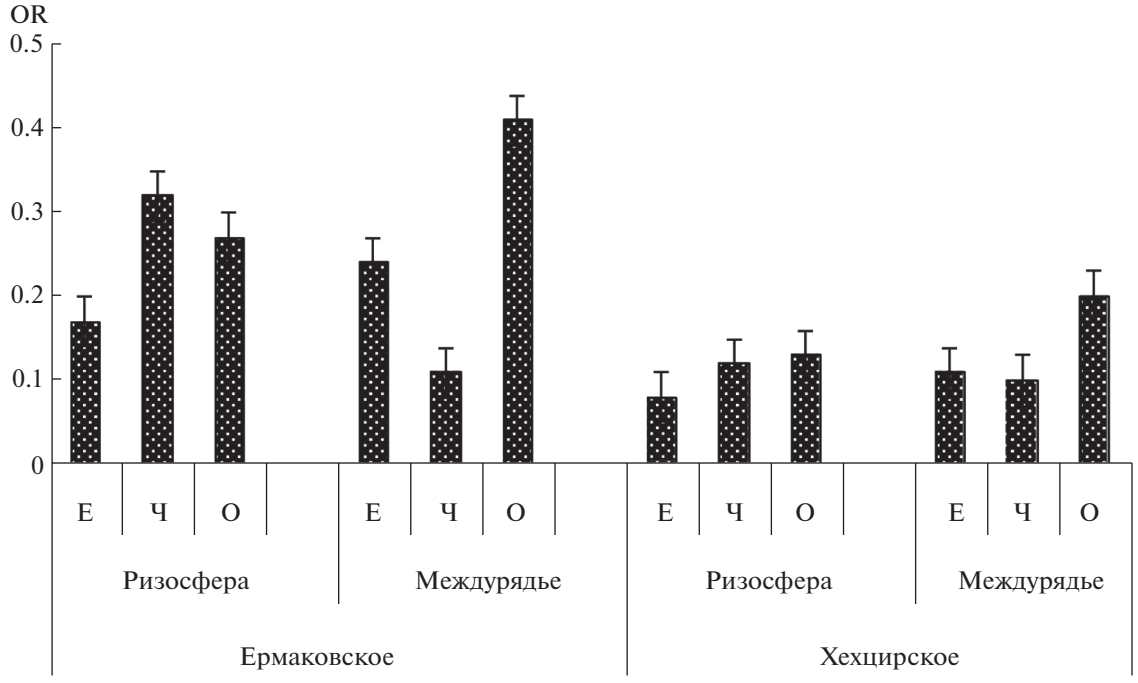

Рис. 3. Коэффициент удельного дыхания микроорганизмов (QR) в ризосфере и междурядьях под кедровыми соснами в зависимости от географических климатипов.

Таблица 5. Ферментативная активность серой лесной и бурой лесной почв в ризосфере (числитель) и между рядами (знаменатель) под климатипами *Pinus sibirica* и *Pinus koraiensis* ($n = 3$)

Вид сосны кедровой	Климатип	ПФО	ПО	$K_г$ (ПФО/ПО)	Инвертаза, глюкоза	Протеаза, глицин	Уреаза, $N\text{-}NH_4$
		мг бензохинона/г почвы			мг/ г почвы		
Серая лесная почва (Ермаковское лесничество)							
P. sibirica	Е	0.37 ± 0.07 / 0.27 ± 0.01	0.55 ± 0.04 / 0.45 ± 0.04	0.67 ± 0.21 / 0.60 ± 0.02	64.32 ± 0.17 / 72.17 ± 0.97	0.40 ± 0.03 / 0.67 ± 0.03	6.16 ± 0.20 / 5.72 ± 0.20
P. koraiensis	Ч	0.36 ± 0.07 / 0.38 ± 0.07	0.72 ± 0.06 / 0.61 ± 0.03	0.49 ± 0.18 / 0.62 ± 0.21	70.76 ± 0.94 / 44.11 ± 0.13	1.13 ± 0.13 / 1.02 ± 0.18	5.42 ± 0.30 / 3.82 ± 0.70
	О	0.43 ± 0.05 / 0.24 ± 0.04	0.76 ± 0.07 / 1.26 ± 0.07	0.57 ± 0.20 / 0.19 ± 0.02	59.19 ± 0.23 / 50.22 ± 2.30	0.83 ± 0.05 / 1.38 ± 0.03	5.79 ± 0.30 / 5.26 ± 0.30
Бурая лесная почва (Хехцирское лесничество)							
P. sibirica	Е	0.3 ± 0.02 / 0.14 ± 0.02	0.29 ± 0.02 / 0.22 ± 0.01	0.84 ± 0.08 / 0.66 ± 0.12	65.09 ± 0.95 / 58.12 ± 0.43	0.71 ± 0.08 / 0.43 ± 0.03	3.80 ± 0.24 / 3.32 ± 0.24
P. koraiensis	Ч	0.2 ± 0.01 / 0.31 ± 0.06	0.33 ± 0.04 / 0.30 ± 0.05	0.70 ± 0.06 / 1.04 ± 0.04	59.38 ± 0.68 / 59.31 ± 1.09	0.88 ± 0.08 / 0.59 ± 0.04	4.30 ± 0.55 / 2.25 ± 0.26
	О	0.2 ± 0.01 / 0.25 ± 0.04	0.37 ± 0.05 / 0.35 ± 0.06	0.65 ± 0.06 / 0.78 ± 0.06	59.19 ± 0.45 / 59.29 ± 0.05	1.83 ± 0.13 / 0.63 ± 0.08	4.00 ± 0.53 / 3.37 ± 0.55

Примечание. ПФО и ПО – полифенолоксидаза и пероксидаза соответственно, $K_г$ – коэффициент гумификации.

микробного метаболического коэффициента QR обоих типов почв свидетельствуют о том, что их микробные сообщества адаптированы к данному режиму, функционируют в пределах природной вариабельности, процессы трансформации органики в них достаточно стабильны.

Ферментативная активность почв. Ферменты группы гидролаз и оксидоредуктаз оказывают наибольшее влияние на процессы разложения органических веществ и гумусонакопления в почве (Хазиев, 2005). Проявление в почвенных образцах довольно активных гидролитических ферментов (инвертазы, протеазы, уреазы), катализирующих расщепление высокомолекулярных органических соединений, также свидетельствует о высокой интенсивности мобилизационных процессов. Гидролазы, таким образом, участвуют в обогащении почвы доступными для растений и микроорганизмов питательными веществами. Оксидоредуктазная способность в почве под посадками кедровых сосен – дополнительная характеристика процессов синтеза и распада гумусовых веществ. Полифенолоксидазы и пероксидазы участвуют в процессах гумусообразования, отношение их содержания (ПФО/ПО) – условный коэффициент гумификации ($K_г$), который в определенной мере характеризует направленность этого процесса (Гулько, Хазиев, 1992).

Из-за существенной разницы климатических, географических и лесорастительных условий ферментативные активности почв двух регионов различались между собой. Активности различных ферментов различались по видам и климатипам кедровых сосен, а также по почвенным зонам (ризосфера, междурядье). В целом ферментативная активность серой лесной почвы превышала таковую бурой лесной в 1.6 (ризосфера) и 1.2 раза (междурядья). В серой лесной почве активности уреазы, инвертазы, ПФО были выше в ризосфере, чем между рядами посадок, а активности протеазы и ПО были более выражены в междурядьях. При этом под *P. sibirica* как в ризосфере, так и в междурядьях были отмечены более низкие протеазная и пероксидазная активности, чем под *P. koraiensis* (табл. 5). В бурой лесной почве в целом активность всех ферментов была выше в зоне ризосферы кедровых сосен, чем между рядами посадок. Под климатипом кедра сибирского активность всех ферментов, кроме инвертазы (в ризосфере), была снижена по сравнению с таковой под корейскими климатипами (табл. 5).

Несмотря на то что активности всех ферментов серой лесной почвы в междурядьях и ризосфере в целом превышали таковые бурой лесной, значения $K_г$ были более высокими в бурой лесной почве (в 1.8 и 1.3 раза в междурядьях и ризосфере соответственно), что, скорее всего, свидетельствует о более высокой интенсивности накопления гумуса по сравнению с серой лесной почвой.

Анализ главных компонент, проведенный по микробиологическим, агрохимическим показателям и составу прокариотного микробиома, показал, что все параметры серой лесной почвы расположены в левой полуплоскости, а бурой лесной – в пра-

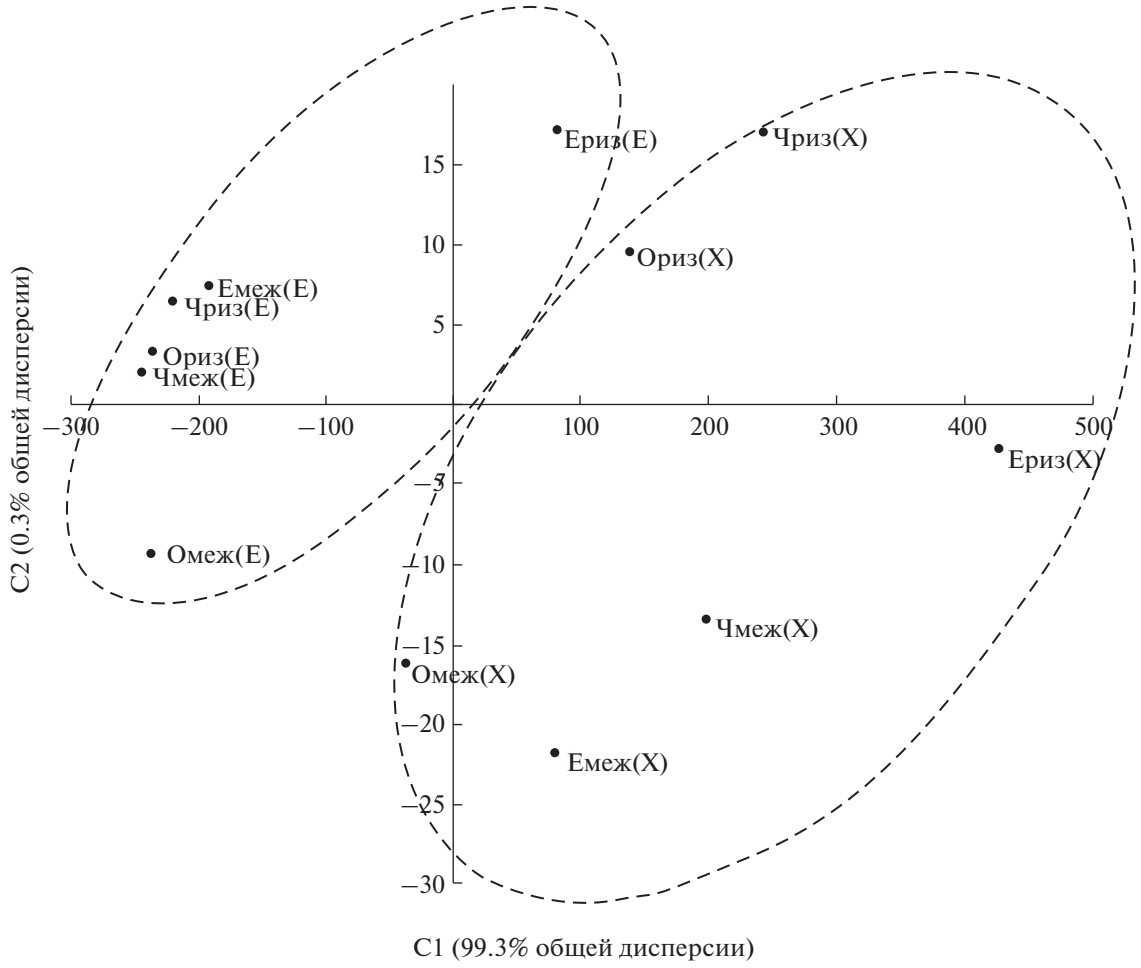

Рис. 4. Расположение параметров двух типов почв (серой лесной и бурой лесной) в плоскости двух главных компонент, полученных по основным почвенным характеристикам и обилию выявленных типов прокариот. Каждая точка характеризуется следующими почвенными параметрами: *T*, °C, влажностью, pH, МБ, БД, QR, $C_{мик}$, %, $C_{орг}$, $N_{вал}$, C : N, ферментами (инвертаза, протеаза, уреаза, пероксидаза, полифенолоксидаза) и $K_г$, а также наличием филоспецифичных типов бактерий: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* (*Ktedonobacteria*), *Verrucomicrobia*, *Planctomycetia*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadete*.

вой, что подтверждает различия между этими почвами (рис. 4). Обилие основных типов прокариот с основными микробиологическими и агрохимическими параметрами почвы, располагающихся в плоскости двух главных компонент, совместно отвечают за 63.5% общей дисперсии данных. Весомый вклад в первую главную компоненту внесли МБ, $C_{мик}$, %. Наибольший вклад во вторую компоненту вносили $C_{мик}$, %, C : N, доли типов *Proteobacteria*, *Chloroflexi* (класс *Ktedonobacteria*) и *Actinobacteria*.

Корреляционный анализ показал взаимосвязь между индексами биоразнообразия и основными почвенными параметрами. Высокие корреляционные связи (прямая и обратная) с микробиологическими, ферментативными и химическими анализируемыми почвенными параметрами (всего 17) были отмечены в Ермаковском лесничестве – с индексами Шеннона (15), Бергера–Паркера (14–15), Менхиника (13–16), а в Хехцирском лесничестве – с индексами Маргалефа (12–13), Менхиника (9–14), Симпсона (12–13) (табл. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что виды и климатипы кедровых сосен *P. sibirica* и *P. koraiensis* оказывали влияние на химические и биологические свойства почв. Исследуемые почвы различались между собой интенсивностью процессов минерализации органики, трансформации C и N и направленностью почвенных процессов, что проявилось в количественных различиях содержания гумуса, валового и гидролизуемого азота, кислотности, скорости биохимических процессов, респираторной активности и формировании структуры микробных сообществ.

Таблица 6. Корреляция индексов биоразнообразия с параметрами почв Ермаковского (в числителе) и Хехцирского (в знаменателе) лесничеств ($p < 0.05$)

Параметр	H		d		D_{Mg}		D_{Mn}		D	
	Р	М	Р	М	Р	М	Р	М	Р	М
Температура	0.34 0.89	0.42 0.29	−0.40 −0.87	−0.60 −0.22	−0.55 0.36	0.63 0.97	0.50 0.95	0.99 0.71	0.93 0.55	0.05 0.60
Влажность	−0.97 0.75	−0.99 0.13	0.98 −0.78	0.99 −0.21	−0.39 −0.74	−0.99 −0.80	−0.998 0.06	−0.59 −0.36	−0.22 −0.58	0.84 −0.87
pH	0.90 0.36	0.89 0.23	−0.92 −0.41	−0.97 −0.16	−0.18 −0.96	0.98 0.96	0.96 −0.40	0.85 0.67	0.42 −0.89	−0.58 0.64
$C_{орг}$	0.93 −0.68	0.85 −0.13	−0.95 0.64	−0.95 0.21	0.26 −0.66	0.96 0.79	0.98 −0.999	0.88 0.36	0.35 −0.80	−0.52 0.88
$N_{вал}$	0.95 0.97	0.86 −0.07	−0.97 −0.98	−0.95 0.15	0.31 −0.35	0.96 0.83	0.99 0.51	0.88 0.42	0.30 −0.15	−0.53 0.84
$N_{ЛГ}$	0.998 −0.23	0.78 0.73	−0.999 0.18	−0.90 −0.67	0.56 −0.95	0.91 0.96	0.99 −0.86	0.94 0.97	0.03 −0.99	−0.40 0.12
C : N	0.95 −0.99	0.90 −0.59	−0.97 0.998	−0.97 0.65	0.33 0.21	0.98 0.40	0.99 −0.63	0.84 −0.14	0.28 0	−0.59 1.00
МБ	0.79 0.37	0.50 −0.997	−0.83 −0.33	−0.68 0.999	−0.02 0.88	0.70 −0.43	0.89 0.92	0.999 −0.84	0.60 0.96	−0.04 0.65
БД	0.74 −0.95	0.87 0.25	−0.78 0.94	−0.75 −0.33	−0.09 −0.20	0.72 −0.71	0.85 −0.89	0.03 −0.24	0.65 −0.40	−0.999 −0.93
QR	−0.91 −0.52	0.74 0.87	0.94 0.48	−0.57 −0.91	−0.22 −0.79	0.54 0.01	−0.97 −0.97	−0.20 0.53	−0.38 −0.90	−0.97 −0.91
$C_{мик}$, %	0.81 0.40	0.62 −0.88	−0.84 −0.35	−0.78 0.91	0.001 0.87	0.80 −0.03	0.90 0.93	0.99 −0.54	0.57 0.95	−0.19 0.90
ПФО	0.30 0.73	−0.94 −0.41	−0.24 −0.70	0.84 0.33	0.95 0.60	−0.82 −0.99	0.13 0.999	−0.19 −0.79	−0.96 0.75	0.99 −0.49
ПО	−0.64 −0.19	0.19 0.33	0.68 0.14	0.03 −0.41	0.24 −0.96	−0.06 −0.65	−0.76 −0.83	−0.75 −0.16	−0.76 −0.999	−0.62 −0.96
$K_г$	0.97 0.46	−0.41 −0.72	−0.98 −0.42	0.02 0.66	0.39 0.84	−0.16 −0.96	0.998 0.95	0.58 −0.96	0.22 0.93	0.78 −0.14
Уреаза	0.95 −0.98	0.996 0.92	−0.97 0.97	−0.99 −0.89	0.32 −0.11	0.99 0.80	0.99 −0.84	0.59 0.99	0.29 −0.31	−0.84 −0.23
Протеаза	−0.96 0.17	−0.14 0.15	0.98 −0.22	0.35 −0.23	−0.35 −0.998	−0.38 −0.78	−0.99 −0.58	−0.92 −0.34	−0.26 −0.96	−0.33 −0.89
Инвертаза	−0.69 0.65	0.996 −0.1	0.65 −0.62	−0.95 0.02	−0.99 0.69	0.94 −0.91	−0.56 −0.998	0.44 −0.56	0.74 0.82	−0.92 −0.74

Примечание. Р – ризосфера, М – междурядье.

Микробиомы исследуемых почв под кедровыми соснами отличались качественно и количественно. На их формирование достоверно влияли тип почв (географическое расположение), физико-химические параметры, биохимические и респирометрические свойства почв, видовая принадлежность (корневые выделения) кедровых сосен. Основными типами бактерий в обоих типах почв были *Acidobacteria, Proteobacteria* и *Actinobacteria*, совместно составляющие в зависимости от почвы 75–85% общего числа типоспецифичных последовательностей генов 16S рРНК.

Размеры и таксономическое богатство микробных сообществ тесно связаны с количеством и качеством органического вещества, содержанием $C_{орг}$ и N. В серой лесной почве под посадками всех климатипов кедровых сосен формировалось большее по численности, а в бурой лесной почве –

большее родовое/видовое разнообразие прокариот. В зоне ризосферы *P. koraiensis* формировалось значительное содержание азотфиксаторов (ризобактерий) (*Proteobacteria)*, актинобактерий (*Actinobacteria*), планктомицетов (*Planctomycetes*), цианобактерий (*Cyanobacteria*), а под *P. sibirica* – больше представителей фил *Firmicutes, Bacterioidetes* и *Gemmatimonadetes* (в серой лесной почве), *Latescibacteria, Nitrospirae* и *Chloroflexi* (в бурой лесной почве).

На наш взгляд, сосна корейская, активно растущая, как в привычных для нее условиях Хабаровского края, так и при интродукции в Красноярском крае, стимулирует развитие азотфиксаторов и трансформацию азота более интенсивно, чем сосна сибирская. Для популяции сосны сибирской лучшие условия произрастания отмечены в природном местообитании (Красноярский край). На систематически затопляемых участках бурой лесной почвы Хабаровского края ермаковская популяция *P. sibirica* находится в угнетенном состоянии. Индикаторами неблагоприятных условий для роста географических культур кедровых сосен, причиной их заболеваний могут служить повышенная численность, особенно в ризосфере, ацидофильных (*Acidobacteria*) и почкующихся бактерий класса *Ktedonobacteria* (*Chloroflexi*), а также *Latescibacteria* и *Nitrospirae*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-01671).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алексанов В.В. Методы изучения биологического разнообразия. Калуга: ГБУ ДО КО ОЭБЦ, 2017. 70 с.

Ананьева Н.Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003. 222 с.

Гродницкая И.Д., Кузнецова Г.В., Антонов Г.И., Кондакова О.Э. Влияние географических культур кедровых сосен (*Pinus sibirica Du Tour* и *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) на биологические свойства почвы на юге Красноярского края // Лесоведение. 2016. № 2. С. 135–147.

Гулько А.Е., Хазиев Ф.Х. Фенолоксидазы почв: продуцирование, иммобилизация, активность // Почвоведение. 1992. № 11. С. 55–67.

Ирошников А.И. Географические культуры хвойных в Южной Сибири // Географические культуры и плантации хвойных в Сибири / Ред. Минина Е.Г., Ирошников А.И. Новосибирск: Наука, 1977. С. 104–110.

Классификация и диагностика почв СССР / Ред. Егоров В.В., Иванова Е.Н., Фридланд В.М. М.: Колос, 1977. 225 с.

Классификация и диагностика почв России / Ред. Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.

Количественные методы экологии и гидробиологии (сборник научных трудов, посвященный памяти А.И. Баканова) / Отв. ред. Розенберг Г.С. Тольятти: СамНЦ РАН, 2005. 404 с.

Кузнецова Г.В. Рост, состояние и развитие кедровых сосен в географических культурах на юге Красноярского края // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. 27. № 1–2. С. 102–107.

Кузнецова Г.В., Грек В.С. Адаптация кедровых сосен (*Pinus sibirica* Du Tour и *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) к различным экологическим факторам в местах их тестирования // Сиб. лес. журн. 2016. № 5. С. 63–71.

Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.

Методы оценки структуры, функционирования и разнообразия детритных пищевых сетей. Методическое руководство / Под ред. Покаржевского А.Д., Гонгальского К.Б., Зайцева А.С. М.: Ин-т проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 2003. 100 с.

Наумова Н.Б., Аликина Т.Ю., Кузнецова Г.В. Биоразнообразие бактериальных ансамблей в буроземе, элювиированном под сосной корейской // Почвы и окружающая среда. 2018. Т. 1. № 3. С. 151–168.

Першина Е.В., Иванова Е.А., Нагиева А.Г., Жиенгалиев А.Т., Чирак Е.Л., Андронов Е.Е., Сергалиев Н.Х. Сравнительный анализ микробиомов природных и антропогенно-нарушенных почв северо-западного Казахстана // Почвоведение. 2016. № 6. С. 720–732.

Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.

Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Кутовая О.В. Оценка различных индексов разнообразия для характеристики почвенного прокариотного сообщества по данным метагеномного анализа // Почвоведение. 2015. № 4. С. 462–468.

Штейникова В.И., Ковалева Г.Ф. Морфобиологические особенности кедра сибирского и кедра корейского различного географического происхождения в горных лесах Хабаровского края // Тр. ДальНИИ лесн. хоз-ва. Хабаровск, 1982. Вып. 24. С. 112–119.

Anderson J.P.E., Domsch K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // Soil Biol. Biochem. 1978. V. 10. № 3. P. 314–322.

Anderson T.H., Domsch K.H. Application of eco-physiological quotients qCO_2 and qD on microbial biomass from soils of different cropping histories // Soil Biol. Biochem. 1990. V. 22. P. 251–255.

Bates S., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // ISME J. 2011. V. 5. P. 908–917.

Hansson K., Olsson B.A., Olsson M., Johansson U., Kleja D.B. Differences in soil properties in adjacent stands of Scots pine, Norway spruce and silver birch in SW Sweden // For. Ecol. Manag. 2011. V. 262. № 3. P. 522–530.

Hobbie S., Oleksyn J., Eissenstat D., Reich P. Fine root decomposition rates do not mirror those of leaf litter among temperate tree species // Oecologia. 2010. V. 162. P. 505–513.

Kakirde K.S., Parsley L.C., Liles M.R. Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 1911–1923.

Oton E.V., Quince C., Nicol1 G.W., Prosser J.I., Gubry-Rangin C. Phylogenetic congruence and ecological coherence in terrestrial *Thaumarchaeota* // ISME J. 2016. V. 10. P. 85–96.

Pinos S., Pontarotti P., Raoult D., Baudoin J.P., Pagnier I. Compartmentalization in PVC superphylum: evolution and impact // Biol. Direct. 2016. 11:38. P. 1–12. https://doi.org/10.1186/s13062-016-0144-3

Pilhofer M., Rappl K., Eckl C., Bauer A.P., Ludwig W., Schleifer K.H., Petroni G. Characterization and evolution of cell division and cell wall synthesis genes in the bacterial phyla *Verrucomicrobia, Lentisphaerae, Chlamydiae*, and *Planctomycetes* and phylogenetic comparison with rRNA genes // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 9. P. 3192–3202.

Raich J.W., Schlesinger W.H. The global carbon dioxide flux in soil respiration and relationship to vegetation and climate // Tellus B. 1992. V. 44. P. 81–99.

Sarathchandra S.U., Perrott K.W., Liter R.A. Soil microbial biomass: Influence of simulated temperature changes on size, activity and nutrient-content // Soil Biol. Boichem. 1989. V. 21. № 8. P. 987–993.

Singh K.P., Shekhar C. Seasonal pattern of total soil respiration, its fractionation and carbon balance in a wheat-maize rotation cropland at Varanasi // Pedobiologia. 1986. V. 29. P. 305–318.

Sparling G.T. The substrate-induced respiration method / Eds Alef K., Nannipieri P. // Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Acad. Press, London.1995. P. 397–404.

Stieglmeier M., Klingl A., Alves R.J., Rittmann S.K., Melcher M., Leisch N., Schleper C. Nitrososphaera viennensis gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota* // Intern. J. Systematic Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 2738–2752.

Youssef N.H., Farag I.F., Rinke C., Hallam S.J., Woyke T., Elshahed M.S. In Silico Analysis of the Metabolic Potential and Niche Specialization of Candidate Phylum "*Latescibacteria*" (WS3) // PloS One. 2015. V. 10(6). P. 1–21. e0127499. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127499

van Kessel M.A.H.J., Speth D.R., Albertsen M., Nielsen P.H., Camp H.J.M.O., Kartal B., Jetten M.S.M., Lücker S. Complete nitrification by a single microorganism // Nature. 2015. 528(7583): 555–9. https://doi.org/10.1038/nature16459

Weber P., Bardgett R.D. Influence of single trees on spatial and temporal patterns of belowground properties in native pine forest // Soil. Biol. Biochem. 2011. V. 43. № 6. P. 1372–1378.

World Reference Base for Soil Resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps // World Soil Res. Rep. № 106. Update 2015. FAO, Rome. www.fao.org

Zhao Q., Zeng D.H., Fan Z.-P. Nitrogen and phosphorus transformations in the rhizospheres of three tree species in a nutrient-poor sandy soil // Appl. Soil Ecol. 2010. V. 46. № 3. P. 341–346.

Features of the Microbiomes Formation in two Types of Soils under Pine Provenance Trials *Pinus sibirica* Du Tour and *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.

I. D. Grodnitskaya[1, #], G. V. Kuznetsova[1], O. E. Pashkeeva[1], and G. I. Antonov[1]

[1]*Sukachev Forest Institute SB RAS, Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

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

The influence of the pine provenance trials *Pinus sibirica* Du Tour, *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc., created in the Krasnoyarsk and Khabarovsk Territories, on chemical and biological parameters of gray forest and brown forest soils in the rhizosphere and between rows of plantings, is compared. It is shown that interspecific heterogeneity of pines influenced the chemical composition of the soil, enzymatic and microbiological activity, and the formation of prokaryotic microbiomes. It is noted that the biodiversity of prokaryotes is more determined by the typical features of the soil than by the inter- and intraspecific heterogeneity of pines and the influence of their roots. The phyla *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, and *Actinobacteria* dominate in both types of soils and together account for 75–85% of the total number of type-specific 16S rRNA gene sequences in each soil.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 389–398

БОТАНИКА

УДК 574.42

ИСТОРИЯ РАСТИТЕЛЬНОСТИ БЛИЖНИХ ОСТРОВОВ АЛЕУТСКОЙ ГРЯДЫ В ГОЛОЦЕНЕ

© 2021 г. О. И. Смышляева*, @, Е. Э. Северова, Б. Ф. Хасанов*, О. А. Крылович*, Е. А. Кузьмичева*, А. Б. Савинецкий***

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

***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119191 Россия*

@E-mail: smyslyaevaol@gmail.com

Поступила в редакцию 24.08.2020 г.
После доработки 04.09.2020 г.
Принята к публикации 17.11.2020 г.

Реконструирована история формирования растительности торфяника Алкан Крик на острове Шемья (Ближние острова Алеутской гряды). На плоском острове, лишенном вулканов, ~7000 лет назад преобладала осоковая тундра, которая сменилась болотом с заметным участием *Sphagnum* и *Equisetum* в период максимального голоценового потепления 7000–5000 лет назад. Разнотравные осоково-злаковые луга сформировались на месте болота 4700 лет назад в результате локального изменения увлажнения. В результате похолодания и процессов выщелачивания ~ 3400 лет назад на острове стали преобладать вересковые тундры.

DOI: 10.31857/S1026347021040135

Исследования истории растительного покрова в голоцене необходимы для анализа путей его формирования, современного состояния и путей будущего развития, они дают ключи к пониманию возможного ответа растительности на глобальные климатические изменения. Основным методом исследований истории растительности в региональном масштабе был и остается спорово–пыльцевой анализ аллювиальных, озерных и болотных отложений. Подкрепленный данными об абсолютном возрасте образцов этот метод дает обоснованную картину изменения растительности и климата прошлого.

Данная работа проведена на Алеутских островах – архипелаге вулканического происхождения, протяженностью почти 2000 км от Аляски до Камчатки. Для выбранного региона характерны мягкие зимы, прохладное лето, небольшой перепад среднегодовых температур, частые туманы, сильная облачность и высокая влажность (Byers, 1959). Атмосферная циркуляция и климатические изменения определяются в регионе, в основном, динамикой Алеутского минимума – области низкого атмосферного давления в районе Алеутских островов (Rodionov *et al.*, 2007). Растительность островов лишена деревьев и может быть охарактеризована как арктическая тундра. Флора представлена преимущественно тихоокеанскими прибрежными видами, также многочисленны аркто-альпийские виды, распространенные циркумполярно (Hulten, 1968).

Историю растительности Алеутской гряды начали изучать в середине прошлого века, когда был проведен спорово-пыльцевой анализ погребенных почв на островах Танага и Уналашка (Anderson, Bank, 1952). Спектры почв с разных глубин показали, что в голоценовой истории о. Танага произошла как минимум одна смена растительных сообществ с вересковыми кустарничками на травяные сообщества. На данный момент изучены торфяники на островах Умнак (Heusser, 1973), Карлайл (Kuzmicheva *et al.*, 2019), Атка (Heusser, 1990), две колонки из торфяника на о. Адак (Heusser, 1978; Noguchi *et al.*, 2018), торфяник на о. Атту (Heusser, 1990) и на о. Беринга (Кирьянов и др., 1986). Обобщив полученные для разных частей гряды результаты, Хессер (Heusser, 1990) выдвинул предположение, что основным фактором, влиявшим на смены растительности в голоцене, был климат. При этом климатические закономерности могли отличаться в западной, центральной и восточной частях Алеутской гряды. Также Хессер (Heusser, 1990) обратил внимание на то, что выпадавшие в результате извержений вулканические пеплы незначительной толщины могли воздействовать на растительность, вызывая скорее изменения участия видов в сообществах, но не приводя к значительной смене их состава. Пеп-

Таблица 1. Полевое описание торфяника Алкан Крик (о. Шемья)

Глубина, см	Описание торфа
0–10	Современные растения
10–20	Дернина черная, плотная, переплетена корнями
20–80	Торф черный, очень плотный, плохо разложившийся
80–130	Горизонт торфянистый, гомогенный, желтоватый, с включениями глины; растительные остатки плохо разложившиеся
130–205	Горизонт торфянистый, однородный, бурый, насыщен плохо разложившимися растительными остатками, с включениями глины. Слой 130-140 см более серый, с большим количеством минеральной фракции. На глубине 165 см есть тонкая прослойка песка
205–250	Горизонт аналогичен предыдущему, с желтоватым оттенком, встречаются небольшие черные вертикальные пятна
250–260	Горизонт глинистый, очень плотный, серый, пластинчатый, содержит много растительных остатков: в горизонте встречаются линзы песка и голубой глины
260–264	Горизонт глиняный, буроватый, с вкраплениями голубой глины
264–270	Горизонт глинистый, желтый, неоднородный, железистый, с включениями щебенки

лы, выпадавшие в результате крупных извержений, могли практически полностью уничтожать растительные сообщества (Talbot *et al.*, 2010). Вулканическая активность на западных островах в голоцене, предположительно, была слабее, чем в остальной части архипелага.

В данной работе для реконструкции динамики растительности западной части Алеутских островов был выбран плоский о. Шемья (Ближние Алеутские острова), лишенный вулканов. В отобранной для спорово-пыльцевого анализа колонке из торфяника Алкан Крик отсутствовали заметные пепловые слои, что позволило проследить независимое от вулканических извержений влияние климатических фаз на растительные сообщества острова в голоцене.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Остров Шемья (Ближние острова) представляет собой плоский, лишенный вулканов остров, расположенный на 52°43′27″ с.ш. и 174°07′08″ в.д., его длина составляет ~4.5 км, ширина – почти 7 км, а площадь – 15 км^2. Современная растительность острова, в основном, представлена сообществами двух типов (Киселева и др., 2002). Растительность с доминированием злаков, осок и значительным участием разнотравья можно встретить в долинах ручьев, низинах и на склонах различных экспозиций. Наибольшего разнообразия такие сообщества достигают на хорошо дренированных склонах южной экспозиции. Второй тип сообществ – мохово-кустарничковые со значительным участием вересковых (*Empetrum nigrum*, *Vaccinium vitis-idea*, *Linnea borealis*), а также злаков и осок – встречается в разнообразных местообитаниях (Киселева и др., 2002). Кроме этих двух типов, на холмах недалеко от берега моря можно встретить сомкнутую растительность лугового типа с доминированием *Elymus arenarius*, *Heracleum lanatum* и *Senecio pseudo-arnica* (Savinetrsky *et al.*, 2010). В условиях переувлажнения доминантами растительных сообществ являются осоки (Киселева и др., 2002).

В 1994 г. в рамках работы WAASP (Западно-Алеутский археологический и палеоэкологический проект) была отобрана колонка из торфяника Алкан Крик глубиной 270 см (рис. 1, табл. 1), слоями толщиной 10 см. Торфяник расположен в долине ручья, в северо-западной части острова, в 750 м от берега моря, на высоте 35 м н. у. м. (Savinetsky *et al.*, 2010). Для определения возраста и скорости накопления отложения на радиоуглеродное датирование были отобраны растительные остатки из пяти слоев (табл. 2). Образцы обрабатывали по методике, описанной в работе Киселевой с соавт. (Киселева и др., 2002). Датирование проводили сцинтилляционным методом в лаборатории исторической экологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова. Радиоуглеродные даты были откалиброваны для определения календарного возраста и построения модели роста отложения (рис. 2) в пакете “Bchron” 4.2.6 (Parnell, 2015) в статистической среде R v. 3.6.2 (R Core Team, 2019) с использованием “наземной” калибровочной кривой “IntCal13” (Reimer *et al.*, 2013). Детали и математический аппарат, используемый в пакете, можно найти в работе Хаслетта и Парнелла (Haslett, Parnell, 2008). Ниже указаны калиброванные даты.

Для спорово-пыльцевого анализа было отобрано 28 образцов объемом 1 см^3 из слоев толщиной 10 см. Химическая обработка проб включала

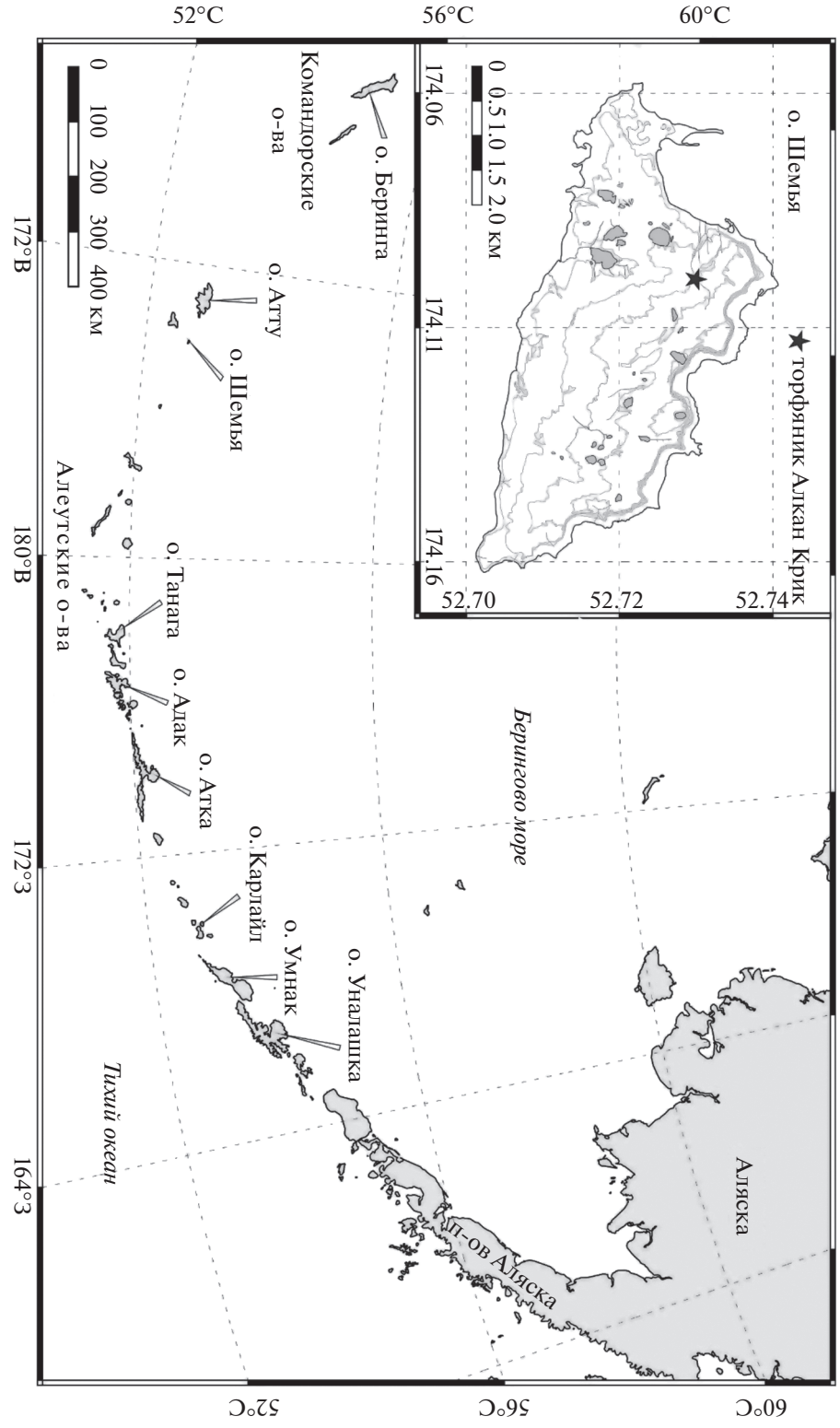

Рис. 1. Карта района исследований. Алеутские острова. На врезке изображен остров Шемья, знаком отмечен торфяник Алкан Крик.

