

СОДЕРЖАНИЕ

Том 51, номер 2, 2020

ОБЗОРЫ

- Фитогормональная регуляция роста и развития гаметофитов папоротников в культуре *in vitro*
Е. А. Романенко, Л. М. Бабенко, Е. В. Вашека, П. А. Романенко, И. В. Косаковская 81
- Эволюционное разнообразие механизмов установления лево-правой асимметрии у животных
Н. Д. Петри 96
-

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

- Пептиды семакс и HLDF-6, введенные крысам разного возраста, регулируют ритм синтеза белка в гепатоцитах, исправляя нарушения при старении
В. Я. Бродский, Ю. А. Золотарев, Л. А. Мальченко, Л. А. Андреева, Д. С. Лазарев, Н. Н. Буторина, В. С. Козик, Н. Ф. Мясоедов 113
-

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

- Жизненный цикл *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (Bacillariophyta)
В. Б. Багмет, Ш. Р. Абдуллин, С. Е. Мазина, А. Ю. Никулин, В. Ю. Никулин, А. А. Гончаров 121
- Онтогенез лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. в растительных сообществах бореальной зоны
Р. В. Игнатенко, В. Н. Тарасова, Е. Ф. Марковская 132
-

ОНТОГЕНЕЗ И ЭКОЛОГИЯ

- Суточная динамика липидов и жирных кислот и активность ферментов энергетического и углеводного обмена у молоди лептоклинуса пятнистого *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838) разных стадий развития в условиях полярной ночи
С. А. Мурзина, С. Н. Пеккоева, М. В. Чурова, З. А. Нефедова, К. А. Филиппова, С. Фальк-Петерсен, Н. Н. Немова 143
-

- Правила для авторов 154
-
-

Contents

Vol. 51, No. 2, 2020

REVIEWS

- Phytohormonal Regulation of Growth and Development
of Fern Gametophytes in Culture in vitro
*K. O. Romanenko, L. M. Babenko, O. V. Vasheka,
P. O. Romanenko, and I. V. Kosakivska* 81
- Evolutionary Diversity of the Mechanisms Providing the Establishment
of Left-Right Asymmetry in Metazoans
N. D. Petri 96
-

BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

- The Peptides Either Semax or HLDF-6 Injected to Rats Regulate Protein
Synthesis Rhythm in Hepatocytes Correcting Senescent Disturbances
*V. Y. Brodsky, Y. A. Zolotarev, L. A. Malchenko, L. A. Andreeva,
D. S. Lazarev, N. N. Butorina, V. S. Kozik, and N. F. Myasoedov* 113
-

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

- Life Cycle of *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (Bacillariophyta)
*V. B. Bagmet, Sh. R. Abdullin, S. E. Mazina, A. Yu. Nikulin,
V. Yu. Nikulin, and A. A. Gontcharov* 121
- Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. Lichen Ontogenesis in Plant Communities
of the Boreal Zone
R. V. Ignatenko, V. N. Tarasova, and E. F. Markovskaya 132
-

ONTOGENESIS AND EVOLUTION

- Daily Dynamics of Lipids and Fatty Acids and the Activity of Enzymes of the Energy
and Carbohydrate Metabolism in Young Fish of the Daubed Shanny
Leptoclinus maculatus (Fries, 1838) at Different Developmental
Stages during Polar Night
*S. A. Murzina, S. N. Pekkoeva, M. V. Churova, Z. A. Nefedova,
K. A. Filippova, S. Falk-Petersen, and N. N. Nemova* 143
-

- Instructions for Authors 154
-
-

УДК 58.036:577/.112/.152.1./19:582.542.11

ФИТОГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ ГАМЕТОФИТОВ ПАПОРОТНИКОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© 2020 г. Е. А. Романенко^{а, *}, Л. М. Бабенко^а, Е. В. Вашека^б,
П. А. Романенко^с, И. В. Косаковская^а

^аИнститут ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина

^бУчебно-научный центр “Институт биологии и медицины” Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, пр-т Академика Глушкова, 2, Киев, 03127, Украина

^сООО “Научно-производственное предприятие “5 Element””, ул. Михайловская, 37, Херсон, 73025, Украина

*e-mail: katerynaromanenko4@gmail.com

Поступила в редакцию 16.07.2019 г.

После доработки 24.11.2019 г.

Принята к публикации 30.11.2019 г.