Таблица 2. Радиоуглеродные датировки торфяника Алкан Крик (остров Шемья)

Лабораторный номер	Глубина, см	Радиоуглеродный возраст, л. н.	Калиброванный возраст, л. н.	
			медиана*	медиана ± 2σ
ИЭМЭЖ-1199	20–30	562 ± 83	830	570–1900
ИЭМЭЖ -1201	80–90	3221 ± 75	3620	3340–4260
ИЭМЭЖ -1200	130–140	4396 ± 198	5350	4700–6350
ИЭМЭЖ -1202 & 1204	200–210	7562 ± 104	8425	8190–8810
ИЭМЭЖ -1203	250–260	7924 ± 320	9365	8735–10755

Примечание. * Медиана и разброс указаны для середин глубин датированных образцов по данным модели роста отложения, построенной в пакете Bchron (Parnell, 2015).

в себя кипячение в 10%-ной HCl, 10%-ном KOH, промывку через сито, ацетолиз по стандартной методике (Faegri, Iversen, 1975) с некоторыми модификациями (Chambers *et al.*, 2011). Для определения концентрации пыльцы и спор в процессе химической обработки добавляли специальные маркеры (Stockmarr, 1973). В каждый образец было добавлено по две таблетки спор *Lycopodium clavatum* из партии № 483216. Определение пыльцы и спор проводили с помощью атласов и ключей (Reille, 1998, 1999), электронных баз данных пыльцевых типов (https://globalpollenproject.org). Несмотря на наличие соответствующих определительных ключей (Warner, Chinnappa, 1986; Sarwar, Takahashi, 2014), пыльца Ericaceae была определена до уровня семейства, поскольку родовые особенности типов не всегда были различимы. Пыльца была посчитана под световым микроскопом Axioskop ZEISS с увеличением ×400, как минимум до 500 пыльцевых зерен в тех образцах, где это было возможно. Процентное соотношение пыльцевых зерен было рассчитано от суммы всей

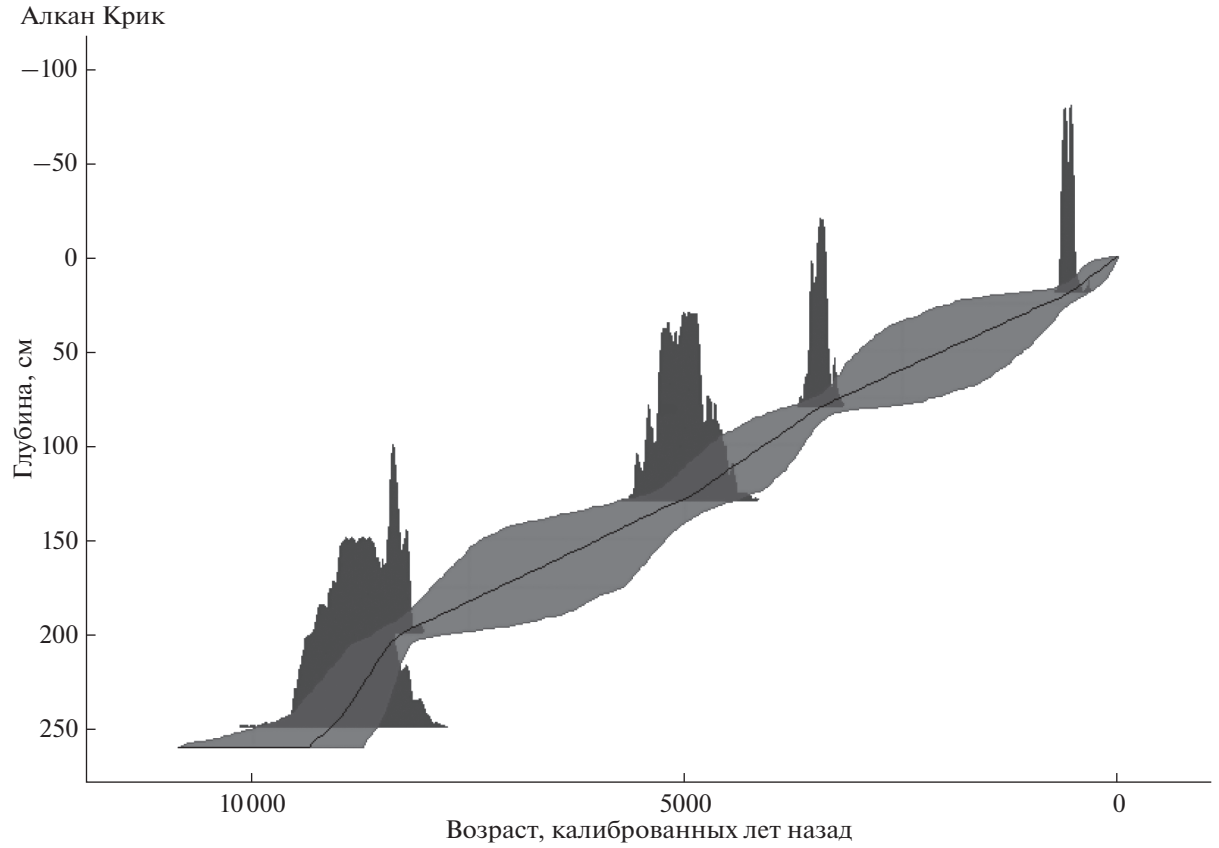

Рис. 2. Модель скорости роста торфяника Алкан Крик. Темно-серый цвет – калиброванные даты, серый цвет – 95% доверительный интервал хронологии.

пыльцы в образце, а процентное соотношение спор от суммы пыльцевых зерен и спор в образце. Для построения спорово-пыльцевых диаграмм была использована программа Tilia software v.2.0.41 (Grimm, 2015). Пыльцевые зоны были выделены с помощью стратиграфически ограниченного кластерного анализа (CONISS) (Grimm, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Торфяник Алкан Крик начал формироваться ~9500 лет назад (рис. 2, табл. 2). Средняя скорость накопления – 0.27 мм/год. Отложение накапливалось относительно равномерно на протяжении всего времени. Только в начальный период формирования отложения 9200–8300 лет назад (250–200 см) торф накапливался несколько быстрее – средняя скорость накопления в это время составила 0.56 мм/год.

В результате спорово-пыльцевого анализа в отложении было выявлено 34 типа пыльцы и спор: 6 древесных палинотипов (“деревья и кустарники”), 21 травянистый палинотип (“травы”), 7 типов спор (рис. 3, рис. 4). Основные доминирующие таксоны – Ericaceae (вересковые), Cyperaceae (осоки), Poaceae (злаки). Участие Ericaceae варьировалось в пределах от единичных зерен до 88.4%, Cyperaceae – от 0.5 до 72.3%, Poaceae от 0.9 до 62.5% (рис. 3). Общая концентрация пыльцевых зерен в образце варьировала от 30424 до 795972 п. з. (пыльцевых зерен)/см^3 (рис. 4).

В самом основании торфяника, в двух первых образцах (~9500 лет назад) в спектрах доминировала пыльца Asteraceae (сложноцветные, 26.1%), Cyperaceae (25.2%), Poaceae (21.4%), а также споры *Lycopodium annotinum* (20.8%). Значение общей концентрации пыльцы – 35 642 п. з./см^3.

В выделенной кластерным анализом зоне от 9500 до 4700 лет назад (AlCr-1a, 270–120 см) в процентном соотношении доминировала пыльца Cyperaceae – в среднем, 45.0% (максимальное значение концентрации – 200972 п. з./см^3). Второй по обилию пыльцевой тип – Ericaceae (рис. 3, 4), содержание которого составляет, в среднем, 17.6%. При этом разброс концентрации пыльцы Ericaceae в данной части составлял от 1355 до 106900 п. з./см^3. Среднее содержание пыльцы Poaceae составляет 12.4%, концентрация варьирует от 3708 п. з./см^3 (6700 лет назад) до 346882 п. з./см^3 (4700 лет назад). Концентрации пыльцы *Betula* и *Alnus* имеют наиболее высокие значения концентрации в пределах этой зоны – до 4478 п. з./см^3 8400 лет назад и 5033 п. з./см^3 9200 лет назад соответственно. Около 8700 лет назад в спектрах появляются единичные споры *Equisetum*, концентрация которых достигает 3192 п. з./см^3, 6500–6000 лет назад, а затем 5600 лет назад падает до нуля. Споры *Sphagnum* появляются в спектре ~8300 лет назад, увеличивают свое участие до 6.0% 6500–6000 лет назад, а затем практически исчезают из спектра ~5100 лет назад. В период 7800–5100 лет назад отмечено появление неопределенного палинотипа (безапертурные пыльцевые зерна с сетчатой скульптурой поверхности), содержание которого достигает 16.9% (5100 лет назад). Среди растений Алеутских островов (Hulten, 1968) такая пыльца может принадлежать растениям из родов *Triglochin* или *Potamogeton*.

Около 4700 лет назад (зона AlCr-1b, 120–80 см, 4700–3400 лет назад) в составе спорово-пыльцевых спектров увеличивается процент участия пыльцы Poaceae, а пыльцевые зерна Ericaceae единичны (рис. 3, 4). Концентрация пыльцы Apiaceae, Poaceae и *Fritilaria* возрастает до 74332, 485911 и 3097 п. з./см^3 соответственно. Концентрация пыльцы *Ranunculus*-type резко увеличивается до 145566 п. з./см^3, к концу зоны (3400 лет назад) снижается до 7585 п. з./см^3, затем исчезает. Изменения концентрации пыльцы 5100–3400 лет назад – 481641–795972 п. з./см^3, значения максимальны для всего отложения. Споры *Lycopodium annotinum* и пыльца Asteraceae на верхней границе зоны AlCr-1b (3400 лет назад, 80 см) практически исчезают из состава спектра.

Пыльца Ericaceae в процентном соотношении начинает преобладать 3400 лет назад (зона AlCr-2, 3400–0 лет назад, 80–0 см) совместно с пыльцой Cyperaceae. При этом концентрация пыльцы осоковых сильно снизилась (рис. 4) по сравнению с предыдущей зоной (до 2549–26346 п. з./см^3). Концентрация пыльцы Ericaceae максимальна ~3400 лет назад – 252577 п. з./см^3, затем постепенно снижается к поверхности до 42475 п. з./см^3. На протяжении зоны AlCr-2 резко снижается общая концентрациия пыльцы – от 53541 до 261505 п. з./см^3. Содержание пыльцы Poaceae, в среднем, составляет 5.1%, за исключением самого верхнего образца, где она достигает 16.4%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Торфяник Алкан Крик начал формироваться в глубине острова Шемья ~9500 лет назад (рис. 1, 2). В это время растительные сообщества, преимущественно, были представлены разнотравно-осоковой тундрой с участием вересковых кустарничков (рис. 3). Злаково-осоковые и разнотравно-осоковые тундры на Алеутских островах распространены в более защищенных от действия ветра условиях, часто слабо дренированных (Heusser, 1973; Jordan, Krumhard, 2003). В состав первичных растительных сообществ других островов архипелага входили зонтичные и плауны, как и на о. Шемья (Heusser, 1973, 1978, 1990; Kuzmicheva *et al.*, 2019). При этом различие доминантов первич-

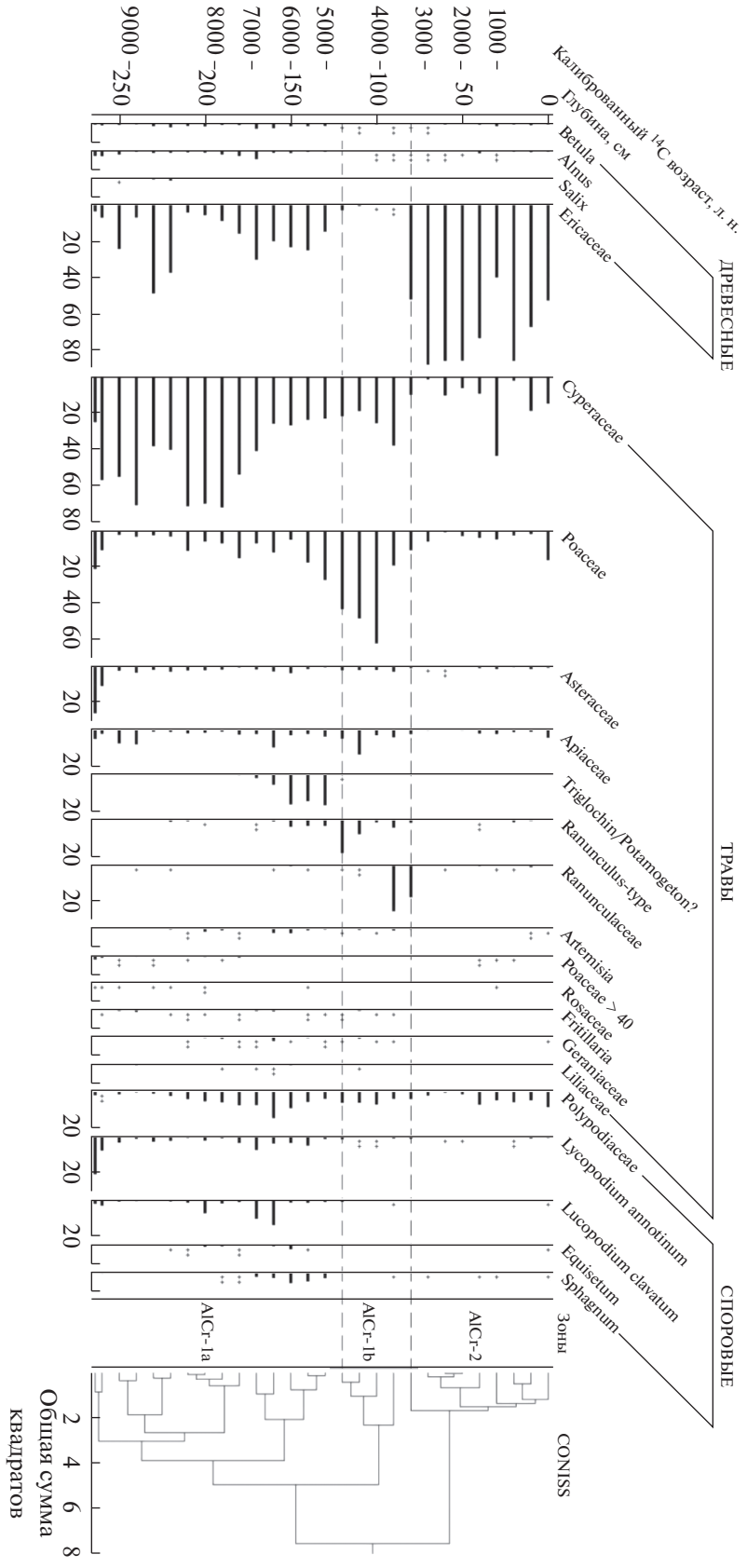

Рис. 3. Сокращенная процентная спорово-пыльцевая диаграмма торфяника Алкан Крик. AlCr-1a, AlCr-1b, AlCr-2 – пыльцевые зоны, выделенные на основании CONISS. Знаками + и ++ отмечены единично встретившиеся пыльцевые зерна.

ных сообществ могли быть значительными, а состав зависел скорее от локальных условий формирования, чем климатической обстановки. На о. Умнак первичные сообщества были представлены сильно переувлажненными осоковыми тундрами (Heusser, 1973). На о. Адак также преобладали осоки, но локальные условия, вероятно, были более сухими (Heusser, 1978). Спорово-пыльцевые спектры острова Атка сходны со спектрами торфяника Алкан Крик, но в растительности о. Атка доминировали злаковые, что также отражает более сухие локальные условия (Heusser, 1990). На близком к острову Шемья о. Атту (Heusser, 1990) первичные сообщества были представлены разнотравьем с высоким участие зонтичных (Apiaceae) и сложноцветных (Asteraceae), которое формировалось в более защищенных от ветра условиях. На Алеутских островах, практически лишенных в голоцене наземных хищников, преобладание в спорово-пыльцевых спектрах зонтичных и сложноцветных может означать наличие рядом с торфяником крупной колонии морских птиц, поскольку отдельные виды этих семейств предпочитают богатые азотом субстраты (Kuzmicheva *et al.*, 2019). Спектры первых сукцессионых стадий о. Карлайл заметно отличаются доминированием вересковых в связи с формированием растительности в условиях сильного воздействия ветра непосредственно в прибрежной зоне (Kuzmicheva *et al.*, 2019). Аналогичные им современные сообщества можно также встретить на морском берегу или высоко на склонах (Heusser, 1990; Jordan, Krumhardt, 2003). Можно предположить, что локальные условия местообитаний, степень защищенности от ветра, дренированности и аэрированности субстрата, а также наличие птичьих колоний в совокупности определяли внешний облик и состав доминантов первичных растительных сообществ.

Около 7000 лет назад разнотравно-осоковая тундра с участием вересковых кустарничков на о. Шемья заметно заболачивается (рис. 3). Индикаторами интенсивного увлажнения служат споры *Equisetum* (Galka *et al.*, 2018) и сфагновых мхов (Jordan, Krumhardt, 2003). Безапертурная пыльца, которая может принадлежать растениям родов *Potamogeton* или *Triglochin* (рис. 3, 4), также является индикатором местообитаний с избыточным увлажнением (Hulten, 1968). Период 7000–5000 лет назад для региона Берингова моря считается температурным максимумом голоцена (Kaufman *et al.*, 2016), после чего температура постепенно понижается. В течение голоцена, в болотах арктической Аляски *Sphagnum* имел высокое участие в составе растительности в относительно более теплые климатические фазы (Galka *et al.*, 2018). Можно предположить, что экспансия сфагновых мхов, способных удерживать большое количество влаги, привела к формированию на месте влажной тундры осокового болота. Эта тенденция хорошо прослеживается при

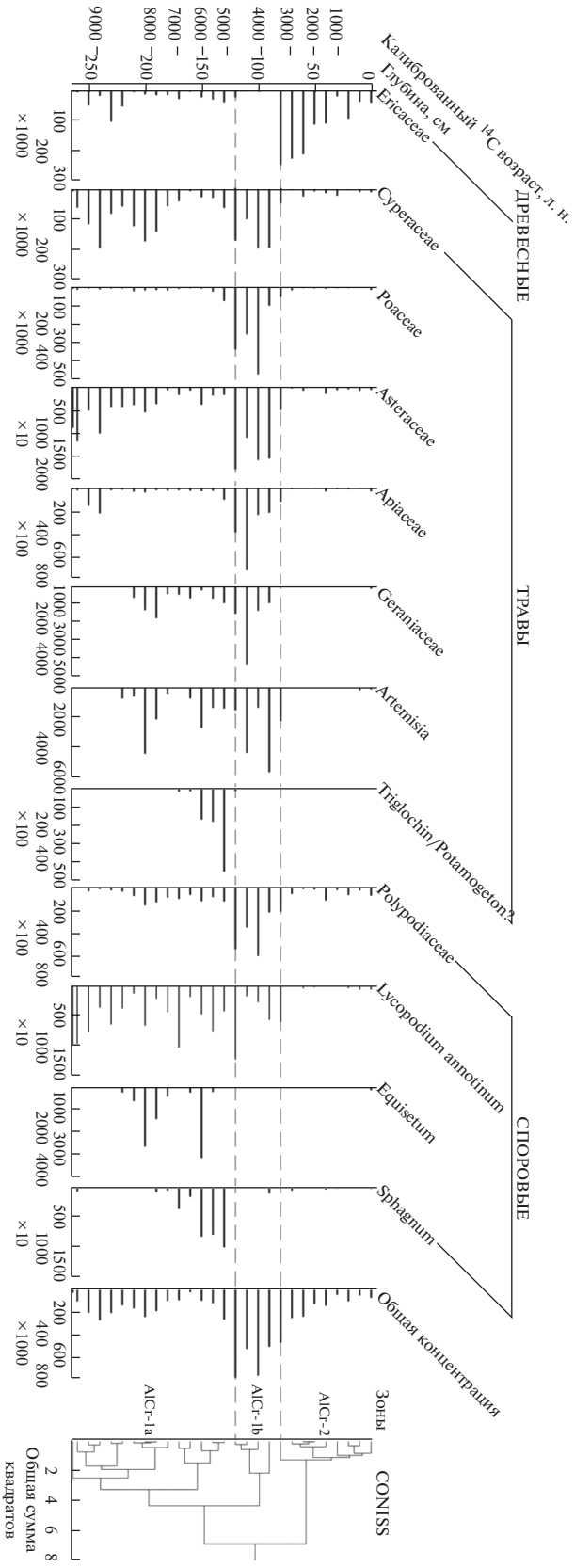

Рис. 4. Сокращенная диаграмма изменения концентрации пыльцевых зерен и спор торфяника Алкан Крик (п.з./см^3). AlCr-1a, AlCr-1b, AlCr-2 – пыльцевые зоны, выделенные на основании CONISS.

анализе спорово-пыльцевого спектра о. Атту (Heusser, 1990), где 7000 лет назад также происходит заболачивание тундры благодаря участию *Sphagnum* (Heusser, 1990). Таким образом, к локальному увеличению увлажнения сообществ на Алеутских островах могли приводить не только периоды увеличения влажности в регионе, но и продолжительные периоды потепления за счет увеличения участия сфагновых мхов.

Около 4700 лет назад в ответ на наступившее за температурным максимумом похолодание *Sphagnum* исчезает из спектров, и осоковое болото зарастает разнотравными осоково-злаковыми лугами (рис. 3). На о. Атту (Heusser, 1990) также произошла смена переувлажненного осокового болота со *Sphagnum* на разнотравно-злаковые луга, но почти на тысячу лет раньше – 5500 лет назад. Несинхронность смен растительности на соседнем с о. Шемья острове можно связать с гористым рельефом о. Атту и наличием в отложении пепловых прослоек. На островах Адак, Атка, Карлайл и Умнак подобных смен растительности в ответ на последовавшее за максимумом температур похолодание не наблюдается (Heusser, 1973, 1978, 1990; Kuzmicheva *et al.*, 2019). Изменения растительных сообществ на этих островах могли быть в большей степени обусловлены влиянием выпадавших вулканических пеплов.

Период 4700–3400 лет назад характеризуется максимальными значениями концентрации пыльцы в торфянике Алкан Крик (рис. 4). При этом увеличение концентрации пыльцы не могло быть связано с особенностями формирования отложения, поскольку, по данным модели роста (рис. 2), на протяжении почти всей истории, торф накапливался равномерно. Этот период характеризуется постепенным снижением температур, последовавшим за голоценовым максимумом (Kaufman *et al.*, 2016). При этом для центральной и восточной частей Алеутских островов реконструированы относительно более сухие периоды 4000–2700 и 5000–3500 лет назад соответственно (Jones *et al.*, 2009; Krawiec, Kaufman, 2014). Можно было бы предположить, что в фазу похолодания более сухие условия на океанических островах с большой облачностью были благоприятными для увеличения продуктивности многих травянистых таксонов, но ни на одном из изученных островов не отмечено повышения концентраций пыльцы в данный период времени. Вероятно, значения концентрации пыльцы оказались чувствительны к вулканическим извержениям, имевшим разное влияние на растительность вдоль всей Алеутской гряды в голоцене (Heusser, 1990). Выпадение в результате извержений пепловых прослоек разной толщины и химического состава могло приводить как к полному уничтожению растительности, так и к заметным сукцессионным сменам сообществ (Нешатаева, 2009), не позволяющим проследить влияние климата.

Около 3400 лет назад разнотравные осоково-злаковые луга достаточно резко сменяются сообществами с доминированием вересковых кустарничков (рис. 3, 4). Значения общей концентрации пыльцы и многих пыльцевых типов, за исключением Ericaceae, снижаются практически до нуля. Также постепенно снижается таксономическое разнообразие. Исходя из современного распространения реконструированных сообществ, можно предположить, что к смене сообществ могли привести похолодание, заметное усиление ветровой активности, общее уменьшение влажности в регионе или локальное изменение гидрологического режима. Возможно также взаимодействие всех выше перечисленных причин. Заметное похолодание началось в регионе Берингова моря, по разным данным, от 4000 до 3000 лет назад (Black, 1976, 1981; Thorson, Hamilton, 1986; Jordan, Krumhardt, 2003). Усиление штормовой активности (Jordan, Krumhardt, 2003) также могло способствовать доминированию вересковых кустарничков, более приспособленных к условиям сильного воздействия ветра (Heusser, 1978). На о. Атту ~3000 лет назад также наблюдается заметный пик участия вересковых кустарничка *Empetrum nigrum* (Heusser, 1990), который образует сообщества на продуваемых хорошо дренированных склонах и в других регионах (Бреслина, 1987; Bunting, 1994). На других островах Алеутской гряды, растительность которых была подвержена более заметному влиянию вулканических извержений (Heusser, 1973, 1978, 1990), не происходило смены травяных сообществ на кустарничковые в связи с заметным похолоданием 4000–3000 лет назад.

Смену травяных сообществ кустарничковыми можно объяснить не только климатическими факторами. На океанических островах в силу избыточного увлажнения идет интенсивный процесс выщелачивания и вымывания почв и торфа (Birks, Peglar, 1979). Подобные процессы наблюдаются на Шетландских (Bunting, 1994) и Фарерских островах (Lawson *et al.*, 2005). В условиях недостатка минерального питания вересковые кустарнички получают конкурентное преимущество по сравнению с травянистыми видами растений, благодаря эрикоидной микоризе (Макаров, 2019). Можно предположить, что на о. Шемья травяные сообщества сменяются кустарничковыми с доминированием вересковых в результате постепенного выщелачивания торфяника Алкан Крик в условиях океанического климата. На о. Адак (Heusser, 1978; Noguchi *et al.*, 2018) вересковые также могли стать доминантами в силу схожих процессов выщелачивания, а не в ответ на более сухие условия (Vaillencourt, 2013). Похожая смена травяных сообществ на вересковые происходила на острове Атту (Heusser, 1990), который, как и о. Шемья, от-

носится к западной части гряды. На острове Атту Ericaceae начинают играть существенную роль в составе спорово-пыльцевых спектров 6200 лет назад, что также может быть связано с гористым рельефом острова и более сильным воздействием ветра, а ~3000 лет назад их участие в составе спектров заметно возрастает (Heusser, 1990). Климатические факторы и интенсивное выщелачивание в условиях избыточного увлажнения могли влиять на растительность Алеутских островов в голоцене совместно.

Таким образом, на основании результатов спорово-пыльцевого анализа торфяника Алкан Крик была реконструирована история растительности острова Шемья (Ближние Алеутские острова). Торфяник формировался со средней скоростью накопления 0.27 мм/год. Период относительно более высокой скорости накопления отмечен 9200–8300 лет назад (0.56 мм/год). Около 9500 лет назад в защищенных от ветра и слабо дренированных условиях на острове преобладала разнотравно-осоковая тундра с участием вересковых кустарничков. В результате заметного потепления 7000 лет назад в растительных сообществах увеличилось участие *Sphagnum*. Сфагновые мхи, благодаря своей способности удерживать влагу, сформировали на месте влажной тундры условия для возникновения осокового болота с участием *Equisetum*. В ответ на последовавшее похолодание, ~4700 лет назад *Sphagnum* исчез из спорово-пыльцевых спектров, а на месте болота в более сухих условиях образовались разнотравные осоково-злаковые луга. Период 4700–3400 лет назад, отличавшийся сухим климатом и более низкой штормовой активностью, характеризуется максимальными значениями концентрации пыльцы в торфянике Алкан Крик. Около 3400 лет назад травяные сообщества на острове Шемья сменились сообществами с доминированием вересковых кустарничков, что могло быть связано с фазой похолодания в регионе Берингова моря, начавшейся ~3000 лет назад.

Авторы выражают благодарность Дикси Вест за организацию и совместное участие в экспедиции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 19-34-90071, 18-04-00782 А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бреслина И.П. Растения и водоплавающие птицы морских островов Кольской Субарктики. Л.: Изд-во" Наука", 1987. 200 с.

Кирьянов В.Ю., Егорова И.А., Литасова С.Н. Вулканические пеплы на острове Беринга (Командорские острова) от голоценовых извержений Камчатки // Вулк. и сейсм. 1986. № 6. С. 18–28.

Киселева Н.К., Савинецкий А.Б., Хасанов Б.Ф. Развитие природных процессов на о Шемья в голоцене // Изв. РАН, сер. Геогр. 2002. Т. 1. С. 97.

Макаров М.И. Роль микоризы в трансформации соединений азота в почве и в азотном питании растений (обзор) // Почв. 2019. №. 2. С. 220–233.

Нешатаева В.Ю. Растительность полуострова Камчатка. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. 537 с.

Anderson S.T., Bank T.P. Pollen and radiocarbon studies of Aleutian soil profiles //Sci. 1952. V. 116. № 3004. P. 84–86.

Birks H.J.B., Peglar S.M. Interglacial pollen spectra from Sel Ayre, Shetland // New Phytol. 1979. V. 83. № 2. P. 559–575.

Black L.T. Volcanism as a factor in human ecology: the Aleutian case // Ethnohistory. 1981. P. 313–340.

Black R.F. Geology of Umnak Island, eastern Aleutian Islands as related to the Aleuts // Arct. Antarct. Alp. Res. 1976. V. 8. № 1. P. 7–35.

Bunting M.J. Vegetation history of Orkney, Scotland; pollen records from two small basins in west Mainland // New Phytolt. 1994. V. 128. № 4. P. 771–792.

Byers F.M. Investigations on Alaska volcanoes: Geology of Umnak and Bogoslov Islands, Aleutian Islands, Alaska // Geol. Soc. Am. Bull. 1959. 267–369.

Chambers F.M., van Geel B., van der Linden M. Considerations for the preparation of peat samples for palynology, and for countin of pollen and non-pollen palynomorphs // Mires and Peat. 2011. V. 7. P. 1–14.

Faegri K., Iversen J. Textbook of pollen analysis. // Munksgaard, Copenhagen. 1975. 295 p.

Gałka M., Swindles G.T., Szal M., Fulweber R., Feurdean A. Response of plant communities to climate change during the late Holocene: Palaeoecological insights from peatlands in the Alaskan Arctic // Ecol. Indic. 2018. V. 85. P. 525–536.

Grimm E.C. Tilia for windows: pollen spreadsheet and graphics program // Version. 2015. 2.41

Haslett J., Parnell A.C. A simple monotone process with application to radiocarbon-dated depth chronologies // J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat. 2008. V. 57. № 4. P. 399–418.

Heusser C.J. Postglacial vegetation on Adak Island, Aleutian Islands, Alaska // Bull. Torrey Bot. Club. 1978. P. 18–23.

Heusser C.J. Postglacial vegetation on Umnak Island, Aleutian Islands, Alaska // Rev. of Palaeobot. and Palyno. 1973. V. 15. № 4. P. 277–285.

Heusser C.J. Late Quaternary vegetation of the Aleutian Islands, southwestern Alaska // Can. J. Bot. 1990. V. 68. № 6. P. 1320–1326.

Hultén E. Flora of Alaska and neighboring territories: a manual of the vascular plants. – Stanford University Press, 1968. 1008 p.

Jones M.C., Peteet D.M., Kurdyla, D., Guilderson T. Climate and vegetation history from a 14.000-year peatland record, Kenai Peninsula, Alaska // Quaternary Res. 2009. P. 72. № 2. P. 207–217.

Jordan J.W., Krumhardt A. Postglacial climate and vegetation on the western Alaska Peninsula // Alaska J. Anthropol. 2003. V. 1. P. 16–33.

Kaufman D.S., Axford Y.L., Henderson A.C., McKay N.P., Oswald W.W., Saenger C., Anderson R.S., Bailey H.L.,

Clegg B., Gajewski K., Hu F.S., Jones M.C., Massa C., Routson C.C., Werner A., Wooller M.J., Yu Z. Holocene climate changes in eastern Beringia (NW North America)–A systematic review of multi-proxy evidence // Quat. Sci. Rev. 2016. V. 147. P. 312–339.

Krawiec A.C.L., Kaufman D.S. Holocene storminess inferred from sediments of two lakes on Adak Island, Alaska // Quaternary res. 2014. V. 82. № 1. P. 73–84.

Kuzmicheva E.A., Smyshlyaeva O.I., Vasyukov D.D., Khasanov B.F., Krylovich O.A., Okuno M., West D.L., Hatfield V.L., Savinetsky, A.B. A 7300-yr-old environmental history of seabird, human, and volcano impacts on Carlisle Island (the Islands of Four Mountains, eastern Aleutians, Alaska) // Quaternary Res. 2019. V. 91. № 3. P. 934–952.

Lawson I.T., Church M.J., McGovern T.H., Arge S.V., Woollet J., Edwards K.J., Gathorne-Hardy F.J., Dugmore A.J., Cook G., Mairs K.-A., Thomson A.M., Sveinbjarnardotti G. Historical ecology on Sandoy, Faroe Islands: palaeoenvironmental and archaeological perspectives // Hum. Ecol. 2005. V. 33. № 5. P. 651–684.

Noguchi M., Fujiki T., Okuno M., Gualtieri L., Hatfield V.L., Sarata B., Torii M., Wada K., Nakamura T., West D. Vegetation Changes around Haven Lake, Adak Island, Central Aleutians, Alaska, Determined from Pollen Analysis // Radiocarbon. 2018. V. 60. № 5. P. 1483–1492.

Parnell A. Bchron: Radiocarbon dating, age-depth modelling, relative sea level rate estimation, and non-parametric phase modelling. R package version 4.1. 1; 2015.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

Reille M. Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord: Supplement 2. – Marseille, 1998. 521 p.

Reille M. Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord: index. – Marseille, 1999. 535 p.

Reimer P.J., Bard E., Bayliss A., Beck J.W., Blackwell P.G., Ramsey C.B., Buck C.E., Cheng H., Edwards R.L., Friedrich M., Grootes P.M., Guilderson T.P., Haflidason H., Hajdas I., Hatte C., Heaton T.J., Hoffmann D.L., Hogg A.G., Hughen K.A., Kaiser K.F., Kromer B., Manning S.W., Niu M., Reimer R.W., Richards D.A., Scott E.M., Southon J.R., Staff R.A., Turney C.S.M., van der Plicht J. IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves 0–50.000 years cal BP // Radiocarbon. 2013. V. 55. № 4. P. 1869–1887.

Rodionov S.N., Bond N.A., Overland J.E. The Aleutian Low, storm tracks, and winter climate variability in the Bering Sea // Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2007. V. 54. № 23–26. P. 2560–2577.

Sarwar A.K.M., Takahashi H. Pollen morphology of the tribe Phyllodoceae (Ericoideae, Ericaceae) and its taxonomic significance // Bangl. J. Plant Taxon. 2014. V. 21. № 2. P. 129–137.

Savinetsky A.B., Kiseleva N.K., Khasanov B.F., Lefevre C., Corbett D. Paleoenvironment-Holocene Deposits from Shemya Island // The People at the End of the World: The Western Aleutians Project and the Archaeology of Shemya Island. Aurora Monograph Series. 2010. V. 7.

Stockmarr J. Determination of spore concentration with an electronic particle counter: Danmarks Geologiske Undersøgelse, 1973.

Talbot S.S., Talbot S.L., Walker L.R. Post-eruption legacy effects and their implications for long-term recovery of the vegetation on Kasatochi Island, Alaska // Arct. Antarct. Alp. Res. 2010. V. 42. № 3. P. 285–296.

Thorson R.M., Hamilton T.D. Glacial Geology of the Aleutian Islands: Based on the contributions of Robert F. Black., 1986.

Vaillencourt D.A. Five-thousand years of hydroclimate variability on Adak Island, Alaska inferred from δD of n-alkanoic acids (Doctoral dissertation, Northern Arizona University), 2013.

Warner B.G., Chinnappa C.C. Taxonomic implications and evolutionary trends in pollen of Canadian Ericales // Can. J. Bot. 1986. V. 64. № 12. P. 3113–3126.

The Near Islands (the Aleutian Arc) Vegetation History in the Holocene

O. I. Smyshlyaeva[1, #], E. E. Severova[2], B. F. Khasanov[1], O. A. Krylovich[1], E. A. Kuzmicheva[1], and A. B. Savinetsky[1]

[1]*Russian Academy of Science Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Leninsky pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

[2]*Lomonosov State University, Biology Faculty, Leninsky Gory, 1 st. 12, Moscow, 119191 Russia*

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

The vegetation history of the Alcan Creek peat deposit on the Shemya Island (Near Islands of the Aleutian ridge) has been reconstructed. We chose this flat island because there are no volcanoes on it and they affected vegetation less. The sedge tundra dominated until 7000 years ago. Then it was replaced by a swamp with a noticeable participation of *Sphagnum* and *Equisetum* during the period of the maximum Holocene warming 7000–5000 years ago. Herbal sedge-grass meadows spread about 4700 years ago as a result of a local change in humidity. In consequence of cooling and leaching processes, heather tundra began to dominate in the inner part of the island about 3400 years ago.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 399–407

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.143.6

Gly, GlyGly И GlyAsp МОДУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА SNF2 И ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В РЕГЕНЕРАНТАХ ИЗ КАЛЛУСОВ ТАБАКА *Nicotiana tabacum*

© 2021 г. Л. И. Федореева*, **, @, Б. Ф. Ванюшин*, **

**Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550 Россия*

***Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, 1, стр. 40, Москва, 119991 Россия*

@E-mail: fedlara@inbox.ru

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.
После доработки 07.10.2019 г.
Принята к публикации 07.11.2019 г.

Обнаружено, что короткие экзогенные пептиды GlyGly и GlyAsp, а также аминокислота Gly могут оказывать избирательное влияние на экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз и белков SNF2 из регенерантов табака *Nicotiana tabacum*. Отмечено, что Gly и GlyGly уменьшают экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз (кроме *CMT3*), но увеличивают экспрессию *CMT3* почти на 30%. Установлено, что присутствие кислого дипептида GlyAsp в питательной среде увеличивает экспрессию генов не только ДНК-метилтрансферазы (*CMT3*), но и поддерживающей ДНК-метилтрансферазы (*MET1*) по сравнению с контрольным вариантом. Определено, что все дипептиды и свободный глицин уменьшают (в 2–4 раза) экспрессию гена *DRM2* метилтрансферазы, осуществляющей метилирование ДНК *de novo*. Показано, что Gly, GlyGly и GlyAsp модулируют экспрессию генов, кодирующих семейство белков SNF2, уменьшая экспрессию практически всех генов семейства SNF2; только GlyGly увеличивает экспрессию генов, кодирующих актинзависимый белок и CHR12. Обнаружено, что уменьшение экспрессии генов *SNF2* приводит к уменьшению доступности свободного ДНК для метилирования, особенно для метилирования *de novo*.

10.31857/S1026347021040081

Секретируемые пептиды, как и фитогормоны, важны в регулировании многочисленных межклеточных связей, физиологических активностей и отвечают на различные воздействия. В настоящее время CLE-пептиды (CLAVATA3/Endosperm surrounding region-related) – наиболее изученные секретируемые пептиды в растениях (Tavormina *et al.*, 2015; Ванюшин и др., 2017). Эти пептиды взаимодействуют с сигнальными фитогормонами и вовлекаются в регуляцию с окружением, модулируя широкий круг биологических процессов. Установлено, что CLE-пептиды включаются в регуляцию развития семян, образование сосудов, боковых корней, в гомеостазе стволовых клеток в апикальной меристеме проростков и корней (Czyzewicz *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Короткие экзогенные пептиды увеличивают продолжительность жизни животных и заметно улучшают физиологический статус пожилых людей (Khavinson, Malinin, 2005). Они избирательно стимулируют экспрессию генов и синтез белков, в том числе участвующих в репликации и репарации ДНК и отвечающих за клеточную дифференцировку (Khavinson, Malinin, 2005). Действие таких пептидов характеризуется геноспецифичностью, сигнальной регуляторностью и, по-видимому, в основном эпигенетической природой (Ванюшин и др., 2017). Регуляторное действие коротких экзогенных пептидов выявлено как у животных, так и у растений (Khavinson, Malinin, 2005; Ванюшин и др., 2017). У растений и животных короткие пептиды индуцируют экспрессию генов, кодирующих факторы транскрипции, клеточной дифференцировки, роста и развития (Murphy *et al.*, 2012; Motomitsu *et al.*, 2015).

Молекулярные механизмы влияния экзогенных пептидов на клеточные процессы до сих пор остаются неизученными. Очевидно, что действия пептидов для всех эукариотов имеют общие молекулярные механизмы. Один из возможных механизмов действия экзогенных пептидов – регуляция транскрипции генов.

Дипептиды глицилглицин (GlyGly), глициласпарагиновая кислота (GlyAsp), а также аминокислота глицин (Gly) в концентрации 10^{-7} М в

среде существенно стимулируют рост и развитие каллусов табака *Nicotiana tabacum*. GlyGly, GlyAsp и Gly влияют на клеточную дифференцировку и формообразовательные процессы у каллусов. Они стимулируют образование и рост листьев и корней. Пептиды модулируют экспрессию генов *KNOX* и *GRF* семейств, отвечающих за клеточную дифференцировку и кодирующих транскрипционные факторы (Федореева и др., 2018). Профили индукции или репрессии экспрессии генов одним и тем же пептидом в каллусе и проростке табака различны. Это указывает на клеточную (тканевую) специфичность действия пептидов у растений. Предположено, что GlyGly, GlyAsp и Gly – новый класс регуляторов роста и развития растений. Наиболее изученный механизм регуляции транскрипции генома – эпигенетическая регуляция, включающая в себя метилирование ДНК и модификации гистоновых белков.

Метилирование ДНК участвует в защите генома, регуляции экспрессии генов, сплайсинге и связано с серьезным перепрограммированием развития растений, например, при яровизации и индукции цветения (Candaele *et al.*, 2014). Метилирование ДНК контролирует клеточную дифференцировку, рост и развитие растений (Vanyushin, Ashapkin, 2011). Вместе с модификациями гистонов и ремоделированием хроматина метилирование ДНК определяет эпигенетическое состояние генома не только на глобальном уровне, влияя на большие хромосомные домены или даже на целые хромосомы, а также на специфические сайты отдельных генов (Suzuki, Bird, 2008).

У эукариот геномная ДНК организована в хроматин, что физически ограничивает доступ регуляторных белков к геному (Kwon, Wagner, 2007). На доступ к геному могут повлиять ковалентные модификации гистонов и/или ремодулирование хроматина, изменяя нековалентные взаимодействия между ДНК и гистонами (Kwon, Wagner, 2007; Archacki *et al.*, 2017). Оба способа перестройки структуры хроматина обеспечивают важные эпигенетические механизмы для регулирования экспрессии генов (Flaus, Owen-Hughes, 2011). Связанные с АТФ изменения в организации нуклеосом, катализируемые АТФазами SNF2-семейства, составляют значительную часть активности ремоделирования хроматина (Flaus, Owen-Hughes, 2011). Ремодулирующие АТФ-зависимые хеликазы способны изменять структуру хроматина и положение нуклеосом, тем самым увеличивая доступность ДНК к взаимодействиям с различными регуляторными белками.

Только несколько АТФаз семейства SNF2 могут функционировать самостоятельно, поэтому АТФазы функционируют вместе как мультибелковый комплекс SWI/SNF гигантских размеров. Белковый комплекс массой 2000 кДа проявляет высокую консервативность во всех эукариотах. SWI/SNF-комплекс идентифицирован в дрожжах, мышах, растениях, у людей, что подтверждает консервативную роль активации транскрипции (Knizewski *et al.*, 2008).

SWI/SNF-белки играют глобальную роль в транскрипционном активировании (Carlson, Laurent, 1994). Однако данных о регулировании экспрессии генов, кодирующих белки SWI/SNF у животных, мало, а данные о регулировании экспрессии генов, кодирующих белки SWI/SNF у растений, отсутствуют.

Мы попытались выяснить, могут ли короткие экзогенные пептиды модулировать экспрессию генов, кодирующих SWI/SNF-белки и ДНК-метилтрансферазу табака *N. tabacum*. Для решения поставленной задачи были использованы два пептида – GlyGly и GlyAsp (нейтральный и кислый дипептид соответственно), а в качестве сравнения – свободная аминокислота Gly.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена табака *N. tabacum L.* сортотипа Самсун помещали в колбы с агаризованной безгормональной средой Мурашиге–Скуга для проращивания. Образовавшиеся после прорастания семян семядоли выкладывали по 10 штук на среду в чашки Петри с агаризованой средой Мурашиге–Скуга, содержавшей 6-бензиламинопурин, нафтилуксусную и индолилмасляную кислоты, с добавлением пептидов в концентрации 10^{-7} М или без пептидов. Опыты по выращиванию каллусов проводили в четырех повторностях.

Каллусы табака использовали для выделения РНК и ДНК с помощью наборов реагентов “РНК-Экстран” и “ДНК-Экстран-3” соответственно (Синтол, Россия) по рекомендуемой производителем прописи. Концентрацию полученных препаратов нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически. кДНК получали стандартным методом с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (Синтол).

В работе использованы сведения о генах ДНК-метилтрансфераз и семействах SNF2 из базы данных NCBI. Праймеры к генам были подобраны с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST и синтезированы (Синтол) (табл. 1, 2).

Реакцию ПЦР с регистрацией в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в термоциклере CFX 96 Real-Time System (BioRad, США). Образцы подготавливали стандартным методом с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии Sybr Green (Синтол). Реакции ПЦР-РВ проводили в одинаковых условиях для всех образцов: 95°С – 5 мин (активация ДНК-полимеразы), далее 45 циклов (94°С – 30 с, 58°С – 30 с,

Таблица 1. Праймеры к ДНК-метилтрансферазам табака *Nicotiana tabacum*

Ген	5'–3'-последовательность	Кодируемый белок	Функция кодируемого белка
Met 1	agc aga aga cag aaa gag gaa gg att cgc tgc aac tca cag ga	Цитозиновая поддерживающая ДНК-метилтрансфераза	Метилирование ДНК
CMT2	ggt gca ctt ccg agt gag aa cat gcc ctg taa cag ctg ga gga	Цитозиновая ДНК-хромометилтрансфераза	То же
CMT3	act gga cta tgc ctt ggt gc tgt ccc aac agt agt gac gc	То же	»
DRM2	aac aag ttc aaa gca ggc gt aag caa cgc aca gtt gga tg	Цитозиновая ДНК-метилтрансфераза	Метилирование ДНК *de novo*

Таблица 2. Праймеры к ремодуляторам хроматина семейства SNF2 табака *Nicotiana tabacum*

Ген	5'–3'-последовательность	Кодируемый белок	Функция кодируемого белка
DDM1	tcg ccg aag aaa ctg att cca gta acg gaa aca gga gag tcc ga	ATP-dependent DNA helicase DDM1-like	АТФ-зависимая хеликаза, ремоделятор хроматина, участвует в метилировании ДНК
CHR12	gcg gtc act gtg tct cga tt gtg gtg atc tact ac tcc cct ac	Helicase-like transcription factor CHR12	Хеликаза, участвующая в ремоделировании хроматина, в развитии и клеточной дифференциации
RAD16	aac cgt tgt aag tgt ttc ggc tga tcg aag acg aag gac gg	DNA repair protein RAD 16-like	Белок, участвующий в репарации ДНК
CLASSY	ttg ctt gga gtg ttt tgg cg tgg tat gct agt gta gct gtc a	Predicted SNF2 domain-containing protein CLASSY-4-like	Белок, участвует в ремоделировании хроматина и в метилировании ДНК
Actin	ctg gaa caa gct ctg ctg ga acg gca agc ttc aac aag ga	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1	Актин, участвующий в поддержании цитоскелета

72°C – 30 с). После последнего цикла реакционные смеси инкубировали при 72°C в течение 2 мин. Реакции проводили трехкратно в 2–3 параллелях. Ген *GaPDh*, кодирующий белок глицерид-3-фосфатдегидрогеназу (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), был взят в качестве референсного гена. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с ПЦР-продуктами, полученными с праймерами к гену *GaPDh*.

Эффективность ПЦР-РВ рассчитывали как $E, \% = (10^{-1/s} - 1) - 100$, где s – угол наклона зависимости десятичного логарифма значений C_t от концентрации кДНК. Эффективность ПЦР-РВ с праймерами к исследованным генам была 95–96%.

ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере DNAEngine (BioRad). Реакцию ПЦР осуществляли с ДНК в тех же условиях, что и для ПЦР-РВ с кДНК. Полученные продукты анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозе.

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования ВНИИСБ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Короткие пептиды в среде в концентрации 10^{-7} М заметно стимулируют рост и развитие каллусов табака (Федореева и др., 2018). Наряду с увеличением каллусной массы эти соединения увеличивают каллусогенез, формирование листьев и корней. Это свидетельствует о том, что GlyGly, GlyAsp, а также Gly влияют на клеточную дифференцировку и вовлечены в формообразовательные процессы у растений. Обнаруженное действие этих веществ при такой низкой концентрации их в среде может указывать на то, что они выполняют некую регуляторную сигнальную функцию в клетке.

Короткие экзогенные пептиды GlyGly, GlyAsp, а также Gly модулируют экспрессию генов семейств KNOX и GRF (Федореева и др., 2018). Один из возможных механизмов модуляции экспрессии генов короткими пептидами – связывание их со

свободными участками ДНК, тем самым модифицируя ДНК подобно метилированию. Одна из основных функций метилирования остатков цитозина в ДНК эукариот, в том числе и растений, – регуляция экспрессии генов в ходе нормального развития. Метилирование ДНК приводит к изменению взаимодействия ДНК с разными функционально важными белками, регулирующими транскрипцию генов.

Метилирование ДНК представляет собой ковалентную модификацию нуклеотидов в ДНК. Метилирование эукариотической ДНК осуществляется ферментами ДНК-метилтрансферазами (DMT), которые переносят метильную группу из S-аденозила метионина (SAM) на углерод цитозина в пятом положении. Эти ферменты подразделяются на поддерживающие и *de novo* DMT, в зависимости от того, метилирован уже сайт распознавания или нет. В растениях существуют два типа поддерживающих DMT: ДНК-метилтрансферазы (MET) и хромометилтрансферазы (CMT) (Goll, Bestor, 2005). Растительные геномы имеют сайты метилирования трех типов (CG, CNG и CNN) в отличие от сайта метилирования одного типа (CG) у животных, за исключением сайтов у эмбриональных стволовых клеток и нейронов (Lister *et al.*, 2009, 2013).

Экспрессия генов из *N. tabacum*, кодирующих цитозиновые DMT, показана на рис. 1. В регенерантах из каллусов табака, выращенных в присутствии Gly и GlyGly, уровень экспрессии гена *MET1*, кодирующего поддерживающую цитозиновую DMT, ингибируется в 1.5–2 раза. Из полученных данных следует, что в регенерантах, выращенных в присутствии GlyAsp, уровень экспрессии гена *MET1,* наоборот, увеличивается почти на 25%. Из полученных данных следует, что короткие пептиды и глицин модулируют экспрессию гена цитозиновой DMT. Можно предположить, что короткие пептиды либо связываются с регуляторными белками и через эти взаимодействия воздействуют на экспрессию гена, либо напрямую связываются со свободными участками ДНК. Это предположение подтверждает данные, полученные методом ПЦР (рис. 2). Продукты, полученные в результате ПЦР-амплификации с праймерами к генам *MET1*, сравнивали с образцами ДНК, выделенной из регенерантов табака, выращенных в присутствии и без коротких пептидов и глицина. Методом электрофореза в агарозе были обнаружены продукты ПЦР с большей молекулярной массой в образцах ДНК с пептидами, чем в контрольной ДНК. Появление продуктов ПЦР, отличающихся от контрольного варианта, свидетельствует о том, что короткие пептиды, проникая в ядро (Федореева и др., 2018), могут связываться со свободными участками ДНК и модифицировать ее.

Уровень экспрессии в каллусах табака хромометилтрансферазы *CMT2* значительно ниже такового у *CMT3*. Этот факт может свидетельствовать о том, что экспрессия *CMT2* в процессе метилирования ДНК в табаке невелика по сравнению с экспрессией *CMT3*. Относительный уровень экспрессии *CMT2* в регенерантах из каллусов, выращенных в присутствии GlyAsp, уменьшается почти в 2 раза, а в присутствии Gly и GlyGly – практически в 4 раза (рис. 1). Однако в отличие от *MET1* в агарозном геле не было обнаружено ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *CMT2* с образцами ДНК из табака, выращенных с пептидами, отличных от контрольной ДНК (рис. 2). Возможно, уменьшение экспрессии генов *CMT2* в присутствии пептидов будет указывать на наличие специфических сайтов связывания с белками, регулирующими экспрессию генов метилтрансфераз.

Относительный уровень экспрессии гена *CMT3* в каллусах табака значительно выше такового для *CMT2* и даже *MET1*. Во всех каллусах, выращенных в присутствии пептидов, экспрессия генов *CMT3* увеличивается по сравнению с контрольным вариантом на 25–35% (рис. 1). Отметим, что при амплификации с праймерами к гену *CMT3* со всеми образцами ДНК образуется разный набор ПЦР-продуктов (рис. 2). Этот факт может свидетельствовать о том, что все три соединения имеют как общие сайты связывания с ДНК, так и отличные от них. Образование новых продуктов может свидетельствовать о связывании пептидов с определенными участками ДНК, тем самым указывая на участие экзогенных пептидов в регуляции экспрессии генов *CMT3*.

Метилирование ранее неметилированной ДНК *de novo* осуществляется семейством ДМТ, названным DRM (Domains rearranged methyltransferases). Известно, что DRM в основном метилируют несимметричные сайты CNN, но способны *de novo* метилировать цитозины в любом контексте последовательности в процессе, называемом РНК-направленным метилированием ДНК (РНДМ). Короткие РНК (24 нуклеотида) образуются в результате действия специфических РНК-полимераз, которые были обнаружены только в растениях (Law, Jacobsen, 2010). Механизм метилирования цитозина в РНДМ недостаточно ясен. Ранее считалось, что метилирование *de novo* метилтрансферазами DRM в растениях происходит в транспозонах и чужеродных последовательностях ДНК, но более поздние исследования показали, что метилирование *de novo* происходит также в регуляторных областях белоккодирующих генов (Lippman *et al.*, 2004). Метилирование ДНК в *Arabidopsis* представляется более динамичным, чем считалось ранее, и может быть связано с транскрипционными ответами как на абиотические, так и на биотические стрессы (Chinnusamy, Zhu, 2009).

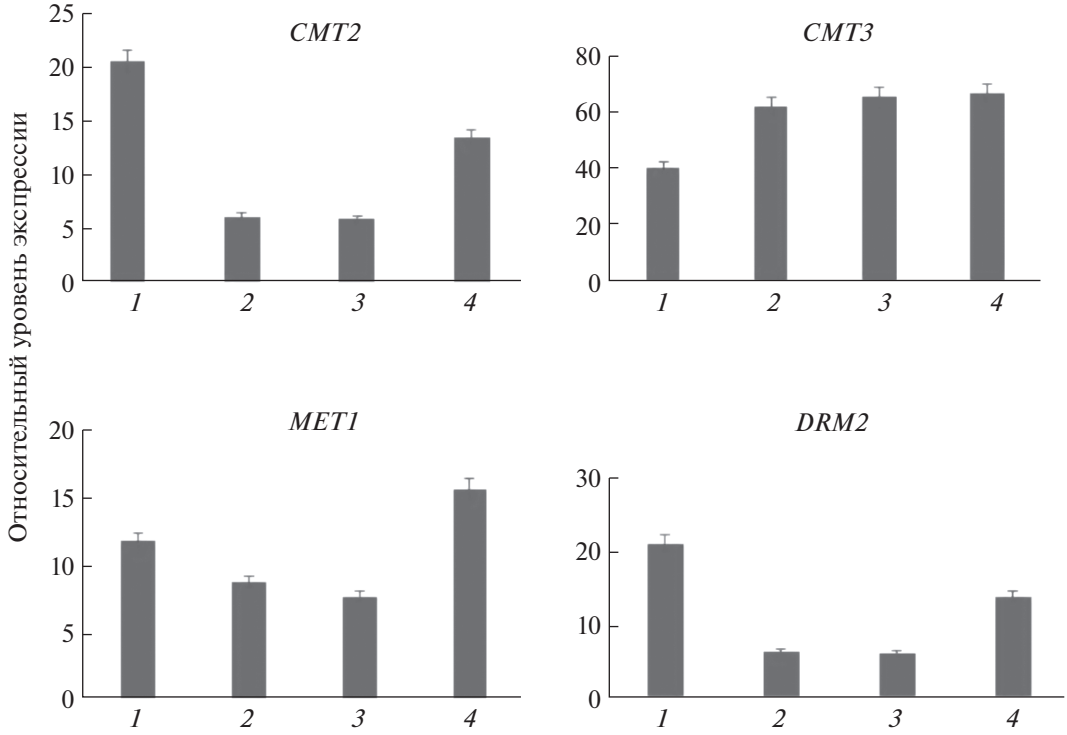

Рис. 1. Экспрессия генов цитозиновых ДНК-метилтрансфераз *MET1*, *CMT2*, *CMT3* и *DRM2* в регенерантах табака *Nicotiana tabacum,* выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp (*2–4* соответственно, *1* – контроль; для рис. 1–4).

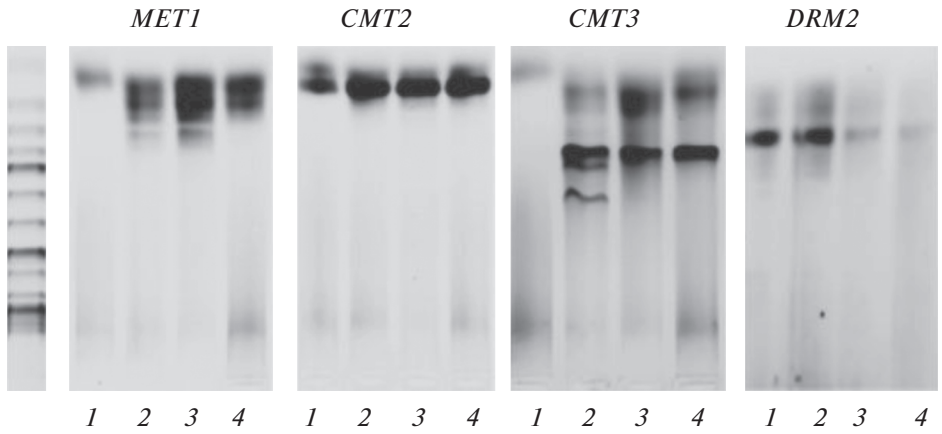

Рис. 2. ПРЦ-амплификация праймеров к генам цитозиновых ДНК-метилтрансфераз *MET1, CMT2*, *CMT3* и *DRM2* и ДНК из регенерантов табака, выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp.

В регенерантах из каллусов табака, выращенных в присутствии коротких пептидов и глицина, уровень экспрессии гена *DRM2*, кодирующего цитозиновую DMT, участвующую в метилировании ДНК *de novo*, ингибируется в 2–4 раза по сравнению с контрольным вариантом. В агарозном геле не было обнаружено ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *DRM2*, с образцами ДНК из табака, выращенных с пептидами, отличных от контрольной ДНК (рис. 2). Более того, количество ПЦР-продуктов сильно уменьшалось при амплификации с ДНК, выращенных в присутствии пептидов. Можно предположить, что уменьшение экспрессии гена *DRM2* в случае присутствия пептидов вызвано тем, что короткие пептиды связываются с теми участками белков, регулирующих экспрессию генов *DRM2*, которые ответственны за связывание с ДНК.

Нуклеосомы – сильное препятствие для метилирования ДНК *de novo,* а белки ремодулирова-

ния облегчают метилирование нуклеосом *in vivo*. Возможно, ремодулирующие комплексы позволяют метилтрансферазам работать непосредственно на поверхности нуклеосом или стимулировать катализ, не влияя на доступ метилтрансфераз к ДНК. Однако считается, что свободная ДНК – предпочтительная матрица для действия большинства ДНК-модифицирующих ферментов, в том числе и для цитозиновых метилтрансфераз, и что ремодуляторы, такие как SNF2, обеспечивают доступ к свободной ДНК.

Белки, принадлежащие к консервативному и диверсифицированному семейству SNF2, имеют АТФ-зависимые субъединицы, которые участвуют в ремодулировании хроматина и контролируют доступность ДНК (Archacki *et al.*, 2017). Большая часть белков SNF2 у растений гомологична таковым у дрожжей и животных и сохраняет соответствующую функциональную специализацию. Однако некоторые из них были адаптированы для проссесов, происходящих только у растений. Мы выбрали пять генов семейства SNF2, которые относятся к различным классам и представлены в табл. 2.

Ремодулятор нуклеосом семейства SNF2 – DDM1, т.е. АТФ-зависимая хеликаза, необходимая для нормального метилирования ДНК (Jeddeloh *et al.*, 1999; Lippman *et al.*, 2004). АТФазный домен SNF2 гидролизует АТФ, перемещаясь по ДНК хроматина, тем самым изменяя структуру хроматина, позволяя другим белкам получать доступ к ДНК (Ryan, Owen-Hughes, 2011). Мутация DDM1 вызывает сильную потерю метилирования у некоторых транспозонных элементов и повторов (Jeddeloh *et al.*, 1999; Lippman *et al.*, 2004). Предполагают, что DDM1 участвует в метилировании CNN-сайтов по механизму РНДМ (Lippman *et al.*, 2004).

В регенерантах из каллусов табака, выращенных в присутствии пептидов, наблюдается снижение активности экспрессии гена *DDM1.* Можно предположить, что уменьшение экспрессии гена *DDM1* сопровождается потерей метилирования ДНК, как и при мутации *DDM1* (Jeddeloh *et al.*, 1999; Lippman *et al.*, 2004). Как отмечено выше, предполагают, что DDM1 участвует в РНДМ – РНК-направленном ДНК-метилировании. В этом процессе участвует DRM2, которая метилирует цитозиновые остатки *de novo.* Уменьшение экспрессии генов, кодирующих как *DRM2*, так и *DDM1*, под влиянием экзогенных пептидов действительно может свидетельствовать о том, что эти два белка взаимосвязаны и участвуют в процессе метилирования ДНК. Однако неясно, как короткие пептиды регулируют экспрессию генов *DRM2* и *DDM1.* Вероятно, пептиды связываются со свободными участками гена *DDM1* (возможно, и в промоторной области АТФазного домена) и тем самым блокируют его транскрипцию. Снижение уровня АТФ-зависимой ДНК-хеликазы DDM1 как ремодулятора хроматина приводит к уменьшению доступа к ДНК-метилтрансферазе DRM2. Хеликаза DDM1 может регулировать экспрессию цитозиновой метилтрансферазы DRM2. Соответственно, уменьшение экспрессии гена *SNF2* может сопровождаться и уменьшением экспрессии гена *DRM2.*

В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные методом ПЦР-амплификации (рис. 4). На рис. 4 сравниваются продукты, полученные в результате ПЦР с праймерами к генам семейства *SNF2* с ДНК, выделенной из табака, выращенного в присутствии и без коротких пептидов и глицина. В агарозном геле были обнаружены продукты ПЦР с большей молекулярной массой в образцах ДНК с пептидами, чем в контрольных ДНК. Образование новых продуктов ПЦР, отличающихся от контрольных, может быть обусловлено тем, что короткие пептиды связываются со свободными участками ДНК и модифицируют ее.

Для нормального развития растения должны реагировать на любые изменения окружающей среды и быстро адаптироваться к неблагоприятным условиям. Реакция на абиотический стресс требует модуляции экспрессии генов, которая может быть опосредована изменением структур хроматина. Было показано, что ген ремодулирования хроматина AtCHR12 играет жизненно важную роль при временной задержке роста арабидопсиса, которая индуцируется при стрессе и обеспечивает гибкую модуляцию роста в неблагоприятных и/или иных условиях (Mlynárová *et al.*, 2007). Семейство белков CHR (chromatin-remodulator) – хеликазы, имеющие АТФазный каталитический центр, как и семейство белков DDM1. АТФ-зависимый белок CHR12 воздействует на экспрессию генов, используя энергию гидролиза АТФ для изменения взаимодействий между гистонами и ДНК, чтобы открыть доступ к ДНК (Mlynárová *et al.*, 2007).

В каллусах табака, выращенных в присутствии Gly, происходит незначительное уменьшение экспрессии генов, кодирующих белок CHR12 (рис. 3). При амплификации праймеров к гену *CHR12* с ДНК из каллусов табака, выращенных в присутствии глицина, образуется набор ПЦР-продуктов, аналогичный контрольному (рис. 4). Можно предположить, что Gly не оказывают существенного влияния на это субсемейство SNF2. Однако в присутствии GlyGly наблюдается увеличение относительной экспрессии гена *CHR12* приблизительно в 1.5 раза, а в присутствии GlyAsp происходит уменьшение относительной экспрессии гена *CHR12* приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем. Наблюдалось также образование разных продуктов ПЦР во всех вариантах (рис. 4). Возможно, короткие пептиды связываются с раз-

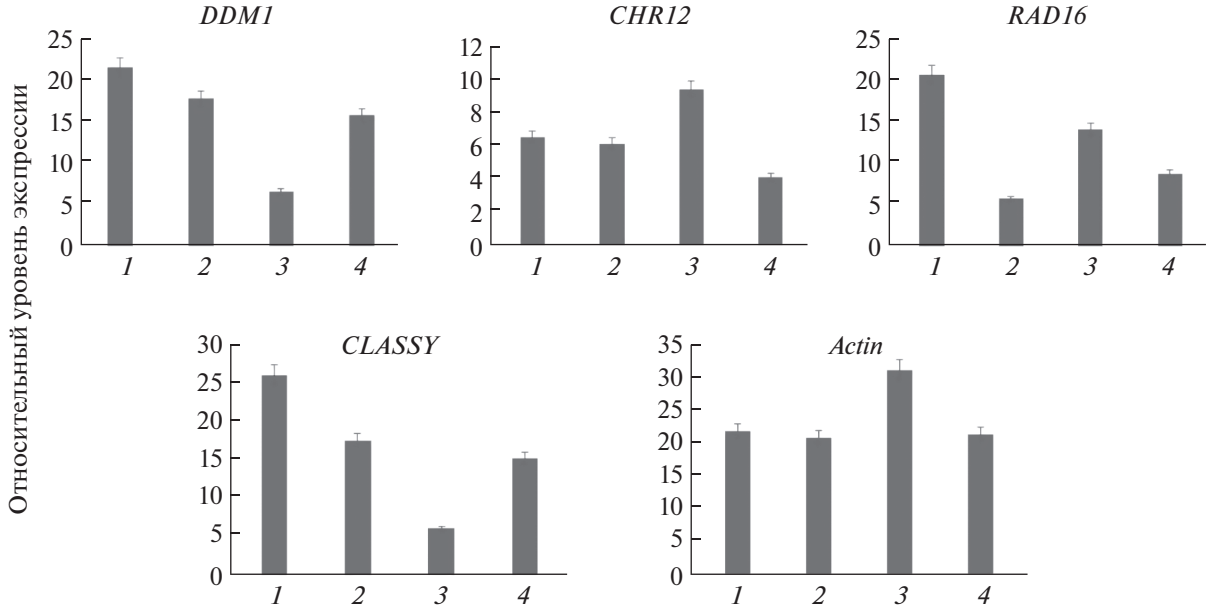

Рис. 3. Экспрессия генов семейства ремодуляторов хроматина SNF2 *DDM1, CHR12*, *RAD16*, *CLASSY*, *actin* в регенерантах табака *Nicotiana tabacum,* выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp.

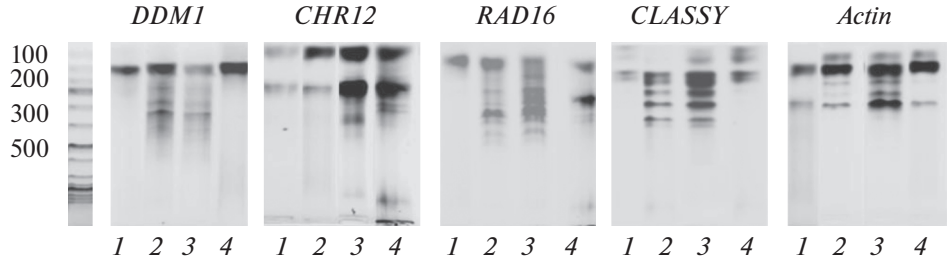

Рис. 4. ПРЦ-амплификация праймеров к генам генов семейства ремодуляторов хроматина SNF2 *DDM1*, *CHR12*, *RAD16*, *CLASSY*, *actin* и ДНК из регенерантов табака, выращенных в присутствии Gly, GlyGly, GlyAsp.

ными участками ДНК, и это играет важную роль в активации или инактивации экспрессии гена *CHR12.*

Белок RAD16, который входит в семейство хроматинремодулирующих белков SNF2, участвует в репарации ДНК после нуклеотидного расщепления под действием УФ в транскрипционно молчащих областях генома и в нетранскрибируемых местах активных генов (Yu *et al.*, 2011). Белок Rad16 имеет два цинковых пальца и хеликазный домен. Относительно мало известно о молекулярных событиях, которые инициируют и регулируют этот процесс в контексте хроматина. Ранее было отмечено (Yu *et al.*, 2011), что в ответ на вызванное УФ-излучением повреждение ДНК происходит повышение уровня ацетилирования гистона H3 в положениях 9 и 14 лизиновых остатков, что коррелирует с изменениями в структуре хроматина. Эти изменения связаны с эффективной глобальной эксцизионной репарацией генома у дрожжей и зависят от присутствия белка Rad16.

Экспрессия гена *RAD16* у каллусов табака, выращенных в присутствии GlyGly, GlyAsp, особенно свободного Gly, уменьшается в 1.5–4 раза по сравнению с контрольными каллусами. Можно предположить, что инактивация экспрессии гена *RAD16* в присутствии использованных нами препаратов препятствует также ацетилированию гистона H3 и реорганизации хроматина по этому сценарию. Репарация ДНК осуществляется также другими репарационными белками, так как экспрессия гена *RAD16*, кодирующего белок, участвующий в репарации ДНК, уменьшается в табаке, выращенном в присутствии дипептидов и свободного глицина. Можно предположить, что короткие пептиды могут активировать экспрессию других репарационных белков.

Другое подсемейство SNF2 – это белки, в состав которых входит домен, определенный как

CLASSY1 или CLSY1. Они участвуют в метилировании ДНК, умалчавании транскрипционных генов и получении 24-нуклеотидных малых РНК (siRNA) (Kanno *et al.*, 2004, 2005a, b). Все шесть белков подсемейства CLSY1 в арабидопсисе имеют высокую гомологию (70%). Белки с доменом CLSY1 наиболее тесно связаны с подсемейством белков RAD16, имеющих гомологичный домен хеликазы С.

Структурное моделирование предсказало, что в домене CLASSY1 в мотивах, ответственных за связывание с кислыми остатками ДНК (фофсфатными группами) и гидролиз АТФ, которые необходимы для ремодулирования хроматина, участвуют остатки Gly, Lys и Arg (Eisen *et al.*, 1995). Относительная экспрессия гена *SNF2* с доменом CLASSY уменьшается в регенерантах табака, выращенных в присутствии пептидов и глицина, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3). На основании структурных данных можно предположить, что экзогенные пептиды, в состав которых входят остатки Gly, могут конкурировать с остатками Gly в домене CLSY1 за связывание АТФ, в результате чего доступность ДНК для действия цитозиновых DMT уменьшается. Этот факт, возможно, оказывает ингибирующее действие на экспрессию метилтрансфераз (рис. 1).

Отметим, что дипептид GlyAsp практически не оказывает влияния на состав ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *SNF2* с доменом CLASSY, по сравнению с контролем. В случае Gly и GlyGly состав продуктов ПЦР аналогичен и значительно отличается от такового в вариантах с GlyAsp и контрольной ДНК (рис. 4).

Семейство актинзависимых белков (actin-related белков (ARP)) относится к ответвлению обширного суперсемейства белков, включающих в себя обычный актин, хит-шоковый белок Hsp70, хит-шоковый родственный белок Hse70 и другие АТФ-связывающие белки. В дрожжах *Saccharomyces cerevisae* семейство ARP состоит из 10 различных белков, на 38–69% идентичных обычному актину. Эти подобные актину протяженные участки включают в себя 13 блоков гомологии, которые важны для структуры и функции актина. Основные функции актина – поддержание и стабилизация цитоскелета в эукариотических клетках.

Из данных об экспрессии гена *SNF2* актинзависимого белка из регенерантов табака, выращенных в присутствии пептидов (рис. 3), следует, что у образцов с GlyGly экспрессия гена растет приблизительно на 30%, а в образцах регенерантов, выращенных в присутствии Gly и GlyAsp, относительный уровень экспрессии остается практически без изменения (как и у контрольных регенерантов). Состав ПЦР-продуктов, полученный при амплификации праймеров к гену *SNF2* актинзависимого белка и ДНК из регенерантов табака, выращенных как без, так и в присутствии пептидов и глицина, практически одинаков. Однако в случае амплификации с ДНК из табака, выращенного в присутствии GlyGly, количество ПЦР-продуктов выше, чем в других вариантах. Возможно, GlyGly связывается с регуляторным белком и комплекс белок–пептид увеличивает экспрессию гена *SNF2*. Вероятно, и свободный Gly, и GlyAsp также связываются с регуляторным белком, но с меньшей константой или с участками белка, которые не оказывают существенного влияния на экспрессию гена.

Таким образом, экзогенные Gly, GlyGly и GlyAsp могут участвовать в регуляции экспрессии генов семейств SNF2 и цитозиновых DMT. Можно предположить, что короткие пептиды либо связываются с регуляторными белками и через эти взаимодействия воздействуют на экспрессию генов, либо напрямую связываются со свободными участками ДНК. Скорее всего, не существует специфического механизма, по которому короткие пептиды модулируют экспрессию генов. Механизм, по которому пептиды могут регулировать экспрессию, по-видимому, определяется доступностью участков ДНК либо мотивов регуляторных белков, специфически взаимодействующих с Gly и GlyGly (например, Cys-петли, или положительно заряженные участки, связывающиеся с GlyAsp). В любом случае короткие пептиды модулируют экспрессию генов ДМТ и белков семейства SNF2 и их можно использовать для регуляции экспрессии генов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ванюшин Б.Ф., Ашапкин В.В., Александрушкина Н.И. Регуляторные пептиды у растений // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 189–195.