Интерес к папоротникам как объектам биотехнологических исследований определяется особенностями их развития и репродукции, знание которых важно для понимания путей эволюции наземных растений. В обзоре проанализированы и обобщены данные литературы об участии фитогормонов в регуляции онтогенеза гаметофитов папоротников при культивировании *in vitro*. Рассмотрен вопрос о возможности размножения папоротников путем использования спор в качестве эксплантов методами *in vitro*. Проанализированы эффекты экзогенной обработки цитокининами, ауксинами, гиббереллинами, этиленом, жасмоновой кислотой и брассиностероидами на прорастание спор, морфологию и развитие гаметофита. Обсуждается роль гиббереллинов и антеридиогена в формировании полового диморфизма гаметофитов папоротников. Обобщены данные о нарушениях полового процесса у папоротников, участии фитогормонов в образовании апогамных спорофитов на талломах гаметофитов.

Ключевые слова: Polypodiopsida, споры, гаметофит, спорофит, культура *in vitro*, фитогормоны

DOI: 10.31857/S0475145020020068

ВВЕДЕНИЕ

Папоротники – сосудистые споровые растения – вместе с хвощами и псилоотовыми образуют класс Polypodiopsida (PPG I, 2016). По разным оценкам насчитывают от 9000 до 10600 видов (Smith et al., 2008; Christenhusz, Chase, 2014; PPG I, 2016), представленных наземными, эпифитными и водными формами. Характерной особенностью папоротников является чередование поколений, которое обеспечивает независимое развитие бесполого поколения – спорофита и полового поколения – гаметофита. Спорофиты, как правило, многолетние растения с различной продолжительностью жизни, тогда как рост и развитие гаметофитов протекает быстрее.

Гаметофит папоротников развивается из споры и является свободноживущим фотосинтезирующим организмом (Sharpe et al., 2010). Развитие таллома гаметофита начинается с прорастания споры и формирования проталлиальной нити, которая дифференцируется в лопатовидный проталлий, а затем в однослойный таллом, форма которого может изменяться (Арнаутова, 2008). На

талломе гаметофита формируются женские (археогонии) и мужские (антеридии) репродуктивные органы, образующие гаметы. После оплодотворения из зиготы на гаметофите развивается спорофит. В дальнейшем гаметофит отмирает, а спорофит переходит к самостоятельному существованию. Во время роста и развития спорофита образуются спорангии, содержащие спорогенную ткань, из которой, в результате мейоза, формируются споры (Banks, 1999; Арнаутова, 2008). Различают равноспоровые (гомоспоровые) и разноспоровые (гетероспоровые) папоротники. Равноспоровые папоротники продуцируют один тип спор, тогда как разноспоровые размножаются посредством мегаспор и микроспор, из которых образуются гаметофиты, производящие только женские или мужские гаметы (Johari, Singh, 2018). Подавляющее большинство современных папоротников являются равноспоровыми.

В онтогенезе гаметофитов равноспоровых папоротников выделяют четыре периода развития: первичный покой, виргинильный, дефинитивный, сенильный и восемь онтогенетических состояний:

спора, проросток, ювенильное, имматурное, виргинильное, дефинитивное, субсенильное и сенильное (Шорина, 1987; Барабанщикова, 2009). Тип развития таллома определяет в дальнейшем форму зрелого проталлия. В работе Н.М. Державиной (2017) обобщены данные касательно классификаций форм развития талломов гаметофитов. Автором отмечено, что существует масса исключений из рассмотренных в работе классификаций. Одной из причин вариабельности форм талломов может быть гормональная регуляция морфогенеза, которая контролируется не только собственным гормоном антеридиогеном, но и антеридиогенами других видов папоротников (Schneller, 2008).

Гаметофиты папоротников являются идеальными модельными объектами для наблюдения за процессами роста и развития (Hickok et al., 1987; Banks, 1999), их легко культивировать *in vitro* до состояния полной зрелости (Raghavan, 1989; Menéndez et al., 2010). Кроме того, они могут размножаться вегетативно с образованием клонов гаметофитов (Johari, Singh, 2018). Исследование гаметофитов в лабораторных условиях позволяет выявить особенности влияния различных экзогенных факторов на прорастание спор, рост и морфогенез таллома, половой диморфизм, образование зиготы и формирование зародыша спорофита. Изолированные в культуре *in vitro* гаметофиты успешно используются для изучения генетических и физиологических механизмов регуляции роста и развития, что способствует получению новых данных об эволюции наземных растений (Banks, 1999).