Федореева Л.И., Диловарова Т.А., Кононенко Н.В., Баранова Е.Н., Смирнова Е.А., Ванюшин Б.Ф. Глицилглицин, глицин и глициласпарагиновая кислота влияют на рост, развитие и экспрессию генов каллусной культуры табака *Nicotiana tabacum* // Изв. РАН. Сер. биол. 2018. № 4. С. 1–9.

Archacki R., Yatusevich R., Buszewicz D., Krzyczmonik K., Patryn J., Iwanicka-Nowicka R., Biecek P., Wilczynski B., Koblowska M., Jerzmanowski A., Swiezewski S. Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling complex binds both promoters and terminators to regulate gene expression // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. P. 3116–3129.

Candaele J., Demuynck K., Mosoti D., Gerrit T., Beemster S., Inzé D., Nelissen H. Differential methylation during maize leaf growth targets developmentally regulated genes // Plant Physiol. 2014. V. 164(3). P. 1350–1364.

Carlson M., Laurent B.C. The SNF/SWI family of global transcriptional activators // Curr. Opin. Cell Biol. 1994. V. 6. P. 396–402.

Chinnusamy V., Zhu J.K. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants // Sci. China C life Sci. 2009. V. 52. P. 331–343.

Czyzewicz N., Yue K., Beeckman T., De Smet I. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 5281–5296.

Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct se-

quences and functions // Nucl. Acids Res. 1995. V. 25. P. 2715–2723.

Flaus A., Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodeling: the means to the end // FEBS J. 2011. V. 278. P. 3579–3595.

Goll M.G., Bestor T.H. Eukariotic cytosine methyltransferases // Ann. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 481–514.

Jeddeloh J.A., Stokes T.L., Richards E.J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein // Nat. Genet. 1999. V. 22. P. 94–97.

Kanno T., Aufsatz W., Jaligot E., Mette M.F., Matzke M., Matzke A.J. A SNF2-like protein facilitates dynamic control of DNA methylation // EMBO Rep. 2005a. V. 6. P. 649–655.

Kanno T., Mette M.F., Kreil D.P., Aufsatz W., Matzke M., Matzke A.J. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation // Curr. Biol. 2004. V. 4. P. 801–805.

Kanno T., Huettel B., Mette M.F., Aufsatz W., Jaligot E., Daxinger L., Kreil D.P., Matzke M., Matzke A.J. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation // Nat. Genet. 2005b. V. 37. P. 761–765.

Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation // Karger AG, Basel (Switzerland). 2005. P. 104.

Knizewski L., Ginalski K., Jerzmanowski A. Snf2 proteins in plants: gene silencing and beyond // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 557–565.

Kwon C.S., Wagner D. Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time // Trends Genet. 2007. V. 23. P. 403–412.

Law J.A., Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nat. Rev. Genet. 2010. V. 11. P. 204–220.

Lippman Z., Gendrel A.V., Black M., Vaughn M.W., Dedhia N., McCombie W.R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K.D., Carrington J.C., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control // Nature. 2004. V. 430. P. 471–476.

Lister R., Mukamel E.A., Nery J.R., Urich M., Puddifoot C.A., Johnson N.D., Lucero J., Huang Y., Dwork A.J., Schultz M.D. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development // Science. 2013. V. 341. P. 1237905.

Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.M. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences // Nature. 2009. V. 462. P. 315–322.

Mlynárová L., Nap J.P., Bisseling T. The SWI/SNF chromatin-remodeling gene AtCHR12 mediates temporary growth arrest in Arabidopsis thaliana upon perceiving environmental stress // Plant J. 2007. V. 51. P. 874–885.

Motomitsu A., Sawa S., Ishida, T. Plant peptide hormone signaling // Ess. Biochem. 2015. V. 58. P. 115–131.

Murphy E., Smith S., De Smet I. Small signallinig peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 3198–3217.

Ryan D.P., Owen-Hughes T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion // Curr. Opin. Chem. Biol. 2011. V. 15. P. 649–656.

Suzuki M.M., Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9. P. 465–476.

Tavormina P., De Coninck B., Nikonorova N., De Smet, I., Cammue B. The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions // Plant Cell. 2015. V. 27. P. 2095–2118.

Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in plants: past, present and future // BBA-Gene Regul. Mechan. 2011. V. 1809. P. 360–368.

Wang G., Zhang G., Wu M. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. P. 1211.

Yu S., Teng Y., Waters R., Reed S.H. How chromatin is remodelled during DNA repair of UV-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. 1002124.

Gly, GlyGly, and GlyAsp Module Expression of Genes of the SNF2 Family and DNA Methyltransferases in Regenerants from Calluses of Tobacco *Nicotiana tabacum*

L. I. Fedoreyeva[1, 2, #] and B. F. Vanyushin[1, 2]

[1] *All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology RAS, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia*

[2] *Research Institute of Physical and Chemical Biology A.N. Belozersky, Moscow State University M.V. Lomonosov, Vorobyovy Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

[#] *e-mail: fedlara@inbox.ru*

It was found that short exogenous peptides GlyGly and GlyAsp and the amino acid Gly can have a selective effect on the expression of genes for DNA-methyltransferases and SNF2 proteins from *Nicotiana tabacum* regenerants. It was noted that Gly and GlyGly decrease the expression of DNA methyltransferase genes (except for *CMT3*), and increase the expression of *CMT3* by almost 30%. It was found that the presence of the acidic dipeptide GlyAsp in the nutrient medium increases the expression of genes not only of the *CMT3* DNA methyltransferase, but also of the supporting *MET1* DNA methyltransferase as compared to the control variant. It was determined that all dipeptides and free glycine reduce (by 2–4 times) the expression of the *DRM2* methyltransferase gene, which is responsible for DNA methylation *de novo*. It was shown that Gly, GlyGly, and GlyAsp modulate the expression of genes encoding the SNF2 family of proteins, decreasing the expression of almost all genes of the SNF2 family, only GlyGly increasing the expression of genes encoding an actin-dependent protein and *CHR12*. It was found that a decrease in the expression of the *SNF2* genes leads to a decrease in the availability of free DNA for methylation, especially for *de novo* methylation.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 408–422

ЗООЛОГИЯ

УДК 576.895.122

МЫШЕЧНАЯ СИСТЕМА *Gyrocotyle urna* (Plathelminthes, Gyrocotylida)

© 2021 г. И. В. Ястребова*, @, М. В. Ястребов*

**Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, пр. Матросова 9, Ярославль, 150057 Россия*

@E-mail: mvy@uniyar.ac.ru

Поступила в редакцию 30.05.2019 г.
После доработки 30.07.2019 г.
Принята к публикации 29.08.2019 г.

Описана архитектоника мускулатуры тела, прикрепительных органов и половых протоков *Gyrocotyle urna*. Показано, что боковые складки тела и лопасти розетки характеризуются наименьшим количеством и разнообразием мускулатуры. В покровах положение каждого шипа регулируется тремя группами мышц. Бóльшая часть половых протоков окружена мышечным плексусом. Присосковидный орган характеризуется чрезвычайной концентрацией мускулатуры. От присосок трематод его отличает обратная пропорциональность в степени развития радиальных мышц, с одной стороны, и прочих групп мышц – с другой. Обсуждается функциональная нагрузка различных групп мышц, механизмы фиксации и локомоции гельминта.

DOI: 10.31857/S1026347021040159

Паразитические плоские черви, обитающие в пищеварительных трактах позвоночных животных, с экологической точки зрения, являются реофильными формами, которые вынуждены противостоять изгоняющему потоку веществ. Для сохранения локализации они, как правило, используют активную фиксацию, т.е. сочетание процессов прикрепления и локомоции (Ошмарин, 1960). Доля каждого процесса существенно отличается в разных систематических группах. Отличия проявляются, в частности, в особенностях внешнего строения и архитектонике мускулатуры гельминтов. Изучение архитектоники мускулатуры – один из путей к познанию способов освоения среды паразитическими червями и закономерностей их морфологической эволюции. В этом плане существенный интерес представляет небогатый видами класс Gyrocotylida Bychowsky, 1937. Его представители, обитающие в спиральном клапане хрящевых рыб, имеют единообразный, легко узнаваемый габитус. Мускулистое тело со своеобразными прикрепительными органами на полюсах и фестончатыми складками на боковых сторонах предполагает высокое своеобразие пространственного распределения мышечных элементов в теле гельминтов. Однако относительно полное иллюстрированное описание мускулатуры гирокотилид в настоящее время отсутствует, и его выполнение является целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом послужили половозрелые представители вида *Gyrocotyle urna* Grube et Wagener, 1852 из спирального клапана химеры европейской (*Chimaera monstrosa* L., 1758), добытой в Баренцевом море. Морфология гельминтов изучена под световым микроскопом МИКМЕД-1 (ОАО “ЛОМО”, Россия) по полным сериям фронтальных, сагиттальных и поперечных парафиновых срезов (по две серии в каждой проекции) толщиной 7 мкм, изготовленных по стандартной методике и окрашенных методом Маллори.

Промеры выполнены с помощью градуированной окулярной линейки. В размерах присосковидного органа указаны последовательно длина вдоль оси органа, ширина по ширине тела и толщина в дорсовентральном направлении. При измерении диаметров мышечных волокон первый диаметр (вертикальный) перпендикулярен базальной пластинке, вдоль которой идет волокно, второй (горизонтальный) параллелен ей. Если первый диаметр больше второго, форма поперечного сечения волокна именуется овальной, если наоборот – поперечно-овальной, при равенстве диаметров – округлой. Для групп мышц, которые не удается расположить строго перпендикулярно плоскости среза, указана толщина, измеренная в одной плоскости. В мышечных слоях расстояние между соседними мышцами приводится в относительных величинах, а именно, в их горизонтальных диаметрах. По вертикальным диаметрам оценивается толщина слоя. Под расстоянием между диагональными мышцами подразумевает-

ся расстояние между теми из них, которые параллельны друг другу. Под углом пересечения мышц в этом слое понимается угол, ориентированный к концам тела. Рисунки выполнены с помощью рисовального аппарата РА-4 (завод "Прогресс", СССР).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У изученных экземпляров тело вытянутое, уплощенное дорсо-вентрально, длиной 11–18 мм при максимальной ширине 5–7 мм. На переднем конце тела находится присосковидный орган с субтерминальным устьем, которое окружено маленькой предротовой губой кольцевой формы. Сторона тела, к которой обращено устье присосковидного органа и на которой открывается отверстие матки, в дальнейшем изложении называется брюшной. Данная сторона тела более плоская, нежели спинная. Боковые края тела позади присосковидного органа образуют многочисленные крупные складки с общей дорсо-вентральной ориентацией, сходящие на нет возле заднего конца тела. На слегка суженном заднем конце тела расположен прикрепительный орган – розетка. Его центр представляет собой довольно обширное углубление в заднем "торце" тела. От краев углубления отходят 5–7 радиально направленных лопастей, каждая из которых делится на лопасти второго порядка, а те, в свою очередь, – на тонкие, длинные и многочисленные лопасти третьего порядка. Упомянутое углубление продолжается сужающимся каналом – воронкой. Воронка открывается наружу дорсальной порой с утолщенными краями, расположенной в основании розетки.

Покровы типичны для паразитических плоских червей и включают наружную пластинку тегумента, базальную пластинку, цитоны, а также три последовательно расположенных слоя мускулатуры – кольцевой, продольный и диагональный (рис. 1в). Покровы вооружены, и элементы вооружения образуют две топографически различные группы. Относительно немногочисленные "фарингеальные" шипы сконцентрированы вокруг и немного позади отверстия присосковидного органа и редко расположены на боковых сторонах тела до середины длины данного органа. Упорядоченность в их расположении не обнаружена. Соматические шипы располагаются диагональными рядами в задней части тела. На дорсальном и дорсо-латеральных участках покровов вооружение распространяется от проксимальной части матки до лопастей розетки, но не на сами лопасти. На вентральном и вентро-латеральных участках вооруженная зона короче и начинается немного впереди от уровня отверстия воронки. На названных участках частота и регулярность расположения шипов увеличиваются в направлении спереди назад, а также в направлении от плоскости симметрии тела к его боковым сторонам. Наиболее густо вооружение покрывает основание розетки. Все шипы вытянутые, округлые в поперечном сечении, расширяющиеся от скругленного основания, а затем плавно сужающиеся к вершине (рис. 1а). При максимальном диаметре 17.3–27.9 мкм их длина варьирует в пределах 74.9–163.2 мкм, и лишь боковые фарингеальные шипы несколько короче (не более 93 мкм). На срезах шипы выглядят слоистыми, словно состоят из разных веществ. Значительная часть каждого шипа находится в инвагинации базальной пластинки, а вершина – в наружной пластинке тегумента. С каждым шипом связано много мышечных волокон, описанных ниже.

На спинной и брюшной сторонах тела максимальный диаметр кольцевых мышц покровов (1.4–3.8 × 1.4–3.9 мкм) наблюдается на уровне присосковидного органа. От его заднего края до основания розетки диаметр равен 1–2.4 × 1–1.9 мкм, а на боковых сторонах тела (за исключением складок) составляет 1–1.4 мкм. Самые тонкие кольцевые мышцы (не более 1 мкм) находятся в лопастях розетки и боковых складках тела. В районе отверстия присосковидного органа кольцевые мышцы поперечно-овальные в сечении, позади отверстия на спинной и брюшной сторонах передней половины тела – овальные, на прочих участках покровов – округлые.

Слой продольных мышц, подобно кольцевому, на боковых сторонах тела тоньше, чем на спинной и брюшной (табл. 1). При этом на всех сторонах тела наблюдаются сходные изменения его параметров в направлении спереди назад. Максимальная толщина наблюдается на уровне присосковидного органа, особенно на брюшной стороне тела. Позади органа до уровня семяприемника включительно продольный слой становится тоньше в несколько раз, уже без различий между спинной и брюшной сторонами. Позади семяприемника он вновь несколько утолщается. В боковых складках тела и лопастях розетки диаметр продольных мышц не более 1 мкм. В поперечном сечении они овальные или округлые на всех участках покровов. Расстояние между соседними мышцами в кольцевом и продольном слоях не превышает их горизонтального диаметра. В покровах полостей розетки и воронки порядок обсуждаемых слоев обратный. Здесь диаметр овальных в сечении кольцевых мышц составляет 1–4.8 × 1–2.9 мкм. Продольный слой в покровах полости розетки тоньше кольцевого (1–2.9 × 2.4–4.8 мкм), а в воронке, напротив, толще (2.9–6.7 × 1.4–5.8 мкм).

Диагональная мускулатура располагается сразу под цитонами тегумента. Она не обнаружена в покровах полостей воронки и розетки и в лопастях третьего порядка розетки. Угол пересечения

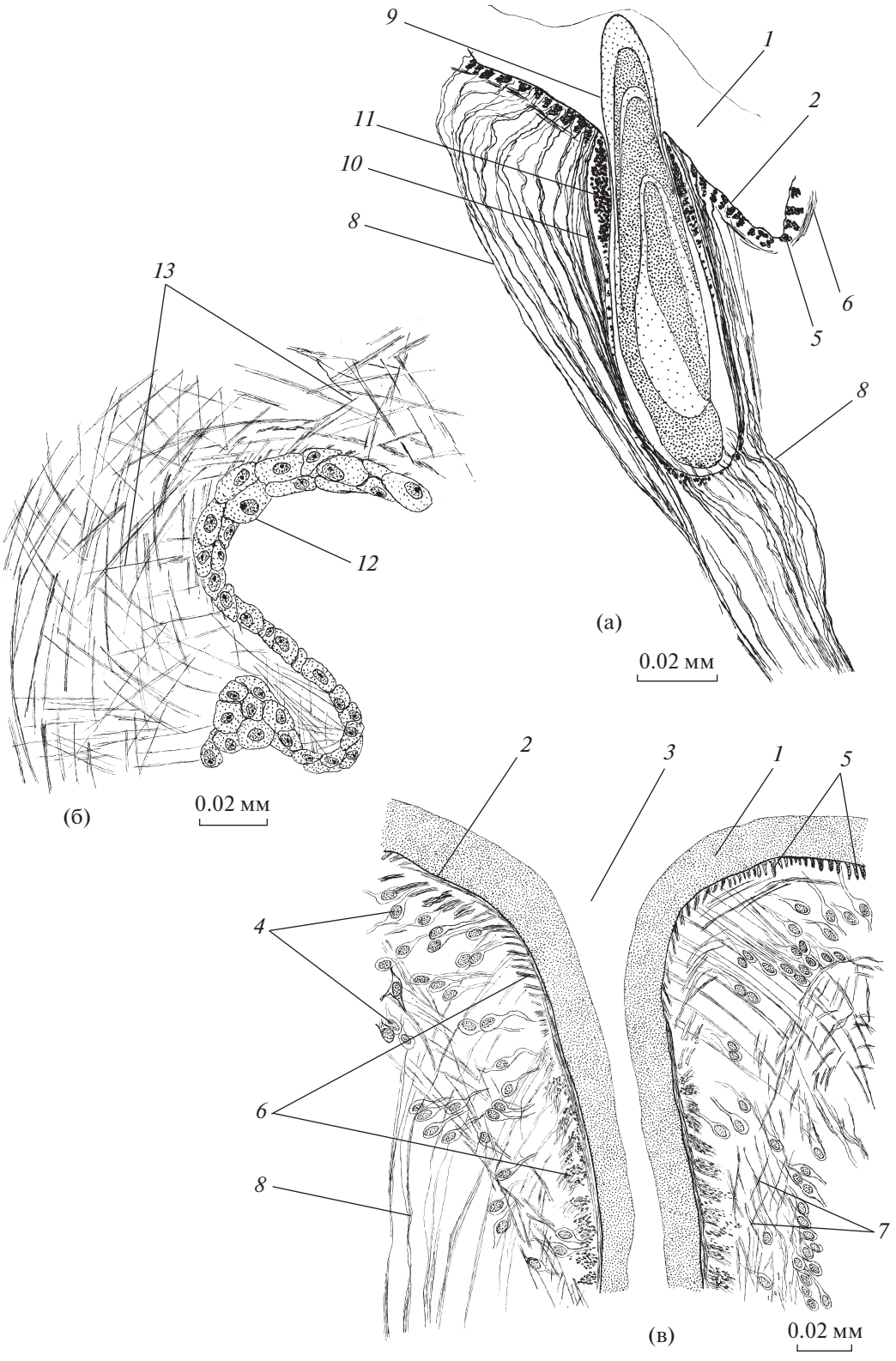

Рис. 1. Мускулатура *G. urna*: (а) – мышцы шипа на сагиттальном срезе тела; (б) – фрагмент семенного пузырька на фронтальном срезе тела; (в) – терминальная часть влагалища на сагиттальном срезе тела. *1* – наружная пластинка тегумента, *2* – базальная пластинка, *3* – отверстие влагалища, *4* – цитоны тегумента, *5* – кольцевые, *6* – продольные, *7* – диагональные мышцы покровов, *8* – окончания дорсо-вентральных мышц, *9* – шип, *10* – продольные мышцы шипа, *11* – сфинктер шипа, *12* – эпителий стенки семенного пузырька, *13* – мышечный плексус.

Таблица 1. Диаметр продольных мышц покровов *G. urna* (мкм)

Участок тела	Сторона		
	спинная	брюшная	боковая
На уровне присосковидного органа	1.4–4.8 × 1–2.4	2.9–6.7 × 1.9–3.9	1–1.9 × 1–1.9
От присосковидного органа до матки	1.4–2.4 × 1–1.4	1.4–2.4 × 1–1.4	1–1.4 × 1
На уровне матки и семяприемника	0.5–1.4 × 0.5–1.4	0.5–1.4 × 0.5–1.4	0.5–1.2
От семяприемника до основания розетки	1–1.9 × 1–1.4	1–1.9 × 1–1.4	0.5–1.2
Основание розетки	0.5–2.9 × 0.5–1.9	0.5–2.9 × 0.5–1.9	0.5–1.4 × 0.5–1.4

Таблица 2. Параметры диагональной мускулатуры покровов *G. urna* (мкм)

Участок тела	Сторона	
	спинная	брюшная
На уровне присосковидного органа	2.9–4.8 5.8–9.6 6.7–14.4	2.9–5.8 14.4–19.2 4.8–14.4
От присосковидного органа до семяприемника	1.4–4.8 24.6–49.2 4.8–11.5	1.4–5.8 24.6–49.2 4.8–14.4
От семяприемника до основания розетки	1.4–2.9 24.6–49.2 4.8–9.6	1.4–4.8 24.6–49.2 3.8–11.5
Основание розетки	1–2.9 6.7–16.3 1.9–5.8	1–2.9 6.7–16.3 1.9–6.7

диагональных мышц тупой. В каждой ячейке табл. 2 последовательно представлены толщина отдельных мышечных волокон, толщина диагонального слоя и расстояние между соседними мышечными волокнами на соответствующем участке покровов. Максимальная толщина диагональных мышц не меняется от переднего конца тела до заднего края семяприемника и на брюшной стороне тела немного превосходит таковую на спинной стороне. Позади семяприемника толщина убывает на обеих сторонах тела. Самые тонкие мышечные элементы (1–1.9 мкм) находятся в боковых складках тела и в лопастях розетки. Оценка толщины не отдельных мышц, а слоя в целом показывает иную закономерность: разница в толщине на спинной и брюшной сторонах тела просматривается лишь на уровне присосковидного органа. Позади органа слой становится более рыхлым, и значение данного показателя резко нарастает, уменьшаясь вновь только в основании розетки. На боковых сторонах тела толщина слоя на уровне присосковидного органа составляет 6.7–7.7 мкм, а позади него уменьшается с 19.2 мкм в проксимальных частях боковых складок до 4.9 мкм в их дистальных частях. В лопастях розетки происходит аналогичное уменьшение с 12 до 3.7 мкм.

Периферической группой паренхимных мышц являются наружные продольные, расположенные в виде слоя под диагональными мышцами. Их передние концы крепятся к покровам в задней половине полости присосковидного органа, а также вокруг органа, задние концы – к покровам наружной (обращенной в полость кишечника хозяина) стороны лопастей первого и второго порядка розетки (рис. 2–5). На уровне присосковидного органа и в основании розетки форма сечения мышц поперечно-овальная при одинаковой толщине на всех сторонах тела (табл. 3). Позади данного органа форма сечения мышц овальная, реже округлая, а толщина резко возрастает на спинной и особенно брюшной сторонах тела, уменьшаясь вновь лишь в основании розетки. На боковых сторонах тела обсуждаемые мышцы самые тонкие, без закономерных изменений толщины в направлении спереди назад. В большей части тела они располагаются на расстоянии меньше собственного диаметра друг от друга. На участке от заднего края семяприемника до розетки расстояние составляет один диаметр, а в розетке и ди-

Таблица 3. Диаметр наружных продольных паренхимных мышц *G. urna* (мкм)

Участок тела	Сторона		
	спинная	брюшная	боковая
На уровне присосковидного органа	2.9–3.4 × 2.9–14.4	2.9–3.4 × 2.9–14.4	2.9–3.4 × 2.9–14.4
От присосковидного органа до матки	17.2–24.6 × 9.8–17.2	29.5–44.3 × 12.3–24.6	2.5–12.3 × 2.5–7.4
На уровне матки и семяприемника	17.2–24.6 × 9.8–17.2	17.2–49.2 × 9.8–24.6	2.5–7.4 × 2.5–7.4
От семяприемника до основания розетки	17.2–49.2 × 12.3–36.9	27.1–56.6 × 12.3–49.2	4.9–17.2 × 4.9–12.3
Основание розетки	9.6–19.7 × 9.6–24.6	9.6–19.7 × 9.6–24.6	9.6–19.7 × 9.6–24.6

стальных участках боковых складок тела – четыре диаметра.

Слой кольцевых паренхимных мышц наблюдается практически по всей длине тела, кроме лопастей третьего порядка розетки (рис. 2–5). На уровне передней половины присосковидного органа он расположен под диагональными мышцами, позади названного участка – под наружными продольными паренхимными мышцами, в воронке и в полости розетки – под кольцевыми мышцами покровов. Диаметр мышц составляет 4.8–14.4 × 4.8–7.7 мкм в устье присосковидного органа, 29.5–39.4 × 17.2–22.1 мкм на уровне передней и задней третей органа и 9.8–17.2 × 14.8–29.5 мкм на уровне его широкой средней трети. Между присосковидным органом и дистальной частью матки диаметр кольцевых паренхимных мышц значительно больше (24.0–72.0 × 9.6–38.4 мкм). На всех названных участках он одинаков на спинной и брюшной сторонах тела. На уровне матки и семяприемника диаметр мышц уменьшается, причем на спинной стороне тела сильнее, чем на брюшной (17.2–36.9 × 9.8–17.2 и 36.9–49.2 × × 24.6–36.9 мкм соответственно). Позади семяприемника до основания розетки включительно их диаметр вновь возрастает, достигая 49.2–61.5 × × 19.7–49.2 мкм. Максимальная толщина слоя (49.2–73.8 × 4.9–7.4 мкм) зарегистрирована на границе полостей розетки и воронки. В боковых складках тела обсуждаемые мышцы намного тоньше, чем в его центральной части (2.5–9.8 × × 2.5–12.3 мкм), а в лопастях розетки их диаметр минимален (1.2–3.7 × 1.2–3.7 мкм). В этих двух частях тела и на уровне средней трети присосковидного органа форма сечения мышц поперечно-овальная, редко округлая, на прочих участках покровов – в основном овальная. Расстояние между соседними мышцами не превышает их диаметра и лишь в лопастях розетки может достигать трех диаметров.

Внутренние продольные паренхимные мышцы расположены под кольцевыми паренхимными и прослеживаются от переднего конца тела до лопастей розетки включительно (рис 2–5). На уровне присосковидного органа данные мышцы образуют почти правильный однорядный слой. Над и под органом они имеют диаметр 1.9–9.6 × × 4.8–14.4 мкм и расположены вплотную друг к другу. По бокам от органа диаметр составляет 1.9–30.7 × 1.9–11.5 мкм, а расстояние между ними постепенно нарастает в латеральных направлениях от одного до пяти собственных диаметров. На участке от присосковидного органа до снования розетки внутренние продольные паренхимные мышцы образуют две мощные зоны на спинной и брюшной сторонах тела. В этих зонах их диаметр варьирует в пределах 4.9–93.9 × 3.7–39.4 мкм. На боковых сторонах тела (но не в боковых складках, где их нет), описываемые мышцы располагаются однорядным слоем. Здесь их толщина растет в направлении спереди назад: 2.5–19.7 × 2.5–12.3 мкм на участке от присосковидного органа до протока матки и 4.9–36.9 × 2.5–12.3 мкм на уровне матки и позади нее. Внутренние продольные паренхимные мышцы обнаружены не только на периферии тела, но и в его центральной части возле влагалища и семяизвергательного канала, между семенниками и редко рядом с семяприемником и яичником. В основании розетки (рис. 5) толща тела буквально заполнена этой группой мышц. Здесь мышечные элементы диаметром 7.4–61.5 × 4.9–19.7 мкм распределены равномерно и отстоят друг от друга на расстояние, не превышающее максимальный диаметр. От основания розетки данные мышцы заходят в лопасти, располагаясь слоем в центральной части каждой из них. В направлении спереди назад диаметр мышц плавно убывает и составляет в самых тонких лопастях 4.9–12.3 × 4.9–12.3 мкм при расстоянии между соседними мышцами до трех максимальных диаметров.

G. urna имеет хорошо развитую дорсо-вентральную мускулатуру. Она распространена от средней части присосковидного органа до места разделения розетки на лопасти. По бокам от при-

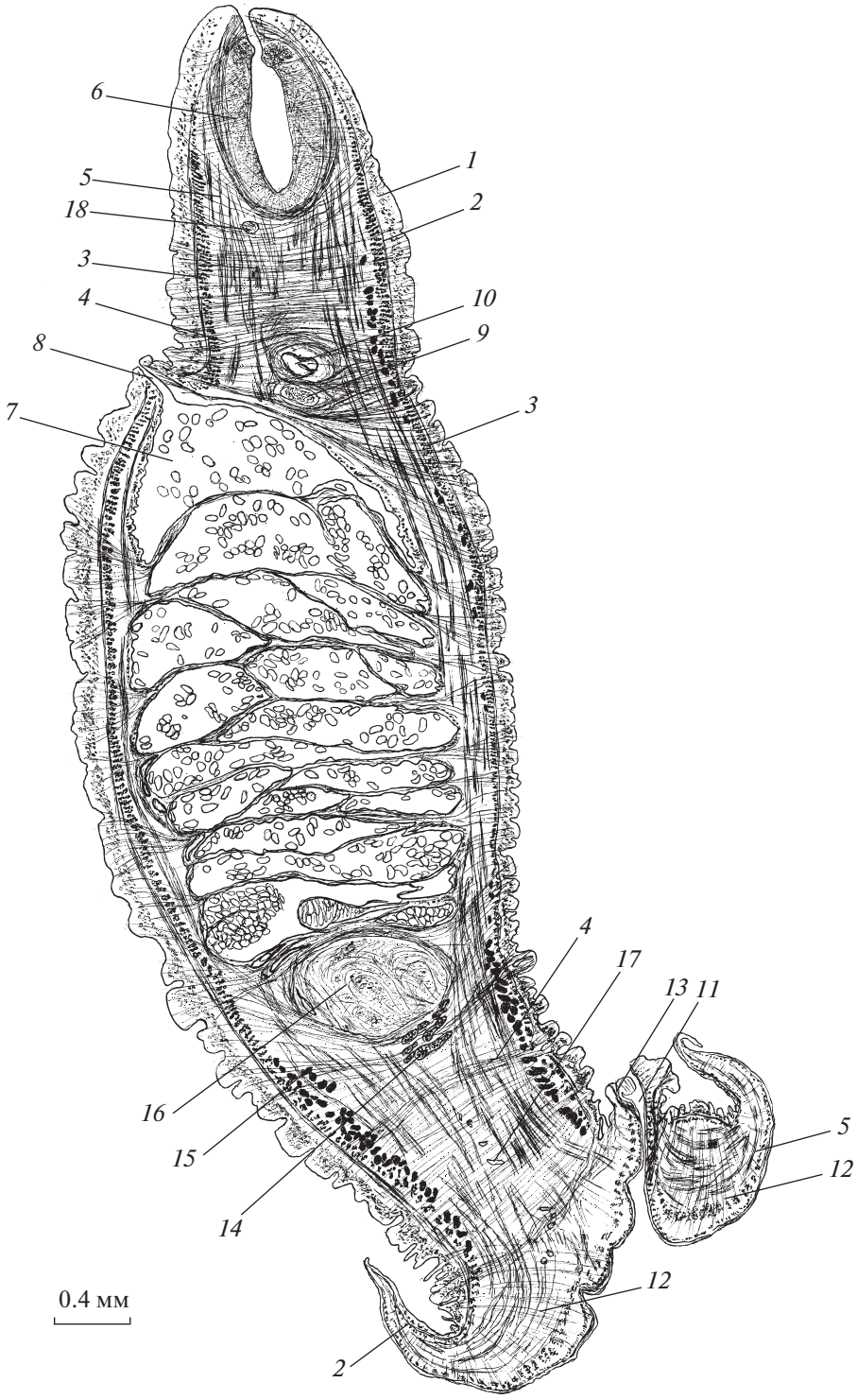

Рис. 2. Мускулатура *G. urna* на срединном сагиттальном срезе тела. *1* – диагональные, *2* – наружные продольные паренхимные, *3* – кольцевые паренхимные, *4* – дорсо-вентральные, *5* – внутренние продольные паренхимные мышцы, *6* – присосковидный орган, *7* – матка, *8* – проток матки, *9* – семенной пузырек, *10* – семяизвергательный канал, *11* – полость воронки, *12* – радиальные мышцы розетки, *13* – хордальные мышцы воронки, *14* – скорлуповые железы, *15* – желточник, *16* – семяприемник, *17* – выделительный канал, *18* – фрагмент нервной комиссуры.

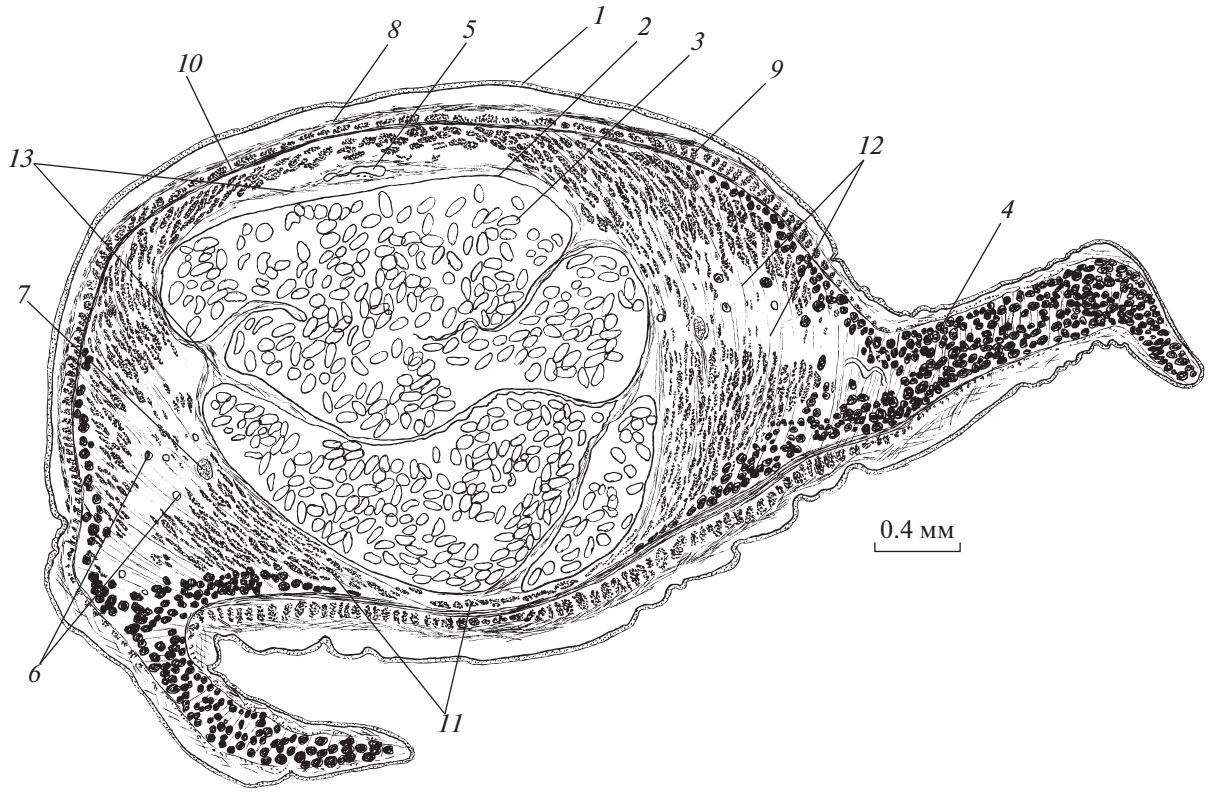

Рис. 3. Мускулатура *G. urna* (поперечный срез тела на уровне середины матки). *1* – наружная пластинка тегумента, *2* – матка, *3* – яйца, *4* – желточники, *5* – влагалище, *6* – выделительный канал, *7* – нервный ствол, *8* – диагональные, *9* – наружные продольные паренхимные, *10* – кольцевые паренхимные, *11* – внутренние продольные паренхимные, *12* – дорсо-вентральные мышцы, *13* – мышечный плексус вокруг матки и влагалища.

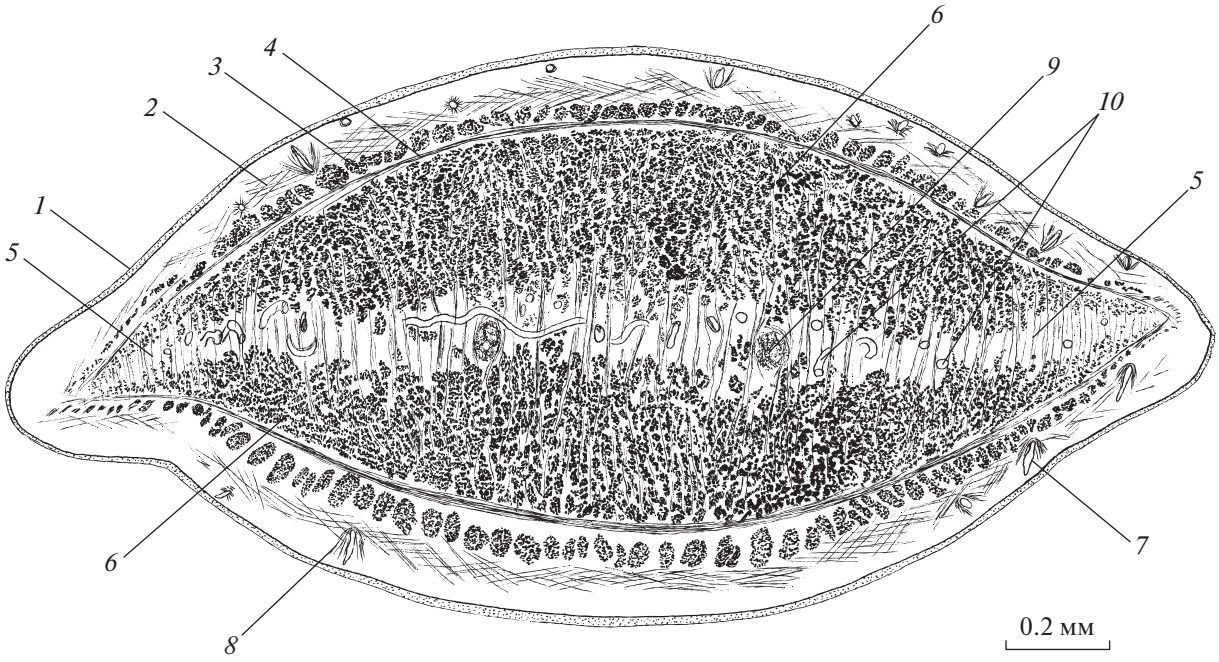

Рис. 4. Мускулатура *G. urna* (поперечный срез тела позади семяприемника). *1* – наружная пластинка тегумента, *2* – диагональные, *3* – наружные продольные паренхимные, *4* – кольцевые паренхимные, *5* – дорсо-вентральные, *6* – внутренние продольные паренхимные мышцы, *7* – шип, *8* – продольные мышцы шипа, *9* – нервный ствол, *10* – выделительный канал.

Рис. 5. Мускулатура *G. urna* (поперечный срез тела на уровне розетки). *1* – наружная пластинка тегумента, *2* – диагональные, *3* – наружные продольные паренхимные, *4* – кольцевые паренхимные, *5* – внутренние продольные паренхимные мышцы, *6* – продольные, *7* – кольцевые мышцы покровов в полости розетки, *8* – радиальные, *9* –"поперечные" мышцы розетки, *10* – выделительный канал, *11* – лопасти розетки.

сосковидного органа концы дорсо-вентральных мышц имеют наклон к плоскости симметрии тела, отчего мышцы обретают форму дуг, огибающих орган справа и слева. Концы мышц, расположенных сразу позади присосковидного органа, наклонены вперед (рис. 6–7). Здесь мышцы толще таковых на участке от присосковидного органа до матки (табл. 4). На уровне матки и семяприемника их толщина максимальна. Мышцы, расположенные между петлями матки, имеют крупные терминальные конусы (рис. 2). Кроме того, в узком пространстве между маткой и семяприемником проходит дорсо-вентральный мышечный пучок толщиной до 32 мкм. Непосредственно за семяприемником расположен еще более мощный пучок с толщиной неразветвленной части до 98.4 мкм. Оба его конца с большими терминальными конусами заметно смещены вперед. Позади данного пучка дорсо-вентральные мышцы вновь становятся тоньше, и в основании розетки наблюдается их наименьшая толщина. В боковых складках тела они в основном тоньше, чем в его центральной части, и расстояние между ними меньше. Здесь закономерности изменений толщины мышц и расстояния между ними сходны с таковыми в центральной части тела, но не идентичны им. Позади семяприемника толщина мышц в боковых складках уменьшается не столь заметно и выравнивается с толщиной в центральной части тела. Дополнительно отметим, что некоторые из дорсо-вентральных мышц крепятся к стенкам влагалища и семяизвергательного канала рядом с половыми отверстиями.

К паренхимной мускулатуре относятся также группы мышц, обнаруженные в розетке и воронке. Каждая лопасть первого и второго порядка розетки содержит многочисленные "поперечные" мышечные волокна толщиной 1 мкм или меньше, которые соединяют покровы на ее наружной и внутренней сторонах (рис. 5). Часть волокон собрана в пучки толщиной до 4.8 мкм. Помимо этого, в розетке до ее разделения на лопасти и в воронке имеются радиальные мышцы толщиной 1–3.8 мкм. Наконец, в воронке обнаружены немногочисленные хордальные мышцы (рис. 2). Они соединяют покровы в полости воронки на ее границе с розеткой и покровы апикальной части воронки. На их наружных концах хорошо выражены терминальные конусы. Толщина неразветвленных участков 4.8–9.6 мкм.

Интересной особенностью архитектоники паренхимной мускулатуры является наличие вокруг влагалища (за исключением терминальной части) и матки общего для обоих органов плексуса из мы-

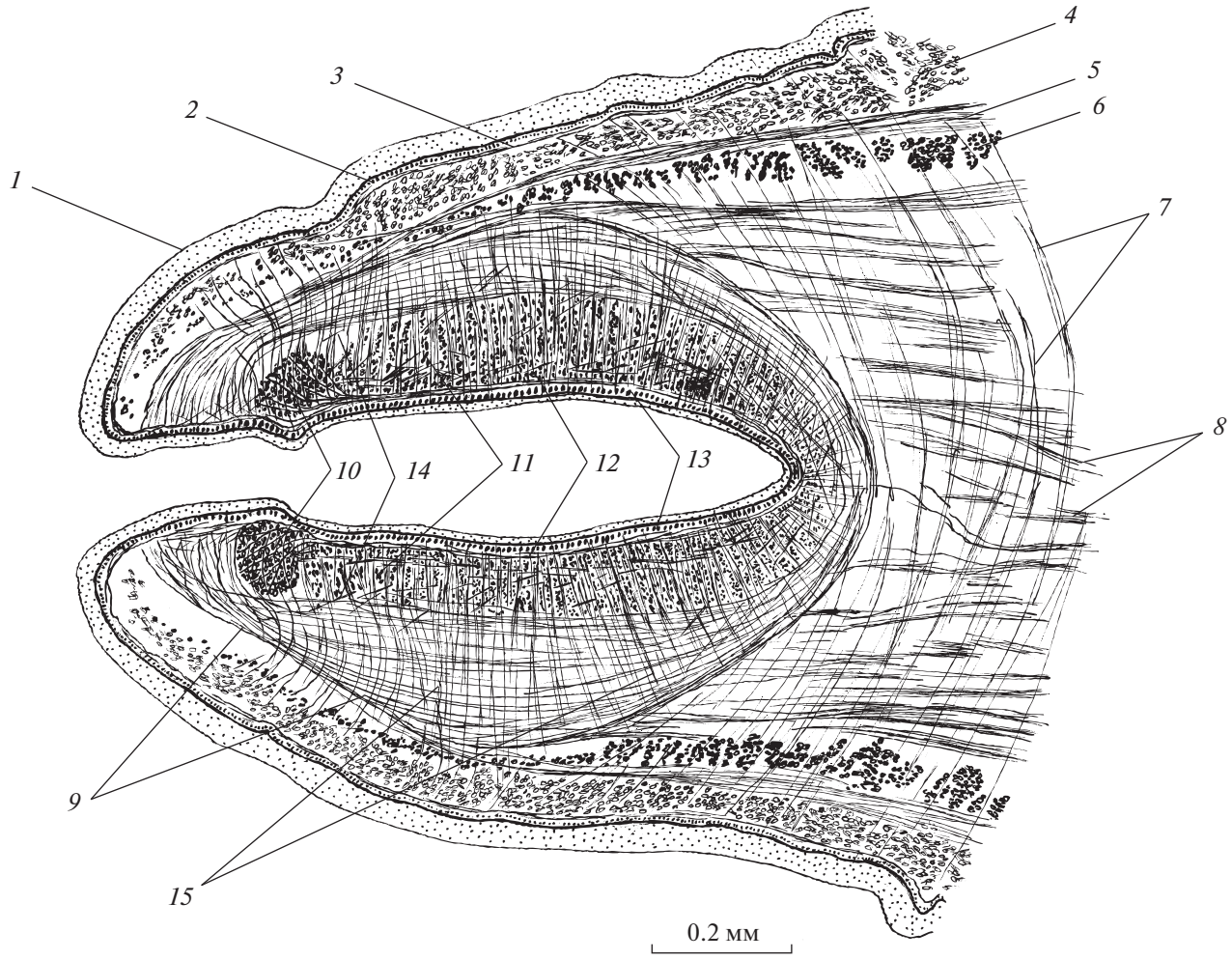

Рис. 6. Мускулатура переднего конца тела *G. urna* на срединном сагиттальном срезе. *1* – наружная пластинка тегумента, *2* – кольцевые, *3* – продольные, *4* – диагональные мышцы покровов, *5* – наружные продольные паренхимные, *6* – кольцевые паренхимные, *7* – дорсо-вентральные, *8* – внутренние продольные паренхимные мышцы, *9* – наружные продольные мышцы, *10* – сфинктер, *11* – наружные кольцевые мышцы, *12* – внутренние продольные мышцы, *13* – внутренние кольцевые мышцы, *14* – диагональные мышцы, *15* – радиальные мышцы присосковидного органа.

шечных волокон толщиной 1–4.8 мкм (рис. 1б, 3). На срезах в любой проекции плексус напоминает рыболовную сеть, ячеи которой не одинаковы по форме и размеру. Его толщина достигает 19.2 мкм. Аналогичные плексусы окружают проксимальную половину семенного пузырька и семяприемник.

К мускулатуре специального назначения мы относим мускулатуру шипов и половых протоков. Продольная мускулатура каждого шипа образована многочисленными тонкими (менее 1 мкм) волокнами, отдельными или сгруппированными в пучки толщиной 1.9–2.9 мкм (рис. 1а). Внутренние концы этих волокон крепятся ко дну инвагинации базальной пластинки, в которой находится шип, а наружные – к базальной пластинке по периметру устья инвагинации. Столь же тонкие и многочисленные кольцевые мышцы шипа формируют в устье инвагинации сфинктер диаметром 11.5–18.2 × 1.9–5.8 мкм. Сфинктер вытянут вдоль шипа. Глубже сфинктера, примерно до середины глубины инвагинации кольцевая мускулатура представлена однорядным слоем волокон на расстоянии 1–4 собственных диаметра друг от друга. Подчеркнем, что кольцевые и продольные мышцы шипа лежат в плоскостях, перпендикулярных тем, в которых расположены одноименные мышцы покровов. С каждым шипом связаны окончания дорсо-вентральных мышц. Одни из них крепятся по периметру устья инвагинации базальной пластинки снаружи от продольных мышц шипа, другие – ко дну инвагинации.

Мускулатура разных участков половых протоков дифференцирована в разной степени. В стенке дистальной половины семенного пузырька обнаружены кольцевой и диагональный мышечные слои, а в стенке семяизвергательного канала по-

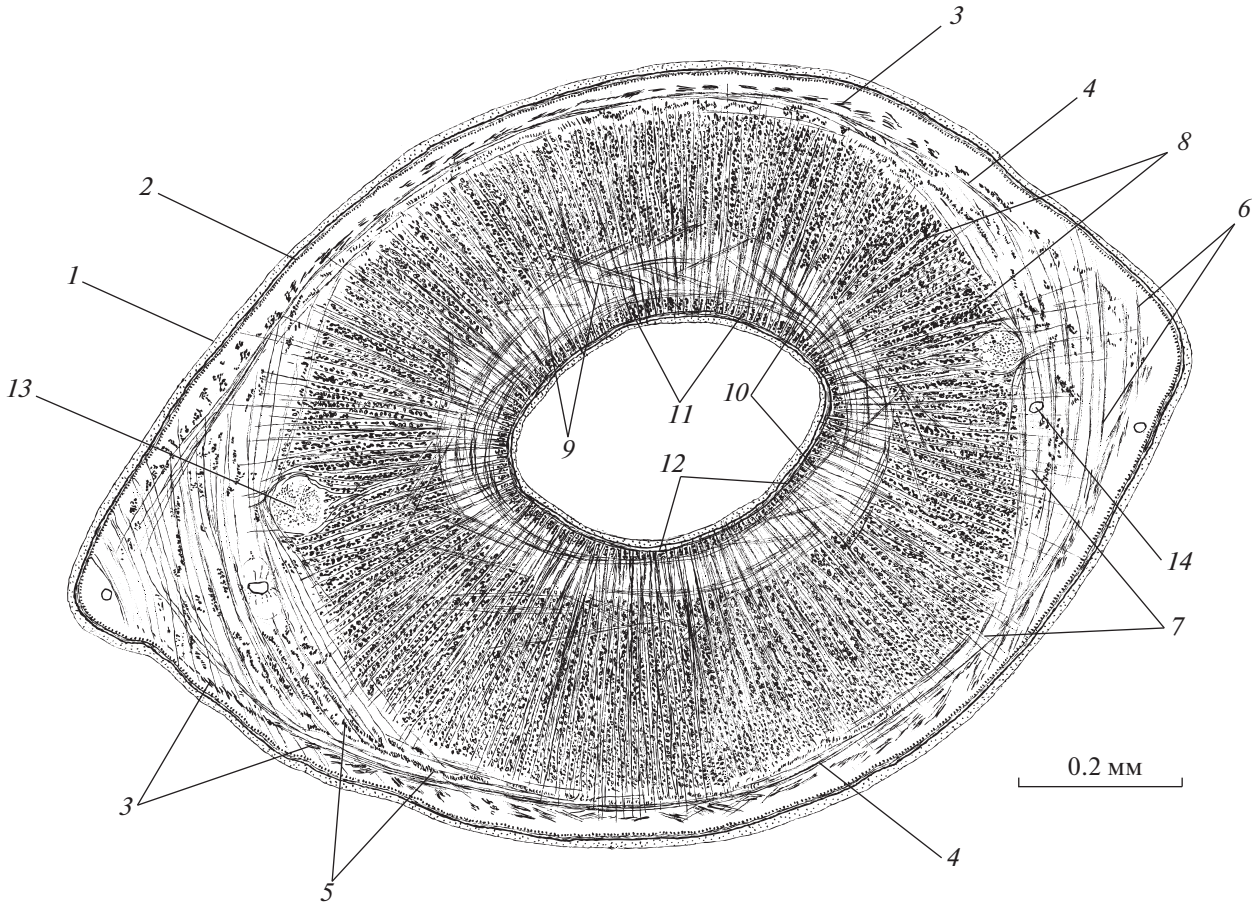

Рис. 7. Мускулатура *G. urna* (поперечный срез тела на уровне середины длины присосковидного органа). *1* – наружная пластинка тегумента, *2* – базальная пластинка, *3* – диагональные мышцы покровов, *4* – кольцевые паренхимные, *5* – внутренние продольные паренхимные, *6* – дорсо-вентральные мышцы, *7* – радиальные, *8* – наружные продольные, *9* – диагональные, *10* – наружные кольцевые, *11* – внутренние продольные, *12* – внутренние кольцевые мышцы присосковидного органа, *13* – нервный ствол, *14* – выделительный канал.

следовательно расположены продольный, кольцевой и диагональный. Та же последовательность мышечных слоев наблюдается в дистальной части влагалища (рис. 1в). Диаметр продольных мышц составляет в обоих протоках 1–2.9 × 1–3.8 мкм. В стенке влагалища они расположены вплотную друг к другу, а в семяизвергательном канале расстояние между ними 1–2 собственных диаметра. Кольцевые мышцы диаметром 1–2.4 × 1–1.9 мкм разнесены на расстояние 1–3 диаметра. Показатели диагональной мускулатуры такие же, как у одноименных мышц покровов в основании розетки. Продольные мышцы влагалища заходят вглубь протока до уровня переднего края семенного пузырька. В стенке матки имеются тонкие (1 мкм и меньше), тесно расположенные кольцевые мышцы. В стенке ее короткого выводного протока, помимо кольцевой, обнаружена диагональная мускулатура. При этом кольцевые мышцы формируют хорошо различимый сфинктер толщиной 6.7–12.5 мкм.

Особым участком тела *G. urna* является присосковидный орган. В отличие от типичных присосок, мы называем его органом лишь условно ввиду отсутствия собственной оболочки (рис. 6–7). Он представляет собой углубление покровов на переднем конце тела, с которым топографически связано большое число мышечных элементов, относящихся как к мускулатуре покровов, так и паренхимной мускулатуре. Однако для удобства изложения мы описываем его как дискретное образование с условной границей по внешней поверхности слоя наружных продольных мышц. Группы мышц данного органа названы так же, как группы в присосках трематод (Ястребов и др., 2008) в силу сходства архитектоники.

Орган довольно крупный (995–1274 × 837–995 × × 762–930 мкм), слегка сжатый дорсо-вентрально, с почти цилиндрической полостью диаметром 298–381 × 251–298 мкм. В полости органа под покровами расположен слой внутренней кольцевой мускулатуры, а глубже него – слой внутренней

Таблица 4. Толщина дорсо-вентральных мышц *G. urna* и (в скобках) расстояние между ними (мкм)

Уровень	Участок тела	
	центральная часть	боковые складки
Присосковидный орган	2.9–12.3 (2.9–12.3)	1.9–2.9 (1.9–7.4)
От присосковидного органа до матки	2.5–9.6 (28.8–33.6)	1.9–4.8 (2.9–9.6)
Матка и семяприемник	2.5–14.4 (50–390)	2.5–7.4 (7.4–24.6)
От семяприемника до основания розетки	2.5–6.2 (2.5–24.6)	1.2–6.2 (2.5–9.8)
Основание розетки	1–2.9 (6.7–24.6)	1.2–4.9 (2.5–9.2)

продольной. Оба слоя фактически относятся к мускулатуре покровов и состоят из тесно расположенных, овальных в сечении мышечных волокон диаметром 2.9–5.8 × 1.4–3.8 и 5.8–11.5 × 1.9–3.8 мкм соответственно. Наружные кольцевые мышцы диаметром 1.4–29.5 × 2.5–7.4 мкм находятся непосредственно под внутренними продольными и образуют "многоэтажный" слой толщиной 91–123 мкм. Они располагаются как вплотную друг к другу, так и реже. Максимальные расстояния (12.3–17.2 мкм) обусловлены размером клеток паренхимы. Данная группа мышц формирует крупный (118.1–147.9 × 68.9–103.3 мкм) сфинктер из плотно "упакованных" мышечных волокон диаметром меньше 1 мкм. Внутренние продольные мышцы дают множество ответвлений в сфинктер, который пронизан ими по всему объему. Ответвления не выходят за пределы сфинктера и, возможно, крепятся к его элементам, создавая на данном участке мышечный ретикулум. Наружные продольные мышцы являются (по крайней мере, частично) производными внутренних продольных паренхимных мышц. Они образуют мощный слой толщиной в средней трети органа 172–204 мкм, состоящий из округлых в сечении мышечных волокон диаметром 1–3.7 мкм. Часть из них почти касается друг друга, часть разделена расстоянием до двух собственных максимальных диаметров. В передней трети органа толщина слоя снижается до 73.8–98.4 мкм, в задней трети – до 49.2–61.5 мкм. Передние концы наружных продольных мышц имеют терминальные конусы. Зона их крепления к покровам находится в устье органа впереди от сфинктера. На боковых сторонах органа зона протяженней, чем на спинной и брюшной, и подходит ближе к переднему концу тела. Диагональные мышцы толщиной 1–4.9 мкм расположены более рыхло, чем на иных участках покровов, и довольно глубоко заходят в наружный кольцевой слой. Радиальные мышцы выходят за пределы органа, соединяя покровы в его полости с покровами тела вокруг него. На наружных концах имеются высокие, но не широкие терминальные конусы. Толщина неразветвленных участков 1.9–5.8 мкм, расстояние между ними превосходит бо́льшую толщину в 2–3 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мускулатура *G. urna* мощная и разнообразная. Предыдущие исследования показывают, что в покровах снаружи от цитонов тегумента последовательно расположены кольцевой и продольный слои, а под цитонами – кольцевой, продольный и вновь кольцевой (Lyons, 1969). Целесообразно скорректировать представления цитированного автора в двух пунктах. Во-первых, мышечный слой, расположенный сразу под цитонами тегумента, является диагональным. Предположительно, он был принят за кольцевой потому, что диагональные мышцы, пересекающиеся под тупым углом, на срезах нередко похожи на кольцевые, и для определения их хода требуется сравнение срезов в разных проекциях. Во-вторых, мы относим к мускулатуре покровов лишь кольцевой, продольный и диагональный слои, а прочие – к паренхимной мускулатуре.

По вопросу о нижней границе покровов плоских червей нет общепринятого мнения. Если считать границей цитоны тегумента, то диагональную мускулатуру обсуждаемого вида следует отнести к паренхимной. Между тем "трехслойная" схема мускулатуры покровов хотя и не тотальна, но обычна в разных группах плоских червей (Иванов, 1952; Быховский, 1957; Гинецинская, 1968; Иоффе, 1981; Дубинина, 1982; Smyth, Halton, 1983; Rieger *et al.*, 1991; Mair *et al.*, 1998; Halton, Maule, 2004; Tyler, Hooge, 2004). При этом диагональные мышцы могут располагаться не только над, но и под цитонами тегумента, что отмечается,

например, у трематод отряда Cyclocoelida Odening, 1961 (Ястребов, 1998; Ястребова и др., 2008).

Независимо от топографии диагональных мышц, мы считаем их наличие своего рода маркером монозоичности плоских червей. Монозоичные формы используют гидравлическую локомоцию, в ходе которой диагональные мышцы скручивают тело относительно его продольной оси. У полизоичных цестод, напротив, в покровах обычно регистрируются лишь кольцевые и продольные мышцы (Lumsden, Byram, 1967; Braten, 1968; Тимофеев, Куперман, 1968; Rees, 1969; Andersen, 1975; Протасова, 1977; Делямуре и др., 1985; Ward *et al*., 1986; Valkounova, 1987). Причина состоит, на наш взгляд, в частичном переходе полизоичных форм от гидравлической локомоции к волновой, чему способствует сильно вытянутая стробила. При волновой локомоции особое значение обретают продольные мышцы, изгибающие тело. У цестод (в дополнение к покровам) они обильно развиваются в паренхиме (Фрезе, 1965; Дубинина, 1966; Спасская, 1966; Мовсесян, 1977). Диагональные мышцы покровов характерны лишь для монозоичных видов отряда Caryophillaeidea Deneden in Carus, 1863 (Протасова и др., 1990). В полизоичных группах их наличие можно ожидать в области сколекса, шейки и, возможно, первых члеников стробилы.

Крупный размер шипов *G. urna* имеет два морфологических следствия. Во-первых, они располагается в глубоких инвагинациях базальной пластинки, что, вероятно, предохраняет от выламывания. Во-вторых, каждый шип "обслуживается" тремя группами мышц. Продольные мышцы шипа являются его протракторами. Помимо них в протракции участвуют дорсо-вентральные мышцы, окончания которых крепятся вокруг устья инвагинации, где расположен шип. Ретракция производится также дорсо-вентральными мышцами, но крепящимися уже к основанию шипа. Кольцевая мускулатура шипа формирует сфинктер. Возможно, его сокращение замыкает устье инвагинации, если шип втянут в нее полностью, а также фиксирует положение шипа на определенном уровне протракции или ретракции. Таким образом, движение шипов регулируется довольно тонко.

Вооружение *G. urna* имеет конвергентное сходство с вооружением адорального диска трематод семейства Echinostomatidae Dietz, 1909. Их объединяют крупный размер, заглубление в покровы и наличие собственных продольных мышц (Fujino *et al*., 1994). Причину сходства мы видим в высокой механической нагрузке на сравнительно немногочисленные шипы. У представителей вида *Patagifer bilobus* Rud., 1819 к основаниям угловых шипов диска подходят, как у *G. urna*, дорсо-вентральные мышцы, осуществляющие их ретракцию. Отличие шипа трематод состоит в том, что он не погружен в инвагинацию базальной пластинки, а целиком заключен в образованную пластинкой капсулу (Ястребов, Ястребова, 2014).

В региональной дифференцировке мускулатуры *G. urna* обращает на себя внимание инвертированное положение кольцевого и продольного слоев в покровах полостей розетки и воронки. Сходная картина обнаружена на некоторых участках тела трематод, а именно в хвостовой камере и хвостовом придатке *Lecithochirium* sp. (Lecithochiriidae Skrjabin et Guschanskaja, 1954), а также в вентральной части переднего сегмента тела и в органе Брандеса *Ichthyocotylurus platycephalus* (Creplin, 1825) (Strigeidae Railliet, 1919) (Ястребова, Ястребов, 1999; Ястребова и др., 2004). В названных случаях инверсия мышечных слоев отмечается на специализированных и филогенетически относительно молодых участках тела гельминтов. Возможно, ее причина кроется в происхождении данных участков и будет понята при изучении времени их закладки в онтогенезе и механизмов развития.

Пространственное распределение мышечных элементов показывает отсутствие диагональной мускулатуры в покровах полостей воронки и розетки и в лопастях третьего порядка розетки. В лопастях розетки нет также кольцевых паренхимных и наружных продольных паренхимных мышц, а в боковых складках тела – внутренних продольных паренхимных мышц. Обе группы продольных паренхимных и кольцевые паренхимные мышцы в розетке наиболее разрежены. Кроме того, в розетке и в боковых складках тела все мышцы покровов, дорсо-вентральные, продольные и кольцевые паренхимные мышцы имеют наименьшую толщину.

Таким образом, боковые складки тела и лопасти розетки характеризуются минимальным количеством мускулатуры и минимальным разнообразием групп мышц. Мускулатура сосредоточена главным образом в массивной "основной" части тела и способна изменять его форму любым необходимым способом при фиксации и передвижении. Тупой угол пересечения диагональных мышц свидетельствует, что они не столько скручивают тело, сколько служат синергистами кольцевой мускулатуры. Большой размер и, соответственно, вес тела обусловливает наличие мощной дорсо-вентральной мускулатуры, а также развитие в паренхиме продольных и в меньшей степени кольцевых мышц, дополняющих одноименные мышцы покровов.

Сокращение паренхимных мышц механически воздействует на полые репродуктивные органы и перемещает по ним гаметы и яйца. Особая роль в этом принадлежит мышечному плексусу вокруг половых протоков. Та его часть, что окружает мешковидное расширение матки, необходима также для выведения яиц во внешнюю среду.

Наличие расширения позволяет предположить, что они выводятся не перманентно, а периодически, довольно большими порциями, хотя причины этого нам не ясны. В период накопления яиц узкий выводной проток матки замкнут сфинктером, отмеченным также другими авторами (Poddubnaya *et al.*, 2009). При накоплении и выведении яиц сфинктер и плексус, по-видимому, работают в противофазе. Похожие матки с мешковидным расширением дистального участка и порционным выведением яиц отмечены у трематод (Ошмарин, 1975). Их сходство с маткой обсуждаемого вида является конвергентным.

Изучение срезов розетки *G. urna* показывает, что ее строение иное, чем описано на живых и фиксированных особях. Есть мнение, что развитие розетки начинается на постларвальной стадии с чашевидной прикрепительной структуры, захватывающей одну ворсинку кишечника хозяина. В ходе роста и развития червя число таких структур увеличивается и может превышать десяток (Halvorsen, Williams, 1968). Возможно, развитие розетки начинается именно так, но не учтено ее деление на лопасти у взрослых особей.

Архитектоника мускулатуры говорит о высокой подвижности всех частей розетки. В функционировании данного органа, по-видимому, используются два механизма прикрепления. Первый из них не требует мышечных усилий и обеспечивается комплексом желез, секреты которых способствуют как слипанию лопастей с тканями хозяина, так и его прекращению (Poddubnaja *et al.*, 2008). Не исключено, что с субстратом слипаются и боковые складки тела гельминта. Учитывая конфигурацию розетки и складок, очевидно, что общая площадь контакта тканей паразита и хозяина весьма велика. Вторым механизмом фиксации служит присасывание. Размер полости розетки свидетельствует о значительном присасывательном эффекте. При фиксации увеличение полости производится сокращением радиальной мускулатуры розетки и заходящих в нее продольных паренхимных мышц.

В воронке радиальная и кольцевая мускулатура регулируют диаметр просвета, продольные мышцы – ее длину, а хордальные – то и другое. Очевидно, что быть самостоятельным органом прикрепления взрослых особей воронка не может из-за слишком мелкого размера. Розетка и воронка функционируют как единое целое, и последняя, по-видимому, способна создавать лишь дополнительный, не слишком большой присасывательный эффект. Мы считаем справедливым мнение, что отверстие воронки, закрытое во время присасывания, открывается для стравливания давления в полости розетки и открепления гельминта от субстрата (Halvorsen, Williams, 1968). Края дорсальной поры воронки заметно утолщены, но мускулатуры на данном участке не много. Возможно, закрывание поры осуществляется не только мышечными усилиями, но и гидравлически, нагнетанием жидкости в данный участок тела.

Относительный размер присосковидного органа, разнообразие, степень развития и архитектоника его мускулатуры показывают, что он является весьма подвижным прикрепительным образованием. Здесь наблюдается этап эволюции мышечной системы плоских червей, на котором отсутствие присосок в собственных оболочках не мешает эффективной фиксации.

Интересно сравнить мускулатуру присосковидного органа и прекрасно развитых брюшных присосок трематод. Сравнение с ротовыми присосками не столь целесообразно, так как они являются сквозными органами. Группы мышц, типичные для брюшных присосок трематод, помимо радиальных, включают наружные и внутренние кольцевые, а также наружные и внутренние продольные. Один или оба кольцевых слоя не всегда, но часто формируют в устье органа сфинктер. Более редкими являются хордальные мышцы, обычно проходящие наискось от устья присоски к ее оболочке позади устья. И совсем редко в брюшных присосках наблюдается диагональная мускулатура (Ястребов, Ястребова, 2014). Легко заметить, что в присосковидном органе имеются все перечисленные группы. Передние концы наружных продольных мышц по топографии соответствуют хордальным мышцам присосок и являются их функциональными аналогами, раскрывая отверстие органа.

При всем сходстве групп мышц, присосковидный орган сильно отличается от брюшных присосок трематод. Отличие состоит в обратной пропорциональности развития радиальных мышц с одной стороны и прочих групп мышц – с другой. В брюшных присосках трематод слои кольцевых, продольных и диагональных мышц составляют периферическую мускулатуру. Наружные и внутренние слои разделены толщей стенки присоски, где обычно нет никаких мышц, кроме радиальных. Это же можно сказать и о ротовых присосках трематод, за исключением представителей отряда Paramphistomatida Skrjabin et Schulz, 1937, имеющих в этих органах срединные слои мускулатуры (Burdakova *et al.*, 2015). В присосковидном органе радиальная мускулатура, напротив, теряется на фоне кольцевых и продольных мышц, заполняющих практически весь его условный объем.

Скорее всего, причина наблюдаемого различия – наличие у присосок трематод оболочки. Оболочка делает орган компактным, и сравнительно слабая периферическая мускулатура достаточна для изменения его формы. В случае с присосковидным органом кольцевые и продольные мышцы перемещают большой объем тканей на переднем конце тела гельминта, в том числе за

условной границей органа, что требует от них большой мощности. Можно предположить, что функционирование присосковидного органа связано больше с обжиманием субстрата, чем с созданием присасывательного эффекта. Добавим, что концы дорсовентральных мышц, огибающих орган сзади, имеют заметный наклон вперед и при сокращении производят его протракцию. Ретракторами органа являются внутренние продольные паренхимные мышцы, крепящиеся к нему сзади.

Общий обзор архитектоники мускулатуры *G. urna* показывает, что сохранение гельминтом локализации достигается прикреплением и перемещением. Органы прикрепления расположены на концах тела, и на каждом конце дополнены вооружением. Топография вооружения говорит о том, что на заднем конце тела прикрепительная зона не ограничивается розеткой, а заходит вперед от нее до границы распространения соматических шипов. Локомоция, вероятно, сходна с таковой у всех плоских червей (моногеней, ряда трематод и турбеллярий), прикрепительные органы которых расположены на полюсах тела. Однако у *G. urna* ожидаемы два нюанса. Во-первых, возможно, что боковые складки тела участвуют в локомоции ундулированием. Подобное явление отмечено для плоских боковых полей тела при перемещении трематоды *Fasciola hepatica* L., 1758 (Fasciolidae Railliet, 1895) (Русак, Папина, 1970). Во-вторых, в теле *G. urna* четко выделяются два специализированных участка отлично различимых на рис. 2, которым, по всей вероятности, принадлежит главная роль в удлинении и укорочении тела. Их общими чертами являются отсутствие массивных частей половой системы и высокая концентрация паренхимной мускулатуры. Протяженность переднего участка – от присосковидного органа до переднего края матки, второго – от заднего края семяприемника до основания розетки.

Таким образом, на примере *G. urna* можно видеть, что мышечная система достигает высокой степени сложности даже на относительно ранних этапах эволюции плоских червей. Несомненно, некоторые качественные черты данной системы (наличие или отсутствие определенных групп мышц, последовательность мышечных слоев и др.) являются диагностическими или специфическими признаками таксонов различного ранга. Кроме того, сравнение принципов устройства мышечных систем в разных классах Plathelminthes полезно для выявления филогенетических связей внутри типа не меньше, чем сравнение покровов, половых систем или иных структур. В настоящее время материал по сравнительной анатомии мышечных систем фрагментарен, но его накопление и анализ имеет большие перспективы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Быховский Б.Е. Моногенетические сосальщики, их система и филогения. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 509 с.

Гинецинская Т.А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1968. 411 с.

Делямуре С.Л., Скрябин А.С., Сердюков А.М. Дифиллоботрииды – ленточные гельминты человека, млекопитающих и птиц / Основы цестодологии. Т. 11. Ред.: Судариков В.Е. М.: Наука, 1985. 200 с.

Дубинина М.Н. Ремнецы фауны СССР. М.–Л.: Наука, 1966. 261 с.

Дубинина М.Н. Паразитические черви класса Amphilinida. Л.: Наука, 1982. 143 с.

Иванов А.В. Строение *Udonella caligorum* Jonston, 1835 и положение Udonellidae в системе плоских червей // Тр. ЗИН АН СССР. Т. 14. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1952. С. 112–163.

Иоффе Б.И. Строение темноцефалид и морфологические изменения при переходе к паразитизму у плоских червей // Паразитология. 1981. Т. 15. № 3. С. 209–218.

Куперман Б.И. Функциональная морфология низших цестод. Л.: Наука, 1988. 167 с.

Мовсесян С.О. Цестоды фауны СССР и сопредельных территорий. Давэнеаты. М.: Наука, 1977. 272 с.

Ошмарин П.Г. К понятию “фиксация гельминтов” // Биологические ресурсы Дальнего Востока. М.: Изд-во АН СССР, 1960. С. 182–190.

Ошмарин П.Г. Экологическое значение расширения дистального участка матки некоторых трематод // Паразитология. 1975. Т. 9. № 5. С. 434–438.

Протасова Е.Н. Ботриоцефаляты – ленточные гельминты рыб / Основы цестодологии. Т. 8. Ред.: Рыжиков К.М. М.: Наука, 1977. 298 с.

Протасова Е.Н., Куперман Б.И., Ройтман В.А., Поддубная Л.Г. Кариофиллиды фауны СССР. М.: Наука, 1990. 238 с.

Русак Л.В., Папина Р.И. Двигательная активность *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) *in vitro* // Зоол. журн. 1970. Т. 49. № 9. С. 1285–1289.

Спасская Л.П. Цестоды птиц СССР. Гименолепидиды. М.: Наука, 1966. 698 с.

Тимофеев В.А., Куперман Б.И. Ультратонкое строение кутикулы и субкутикулярного слоя процеркоида, плероцеркоида и взрослых особей *Triaenophorus nodulosus* (Pall.) // Паразитология. 1968. Т. 2. № 1. С. 42–49.

Фрезе В.И. Протеоцефаляты – ленточные гельминты рыб, амфибий и рептилий. М.: Наука, 1965. 538 с.

Ястребов М.В. Локомоторные аппараты некоторых Trematoda (Plathelminthes) с недифференцированным телом // Зоол. журн. 1998. Т. 77. № 6. С. 627–638.

Ястребов М.В., Ястребова И.В. Мышечная система трематод (строение и возможные пути эволюции). М.: КМК, 2014. 343 с.

Ястребов М.В., Ястребова И.В., Филимонова Л.В. Об эволюционной пластичности мышечной системы гермафродитного поколения трематод (Plathelminthes, Trematoda) // Систематика и биология па-

разитов. Тр. Центра паразитологии ИПЭЭ РАН. Т. 45. М.: Наука, 2008. С. 184–213.

Ястребова И.В., Ястребов М.В. Мускулатура стенки тела *Ichthyocotylurus platycephalus* (Trematoda, Strigeidae) // Зоол. журн. 1999. Т. 78. № 11. С. 1267–1274.

Ястребова И.В., Ястребов М.В., Фрезе В.И. Мышечная система *Lecithochirium sp.* (Trematoda, Lecithochiriidae) // Успехи общей паразитологии. Тр. ИНПА РАН. Т. 44. М.: Наука, 2004. С. 433–450.

Ястребова И.В., Ястребов М.В., Филимонова Л.В. Мышечная система двух представителей отряда Cyclocoelida (Plathelminthes, Trematoda) // Систематика и биология паразитов. Тр. Центра паразитологии ИПЭЭ РАН. Т. 45. М.: Наука, 2008. С. 214–231.

Andersen K. The functional morphology of the scolex of *Diphyllobothrium* Cobbold (Cestoda, Pseudophyllidea). A scanning electron and light microscopical study on scolex of adult *D. dendriticum* (Nitzsch*), D. latum* (L.) and *D. ditremum* (Creplin) // Intern. J. for Parasitol. 1975. V. 5. P. 487–493.

Braten T. The fine structure of the tegument of *Diphyllobothrium latum* (L.). A comparison of the plerocercoid and adult stages // Z. Parasitenk. 1968. Bd. 30. S. 194–112.

Burdakova E.N., Yastrebova I.V., Yastrebov M.V. The Oral Sucker Muskles of Six Representatives of the Order Paramphistomatida (Plathelminthes, Trematoda) // Biology Bull. 2015. V. 42. P. 108–116.

Fujino T., Fried B., Hosier D. The expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) from ICR mice: extension/retraction mechanisms and ultrastructure of the collar spines // Parasitol. Res. 1994. V. 80. P. 581–587.

Halton D., Maule A. Flatworm nerve–muscle: structural and functional analysis // Can. J. Zool. 2004. V. P. 316–333.

Halvorsen O., Williams H. Gyrocotyle (Platyhelminthes) in *Chimaera monstrosa* from Oslo Fjord with emphasis on its mode of attachment and a regulation in the degree of infection // Nytt. Mag. Zool. 1968. V. 15. P. 130–142.

Lumsden R., Byram J. The ultrastructure of Cestode muscle // J. Parasitol. 1967. V. 53. P. 326–342.

Lyons K. The fine structure of the body wall of *Gyrocotyle urna* // Z. Parasitenk. 1969. Bd. 33. S. 95–109.

Mair G., Maule A., Shaw C., Halton D. Muscling in on parasitic flatworms // Parasitol. Today. 1998. V. 14. P. 73–76.

Poddubnaya L., Scholz T., Kuchta R., Levron C., Gibson D. Ultrastructure of the surface structures and secretory glands of the rosette attachment organ of *Gyrocotyle urna* (Cestoda: Gyrocotylidea) // Folia Parasitologica. 2008. V. 55. P. 207–218.

Poddubnaya L., Kuchta R., Levron C., Gibson D., Scholz T. The unique ultrastructure of the uterus of the Gyrocotylidea Poche, 1926 (Cestoda) and its phylogenetic implications // Syst. Parasitol. 2009. V. 74. P. 81–93.

Rees G. Cestodes from Bermuda fishes and an account of *Acompsocephalum tortum* (Linton, 1905) gen. nov. from the lizard fish *Synodus intermedius* (Agassiz) // Parasitology. 1969. V. 59. P. 519–548.

Rieger R., Salvenmoser W., Legniti A., Reindl S., Adam H., Simonsberger P., Tyler S. Organization and differentiation of the body-wall musculature in *Macrostomum* (Turbellaria, Macrostomidae) // Hidrobiologia. 1991. V. 227. P. 119–129.

Smyth J., Halton D. The physiology of trematodes. Cambridge: Cambr. Univ. press, 1983. 446 p.

Tyler S., Hooge M. Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes) // Can. J. Zool. 2004. V. 82. P. 194–210.

Valkounova J. Comparative studies on the morphology, histology and histochemistry of Metacestodes (Hymenolepididae, Dilepididae and Dipylididae) // Folia parasitol. 1987. V. 34. P. 117–128.

Ward S., McKerr G., Allen G. Structure and ultrastructure of muscle systems within *Grilotia erinaceus* metacestodes (Cestoda: Trypanorhyncha) // Parasitology. 1986. V. 93. P. 587–597.

Muscle System of *Gyrocotyle urna* (Plathelminthes, Gyrocotylida)

I. V. Yastrebova[1] and M. V. Yastrebov[1, #]

[1]*Demidov Yaroslavl State University, pr. Matrosova 9, Yaroslavl, 150057 Russia*

[#]*e-mail: mvy@uniyar.ac.ru*

Musculature architectonics of the body, the attachment organs, and the genital ducts of *Gyrocotyle ur*na is described. It is shown that the lateral folds of the body and the rosette blades are characterized by the least amount and variety of musculature. In the integument, the position of each spine is regulated by three muscle groups. Most of the genital ducts are surrounded by a muscular plexus. The sucker-like organ is characterized by an extreme concentration of musculature. It is distinguished from the fluke suckers by its inverse proportionality in the degree of development of the radial muscles, on the one hand, and other muscle groups, on the other. Functional load of various muscle groups, mechanisms of helminth fixation and locomotion are discussed.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 423–434

ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.192:58.02:581.144.4

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОСЕННЕЙ РЕТРАНСЛОКАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ

© 2021 г. О. С. Железнова*, @, С. А. Тобратов*

**Рязанский государственный университет им. С.А. Есенина, ул. Свободы, 46, Рязань, 390000 Россия*

@E-mail: zheleznova_rzn@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.
После доработки 27.11.2019 г.
Принята к публикации 18.12.2019 г.

Изучена осенняя ретранслокация тяжелых металлов (ТМ) – Cu, Zn и Cd – из фотосинтезирующих органов древесных растений. Исследование проведено в подтаежных экосистемах Южной Мещеры (Рязанская область РФ). Показано влияние на ретранслокацию ТМ из стареющих листьев трех факторов: 1) характеристики химического элемента (степени его биофильности, мобильности элемента в растительных тканях, которая зависит в т. ч. от его способности к комплексообразованию в транспортных системах растений, а также геохимической аналогичности элементов с разными кларками, определяемой сходством строения внешних электронных оболочек); 2) видовых особенностей растений; 3) содержания элемента в почвенном растворе в биодоступной форме. Рассмотрена связь процесса ретранслокации Cu и Zn с азотным катаболизмом осенних листьев. Наиболее общей тенденцией является отток Cu из стареющих листьев и аккумуляция в них Zn. Доля ретранслоцируемого из листьев токсичного Cd широко варьирует между видами. Обсуждена многофакторность процесса ретранслокации и причины ее изменчивости в разных экологических условиях.

DOI: 10.31857/S1026347021040160

Круговороты минеральных элементов являются важнейшей характеристикой экосистемы. Одно из существенных звеньев круговорота – ретранслокация (резорбция) веществ из стареющих фотосинтезирующих органов многолетних видов (Aerts, Chapin, 1999; Vergutz *et al.*, 2012). Эффективность резорбции – это процентная доля химического элемента, экспортируемая из зрелых листьев до листопада (van Heerwaarden, 2004).

Ретранслокация является одной из важнейших составляющих малого биологического круговорота, выступая в качестве альтернативы выщелачиванию элементов осадками и их удалению при листопаде. Тем самым, ретранслокация способствует сохранению элементов в растительном организме, тогда как выщелачивание и листопад – их возврату в экосистему (Hagen-Thorn *et al.*, 2006). В зависимости от географических условий, биологических особенностей растений и геохимической специфики элементов устанавливается разное соотношение между этими противоположными по направленности процессами. Потенциально рост масштабов рециркуляции элементов внутри растения за счет снижения их потерь во внешнюю среду может способствовать росту устойчивости экосистем к загрязнению тяжелыми металлами (ТМ), поскольку сопровождается их накоплением в многолетних одревесневающих органах, что, в соответствии с методологией критических нагрузок, имеет наибольшее экологическое значение (Manual on methodologies..., 2004). Кроме того, резорбция питательных веществ из листьев деревьев и кустарников в их стволы, ветви и корни позволяет выдерживать флуктуации почвенной биодоступности элементов (Nieminen, Helmisaari, 1996; Viers *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2014).

Ретранслокация элементов из листьев активно изучается с 1970-х гг. При этом основными элементами исследований являются N и P, лимитирующие рост растений в широком диапазоне условий окружающей среды (Freschet *et al.*, 2010). В то же время ремобилизация микроэлементов и ТМ из листьев наименее изучена (Maillard *et al.*, 2015).

В целом, ретранслокация элементов из стареющих фотосинтезирующих органов зависит от трех главных факторов: геохимической специфики элемента (определяющейся строением атома); видовых особенностей растений; экологических факторов (главным образом, от содержания элемента в питательном растворе) (Niinemets, Tamm,

Таблица 1. Подвижные формы тяжелых металлов (мг/кг) в почвах Южной Мещеры и их экологические нормативы (ЭН*)

Элемент	Почвенные группировки			
	минеральные (песчаные)		органические (торфяные)	
	среднее	ЭН	среднее	ЭН
Cu	0.10 (0.07–0.14)	0.24	0.17 (0.10–0.23)	0.32
Zn	1.82 (0.90–3.45)	6.00	**7.72** (**5.25–11.99**)	2.45
Cd	**0.06** (0.04–**0.09**)	0.06	**0.18** (**0.12–0.22**)	0.08

Примечание. * ЭН – верхний предел накопления элемента в почве данного типа при отсутствии техногенного загрязнения (с учетом типологических и региональных особенностей почвообразования). ЭН является альтернативой традиционному гигиеническому нормированию на основе ПДК. Методика определения ЭН описана в работе (Tobratov *et al.*, 2016). Выделены случаи превышения ЭН содержания металлов. В скобках указан диапазон варьирования концентраций ТМ в почвах района исследований.

2005; Maillard *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2018 и др.). Обобщение литературных данных позволяет заключить, что, при всей теоретической ясности, механизмы влияния указанных факторов в конкретных экологических условиях изучены недостаточно, а опубликованные результаты зачастую противоречивы. Так, например, рядом авторов (van Heerwaarden, 2004; Hagen-Thorn *et al.*, 2006; Maillard *et al.*, 2015) установлена зависимость резорбции от вида растения. Однако их оппоненты (Fife *et al.*, 2008) утверждают, что резорбция элементов даже для одного вида растений испытывает сильное влияние особенностей территории и характеристик насаждения, возраста листьев, листового затенения, что затрудняет установление четких межвидовых различий ретранслокации.

Цель настоящей работы – оценить величину осенней ретранслокации ТМ (Cu, Zn, Cd) из листьев древесных растений подтаежных экосистем и выявить влияние на величину ретранслокации видовых особенностей растений, специфики ТМ и их концентрации в почвенном растворе. Cu и Zn – биофильные элементы, активно участвующие в процессах метаболизма (фотосинтезе, дыхании, синтезе протеинов, защите от окислительного стресса, поддержании целостности мембран), но становящиеся токсичными при избыточном поступлении в среду (Marschner's mineral..., 2012; Sinclair, Kramer, 2012; Singh *et al.*, 2016). Cd является геохимическим аналогом Zn, однако метаболической потребности в нем у растений нет (Cocozza *et al.*, 2008). Со второй половины XX в. Cd стал одним из приоритетных поллютантов планеты (Волков, 2003). Все три изученных нами элемента можно отнести к умеренно ретранслоцируемым: они резорбируются, в среднем, значительно слабее, чем N и K, но существенно сильнее, чем Ca (который можно считать наиболее типичным элементом со слабой флоэмной подвижностью) (Maillard *et al.*, 2015).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Территория исследования – подтаежные ландшафты южной части Мещерской природной провинции – расположена в центре Восточно-Европейской равнины (Рязанская область) и приурочена к Приокскому морфоструктурному блоку, испытывающему современное тектоническое опускание со скоростью 0.5 мм/год (Кривцов и др., 2011). Это обусловливает характерную особенность Южной Мещеры – малоконтрастный рельеф влажных, сырых и заболоченных песчаных равнин. Затрудненная гидродинамика и низкотрофные песчаные субстраты, являющиеся наследием четвертичных оледенений, определяют специфику почвенно-растительных условий района исследований (Железнова, Тобратов, 2017). Автоморфные дерново-подзолы песчаные в условиях ослабления дренажа сменяются дерново-подзолами глеевыми и органогенными почвами, приуроченными к заболоченным котловинам и плейстоценовым эрозионным ложбинам. К особенностям химического состава почв района исследований следует отнести дефицит подвижных форм Cu и избыток Zn (в болотных почвах) и Cd (в почвах всех типов) (табл. 1). Избыток Zn обусловлен в основном природными факторами (ростом мобильности железа и его геохимических аналогов, к числу которых относится и Zn, в болотных экосистемах зоны активного тектонического опускания). Для Cd наибольшее значение имеет техногенный фактор – высокий уровень его атмосферных выпадений в Центральной России (Кривцов и др., 2011).

К видам–эдификаторам растительных сообществ относятся *Pinus sylvestris*, *Betula pubescens*, *Betula pendula*, *Populus tremula*, при повышении

Таблица 2. Краткая характеристика ключевых участков почвенно-биогеохимического опробования

№	Растительное сообщество	Возраст древостоя (лет)	Подтип почвы *	*h***, м
1	Посадки сосны: 7С2Б1Е*** (верхняя часть пологого склона)	55–65	Дерново-подзол глеевый иллювиально-железистый	121.5
2	Посадки сосны (7С3Б + Ос) (влажная плоская песчаная слабонаклонная равнина)	20–40	Дерново-подзол глееватый	119.1
3	Разреженный сосново-березовый лес V класса бонитета: 5С5Б (верховое болото в термокарстовом понижении)	5–45	Торфяная олиготрофная типичная	116.6
4	Дубово-осиновый лес в полуболотных условиях: 7Ос3Д+С+Е (сырая плоская песчаная равнина)	45	Дерново-подзол глеевый оруденелый	114.7
5	Сосново-дубовый лес: 3С4Д2Ос1Е (влажная песчаная слабоволнистая наклонная равнина)	90–100	Подзол глеевый иллювиально-железистый	107.7
6	Крапивный ольшаник: 10Ол; низинное болото (депрессия на границе трансгрессирующей поймы Оки)	45–50	Торфяная эутрофная типичная	106.8
7	Крапивный ольшаник: 10Ол (заторфованная пойма и 1-я надпойменная терраса р. Игловка)	56	Аллювиальная перегнойно-глеевая типичная	105.2

Примечание. * Типизация дана в соответствии с Классификацией и диагностикой почв России (2004); ** *h* – абсолютная высота точек опробования; *** формула древостоя включает название вида (С – сосна, Е – ель, Б – береза, Ос – осина, Д – дуб, Ол – ольха) и коэффициент, определяющий степень его участия (по запасу) в образовании древостоя; сумма всех коэффициентов формулы равняется десяти.

трофности субстрата – также *Quercus robur*, *Picea abies*, *Alnus glutinosa*. В связи с экотонным положением района исследований в его флоре присутствуют две принципиально различающиеся по геохимической специализации группы растений – ариданитные (эволюционировали в аридных условиях и накапливают преимущественно анионогенные элементы, обладая ограниченным корневым поглощением двухвалентных катионов, в том числе Zn^{2+} и Cd^{2+}) и гумидокатные (эволюционировали в гумидных ландшафтах и приспособлены к питанию катионными формами элементов; в связи с этим индикатором гумидокатности может служить биоконцентрирование Zn) (Перельман, Касимов, 1999; Железнова, 2017). Наиболее полным комплексом признаков ариданитных растений обладает дуб, а гумидокатных – береза и осина.

Сезонный отбор образцов почв (горизонт А1) и фотосинтезирующих органов деревьев осуществляли 8–14 июня, 28 июля–1 августа и 5–11 октября 2013 г. в соответствии со стандартными методическими приемами (Базилевич и др., 1978; Методические указания..., 1992). Исследования проводили на 7 ключевых участках (табл. 2). Хвою *P. sylvestris* отбирали 24 сентября 2016 г. на участке № 2. Образцы измельчали и высушивали до воздушно-сухой массы.

Химические анализы образцов фитомассы и почв проводили на базе лаборатории геохимии ландшафтов Рязанского государственного университета им. С.А. Есенина. Для определения концентраций ТМ в фитомассе осуществляли кислотное разложение образцов в автоклавах с использованием микроволновой системы (объемное соотношение реактивов на 1 г фитомассы 24.3 : 6 : 2 : 1 для HNO_3, H_2O_2, H_2SO_4, HF соответственно) и последующее упаривание. Для почв определяли подвижные формы ТМ (экстракция ацетатно-аммонийным буферным раствором с pH 4.8) (Методические указания ..., 1992; МУК 4.1.985-00). Определение концентраций ТМ осуществляли атомно-абсорбционным методом (пламенный вариант).

Статистическая обработка данных выполнена в программных пакетах *Statistica* и *Excel*. Эффективность ретранслокации элементов из листьев во время их осеннего старения ($R_{(t)}$) рассчитывали по формуле (Niinemets, Tamm, 2005):

$$R_{(t)} = \frac{X_M - X_{(t)}}{X_M} \times 100\% \times (-1), \qquad (1)$$

где X_M – средняя концентрация элемента в листьях в середине вегетационного сезона; $X_{(t)}$ – средняя концентрация элемента в старых листьях перед их опадением. Отрицательные значения $R_{(t)}$ свидетельствуют об оттоке элемента из листьев осенью, то есть о наличии резорбции, а положительные, наоборот, указывают на накопление элемента в листьях.

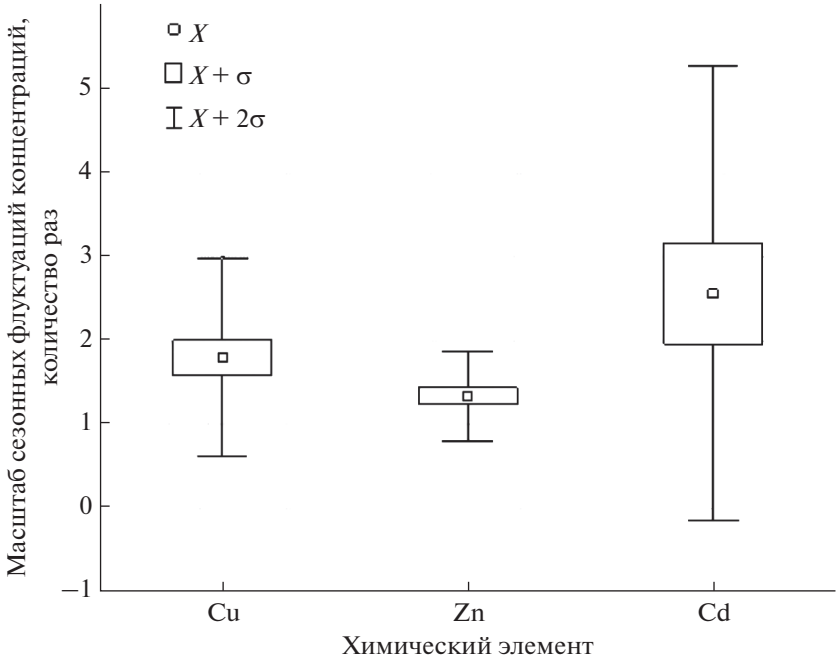

Рис. 1. Масштаб сезонных флуктуаций концентраций тяжелых металлов в фотосинтезирующих органах деревьев Южной Мещеры. X – среднее значение; σ – стандартное отклонение.

Недостатком формулы (1) является неучет изменения массы листьев во время старения (за счет оттока крахмала и других листовых компонентов), что может приводить к недооценке резорбции. Поэтому иногда используют модифицированный вариант формулы (1) (van Heerwaarden, 2004; Vergutz *et al.*, 2012):

$$R_{(t)} = \left(1 - \frac{X_{(t)}}{X_M}\mathrm{MLCF}\right)100\%(-1), \qquad (2)$$

где MLCF – корректирующий коэффициент на потерю массы осенних листьев (соотношение сухой массы старых и зеленых листьев). Для лиственных древесных видов средняя величина MLCF, согласно обобщению результатов 63 исследований в экосистемах разных континентов, принимается равной 0.784 (Vergutz *et al.*, 2012), т.е. листья теряют при старении 21.6% своей массы. Однако, поскольку данные о потере листьями массы во время осеннего старения противоречивы (например, указано (Niinemets, Tamm, 2005), что после достижения пика физиологической активности листовая масса остается стабильной), расчет эффективности резорбции мы осуществляли по двум формулам. Далее по тексту результаты расчета по формуле (1) обозначаются “без коррекции”, по формуле (2) – “с коррекцией”.

В формулах (1) и (2) не учитываются возможные потери элементов за счет их выщелачивания из листьев осадками. Однако анализ литературных данных (Killingbeck, 1985; Nieminen, Helmisaari, 1996; Hagen-Thorn *et al.*, 2006) позволяет заключить, что выщелачивание рассматриваемых ТМ ничтожно по сравнению с величиной их резорбции из листьев, поэтому им можно пренебречь.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны масштабы сезонных флуктуаций содержания ТМ в фотосинтезирующих органах деревьев. Как следует из рис. 1, концентрации биофильных элементов (Zn и Cu) в зависимости от сезона меняются соответственно в 1.3 и 1.8 раза. Масштаб сезонной динамики концентраций токсичного Cd больше. Высокая сезонная вариабельность концентраций – это известная закономерность для неэссенциальных элементов, характеризующихся менее регулярными процессами поглощения и перераспределения в растительном организме по сравнению с биофильными элементами (Gjengedal *et al.*, 2015).

Ретранслокация Cu. В табл. 3 представлены результаты расчета эффективности ретранслокации ТМ из листьев древесных растений Южной Мещеры. Как следует из табл. 3, Cu к концу вегетационного периода оттекает из листьев дуба, березы и осины. Резорбция Cu для этих видов составляет в среднем 33.6% (по данным с коррекцией на потерю массы листьев). Полученные результаты, свидетельствующие об осенней ретранслокации Cu, согласуются с литературными данными: отток Cu из фотосинтезирующих органов во время их ста-

Таблица 3. Эффективность ретранслокации тяжелых металлов из листьев древесных растений Южной Мещеры осенью, %

Вид	Точка; возраст *	Cu		Zn		Cd	
		без коррекции	с коррекцией	без коррекции	с коррекцией	без коррекции	с коррекцией
Populus tremula	Т. 2; 25	26.37	–0.93	65.61	29.84	61.03	26.25
	Т. 5; 8–20	–20.82	–37.92	17.93	–7.54	51.34	18.65
	Т. 4; 45	–40.53	–53.38	8.36	–15.05	22.28	–4.13
	Среднее	**–11.66**	**–30.74**	**30.63**	**2.42**	**44.88**	**13.59**
Betula pubescens	Т. 2; 25	–30.15	–45.24	–12.72	–31.57	–80.14	–84.43
	Т. 3; 40	–16.36	–34.43	35.53	6.25	21.13	–5.04
	Т.1; 55	–2.62	–23.65	2.19	–19.88	46.82	15.11
	Среднее	**–16.38**	**–34.44**	**8.33**	**–15.07**	**–4.06**	**–24.79**
Quercus robur	Т. 5; 81	–29.08	–44.40	–1.18	–22.53	–28.27	–43.76
	Т. 5; 20	–8.74	–28.45	–16.53	–34.56	183.18	122.01
	Среднее	**–24.21**	**–40.58**	**–10.16**	**–29.56**	**37.22**	**7.58**
Alnus glutinosa	Т.6; 45	33.88	4.96	31.11	2.79	–3.66	–24.47
	Т.7; 57	2.42	–19.71	11.39	–12.67	–60.73	–69.21
	Среднее	**18.15**	**–7.37**	**21.25**	**–4.94**	**–32.19**	**–46.84**

Примечание. * Характеристика точек пробоотбора см. в табл. 2. "–" –наличие ретранслокации (оттока) элементов из листьев осенью; положительные значения – отсутствие оттока и аккумуляция элемента в старых листьях.

рения отмечался ранее для широкого спектра видов: *Quercus suber* (Andivia *et al*., 2009), *Q. robur*, *Populus nigra* (Maillard *et al*., 2015), *P. sylvestris* (Nieminen, Helmisaari, 1996), *Betula pendula*, *Q. robur*, *Fraxinus excelsior*, *Tilia cordata* (Hagen-Thorn *et al*., 2006), *Larix gmelinii* (Viers *et al*., 2012).

Примечательным является отсутствие ретранслокации Cu из листьев *A. glutinosa* (по данным, полученным без коррекции на потерю массы; в случае коррекции резорбция Cu из листьев ольхи наблюдается, но она минимальна по сравнению с другими древесными растениями Южной Мещеры – см. табл. 3). На наш взгляд, отсутствие экспорта Cu из листьев ольхи является закономерным и связано со спецификой данного вида. Известно, что Cu в растениях входит в состав более 100 различных белков (Yruela, 2009). При этом ~50% Cu, найденной в растениях, присутствует в хлоропластах и связано с пластоцианином (Marschner's mineral..., 2012). В процессе старения листьев их клетки подвергаются изменениям в метаболизме и экспрессии генов (Lim *et al*., 2007; Shane *et al*., 2014). Главная функция этих изменений – обеспечить посредством гидролиза макромолекул эффективную ремобилизацию клеточного материала, накопленного во время жизни листьев, в первую очередь, жизненно необходимого растениям азота, часто дефицитного в окружающей среде (Avila-Ospina *et al*., 2014). Особенно значима для ремобилизации азота деградация хлоропластов, содержащих до 70% белков листьев (Sillanpää, 2003). Главным макроскопическим признаком такой деградации является пожелтение листьев.

Однако осеннее пожелтение не характерно для ольхи: ее листья сохраняются зелеными до начала зимы, что указывает на отсутствие гидролиза белков и ремобилизации азота. Эффективность ретранслокации азота в ольхе составляет 10–16% (Dawson, Funk, 1981; Llinares *et al*., 1992), что существенно меньше, чем средняя (для многих видов) эффективность ретранслокации азота, равная ~50% (van Heerwaarden, 2004). Отсутствие ярко выраженной ремобилизации азота связано со способностью ольхи фиксировать атмосферный азот через симбиоз с актиномицетами (Llinares *et al*., 1992). Проблемы дефицита азота в почвенном растворе, актуальной для большинства растений, для ольхи, использующей принципиально иной источник азотного питания, не существует. Поэтому ольха не получает очевидных преимуществ от гидролиза макромолекул и ремобилизации азота в осенний период. Cu в растениях тесно связана с азотным метаболизмом, поэтому этот элемент также не ретранслоцируется из стареющих листьев ольхи, оставаясь в составе азотных соединений. Таким образом, отсутствие ретранслокации Cu из листьев *A. glutinosa* связано со спецификой данного вида – его способностью к азотфиксации.

Ретранслокация Zn и Cd. Поскольку Zn и Cd являются геохимическими аналогами, вполне логичным выглядит предположение о возможном сходстве в закономерностях осенней ретранслокации для этих элементов. Однако, как показывают результаты наших расчетов (см. табл. 3), величины резорбции Zn и Cd из стареющих листьев существенно различаются. Очевидно, это может быть связано с различной биофильностью данных элементов, а также с многофакторностью самого процесса ретранслокации.

Как следует из табл. 3, существует тенденция накопления биофильного Zn в стареющих листьях осины, березы и ольхи, особенно отчетливо проявляющаяся по данным без коррекции на потерю массы листьев. По данным с коррекцией осенняя резорбция Zn существует, однако ее процент существенно меньше, чем для Cu. Полученные нами результаты, свидетельствующие о сниженном экспорте Zn из стареющих листьев, согласуются с литературными данными. Так, накопление Zn в старых фотосинтезирующих органах установлено для *Populus nigra*, *A. glutinosa* (Maillard *et al.*, 2015), *Populus euramericana* (Di Baccio *et al.*, 2009), *P. sylvestris* (Nieminen, Helmisaari, 1996), *Fagus sylvatica* (Fromm *et al.*, 1987). В этой связи возникает закономерный вопрос: с чем связано накопление Zn в листьях древесных растений в осенний период? Ведь Zn, как неоднократно подчеркивалось нами выше, является биофильным элементом, и его ретранслокация в многолетние органы была бы полезна растению. Кроме того, Zn, в отличие, например, от Ca, является мобильным во флоэме элементом (когда транспортируется в комплексе с лигандами), а это – ключевое условие для его резорбции из листьев, которая осуществляется за счет флоэмного транспорта элементов (Álvarez-Fernández *et al.*, 2014; Hazama *et al.*, 2015).

Анализ литературных данных показал, что к настоящему времени получены доказательства важной роли вакуолярного, хлоропластного и цитозольного пулов Zn в обширных синтетических процессах во время старения клеток листьев. Zn участвует в синтезе различных протеаз, в том числе цистеин-протеазы, локализованной в вакуоли стареющих клеток (Sillanpää, 2003), и металлоэндопептидаз в хлоропластах (Zhang *et al.*, 2012). Кроме того, во время старения в клетках появляются особые маленькие вакуоли (SAVs – Senescence-Associated Vacuoles), отсутствующие в нестарых клетках (Carrión *et al.*, 2014). Отличительная особенность SAVs – их высокая пептидазная активность, главным образом, за счет цистеин-протеаз. Протеазы осуществляют гидролиз протеинов до свободных аминокислот, способных ретранслоцироваться из стареющих листьев (Hörtensteiner, Feller, 2002). Таким образом, Zn, накапливаясь в листьях осенью, участвует в синтезе протеаз и, следовательно, способствует азотному катаболизму и ретранслокации азота в многолетние органы деревьев.

Согласно полученным нами данным (см. табл. 3), на величину ретранслокации Zn влияет видовая специфика растений. Максимальная эффективность резорбции характерна для *Q. robur* (это единственный вид, резорбция Zn из листьев которого проявляется даже по данным без коррекции на потерю массы листьев). По-видимому, ретранслокация Zn из листьев дуба осенью связана с тем, что из лиственных деревьев Южной Мещеры только *Q. robur* относится к ариданитным видам, которые, эволюционируя в условиях низкой почвенной доступности катионов, должны были выработать стратегию сохранения эссенциальных элементов в своих тканях. Резорбция биофильного Zn, предотвращающая его непродуктивную потерю с листопадом, может быть проявлением этой стратегии. Очевидна, на наш взгляд, некоторая аналогия со спецификой биокруговоротов в тропических и экваториальных лесах: растения из-за промывного водного режима зональных почв “идут по пути” удержания максимального количества питательных элементов в своих тканях, “не выпуская” их во внешний круговорот (Безуглова, Орлов, 2000).

Следует однако отметить, что, в отличие от установленной нами закономерности резорбции Zn из стареющих листьев *Q. robur*, в ряде исследований, напротив, обнаружено накопление Zn в листьях разных видов дуба (*Q. robur*, *Q. suber*) перед листопадом (Andivia *et al.*, 2009; Maillard *et al.*, 2015). Противоречивость данных указывает на сложность процесса ретранслокации элементов и необходимость рассмотрения комплекса факторов, ее определяющих.

Процент ретранслокации Cd из старых листьев, как следует из табл. 3, широко варьирует между видами и между различными местообитаниями. Осенняя ретранслокация Cd из листьев *P. tremula* – гумидокатного вида, наиболее активно, по сравнению с другими растениями Мещеры, накапливающего Cd и Zn (Железнова и др., 2017), отсутствует. Отметим, что тенденция тесной отрицательной связи между процентом ретранслокации Cd из листьев и концентрацией в них Zn также установлена для сельскохозяйственных культур (Cakmak *et al.*, 2000). Вероятно, что Zn в высоких концентрациях может ингибировать транспорт Cd в клетки флоэмы, поскольку транспорт этих элементов осуществляется посредством общих транспортеров (Conn, Gilliham, 2010). Хорошо известная способность растений аккумулировать Cd в семенах в более высоких количествах в условиях дефицита Zn также может быть связана с повышенной флоэмной мобильностью Cd при отсутствии конкурирующего иона (Cakmak *et al.*, 2000).

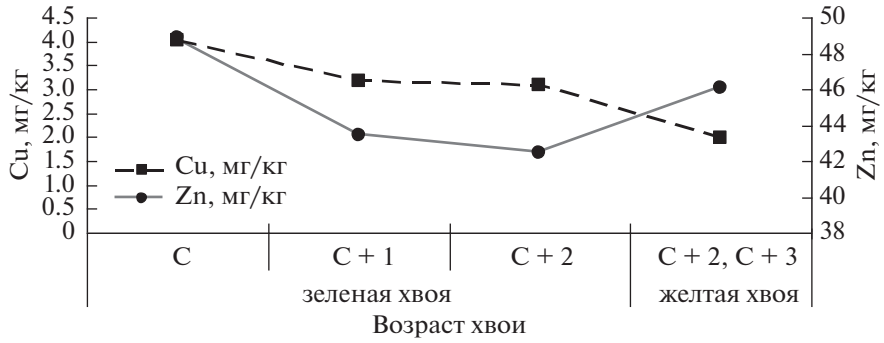

Рис. 2. Концентрации Cu и Zn в хвое разных классов возраста *P. sylvestris*. C – хвоя текущего года (current); C + 1 – хвоя прошлого года (однолетняя); C + 2 – хвоя позапрошлого года (двухлетняя); C + 3 – трехлетняя хвоя.

Выраженная осенняя ретранслокация Cd из листьев *A. glutinosa* (при отсутствии резорбции Cu и Zn) (табл. 3) свидетельствует о принципиально иной – небелковой – биохимической природе пула этого элемента, по-видимому, локализованного в вакуоли (Parrotta *et al.*, 2015). Мобилизация вакуолярного пула Cd (запасенного в комплексе с лигандами) не связана, в отличие от Cu, с азотным метаболизмом, то есть протекает независимо от гидролиза белков, и поэтому возможна в ольхе. По-видимому, аналогичный характер имеет пул Cd в листьях других видов (хотя Cd также взаимодействует с тиоловыми группами белков) (Singh *et al.*, 2016).

Ретранслокация Cd из стареющих листьев имеет важное экологическое значение, сокращая его долю, участвующую в рецикличной миграции, и стимулируя изъятие этого токсиканта из биокруговоротов за счет накопления в одревесневающих органах. Но поскольку флуктуации в концентрациях металлов в растительных тканях в течение года наиболее существенны для неэссенциальных элементов (см. рис. 1), более надежные оценки ретранслокации Cd могут быть получены при проведении многолетних исследований.

Ретранслокация ТМ хвойными. Известно, что во время осенней резорбции питательных веществ из стареющей хвои в качестве органа–резервуара для их зимнего хранения может выступать более молодая хвоя (Nieminen, Helmisaari, 1996). Поэтому оценивать сезонную динамику концентраций элементов в фотосинтезирующих органах хвойных необходимо отдельно для хвои разных возрастных групп.

На рис. 2 приведены результаты измерений концентраций Cu и Zn в хвое разного возраста *P. sylvestris*. Как следует из рис. 2, максимальные концентрации Cu характерны для хвои текущего года. В последующих классах возраста концентрации ниже ~ на 20%, при этом в желтой двух- и трехлетней хвое содержание Cu снижено на 50% по сравнению с хвоей текущего года. Cu, таким образом, ретранслоцируется из старой хвои, причем величина этой ретранслокации даже более существенна, чем резорбция Cu из фотосинтезирующих органов лиственных пород. Наши результаты близки к оценкам осенней ретранслокации Cu из хвои *P. sylvestris* в фоновых местообитаниях западной части Финляндии (Nieminen, Helmisaari, 1996).

Содержание Zn, как следует из рис. 2, также максимально в хвое текущего года. В однолетней и двухлетней хвое его концентрации падают на 11–13%. Однако в желтой хвое содержание Zn, в отличие от Cu, не уменьшается, а растет, составляя лишь немногим менее (на 5.6%) его содержания в хвое текущего года. Zn, таким образом, накапливается как в хвое текущего года, так и в самой старой, готовой к опадению желтой хвое. Данная закономерность отражает две важнейшие особенности биогеохимии Zn: с одной стороны, потребность в его высоких концентрациях в растущих органах и, с другой стороны, его ограниченную ретранслокацию или даже накопление в старых фотосинтезирующих тканях. В отличие от Zn, концентрации Cd в желтой хвое почти в два раза выше его концентраций в зеленой хвое (0.569 и 0.304 мг/кг соответственно). Cd, таким образом, не подвергается осенней ретранслокации в многолетние органы, а, напротив, накапливается в старой хвое и поступает в рецикличное звено миграции.

Подчеркнем, что для Zn, согласно литературным данным, возможны различные варианты соотношения концентраций в старой и молодой хвое. Его максимальные концентрации осенью могут наблюдаться как в старой, так и самой молодой хвое. Так, показано, что динамика концентраций Zn в хвое разного возраста *P. abies* может зависеть от биодоступности Zn: если содержание Zn в молодой хвое было меньше 20 мг/кг, то он ретранслоцировался из старой хвои (Wyttenbach, Tobler, 2000). В хвое *Pinus nigra* концентрация Zn увеличивалась с возрастом только в загрязненных местообитаниях, в то время как в фоновых местообитаниях

его концентрации не показывали явной динамики (Giertych *et al.*, 1999). Шимура (*Szymura*, 2008), обобщая литературные данные, отмечает, что концентрации Ni и Pb в хвое *P. sylvestris* при высоком их содержании в почвенном растворе были обычно выше в однолетней и двухлетней хвое, чем в хвое текущего года. В то же время в условиях низких почвенных концентраций содержание этих элементов было обычно максимальным в хвое текущего года (Wyttenbach, Tobler, 1988, 2000; Szymura, 2008). Таким образом, как видно из приведенных выше примеров, ключевым моментом в объяснении различных концентраций Zn и других элементов в хвое разного возраста выступает количество доступного для поглощения элемента в почвенном растворе.

Влияние почвенной биодоступности элемента на величину его ретранслокации из стареющих листьев. Среди экологических факторов, влияющих на осеннюю ретранслокацию элементов, наиболее важным является их содержание в почве в биодоступной форме. Логично предположить, что растения в низкотрофных местообитаниях имеют более высокую эффективность резорбции биофильных элементов, чем в условиях богатого минерального питания. Однако литературные данные о связи резорбции элемента с его содержанием в почвенном растворе противоречивы. Так, в экспериментах по удобрению азотом и фосфором шестидесяти видов растений снижение ретранслокации этих элементов в ответ на повышение их биодоступности наблюдалось только для 32–35% выборки (Aerts, Chapin, 1999). В то же время в ряде исследований получены убедительные доказательства зависимости величины оттока элементов из стареющих листьев от их почвенной биодоступности (Di Baccio *et al.*, 2009; Viers *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2014; Delgado *et al.*, 2018). Косвенным подтверждением такой зависимости может служить также противоречивость литературных данных. Анализируя материалы табл. 3 и результаты других исследований, мы обнаружили, что один и тот же химический элемент в близкородственных видах растений может либо ретранслоцироваться из стареющих листьев, либо, напротив, накапливаться в них, а однозначную закономерность установить зачастую нельзя (Killingbeck, 1985; Oleksyn *et al.*, 2000; Hagen-Thorn *et al.*, 2006; Andivia *et al.*, 2009; Maillard *et al.*, 2015). Следовательно, влияние химического элемента и вида растений может затушевываться воздействием на ретранслокацию экологического фактора – содержания элемента в почвенном растворе.

Для оценки питательного статуса почвенного раствора (дефицитного или избыточного содержания в нем химических элементов) было предложено использовать соотношение “потребности” (концентрации в листьях) и “доступности” (концентрации в почве в биодоступной форме) элементов (Killingbeck, 1985). Элемент с максимальным соотношением должен лимитировать рост и ретранслоцироваться из осенних листьев (при условии его флоэмной мобильности), запасаясь в многолетних органах.

В табл. 4 приведены результаты расчетов соотношений “потребность/доступность” для Cu, Zn и Cd. Максимальные значения соотношения, в основном, характерны для Cu (в среднем, 69.8), что является индикатором дефицита Cu в почвах Южной Мещеры. Таким образом, установленная нами тенденция осеннего оттока Cu из фотосинтезирующих органов дуба, березы, осины и сосны (см. табл. 3 и рис. 2) может быть связана с дефицитностью этого важнейшего биофильного элемента в почвах района исследований (см. табл. 1). Действительно, Cu не относится к числу элементов, активно перераспределяющихся от старых к молодым листьям и к меристемам (Burkhead *et al.*, 2009), в отличие, например, от N, P и K (Maillard *et al.*, 2015). Наряду с многочисленными примерами осенней ретранслокации Cu (некоторые из которых приведены в разделе “Ретранслокация Cu”), не менее часто отмечается также накопление этого элемента в старых листьях деревьев (Killingbeck, 1985; Oleksyn *et al.*, 2000; Fernández-Moya *et al.*, 2016). По-видимому, ключевое влияние на динамику листового пула Cu осенью, помимо видовой специфики растений (как показано нами на примере *A. glutinosa*), оказывает именно почвенная биодоступность Cu – величина содержания меди в почве в подвижной форме. Нами установлена тенденция отрицательной корреляции (–0.46) между эффективностью резорбции Cu из осенних листьев и соотношением “потребность/доступность”. Следовательно, чем больше потребность растения в меди в мещерских экосистемах (чем выше ее дефицит в почве), тем меньшее ее количество сохраняется в осенних листьях и поступает в рецикличное звено миграции.

Минимальные значения соотношения “потребность/доступность” характерны для токсичного Cd (в среднем, 6.9 – см. табл. 4). В принципе, можно было бы ожидать нулевых значений данного соотношения, поскольку потребности в Cd у растений нет. Однако в подтаежных экосистемах с преобладанием гумидокатной растительности, активно поглощающей двухвалентные катионы, Cd^{2+} способен поглощаться из-за его геохимического подобия Zn^{2+} и широкой субстратной специфичности транспортеров корневых систем (Conn, Gilliham, 2010).

Величины соотношения “потребность/доступность” для Zn широко варьируют между видами (различия достигают 15 раз – см. табл. 4). Аномально высоки они в случае осины и березы, что является отражением гумидокатности этих видов. Для дуба и ольхи соотношения невелики (в

Таблица 4. Соотношение “потребности” (концентрации в листьях, мг/кг) и “доступности” (концентрации подвижных форм в почвенном растворе, мг/кг) тяжелых металлов, как показатель их дефицитности или избыточности для растений

Вид	Точка; возраст	Cu	Zn	Cd
Populus tremula	Т. 2; 25	83.61	37.42	12.78
	Т. 5; 8–20	84.81	79.92	11.83
	Т. 4; 45	110.80	119.88	14.93
Betula pubescens	Т. 2; 25	70.52	33.51	7.88
	Т. 3; 40	69.65	31.74	2.30
	Т. 1; 55	60.48	82.69	7.94
Quercus robur	Т. 5; 81	60.75	7.95	5.23
	Т. 5; 20	61.32	12.90	3.61
Alnus glutinosa	Т. 6; 45	51.93	9.76	0.69
	Т. 7; 57	44.28	15.16	1.70

среднем, 11.4), что может указывать на отсутствие дефицита Zn в почвах Южной Мещеры и на невысокую потребность в Zn этих видов. Повышенное содержание биодоступных форм Zn^{2+} в почве является характерной чертой подтаежных гумидных ландшафтов (см. табл. 1). Возможно, что именно этот фактор – отсутствие дефицита Zn в мещерских почвах – определяет тенденцию накопления этого элемента в стареющих листьях осины, березы и ольхи (см. табл. 3). Ведь несмотря на отмеченную выше важную роль Zn в процессах азотного катаболизма осенних листьев, Zn, тем не менее, зачастую ретранслоцируется из фотосинтезирующих органов в многолетние ткани (Killingbeck, 1985; Fernández-Moya *et al.*, 2016). По-видимому, как и в случае с Cu, ключевым фактором в судьбе листового пула Zn осенью является его почвенная биодоступность. К сожалению, данные о почвенных уровнях элементов в работах, посвященных ретранслокации, зачастую не приводятся, поэтому проверить это предположение на основании литературных данных проблематично. Нами установлена положительная корреляция (0.44) между содержанием подвижных форм Zn в почве и его накоплением в осенних листьях древостоев Мещеры. Снижение ретранслокации ТМ из листьев в условиях их повышенной почвенной биодоступности способствует удалению накопленных в листьях излишков элементов во время листопада. Этот процесс может рассматриваться как важнейшая часть ежегодного цикла “самоочищения” деревьев (Fromm *et al.*, 1987; Aznar *et al.*, 2009).

Таким образом, изученная нами сезонная динамика концентраций Cu и Zn свидетельствует о наличии зависимости их резорбции от количества биодоступных почвенных форм, что согласуется с результатами ряда исследований (Di Baccio *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2014). Однако существуют свидетельства отсутствия подобной зависимости (Aerts, Chapin, 1999), что противоречит полученным нами данным. По нашему мнению, причиной противоречия является сложность и многофакторность процесса резорбции, когда влияние на него экологических факторов (в первую очередь, почвенной биодоступности элементов) может затушевываться воздействием других агентов.

1. Многофакторность резорбции хорошо видна на примере результатов молекулярно-генетических исследований, выполненных на модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Так, установлено, что важную роль в ретранслокации металлов, в том числе, Zn, из старых тканей *A. thaliana* в репродуктивные органы играют YSL транспортеры (Yellow Stripe-Like), принадлежащие к надсемейству олигопептидных транспортеров (Yruela, 2009). К настоящему времени описаны 8 YSL белков, транспортирующих комплексы “металл–никотианамин” (NA). Однако их действие и ретранслокация Zn в целом зависят от множества факторов (Koike *et al.*, 2004, цит. по: Титов и др., 2014; Yruela, 2009; Sinclair, Kramer, 2012). Экспрессия гена *AtYSL2*, кодирующего транспортер комплексов “Zn–NA”, зависит от содержания Zn (а также Fe и Cu) в почве. В условиях дефицита Zn в почвенном растворе происходит снижение уровня транскриптов данного гена, что должно приводить к снижению ретранслокации Zn из стареющих листьев.

2. Экспрессия гена *AtNAS2* (кодирует одну из четырех изоформ NAS – никотианаминсинтазы, при участии которой синтезируется лиганд Zn – NA) также зависит от содержания Zn в почве. Уровни транскриптов *AtNAS2* сильно увеличиваются при дефиците Zn. Таким образом, действие данного гена в условиях дефицита Zn противоположно действию *AtYSL2*.

3. Экспрессия генов *AtYSL2* и *AtNAS2* также зависит от содержания Zn в растении. Перераспределение Zn между отдельными органами и тканями может затушевывать влияние его почвенного уровня на экспрессию данных генов.

4. Экспрессия оставшихся семи генов *AtYSL* не зависит от содержания Zn в почве. При этом у других видов растений количество генов *YSL* может быть существенно больше (например, у риса – 19 *OsYSL)*, а регуляция их экспрессии может отличаться от таковой у *A. thaliana*.

5. Установление четких взаимосвязей между содержанием элемента в почве и его резорбцией из стареющих листьев осложняется взаимодействиями переходных металлов – их синергизмом и антагонизмом.

Приведенный пример иллюстрирует слабую изученность процесса резорбции и его возможных экосистемных эффектов, а также сложность интерпретации экологических факторов биогеохимических процессов.

* * *

Таким образом, концентрации биофильных элементов – Zn и Cu – в фотосинтезирующих органах растений в зависимости от сезона меняются в 1.3 и 1.8 раза. Масштаб сезонной динамики концентраций токсичного Cd больше. При этом величина и закономерности осенней ретранслокации ТМ из стареющих листьев зависят от специфики химического элемента, видовых особенностей растений, а также от экологических факторов.

Наиболее общей тенденцией является осенний отток Cu из стареющих листьев *Q. robur*, *B. pubescens*, *P. tremula* и хвои *P. sylvestris*. Отсутствие ретранслокации Cu из листьев *A. glutinosa* связано со способностью данного вида к азотфиксации. Благодаря этому для ольхи не существует проблемы дефицита азота в почвенном растворе и, следовательно, необходимости гидролиза макромолекул и ремобилизации азота в осенний период. Cu в растениях тесно связан с азотным метаболизмом, поэтому этот элемент также не ретранслоцируется из стареющих листьев ольхи, оставаясь в составе азотных соединений.

Величины резорбции Zn и Cd, несмотря на их геохимическую аналогичность, существенно различаются, что может быть связано с их различной биофильностью. Для Zn характерна сниженная ретранслокация или аккумуляция в стареющих листьях, где он играет важную роль в синтезе протеаз, необходимых для процессов азотного катаболизма. Доля ретранслоцируемого из листьев Cd широко варьирует между видами.

Важнейшим экологическим фактором, влияющим на ретранслокацию элементов, является их содержание в почве в биодоступной форме. Осенний отток Cu из фотосинтезирующих органов дуба, березы, осины, сосны и накопление Zn в стареющих листьях березы, осины и ольхи может быть связано с дефицитом Cu и повышенным содержанием биодоступных форм Zn в почвах Южной Мещеры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Базилевич Н.И., Титлянова А.А., Смирнов В.В. Методы изучения биологического круговорота в различных природных зонах. М.: Мысль, 1978. 183 с.

Безуглова О.С., Орлов Д.С. Биогеохимия. Учебник для студентов высших учебных заведений. Ростов-на-Дону: Феникс, 2000. 320 с.

Волков С.Н. Геохимическая эволюция кадмия в естественном и техногенном циклах миграции // Техногенез и биохимическая эволюция таксонов биосферы: Тр. Биогеохим. лаб. Т. 24. М.: Наука, 2003. С. 113–141.

Железнова О.С. Комплексная оценка биогеохимической устойчивости экосистем в условиях техногенеза (на примере подтаежных лесов Южной Мещеры): Дисс. канд. биол. наук. М.: РУДН, 2017. 297 с.

Железнова О.С., Тобратов С.А. Опыт ландшафтного анализа пространственных закономерностей продуктивности зональных экосистем Южной Мещеры // Изв. РАН. Сер. геогр. 2017. № 6. С. 47–62.

Железнова О.С., Черных Н.А., Тобратов С.А. Цинк и кадмий в фитомассе древесных растений лесных экосистем: закономерности транслокации, аккумуляции и барьерных механизмов // Вестник РУДН. Сер. “Экология и безопасность жизнедеятельности”. 2017. Т. 25. С. 253–270.

Классификация и диагностика почв России. Авторы и сост.: Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.

Кривцов В.А., Тобратов С.А., Водорезов А.В., Комаров М.М., Железнова О.С., Соловьева Е.А. Природный потенциал ландшафтов Рязанской области. Рязань: Рязанский гос. ун-т им. С.А. Есенина, 2011. 768 с.

Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства: изд. 2-е, перераб. и дополн. М., 1992. 59 с.

МУК 4.1.985-00 Определение содержания токсичных элементов в пищевых продуктах и продовольственном сырье. Методика автоклавной пробоподготовки: метод. указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000. 19 с.

Перельман А.И., Касимов Н.С. Геохимия ландшафта. М.: Астрея-2000, 1999. 768 с.

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.

Aerts R., Chapin F.S. The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns // Adv. Ecol. Res. 1999. P. 1–67.

Álvarez-Fernández A., Díaz-Benito P., Abadía A., López-Millán A.-F., Abadía J. Metal species involved in long

distance metal transport in plants // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. № 105.

Andivia E., Fernández M., Vázquez-Piqué J., González-Pérez A., Tapias R. Nutrients return from leaves and litterfall in a mediterranean cork oak *(Quercus suber L.)* forest in southwestern Spain // Eur. J. Forest Res. 2009. V. 129. P. 5–12.

Avila-Ospina L., Moison M., Yoshimoto K., Masclaux-Daubresse C. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling // J. Experim. Botany. 2014. V. 65. P. 3799–3811.

Aznar J.-C., Richer-Laflèche M., Bégin C., Bégin Y. Lead exclusion and copper translocation in black spruce needles // Water, Air, and Soil Pollution. 2009. V. 203. P. 139–145.

Burkhead J.L, Gogolin Reynolds K.A, Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Pilon M. Copper homeostasis // New Phytologist. 2009. V. 182. P. 799–816.

Cakmak I., Welch R.M., Erenoglu B., Römheld V., Norvell W.A., Kochian L.V. Influence of varied zinc supply on retranslocation of cadmium (^{109}Cd) and rubidium (^{86}Rb) applied on mature leaf of durum wheat seedlings // Plant and soil. 2000. V. 219. P. 279–284.

Carrión C., Martínez D., Costa M., Guiamet J. Senescence-associated vacuoles, a specific lytic compartment for degradation of chloroplast proteins? // Plants. 2014. V. 3. P. 498–512.

Cocozza C., Minnocci A., Tognetti R., Iori V., Zacchini M., Scarascia Mugnozza G. Distribution and concentration of cadmium in root tissue of *Populus alba* determined by scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray microanalysis // iForest – Biogeosciences and Forestry. 2008. V. 1. P. 96–103.

Conn S., Gilliham M. Comparative physiology of elemental distributions in plants // Ann. Botany. 2010. V. 105. P. 1081–1102.

Dawson J.O., Funk D.T. Seasonal change in foliar nitrogen concentration of *Alnus glutinosa* // Forest Sci. 1981. V. 27. P. 239–243.

Delgado M., Valle S., Reyes-Díaz M., Barra P.J., Zúñiga-Feest A. Nutrient use efficiency of southern South America Proteaceae species. Are there general patterns in the Proteaceae family? // Front. Plant Sci. 2018. V. 9.

Di Baccio D., Tognetti R., Minnocci A., Sebastiani L. Responses of the *Populus×euramericana* clone *I-214* to excess zinc: carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization // Environm. Experim. Botany. 2009. V. 67. P. 153–163.

Fernández-Moya J., Algeet-Abarquero N., Cabalceta G., Alvarado A., San Miguel-Ayanz A., Marchamalo-Sacristán M. Modifying harvesting time as a tool to reduce nutrient export by timber extraction: a case study in planted teak (*Tectona grandis L.f.*) forests in Costa Rica // iForest - Biogeosciences and Forestry. 2016. V. 9. P. 729–735.

Fife D.N., Nambiar E.K.S., Saur E. Retranslocation of foliar nutrients in evergreen tree species planted in a Mediterranean environment // Tree Physiology. 2008. V. 28. P. 187–196.

Freschet G.T., Cornelissen J.H.C., van Logtestijn R.S.P., Aerts R. Substantial nutrient resorption from leaves, stems and roots in a subarctic flora: what is the link with other resource economics traits? // New Phytologist. 2010. V. 186. P. 879–889.

Fromm J., Essiamah S., Eschrich W. Displacement of frequently occurring heavy metals in autumn leaves of beech *(Fagus sylvatica)* // Trees. 1987. V. 1. P. 164–171.

Giertych M.J., Karolewski P., Temmerman L.O. Foliage age and pollution alter content of phenolic compounds and chemical elements in *Pinus nigra* needles // Water, Air, and Soil Pollution. 1999. V. 110. P. 363–377.

Gjengedal E., Martinsen T., Steinnes E. Background levels of some major, trace, and rare earth elements in indigenous plant species growing in Norway and the influence of soil acidification, soil parent material, and seasonal variation on these levels // Environmental Monitoring and Assessment. 2015. V. 187. № 6. P. 386.

Hagen-Thorn A., Varnagiryte I., Nihlgård B., Armolaitis K. Autumn nutrient resorption and losses in four deciduous forest tree species // Forest Ecology and Management. 2006. V. 228. P. 33–39.

Hayes P., Turner B.L., Lambers H., Laliberté E., Bellingham P. Foliar nutrient concentrations and resorption efficiency in plants of contrasting nutrient-acquisition strategies along a 2-million-year dune chronosequence // J. Ecology. 2014. V. 102. P. 396–410.

Hazama K., Nagata S., Fujimori T., Yanagisawa S., Yoeneyama T. Concentrations of metals and potential metal-binding compounds and speciation of Cd, Zn and Cu in phloem and xylem saps from castor bean plants *(Ricinus communis)* treated with four levels of cadmium // Physiol. Plantarum. 2015. V. 154. P. 243–255.

Hörtensteiner S., Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence // J. Experim. Botany. 2002. V. 53. P. 927–93

Killingbeck K.T. Autumnal resorption and accretion of trace metals in gallery forest trees // Ecology. 1985. V. 66. P. 283–286.

Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. Leaf Senescence // Ann. Rev. Plant Biol. 2007. V. 58. P. 115–136.

Llinares F., Munoz-Mingarro D., Acero N., Probanza A. Temporal variation of the total nitrogen concentration in aereal organs of nitrogen fixing and non fixing riparian species // Orsis. 1992. V. 7. P. 125–130.

Maillard A., Diquélou S., Billard V., Laîné Ph., Garnica M., Prudent M., et al. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency // Front. Plant Sci. 2015. V. 6.

Manual on methodologies and criteria for modeling and mapping critical loads & levels and air pollution effects, risks and trends [Электронный ресурс] / UNECE Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution. 2004. – URL: http://www.icpmapping.org/ (Дата обращения 25.09.2015).

Marschner's mineral nutrition of higher plants. Ed. P. Marschner. L.: Academic Press, 2012. 672 p.

Nieminen T., Helmisaari H.-S. Nutrient retranslocation in the foliage of *Pinus sylvestris* L. growing along a heavy metal pollution gradient // Tree Physiology. 1996. V. 16. P. 825–831.

Niinemets U., Tamm U. Species differences in timing of leaf fall and foliage chemistry modify nutrient resorption efficiency in deciduous temperate forest stands // Tree Physiology. 2005. V. 25. P. 1001–1014.

Oleksyn J., Zykowiak R., Reich P.B., Tjoelker M.G., Karolewski P. Ontogenetic patterns of leaf CO_2 exchange, morphology and chemistry in *Betula pendula* trees // Trees. 2000. V. 14. P. 271–281.

Parrotta L., Guerriero G., Sergeant K., Cai G., Hausman J.-F. Target or barrier? The cell wall of early-and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. № 133.

Shane M.W., Stigter K., Fedosejevs E. T., Plaxton W.C. Senescence inducible cell wall and intracellular purple acid phosphatases: implications for phosphorus remobilization in *Hakea prostrata* (Proteaceae) and *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) // J. Exper. Botany. 2014. V. 65. P. 6097–6106.

Sillanpää M. Leaf senescence in silver birch (*Betula pendula* Roth). Academic dissertation. Helsinki, 2003. 60 p.

Sinclair S.A., Kramer U. The zinc homeostasis network of land plants // Bioch. Bioph. Acta (BBA) – Mol. Cell Res. 2012. V. 1823. P. 1553–1567.

Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics // Front. Plant Sci. 2016. V. 6.

Szymura T.H. Concentration of elements in silver fir (*Abies alba* Mill.) needles as a function of needles' age // Trees. 2008. V. 23. P. 211–217.

Tobratov S.A., Zheleznova O.S., Krivtsov V.A. Critical loads-based ecological control of heavy metal deposition in natural and anthropogenic ecosystems: trial study // Intern. J. Biol., Pharm.and Allied Sciences. 2016. V. 5. P. 3013–3028.

van Heerwaarden L. From leaf to litter: nutrient resorption in a changing environment. PhD thesis. Amsterdam: Vrije Universiteit, 2004. 61 p.

Vergutz L., Manzoni S., Porporato A., Ferreira Novais R., Jackson R.B. Global resorption efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial plants // Ecol. Monographs. 2012. V. 82. P. 205–220.

Viers J., Prokushkin A.S., Pokrovsky O.S., Auda Y., Kirdyanov A.V., Beaulieu E., Zouiten C., Oliva P., Dupré B. Seasonal and spatial variability of elemental concentrations in boreal forest larch foliage of Central Siberia on continuous permafrost // Biogeochemistry. 2012. V. 113. P. 435–449.

Wyttenbach A., Tobler L. The concentrations of Fe, Zn and Co in successive needle age classes of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) // Trees. 2000. V. 14. P. 198–205.

Wyttenbach A., Tobler L. The seasonal variation of 20 elements in 1st and 2nd year needles of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst // Trees. 1988. V. 2. № 1. P. 52-64.

Yruela I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions // Funct. Plant Biology. 2009. V. 36. P. 409–430.

Zhang L., Zhang Y., Rui Q., Ren Y., Xu L. Effects of ATP and Zn^{2+} on degradation of the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat leaves // Afric. J. Agricult. Res. 2012. V. 7. P. 711–720.

Patterns of Autumn Retranslocation of Heavy Metals from the Leaves of Woody Plants in Forest Ecosystems

O. S. Zheleznova[1, #] and S. A. Tobratov[1]

[1]*Ryazan State University named after S.A. Yesenin, Svobody st. 46, Ryazan, 390000 Russia*

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

Autumn retranslocation of heavy metals (HM) such as Cu, Zn, and Cd from photosynthetic organs of woody plants was studied. The study was conducted in the subtaiga ecosystems of the Southern Meshchera (Ryazan region of the Russian Federation). The influence of three factors on the retranslocation of HM from aging leaves was shown: 1) the specifics of the chemical element (the degree of its biophilicity; the mobility of the element in plant tissues, which depends, in particular on its ability to form complexes in plant transport systems; the geochemical similarity of elements with different clarks, determined by the similarity of the structure of the external electronic shells); 2) the specific plant features; 3) the content of the element in the soil solution in a bioavailable form. The relationship of the Cu and Zn retranslocation with the nitrogen catabolism of autumn leaves was considered. The most common trend was the outflow of Cu from aging leaves and the accumulation of Zn in them. The proportion of toxic Cd retranslocated from leaves varied widely between species. The multifactorial nature of the retranslocation process and the reasons for its variability in different environmental conditions are discussed.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 435–443

ЭКОЛОГИЯ

УДК 574.5

ГЛОБАЛЬНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ТЕРРИТОРИИ ЯКУТИИ ^{137}Cs И ЕГО СОДЕРЖАНИЕ В КОРМАХ И ТКАНЯХ ОХОТНИЧЬИХ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. П. И. Собакин*, @, Е. С. Захаров*, В. М. Сафронов*

**Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, пр. Ленина, 41, Якутск, 677980 Россия*

@E-mail: radioecolog@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.04.2019 г.
После доработки 19.11.2019 г.
Принята к публикации 02.12.2019 г.

Получены данные по концентрации ^{137}Cs в почвах, кормовых растениях и мышечной ткани семи видов охотничьих животных (дикого северного оленя, лося, косули, кабарги, снежного барана, зайца-беляка и бурого медведя) в тундровой и таёжной зонах Якутии. Показано, что северный олень и кабарга – потребители кустистых лишайников, характеризуются относительно высоким содержанием ^{137}Cs (до 51.6–75.1 Бк/кг) и могут быть источником его поступления в организм последующего консумента – бурого медведя. Уровни ^{137}Cs у других растительноядных видов сравнительно невысокие. Мясная продукция ряда видов составляет важный компонент питания населения оленеводческих и охотничье-промысловых районов Крайнего Севера. В настоящее время концентрации радионуклида в тканях исследованных видов не превышают установленной санитарно-гигиенической нормы.

DOI: 10.31857/S1026347021040147

Основным источником загрязнения территории Якутии долгоживущими техногенными радионуклидами были ядерные взрывы, произведенные в 1949–1980 гг., а также известная авария на Чернобыльской АЭС в 1986 г. Плотность загрязнения земной поверхности радионуклидами особенно повышалась при серийных ядерных взрывах в атмосфере в 1955–1958 и 1961–1962 гг., достигла максимума в 1966 г. (Иванов и др., 1997). По данным аэрогамма-спектрометрической съемки, в мерзлотных почвах равнинной части Якутии уровни глобальных выпадений ^{137}Cs из атмосферы в конце 1960-х гг. составляли 1850–5550 Бк/м^2 (Болтнева и др., 1977). Во время испытаний ядерного оружия наблюдалась повышенная миграция ^{137}Cs в организм человека в тундровой зоне по пищевой цепи лишайники–олень–человек. Проведенные в этом плане исследования позволили установить географическую изменчивость уровней накопления ^{137}Cs в лишайниках и тканях северных оленей, связанную с комплексом факторов, включая различия в количестве атмосферных осадков и соответственно плотности радиоактивных выпадений. На северо-востоке страны и, в том числе, в Якутии эти показатели были в два раза ниже, чем на северо-западе, в частности, в Мурманской области (Соколов и др., 1989). Миграция ^{137}Cs по трофическим цепям других видов млекопитающих, замыкающимся на человеке, особенно в районах проживания коренных малочисленных народов Крайнего Севера, оставалась не изученной. Имелись некоторые сведения о современных уровнях глобальных выпадений ^{137}Cs в тундровой и таежной зонах Якутии и особенностей его вертикальной и латеральной миграции в мерзлотных почвах геохимически сопряженных по стоку ландшафтов (Собакин, 2010; Собакин и др., 2019).

Цель настоящего исследования – оценка содержания и распределения ^{137}Cs в мерзлотных почвах, кормовых растениях и мясной продукции семи охотничьих видов млекопитающих – дикого северного оленя (*Rangifer tarandus*), лося (*Alces alces*), сибирской косули (*Capreolus capreolus*), кабарги (*Moschus moschiferus*), снежного барана (*Ofis nivicola*), зайца-беляка (*Lepus timidus*) и бурого медведя (*Ursus arctos*) в разных эколого-географических зонах Якутии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал собран в 2004–2018 гг. в тундровой и таежной зонах Якутии (рис. 1). Экспедиционные исследования проводили авиадесантным методом с заброской в разные пункты местности, а также с использованием водного и наземного транспорта. Почвенные образцы отбирали в основном из разрезов на плоских и слабо наклонённых водораздельных поверхностях, на суходольных террасах долин рек, имея в виду, что данные участки представляют собой наиболее информативные части

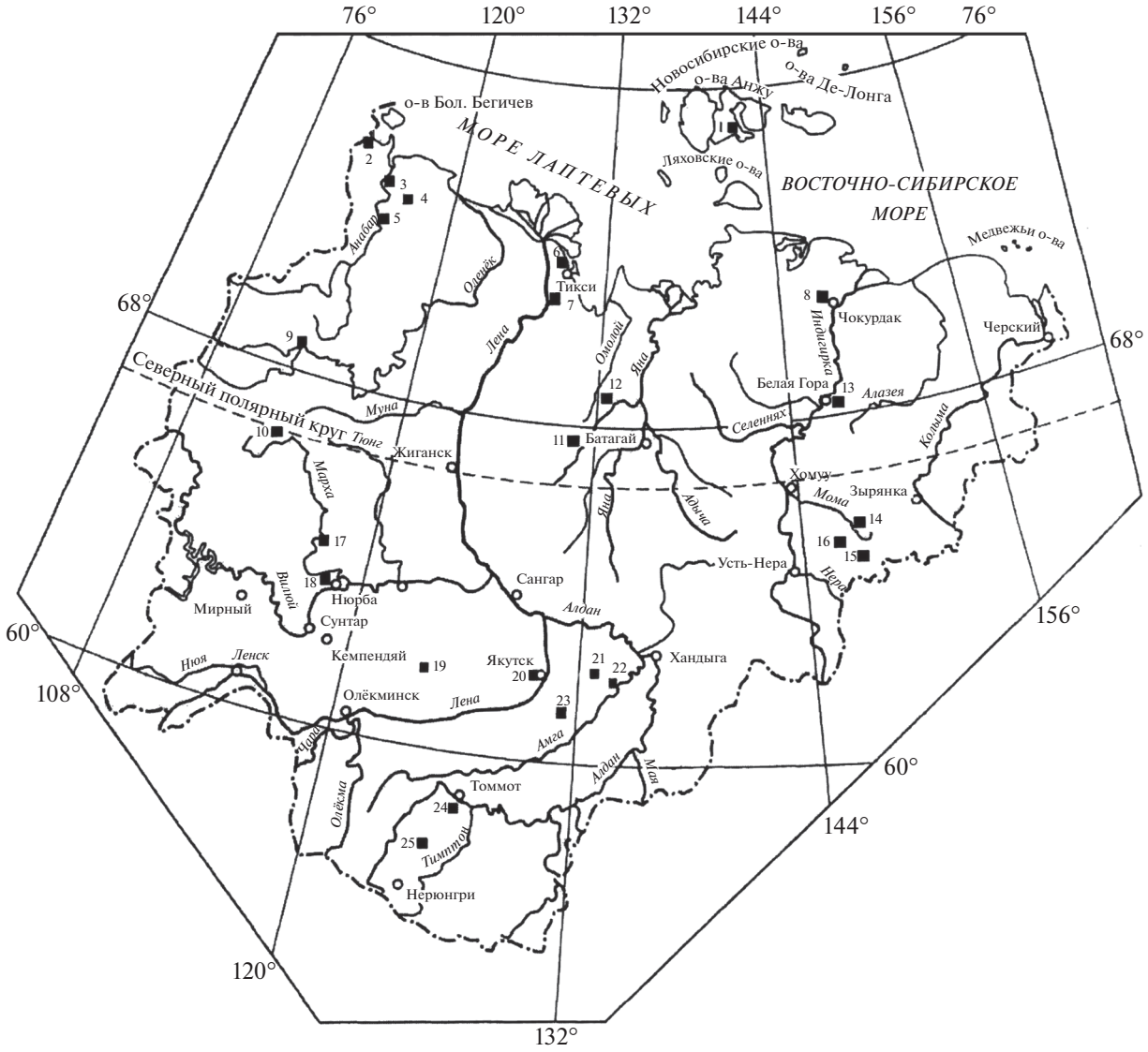

Рис. 1. Пункты исследований: 1 – о-в Земля Бунге; 2, 3, 4, 5 – Анабаро-Оленекская низменность; 6, 7 – устье р. Лены; 8 – Яно-Индигирская низменность; 9, 10 – Вилюйское плато; 11, 12 – Бытантайское холмогорье; 13 – Абыйская низменность; 14 – Момская впадина; 15 – хр. Улахан-Чистай; 16 – высокогорная равнина Улахан-Чистай; 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 – Центрально-Якутская равнина; 24, 25 – Алданское нагорье.

ландшафтов с относительно слабой латеральной миграцией ^{137}Cs. Непосредственно отбор проб проводили послойно через каждые 1–5 см с учетом площади и генетических горизонтов до глубины 50 см. Кормовые растения для анализа (кустарники, травы, лишайники) брали близ почвенных разрезов. Растения высушивали до воздушно-сухого состояния и озоляли в муфельной печи при температуре 450°С. Пробы мышечной ткани диких копытных, зайца-беляка и бурого медведя получены от охотников. Все животные представлены взрослыми особями, добытыми в осенне-зимние периоды: дикий северный олень в количестве 53 экз., лось – 34, косуля – 8, кабарга – 7, снежный баран – 3, заяц-беляк – 3, бурый медведь – 10 особей.

Часть проб с низкой концентрацией ^{137}Cs предварительно обугливали в металлической посуде и только затем озоляли в муфельной печи. Подавляющее большинство проб использовали в сыром виде. Гамма-спектрометрический анализ на содержание ^{137}Cs проводили с применением многоканального анализатора ГАММА-01 (НПЦ “Аспект”, Россия) со сцинтилляционным детектором натрий-йод размером 150 × 100 мм. Использовали методику, предложенную Якубович А.Л. и др. (1982). Порог обнаружения ^{137}Cs при экспозиции 1 ч при массе проб 250 г составлял при данном методе 1–2 Бк/кг. Относительная среднеквадратическая погрешность не превышала ±30%.

Таблица 1. Плотность загрязнения ^{137}Cs в мерзлотных почвах на территории Якутии

№	Район исследований	Ландшафт (почвы)	*n**	Высота над ур. м.	Количество осадков, мм	Бк/м^2
1	О-в Земля Бунге	Арктическая тундра (тундровые глеевые)	8	5–80	150–200	505 ± 128** / 380–680
2–5	Анабаро-Оленекская низменность	Субарктическая тундра (тундровые глеевые, подбуры, болотные)	42	10–150	150–200	526 ± 118 / 377–745
6–7	Устье р. Лена	Субарктическая тундра (тундровые глеевые, подбуры, болотные)	74	5–100	250–300	617 ± 60 / 522–682
8	Яно-Индигирская низменность	Субарктическая тундра (тундровые глеевые, подбуры, болотные)	104	10–100	150–200	490 ± 72 / 366–587
9–10	Вилюйское плато	Северная тайга (дерново-карбонатные, болотные)	144	300–500	250–300	865 ± 70 / 797–1090
11–12	Бытантайское холмогорье	Северная тайга (северотаежные, болотные)	38	400–700	150–200	566 ± 65 / 484–648
13	Абыйская низменность	Северная тайга (северотаёжные, болотные)	18	100–200	120–250	546 ± 75 / 477–645
14	Момская котловина	Северная тайга (подбуры, подзолистые, болотные)	32	600–900	200–300	918 ± 66 / 807–982
15	Хребет Улахан-Чистай	Горная тундра (подбуры тундровые, болотные)	21	1600–2600	400–600	1939 ± 378 / 1442–2362
16	Высокогорная равнина Улахан-Чистай	Тундра (горно-тундровые глеевые, болотные)	34	1200–1600	350–450	1033 ± 150 / 804–1262
17–23	Центрально-Якутская равнина	Средняя тайга (палевые, мерзлотно-таёжные, аласные)	292	120–300	150–300	718 ± 146 / 484–1120
24–25	Алданское нагорье	Средняя и верхняя тайга (подбуры, подзолистые, болотные)	288	700–1200	500–600	1924 ± 268 / 1456–2465

Примечание. № – пункты исследования; * *n* – число проб; ** в числителе – среднее и его ошибка, в знаменателе – пределы колебания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как установлено, в мерзлотных почвах автоморфных ландшафтов Якутии современные уровни глобальных выпадений ^{137}Cs варьируют от 366 до 2465 Бк/м^2 (табл. 1). Степень радиоактивного загрязнения почв обследованной территории со стороны Чернобыльской АЭС на данном этапе неизвестна. По данным территориального управления гидрометеослужбы в августе 1987 г., в районе г. Якутска вклад аварийных выбросов Чернобыльской АЭС в накопление ^{137}Cs верхнего пятисантиметрового слоя почвы не превышал 6% от его общего запаса (Израэль и др., 1990). В настоящее время уровни загрязнения почв Якутии в целом на один-три порядка величин ниже, чем в Брянской, Калужской, Тульской, Орловской и других центральных областях страны, пострадавших от аварии на Чернобыльской АЭС (Изменение ..., 2012; Ашитко и др., 2016).

На обследованных нами участках Анабаро-Оленекской низменности средняя плотность загрязнения почв ^{137}Cs составляла 526 Бк/м^2, в устье р. Лены – 617 Бк/м^2, на Яно-Индигирской низменности – 490 Бк/м^2, на Вилюйском плато –

865 Бк/м^2, на Центрально-Якутской равнине – 718 Бк/м^2 (табл. 1). В сравнении с данными аэрогамма-спектральных съемок в 1968–1974 гг. (Болтнева и др., 1977) эти показатели снизились в 3–4 раза, как надо полагать за счет радиоактивного распада, заглубления, выноса с поверхностными водами и аккумуляции растительностью. Наибольшее содержание ^{137}Cs в почвах выявлено в горно-таежных районах с большим среднегодовым количеством осадков (400–600 мм в год), как на юге (Алданское нагорье), так и на северо-востоке Якутии (хр. Улахан-Чистай), наименьшее – в тундровой зоне с небольшим количеством осадков (150–300 мм). Установлена статистически значимая корреляция между средними величинами выпадения осадков и загрязнённости почв радионуклидом ($r = 0.94$, $P > 0.95$). В среднем, по обследованным участкам загрязнение почв ^{137}Cs в Якутии в 2–4 раза меньше, чем на Урале, в Западной и Южной Сибири, а также в других регионах страны (Собакин, 2015, Собакин и др., 2019).

По данным Якутского управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, в последние годы уровень выпадений ^{137}Cs из атмосферы существенно снизился (Государственный..., 2012). Поступление радионуклида в высшие растения происходит в основном через корневую систему при минимальном аэральном влиянии. В исследованных нами кустарниках и травянистых растениях концентрация ^{137}Cs варьировала от <1 до 4 Бк/кг в воздушно-сухой массе, в среднем, составляла 1.7 ± 0.4 Бк/кг (табл. 2). Низкие показатели радионуклида в растениях свидетельствуют об исходно невысоком уровне загрязненности корнеобитаемого слоя почв. Статистически значимая корреляция между содержанием ^{137}Cs в растениях и почве отсутствует.

В кустистых лишайниках содержание ^{137}Cs в 2–29 раз выше, чем в кустарниковых и травянистых растениях (табл. 3). Наибольшее количество ^{137}Cs обнаружено в лишайниках *Cladonia arbuscula, Cladonia stellaris* на Вилюйском плато (до 58–61 Бк/кг) и хр. Улахан-Чистай (до 55 Бк/кг), среднее – на Алданском нагорье (до 45 Бк/кг), наименьшее – на Центрально-Якутской равнине (до 22 Бк/кг). В *Cladonia rangiferina* этого радионуклида также несколько больше в горно-таежных ландшафтах (до 31 Бк/кг), меньше – в равнинной Центральной Якутии (до 18 Бк/кг). Концентрация ^{137}Cs в лишайниках *Flavocetraria cucullata* и *Flavocetraria nivalis* сильно варьирует по районам, максимальных значений достигает на хр. Улахан Чистай (до 55.0 Бк/кг). В среднем, у *Cladonia* она определена в 16.1 ± 4.1, у *Flavocetraria* – в 10.4 ± 3.9 Бк/кг. Корреляция между содержанием ^{137}Cs в почве и лишайниках отсутствует. Это позволяет заключить, что концентрация радионуклида в кустистых лишайниках разных видов, как и у рассмотренных выше сосудистых растений, мало зависит от его содержания в почвенном покрове.

Средний показатель концентрации ^{137}Cs в мышечной ткани исследованных животных уменьшается в следующей последовательности: северный олень (20.0 ± 16.3 Бк/кг, $n = 53$), кабарга (15.1 ± ± 15.4 Бк/кг, $n = 7$), косуля (4.8 ± 1.8 Бк/кг, $n = 8$), медведь (4.8 ± 9.7, $n = 10$), лось (3.8 ± 3.6 Бк/кг, $n = 34$), снежный баран (1.5 ± 0.6, $n = 3$), заяц-беляк (1.1 ± 0.3, $n = 3$ Бк/кг) (табл. 4). Высокие уровни этого радионуклида, отмеченные у северного оленя и кабарги, согласуется с большим потреблением ими лишайников (Сафронов, 2005), аккумулирующих ^{137}Cs. Повышенным содержанием радионуклида, по нашим данным, характеризуются также грибы (от 4 до 74 Бк/кг сырой массы) – один из важных нажировочных кормов этих видов копытных. Максимальные показатели ^{137}Cs у северного оленя отмечены на Вилюйском плато (до 75.1 Бк/кг), средние – на Абыйской низменности (до 24.1 Бк/кг) и Алданском нагорье (до 31.0 Бк/кг), наименьшие – в тундровой зоне (до 12.4 Б/кг) и на Центрально-Якутской равнине (до 9.7 Бк/кг). Констатирована тесная корреляция между количеством ^{137}Cs в тканях оленей и потребляемых ими лишайниках ($r = 0.91$, $P > 0.95$). В виде аппроксимирующей кривой эта зависимость показана на рис. 2. Получены данные о значительной концентрации ^{137}Cs в лишайниковом содержимом рубцов оленей (10–15 Бк/кг воздушно-сухой массы), подтверждающие его поступление из объекта питания. Примечательно, что содержание ^{137}Cs у северного оленя в наших пробах в среднем в 20 раз меньше, чем по данным В.Е. Соколова с соавторами (1989) за 1950–1960 гг. (400 Бк/кг).

В пробах кабарги, которая постоянно поедает лишайники во всех районах обитания (до 100% встреч в содержимом желудков) (Тавровский и др., 1971), ландшафтно-биотопические различия в концентрации радионуклида, не обнаружены. Максимальный показатель отмечен в Центральной Якутии (до 51.6 Бк/кг). На третьем месте по содержанию ^{137}Cs находится косуля (до 7.1 Бк/кг), что находит связь с большим потреблением лишайников (до 50%), а также грибов (до 63–84%) (Тавровский и др., 1971). При этом у европейской косули в Брянской области, обитающей в районе радиоактивного загрязнения (900–43000 Бк/кг сырой массы), содержание ^{137}Cs в мышечной ткани (Пельгунов, Пельгунова, 2009) в среднем на три порядка величин больше, чем в Якутии. Далее по частоте употребления лишайников и грибов в пищу (соответственно 15 и 23%) и уровню ^{137}Cs в организме идет лось (табл. 4). Замыкает ряд лихенофагов – потребителей лишайников – снежный баран с низким содержанием радионуклида (в среднем, 1.5 Бк/кг), что требует уточнения в по-

Таблица 2. Содержание ^{137}Cs в кустарниковых и травянистых растениях

Район исследований	Место отбора проб	Вид, орган		*n**	Бк/кг воздушно-сухой массы
Тундра					
Анабаро-Оленекская и Яно-Индигирская низменности	Водоразделы рр. Анабар и Индигирка	Ива полярная	Листья	8	2.0 ± 0.8 (1–3)**
			Ветви	8	2.2 ± 0.9 (1–4)
		Береза тощая	Листья	7	1.0 ± 0.8 (<1–2)
			Ветви	7	1.3 ± 0.6 (<1–2)
		Пушица влагалищная	Надземная часть	9	0.8 ± 0.3 (<1–1)
		Осока	Надземная часть	8	1.2 ± 0.6 (1–2)
Северная тайга					
Вилюйское плато	Водоразделы рр. Далдын и Сытыкан	Ива скальная	Листья	8	1.7 ± 0.6 (<1–2)
			Ветви	8	2.1 ± 1.2 (<1–3)
		Береза кустарниковая	Листья	10	1.8 ± 0.8 (<1–3)
			Ветви	10	2.0 ± 0.9 (1–4)
	Пойма р. Далдын	Пушица влагалищная	Надземная часть	6	0.9 ± 0.8 (<1–2)
	Пойма р. Сытыкан	Осока	Надземная часть	6	0.9 ± 0.8 (<1–2)
Бытантайское холмогорье	Водораздел и пойма р. Бытантай	Ива	Листья	4	1.7 ± 0.9 (1–3)
			Ветви	4	1.8 ± 1.4 (<1–4)
		Разнотравье	Надземная часть	5	1.1 ± 0.6 (<1–2)
Средняя тайга					
Центрально-Якутская равнина	Долины и водоразделы рр. Лена и Амга Долина р. Амга и аласы Лено-Амгинского междуречья	Ива	Листья	7	1.7 ± 0.7 (<1–2)
			Ветви	7	1.8 ± 0.4 (1–2)
		Береза кустарниковая	Листья	12	1.6 ± 1.1 (<1–3)
			Ветви	12	1.7 ± 1.0 (<1–3)
		Разнотравье	Надземная часть	11	1.4 ± 0.7 (<1–2)
		Осока	Надземная часть	11	1.7 ± 0.6 (<1–2)
Горная тундра и тайга (верхняя и средняя)					
Хребет Улахан-Чистай и Алданское нагорье	Поймы и водоразделы рр. Большой Нагаин, Сугун, Алдан, Тимптон, и др.	Ива Шверина	Листья	13	2.1 ± 0.9 (1–4)
			Ветви	13	2.2 ± 0.8 (1–4)
		Береза кустарниковая	Листья	16	1.7 ± 0.6 (<1–3)
			Ветви	16	2.0 ± 0.8 (1–4)
		Береза тощая	Листья	5	2.2 ± 1.5 (<1–4)
			Ветви	5	2.7 ± 1.5 (1–5)
		Вейник Лангсдорфа	Надземная часть	17	1.5 ± 0.6 (1–3)
		Осока	Надземная часть	18	1.8 ± 0.7 (1–3)
		Разнотравье	Надземная часть	12	1.6 ± 0.6 (1–4)

Примечание. * *n* – число проб; ** в скобках – пределы колебания для табл. 2, 3.

Таблица 3. Содержание ^{137}Cs в кустистых лишайниках

Район исследований	Место отбора проб	Вид	*n*	Бк/кг воздушно-сухой массы
Тундра				
Яно-Индигирская низменность	Водораздел р. Индигирка	*Flavocetraria cucullata*	10	12.1 ± 3.4 (6–18)
Анабаро-Оленекская низменность	Водораздел р. Анабар	*Flavocetraria cucullata*	9	9.3 ± 2.4 (6–14)
		Flavocetraria nivalis	8	5.5 ± 1.6 (4–9)
Северная тайга				
Вилюйское плато	Водоразделы рр. Марха, Далдын и Тюнг	*Cladonia arbuscula*	17	23.5 ± 13.9 (7–61)
		Cladonia stellaris	16	17.1 ± 12.2 (6–58)
		Flavocetraria cucullata	18	11.1 ± 5.2 (5–22)
Средняя тайга				
Центрально-Якутская равнина	Водоразделы рр. Лена и Амга	*Cladonia arbuscula*	14	11.4 ± 4.9 (4–22)
		Cladonia rangiferina	16	12.7 ± 3.7 (8–18)
		Cladonia stellaris	15	10.6 ± 2.9 (6–16)
		Flavocetraria cucullata	17	7.2 ± 2.1 (4–12)
Горная тундра и тайга (верхняя и средняя)				
Хребет Улахан-Чистай	Водораздел р. Улахан-Нагаин	*Flavocetraria cucullata*	7	17.6 ± 15.2 (10–55)
Алданское нагорье	Водоразделы притоков р.Алдан	*Cladonia arbuscula*	21	19.2 ± 6.8 (5–41)
		Cladonia rangiferina	19	18.3 ± 4.3 (7–31)
		Cladonia stellaris	22	16.2 ± 9.4 (4–45)
		Flavocetraria cucullata	20	10.2 ± 3.3 (4–16)

следующих исследованиях, поскольку кустистые лишайники и грибы в значительном количестве потребляются этим видом (до 40–100%) (Тавровский и др., 1971). Заяц-беляк в описанной миграции радионуклида не участвует и в малой степени подвержен его воздействию.

Бурый медведь характеризуется небольшим уровнем концентрации ^{137}Cs (табл. 4). Как исключение отмечено повышенное содержание радионуклида у медведя в возрасте более 10 лет (32.0 Бк/кг) на Алданском нагорье, связанное, как можно предположить, с поеданием оленя или кабарги и сохранившееся в организме. Копытные составляют в питании медведя небольшой процент (1.2–1.6%) (Тавровский и др., 1971), как, вероятно, и данный случай их добычи, повысивший поступление ^{137}Cs

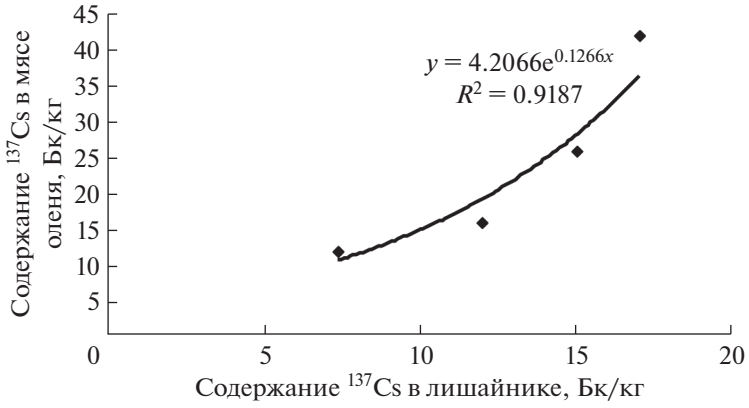

Рис. 2. Содержание ^{137}Cs в мышечной ткани северного оленя и кустистых лишайниках.

Таблица 4. Содержание ^{137}Cs в мышечной ткани охотничьих видов млекопитающих

Район исследований	Место отбора проб	Вид	*n*	Бк/кг сырой массы
Тундра				
Анабаро-Оленекская низменность	Водораздел р. Анабар	Олень	8	7.2 ± 2.9 (4.0–11,5)
Устья р. Лена	Водораздел р. Лена	Олень	3	7.6 ± 4.5 (2.4–10.8)
Яно-Индигирская низменность	Водораздел р. Индигирка	Олень	3	10.0 ± 5.2 (6.2–12.4)
Северная тайга				
Вилюйское плато	Водоразделы рр. Далдын и Мархa	Олень	17	36.7 ± 15.6 (13.6–75.1)
		Лось	7	5.4 ± 5.8 (0.8–14.8)
Бытантайское нагорье	Водоразделы и долины р. Бытантай	Лось	3	3.1 ± 2.5 (1.0–5.6)
		Медведь	3	3.5 ± 3.1 (0.6–6.8)
		Заяц-беляк	3	1.1 ± 0.3 (0.8–1.3)
Абыйская низменность	Водоразделы и долины притоков р. Индигирка	Олень	4	16.6 ± 8.3 (6.7–24.1)
		Лось	4	5.6 ± 4.1 (1.5–10.1)
Средняя тайга				
Центрально-Якутская равнина	Водоразделы и долины рр. Лена, Татта и Амга	Олень	5	7.3 ± 2.5 (4.0–9.7)
		Лось	13	2.8 ± 2.0 (0.7–6.5)
		Косуля	8	4.8 ± 1.8 (1.4–7.1)
		Кабарга	4	18.1 ± 19.3 (3.9–51.6)
		Медведь	3	0.8 ± 0.2 (0.6–1.0)
Горная тундра и тайга (верхняя и средняя)				
Хребет Улахан-Чистай	Водоразделы рр. Улахан-Нагаин и Сугун	Снежный баран	3	1.5 ± 0.5 (1.0–2.1)
Момская котловина	Водоразделы и долина р. Мома	Лось	3	3.8 ± 3.9 (1.4–8.4)
Алданское нагорье	Водоразделы и долины притоков р. Алдан	Олень	7	17.2 ± 7.2 (6.8–31.0)
		Лось	3	2.1 ± 1.1 (1.0–3.2)
		Кабарга	3	8.7 ± 1.9 (6.8–11.4)
		Медведь	4	8.9 ± 15.3 (0.5–32.0)

в мясо хищника. Необходимо отметить, что к лихенофагам, кроме рассмотренных выше, относятся разные виды лесных и тундровых полевок, составляющие кормовую базу многочисленных мелких и средних хищников (ласки, горностая, соболя, песца и др.), также вовлекаемых в распространение рассматриваемого радионуклида по трофическим цепям.

По нашим материалам, мясо крупного рогатого скота и лошадей на территории Якутии характеризуется низким уровнем ^{137}Cs (0.5–2.2 Бк/кг сырой массы), что согласуется с небольшим содержанием радионуклида в травянистых растениях. В коне- и скотоводческих районах республики ожидаемая внутренняя доза облучения населения за счет ^{137}Cs при среднегодовом потреблении мяса 0.134 кг/сут. может составлять в среднем 1 мкЗв в год (Дарбасов, Никифоров, 2007; Рамзаев и др., 2008). В оленеводческих и охотничье-промысловых районах этот показатель, исходя из наших данных, может достигать 10 мкЗв в год и более, что на современном этапе ниже установленных

норм (1 мЗв) и не является опасным для населения (Гигиенические..., 2002; Нормы..., 2009).

Содержание ^{137}Cs в тканях северного оленя, кабарги, косули, лося, снежного барана, зайца-беляка и бурого медведя значительно варьирует (0.5–75.1 Бк/кг сырой массы) в зависимости от видовой принадлежности, распространения, мест обитания и состава питания. Их использование в качестве видов-идентификаторов радиоактивного загрязнения окружающей среды возможно только при наличии значительного количества данных. Максимальное количество радионуклида выявлено у северного оленя и кабарги, в наибольшем количестве потребляющих кустистые лишайники. Повышенное содержание ^{137}Cs в лишайниковом содержимом желудков оленей свидетельствует о поступлении изотопа из съеденного корма. Ландшафтно-географическая изменчивость содержания ^{137}Cs у растительноядных видов млекопитающих, в общем, соответствует его уровням в растительном покрове с тенденцией повышения в районах с горным и приподнятым рельефом со сравнительно большим количеством атмосферных осадков. Содержание ^{137}Cs у северного оленя значительно уменьшилось в сравнении с 1950–1960 гг. что может объясняться снижением его концентрации в лишайниках, происходящим под действием естественных процессов радиоактивного распада и вымывания. Установленные концентрации радионуклида в мясе исследованных видов в текущий период не превышают существующие санитарно-гигиенические нормы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по проектам: № 0297-2021-0027, ЕГИСУ НИИОКТР № АААА-А21-121012190033-5 и № 0297-2021-0044, ЕГИСУ НИОКТР № 121020500194-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ашитко А.Г., Золочевский Д.В., Овсянникова Л.В., Рожкова С.А. Радиационная обстановка на территории Калужской области 30 лет спустя после аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная гигиена. 2016. Т. 9. № 2. С. 40–47.

Болтнева Л.И., Израэль Ю.А., Ионов В.А., Назаров И.М. Глобальное загрязнение ^{137}Cs и ^{90}Sr и дозы внешнего облучения на территории СССР // Атомная энергия. 1977. Т. 42. Вып. 5. С. 355–358.

Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидеомологические правила и нормативы. СанПиН. 2.3.2.1078-01. М.: ФГУН “ИнтерСЭН”, 2002. 168 с.

Государственный доклад о состоянии окружающей среды Республики Саха (Якутия) в 2011 г. Якутск: Компания Дани-Алмаз. 2012. 113 с.

Дарбасов В.Р., Никифоров А.Г. Продовольственное обеспечение Якутии. (Теория, опыт, проблемы). Новосибирск: Наука, 2007. 212 с.

Иванов А.Б., Красилов Г.А., Логачев В.А., Матущенко А.М., Сафронов В.Г. Северный полигон Новая Земля – радиоэкологические последствия ядерных испытаний. М.: 1997. 68 с.

Израэль Ю.А., Вакуловский С.М., Ветров В.А., Петров В.Н., Ровинский Ф.Я., Стукин Е.Д. Чернобыль: радиоактивное загрязнение природных сред. Л.: Гидрометеоиздат, 1990. 296 с.

Изменение природной среды России в XX веке. М.: Молнет, 2012. 404 с.

Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009): Гигиенические нормативы. М.: Центр санитарно-эпидемологического нормирования, гигиенической сертификации и экспертизы Минздрава России, 2009. 72 с.

Пельгунов А.Н., Пельгунова Л.А. Роль разных видов охотничье-промысловых животных в формировании дозы облучения населения на территориях, загрязненных ^{137}Cs // Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49. № 2. С.234–237.

Рамзаев В.П., Травникова И.Г., Басалаев Л.Н., Брук Г.Я., Голиков В.Ю., Мишин А.С., Браун Дж.Е., Странд П. О влияние подземных ядерных взрывов “Кратон-3” и “Кристалл” на радиационно-гигиеническую обстановку в близлежащих населенных пунктах // Радиационная гигиена. 2008. Т. 1. № 2. С. 14–19.

Соколов В.Е., Криволуцкий Д.А., Усачев В.Л. Дикие животные в глобальном радиоэкологическом мониторинге. М.: Наука, 1989. 150 с.

Сафронов В.М. Экология и использование дикого северного оленя в Якутии. Якутск: ЯФ ГУ “Изд-во СО РАН”, 2005. 178 с.

Собакин П.И. Миграция ^{137}Cs в мерзлотных почвах Якутии // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50. № 5. С. 590–598.

Собакин П.И. Естественные и искусственные радионуклиды в мерзлотных почвах Якутии: Автореф. дис. ... док. биол. наук. Улан-Удэ. 2015. 39 с.

Собакин П.И., Чевычелов А.П., Герасимов Я.Р. Географические особенности загрязнения территории Якутии цезием-137 // География и природные ресурсы. 2019. № 9. С. 112–123.

Тавровский В.А., Егоров О.В., Кривошеев В.Г., Попов М.В., Лабутин Ю.В. Млекопитающие Якутии. М.: Наука, 1971. 660 с.

Якубович А.Л., Зайцев Е.И., Пржиялковский С.М. Ядерно-физические методы анализа горных пород. М.: Энергоатомиздат, 1982. 264 с.

Global Pollution of the Territory of Yakutia ^{137}Cs and its Content in Feeds and Tissues of Game Animals

P. I. Sobakin[1, #], E. S. Zakharov[1], and V. M. Safronov[1]

[1] *Institute of biological problems of cryolithozone SB RAS, Lenin Ave. 41, Yakutsk, 677980 Russia*

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

The data on the concentration of ^{137}Cs in soils, forage plants and muscle tissue of seven species of hunting animals (wild reindeer, elk, roe, musk deer, snow sheep, white hare and brown bear) in the tundra and taiga zones of Yakutia are considered. It is shown that reindeer and musk deer are consumers of bushy lichens, characterized by a relatively high content of ^{137}Cs (up to 51.6–75.1 Bq/kg) and can be a source of its entry into the body of the subsequent consulate – brown bear. Levels of ^{137}Cs in other herbivorous species are relatively low. Meat products of a number of species are an important component of nutrition of the population of reindeer herding and hunting-fishing areas of the Far North. Currently, the isotope concentrations in the tissues of the studied species do not exceed the established sanitary and hygienic norms.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 4, с. 444–448

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 591.111.1.597.42.55

ПАРАМЕТРЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДВУХ ВИДОВ ГЛУБОКОВОДНЫХ РЫБ СЕМЕЙСТВА ВЕРЕТЕННИКОВЫХ (Paralepididae)

© 2021 г. Г. И. Пронина*, **, А. М. Орлов*, ****, *****, ******, *******, ********, Д. В. Артеменков***, @**

**Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационого рыбоводства, ул. Сергеева, 24, пос. Воровского, Ногинский р-н, Московская обл., 142460 Россия*

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

****Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, ул. Верхняя Красносельская, 17, Москва, 107140 Россия*

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

******Дагестанский государственный университет, ул. Гаджиева, 43а, Махачкала, 367000 Россия*

*******Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, ул. Гаджиева, 45, Махачкала, 367000 Россия*

********Томский государственный университет, просп. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия*

*********Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Нахимовский просп., 36, Москва, 117218 Россия*

@E-mail: artemenkov@vniro.ru

Поступила в редакцию 13.04.2020 г.
После доработки 25.07.2020 г.
Принята к публикации 25.07.2020 г.

На основании материалов комплексной экспедиции в море Ирмингера в 2018 г. впервые описаны гематологические и цитохимические параметры периферической крови паралеписа Кройера (морской щучки или ложного нотолеписа Риссо) *Arctozenus risso* и средиземноморского сиговидного веретенника *Paralepis coregonoides* (Paralepididae). Показано, что эритропоэз у обоих изучаемых видов рыб примерно одинаковый, присутствуют нормобласты и эритроциты. Путем сравнительного анализа лейкограмм изучаемых видов установлен лимфоидный характер крови обоих видов рыб. Отмечено, что для сиговидного веретенника характерна большая доля зрелых сегментоядерных форм – нейтрофилов, отвечающих за неврожденный неспецифический клеточный иммунитет.

DOI: 10.31857/S1026347021030139

Эритроциты и лейкоциты характеризуют параметры периферической крови, а также выполняют разнообразные физиологические и иммунологические функции, защищают организм от чужеродных тел и обеспечивают адаптацию рыб (Микряков, Балабанова, 1979; Secombes, 1996; Галактионов, 2005). Особенности вида и среды обитания отражаются на составе эритроцитов и лейкоцитов рыб, основные типы которых – зрелые и базофильные эритроциты, нормобласты, а также лимфоциты, моноциты, нейтро-, эозино- и базофилы и небольшая доля незрелых форм лейкоцитов. Соотношение отдельных типов клеток может свидетельствовать о физиологическом состоянии организма и наличии биотических и абиотических стресс-факторов (Иванова, 1983; Parish *et al.*, 1986; Головина, Тромбицкий, 1989; Житенева и др., 1989; Точилина, 1994; Микряков и др., 2001).

Довольно много исследований связано с изучением клеточного состава крови рыб, обитающих в пресноводных и солоноватоводных экосистемах. Однако глубоководные рыбы, несмотря на свое широкое распространение и значительную численность в Мировом океане (Беккер, 1971; Deep-sea..., 1997), обитающие преимущественно на глубинах >400 м в условиях высокого давления, низких температур, абсолютной темноты, своеобразной кормовой базы и других биотических и абиотических факторов (Haedrich, 1996; Richards, 2006), вероятно, в силу своей меньшей доступности остались изучены крайне недостаточно или не изучены совсем (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989; Точилина, 1994). Они давно привлекают внимание специалистов, которыми в большей степени исследованы процессы роста, особенности морфологии, физиологии, биохимии, химического состава тела, пищевого поведения и т.д. (Childress, Somero, 1979; Deep-sea..., 1997; Rofen, 2019). Однако сведения о составе эритроцитов и лейкоцитов этих рыб в доступ-

Таблица 1. Информация о поимках паралеписа Кройера *Arctozenus risso* и средиземноморского сиговидного веретенника *Paralepis coregonoides*

Вид	Длина, см	Масса, г	Дата поимки	Широта, с.ш.	Долгота, з.д.	Глубина, м
Arctozenus risso	23.8	21.7	25.06.2018	62°34′	30°50′	400
	23.1	20.3	28.06.2018	62°35′	39°21′	375
	24.2	22.0	28.06.2018	62°35′	39°21′	375
Paralepis coregonoides	28.4	55.1	29.06.2018	62°05′	37°1′	700
	22.7	42.6	29.06.2018	62°05′	37°1′	700

ной литературе крайне редки (Гордеев и др., 2014), поэтому исследование данного направления важно для понимания морфофизиологических перестроек в процессе адаптации к глубоководным условиям обитания.

Цель данной работы – исследование гематологических и цитохимических параметров периферической крови двух видов глубоководных рыб (*Arctozenus risso*, *Paralepis coregonoides*) семейства веретенниковых (Paralepididae).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рыб отлавливали в экспедиции НИС “Атлантида” в июне–июле 2018 г. в море Ирмингера (62°34′–64°50′ с.ш., 30°50′–39°21′ з.д.) на глубине от 375 до 700 м разноглубинным тралом 78.7/416 м проекта 2492-02, канатная и сетная части которого изготовлены из современных облегченных материалов, размеры ячеи в крыльях и кутце 68 и 16 мм соответственно.

Для проведения клинических исследований рыб взяты 5 проб из уловов 3 тралений (паралепис Кройера – 3, сиговидный веретенник – 2 экз., табл. 1). У свежевыловленных рыб пробы крови брали из хвостовой артерии. Сразу изготавливали препараты на предметных стеклах в двух повторностях на одну пробу. После изготовления мазки крови высушивали в темном проветриваемом месте до исчезновения влажного блеска. Высушенные мазки хранили при комнатной температуре, обернув мазки в бумагу, и транспортировали в лабораторию для анализа (Иванов и др., 2013).

Состав эритроцитов и лейкоцитов определяли в мазках периферической крови, окрашенных по Романовскому–Гимза (Иванов и др., 2013). В каждом мазке определяли содержание основных типов клеток и относительное их количество под цифровым микроскопом Optika DM-15 (Польша) с увеличением 10 × 60.

Результаты исследований обработаны статистически с использованием *t*-теста при уровне достоверности $p \leq 0.05$ стандартным пакетом программ (Statistica v.12).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Паралепис Кройера (морская щучка или ложный нотолепис Риссо) *A. risso* (Bonaparte, 1840) и средиземноморский сиговидный веретенник *P. coregonoides* (Risso, 1820) – хищные рыбы средних размеров, обитающие в умеренных и холодных водах. Первый вид втречается на глубинах от поверхности до 3465 м, обычен в диапазоне глубин 200–1000 м (Orlov, Tokranov, 2019). Распространение практически космополитическое (Тупоногов, Кодолов, 2014), в российских водах встречается в западной части Берингова и в Охотском море, а также в тихоокеанских водах Курильских о-вов, где считается обычным видом (Parin et al., 2014). Второй вид распространен преимущественно в Северной Атлантике (от Гренландии, Исландии и Северного моря на севере до приблизительно 30° с.ш., включая Срезиземное море), изредка встречается в Мексиканском заливе и в Карибском море, а в восточной тропической Атлантике его находки привязаны к материковому склону Африки (Porteiro *et al.*, 2017).

Особи паралеписа Кройера могут достигать длины 31 см (Thompson, 2002), сиговидного веретенника – 50 см (Muus, Nielsen, 1999). Основные объекты питания обоих видов – мелкие рыбы, креветки и различные беспозвоночные (Post, 1984; Парин, 1988).

Морфология и размеры клеток эритропоэтического ряда у обоих рассматриваемых видов аналогичны таковым у других видов рыб (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). Среди типов клеток были отмечены нормобласты, базофильные эритроциты и зрелые полихроматофильные эритроциты, за исключением гемоцитобластов и эритробластов (табл. 1). Доля созревающих клеток составляла 15.0–15.2%, базофильные эритроциты – 13.0 ± 3.5 и 11.7 ± 3.5 соответственно у паралеписа Кройера и сиговидного веретенника, нормобласты – соответственно 2.2 ± 0.9 и 3.3 ± 1.5. Зрелые эритроциты были самой многочисленной группой и составляли 84.8 ± 8.8 и 85.0 ± 4.9 соответственно. Повышенное содержание зрелых эритроцитов в составе клеток эритропоэтического ряда по сравнению с таковым у пресноводных рыб (Грушко, 2010) может быть обусловлено вы-

Таблица 2. Параметры периферической крови паралеписа Кройера *Arctozenus risso* и средиземноморского сиговидного веретенника *Paralepis coregonoides*

Показатели	Паралепис Кройера *Arctozenus risso*	Средиземноморский сиговидный веретенник *Paralepis coregonoides*
Эритропоэз, %		
Гемоцитобласты, эритробласты	–	–
Нормобласты	2.2 ± 0.9	3.3 ± 1.5
Базофильные эритроциты	13.0 ± 3.5	11.7 ± 3.5
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	84.8 ± 8.8	85.0 ± 4.9
Лейкоцитарная формула, %		
Миелобласты	–	–
Промиелоциты	–	0.3 ± 0.3
Миелоциты	0.4 ± 0.4	1.7 ± 0.8
Метамиелоциты	1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.3
Палочкоядерные нейтрофилы	2.4 ± 0.8	2.7 ± 0.3
Сегментоядерные	2.8 ± 0.9	8.7 ± 2.0*
Эозинофилы	1.0 ± 0.6	2.0 ± 0.9
Базофилы	–	–
Моноциты	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.3
Лимфоциты	91.8 ± 1.6	83.6 ± 3.5

Примечание. * – разность по сравнению с относительным числом типов клеток у паралеписа Кройера достоверна при $p \le 0.05$, "–" – данные типы форменных элементов не наблюдались.

полнением функции переноса кислорода в условиях высокого давления на больших глубинах.

Данные о составе лейкоцитов у рассматриваемых видов семейства веретенниковых, как и у пресноводных видов рыб, представлены теми же типами лейкоцитов, за исключением миелобластов и базофилов. В лейкоцитарной формуле (табл. 2) основную долю составляют лимфоциты, далее в порядке убывания следуют сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофилы, эозинофилы, сумма миелоцитных форм клеток (1.4 и 2.7%) и моноциты. Поэтому можно отметить, что оба рассматриваемых вида имеют сходный состав лейкоцитов, но наблюдается примерно в 3 раза большая доля зрелых сегментоядерных нейтрофилов в лейкограмме средиземноморского сиговидного веретенника *P. coregonoides* по сравнению с паралеписом Кройера *A. risso*. Так как сегментоядерные нейтрофилы – фагоциты, то относительно высокое их содержание свидетельствует о значительном потенциале клеточного фактора врожденного иммунитета.

Лимфоидный характер крови паралеписа Кройера и сиговидного веретенника позволяет предположить, что лимфоциты составляют большую часть иммунокомпетентных клеток в их органах кроветворения, почках и селезенке. Рассматриваемые глубоководные виды рыб имеют аналогичную другим видам рыб морфологию и размеры лейкоцитов: диаметры лимфоциты – 5.0 мкм, моноцитов, нейтрофилов и эозинофилов 11.0–12.0 мкм, бластных клеток – 10.0 мкм. Гранулоциты этих видов, как и у большинства представителей отряда Perciformes, представлены тремя типами: эозинофилами, палочкоядерными и сегментоядерными нейтрофилами (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989; Балабанова, 2002).

Необходимо отметить, что при изучении лейкограмм морских костистых рыб из отрядов Clupeiformes, Beloniformes, Gadiformes, Perciformes, Pleuronectiformes и семейств Serranidae, Labridae и Myctophidae были выделены пять типов клеток (лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, нейтро-, эозино- и базофилы) (Точилина, 1994). В нашем исследовании базофилы отсутствовали. Данная популяция лейкоцитов в норме у млекопитающих и большинства костистых рыб составляет 0–3% (Иванов и др., 2013; Пронина, Корягина, 2015). Поэтому полученная информация свидетельствуют об отсутствии патологии, в частности воспалений у исследуемых рыб.

Ввиду наблюдаемого состава клеток эритропоэтического ряда обратим внимание на то, что эритропоэз у двух исследованных видов глубоководных рыб достоверно не различался. Однако было отмечено повышенное содержание зрелых эритроцитов относительно такового у пресновод-

ных рыб, находящихся в различных условиях обитания.

Результаты изучения лейкоцитов периферической крови паралеписа Кройера и сиговидного веретенника свидетельствуют о том, что их морфофункциональные характеристики гетерогенны и представлены разными по структуре клетками (лимфоциты, сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и бластные формы клеток (промиелобласты, миелобласты, метамиелоциты)). Анализ лейкоцитарной формулы двух рассматриваемых видов глубоководных рыб показал, что перифирическая кровь имеет лимфоидный характер.

Обнаруженное достоверное различие – бóльшая доля зрелых сегментоядерных нейтрофилов в лейкограмме паралеписа Кройера по сравнению с сиговидным веретенником свидетельствует о значительном потенциале их клеточного фактора врожденного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Балабанова Л.В. Ультраструктура гранулоцитов некоторых видов окунеобразных рыб // Биология внутр. вод. 2002. № 1. С. 79–84.

Беккер В.Э. Жизнь животных. Т. 4. Ч. 1. Рыбы. Семейство Веретенниковые (Paralepididae). М.: Просвещение, 1971. 655 с.

Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология: учебное пособие. М.: Академкнига, 2005. 408 с.

Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца, 1989. 156 с.

Гордеев И.И., Микряков Д.В., Балабанова Л.В., Микряков В.Р. Состав лейкоцитов периферической крови антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* (Nototheniidea) // Вопр. ихтиол. 2014. Т. 54. № 3. С. 1–4. https://doi.org/10.7868/S0042875214030047

Грушко М.П. Морфофизиологические особенности кроветворения у костистых рыб (на примере воблы (*Rutilus rutilus caspicus*)) // Вопр. рыболовства. 2010. Т. 11. № 2(42). С. 327–340.

Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов н/Д.: Ростов. книж. изд-во, 1989. 111 с.

Иванов А.А., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Петрушин А.Б. Клиническая лабораторная диагностика в аквакультуре. Методические указания. М.: Изд-во ТСХА, 2013. 50 с.

Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. 184 с.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб. Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 57–64.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.

Парин Н.В. Рыбы открытого океана. М.: Наука, 1988. 272 с.

Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. Референтные значения физиолого-иммунологических показателей гидробионтов разных видов // Вестн. Астрахан. гос. тех. ун-та. 2015. № 4. 2015. С. 103–108.

Точилина Л.В. Лейкоцитарная формула морских рыб // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30. № 3. С. 50–57.

Тупоногов В.Н., Кодолов Л.С. Полевой определитель промысловых и массовых видов рыб дальневосточных морей России. Владивосток: Русский остров, 2014. 336 с.

Childress J.J., Somero G.N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts // Mar. Biol. 1979. V. 52. P. 273–283. https://doi.org/10.1007/BF00398141

Deep-sea fishes / Eds Randall D.J., Farrell A.P. San Diego: Acad. Press, 1997. 387 p.

Haedrich R.L. Deep-water fishes: evolution and adaptation in the earth's largest living spaces // J. Fish. Biol. 1996. V. 49. P. 40–53. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb06066.x

Muus B.J., Nielsen J.G. Sea fish. Denmark; Hedehusene: Scand. Fish. Year Book, 1999. 340 p.

Orlov A.M., Tokranov A.M. Checklist of deep-sea fishes of the Russian northwestern Pacific Ocean found at depths below 1000 m // Progr. Oceanogr. 2019. V. 176. Pt 102143. 13 p. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2019.102143

Parin N.V., Evseenko S.A., Vasileva E.D. Fishes of Russian Seas: Annotated Catalogue. M.: KMK, 2014. 733 p.

Parish N., Wrathmell A., Hart S., Harris J.E. The leucocytes of the elasmobranch *Scyliorhinus vanicula* L. A morphological study // J. Fish. Biol. 1986. V. 28. № 5. P. 545–561. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05192.x

Porteiro F.M., Sutton T., Byrkjedal I., Orlov A.M., Heino M., Menezes G., Bergstad. O.A. Fishes of the Northern Mid-Atlantic Ridge Collected During the MAR-ECO Cruise in June-July 2004: An Annotated Checklist. Arquipelago. Life and Marine Sciences. 2017. Supplement 10. 125 p.

Post A. Paralepididae // Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Paris: UNESCO, 1984. P. 498–508.

Richards W.J. Early stages of Atlantic fishes: an identification guide for Western Central North Atlantic. Boca Raton: Taylor and Francis, 2006. 1312 p.

Rofen R.R. Family Paralepidae // Fishes of the Western North Atlantic. New Haven: Yale Univ. Press, 2019. Pt 5. P. 205–448.

Secombes C.J. The nonspecific immune system: cellular defense // The fish immune system: organism, pathogen and environment. London: Acad. Press, 1996. P. 63–105.

Thompson B.A. Paralepididae // The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic. Rome: FAO, 2002. P. 933–934.

Peripheral Blood Parameters of Two Species of Deep-sea Fish Family Paralepididae

G. I. Pronina[1, 2], A. M. Orlov[3, 4, 5, 6, 7, 8], and D. V. Artemenkov[3, #]

[1]Russian Scientific Research Institute of Irrigation Fisheries, ul. Sergeeva, 24, pos. Vorovskogo, Noginsky r-n, Moscow obl., 142460 Russia

[2]Russian State Agrarian University – K.A. Timiryazev Moscow Agricultural Academy, ul. Timiryazevskaya, 49, Moscow, 127550 Russia

[3]Russian Federal Research Institute Of Fisheries and Oceanography, Verkhnyaya Krasnoselskaya ul., 17, Moscow, 107140 Russia

[4]Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

[5]Dagestan State University, ul. Gadzhieva, 43a, Makhachkala, 367000 Russia

[6]Caspian Institute of Biological Resources, Dagestan Federal Research Center RAS, ul. Gadzhieva, 45, Makhachkala, 367000 Russia

[7]Tomsk State University, prosp. Lenina, 36, Tomsk, 634050 Russia

[8]Shirshov Institute of Oceanology RAS, Nakhimovsky prosp., 36, Moscow, 117218 Russia

[#]e-mail: artemenkov@vniro.ru

Hematological and cytochemical parameters of the peripheral blood of spotted barracudina *Arctozenus risso* and sharpchin barracudina *Paralepis coregonoides* (Paralepididae) are firstly studied on the materials of the survey to the Irminger Sea in 2018. It was shown that erythropoiesis in both studied fish species is approximately the same. Normoblasts and erythrocytes are present. The lymphoid character of the blood of both fish species was established by comparative analysis of leukograms. It was noted that a large proportion of mature segmented forms – neutrophils responsible for non-congenital nonspecific cellular immunity – is characteristic of sharpchin barracudina.