Процессы роста и развития гаметофита и спорофита папоротников, как и представителей других таксонов, контролируются многокомпонентной гормональной системой (Haufler et al., 2016). Определяющим в характере действия фитогормонов является их концентрация и локализация в отдельных органах и тканях растений (Davies, 2010). Благодаря гормональной регуляции и влиянию экзогенных факторов этапы реализации генетической программы растительного организма могут ускоряться либо замедляться (Bradford, Trewavas, 1994). Так, ауксины влияют на митотический цикл, переход клеток из состояния покоя к активной пролиферации, задействованы в эмбрио-, органо- и морфогенезе, развитии корневой системы, формировании цветков, семян, плодов (Del Pozo et al., 2005; Ludwig-Muller, 2011). Гиббереллины (ГК) координируют процессы деления и растяжения клеток, индуцируют цветение, регулируют пол, активируют завязывание и развитие плодов, а также прорастание семян, клубней и луковиц (Peng, Harberd, 2002; Chandler, 2011; Davière, Achard, 2013). В формировании антеридиев на поверхности гаметофита задействованы антеридиогены (АГ) – специфические ГК-подобные гормоны (Atallah, Banks, 2015). образо-

вание мужского гаметофита происходит при высокой концентрации эндогенного АГ, в случае же его отсутствия формируется женский гаметофит. Низкая концентрация АГ обуславливает развитие двуполого заростка (Haufler et al., 2016). АГ может проникать в почву на глубину от одного до пятнадцати сантиметров (Schneller, 1988). Выделенный в почву на стадии развития проталлия АГ активирует прорастание других спор (Chiou, Farrar, 1997), а также индуцирует развитие антеридиев на более поздних стадиях развития гаметофита (Tanaka et al., 2014). АГ играет важную роль в видообразовании и эволюции папоротников, поскольку он способствует перекрестному межгаметофитному оплодотворению и формированию генетической гетерозиготности (Chiou, Farrar, 1997; Korpelainen, 1998; Tanaka et al., 2014).

Цитокинины (ЦК) стимулируют процессы деления и роста клеток, образование побегов из каллусов в культуре *in vitro*, активируют биогенез и дифференциацию хлоропластов, ингибируют рост апикальной меристемы корня, тормозят процесс старения листьев, регулируют покой и прорастание семян (Романов, 2009). ЦК также влияют на устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям окружающей среды (Ha et al., 2012). Абсцизовая кислота (АБК), этилен, вместе с жасмоновой кислотой (ЖК) и брассиностероидами (БС) относятся к фитогормонам, которые задействованы в реакциях растений на абиотические и биотические стрессы (Bartoli et al., 2013; Vabenko et al., 2015). АБК, помимо регуляции защитных механизмов (Vishwakarma et al., 2017), управляет процессами покоя, прорастания семян, вегетативного роста (Finkelstein et al., 2008). Прорастание семян, развитие, созревание плодов и старение растений находится под контролем этилена (Pierik et al., 2006). ЖК регулирует процессы созревания семян и плодов, рост корней, способствует выходу из состояния покоя, индуцирует защитные реакции (Hyun, Lee, 2008; Vabenko et al., 2015). БС – растительные фитостероиды (Aroga et al., 2008) – влияют на процессы роста, формирования сосудистой системы, репродукцию, развитие цветков и плодов (Khrirach et al., 2000). Контролируя ингибиторные эффекты АБК, брассиностероиды положительно влияют на прорастание семян (Hu, Yu, 2014).

Споры и гаметофиты папоротников активно используют при проведении физиологических (Ballesteros et al., 2012; Zhang et al., 2016), генетических (Rutherford et al., 2004; Plackett et al., 2015), цитологических (Rodríguez-Romero et al., 2018), биохимических (Nekrasov et al., 2019) и экотоксикологических исследований (García-Cortés et al., 2018). Это обусловлено продуцированием папоротниками больших количеств спор, простотой их сбора и хранения, достаточно несложными методами проращивания и последующего культи-

вированием гаметофитов. Изучение влияния экзогенных фитогормонов на рост и развитие гаметофитов открывает возможности для поиска путей управления этими процессами. Целью нашего обзора был анализ и обобщение результатов научных исследований, посвященных изучению влияния экзогенных фитогормонов на прорастание спор, регуляцию морфогенеза, реализацию полового диморфизма гаметофитов, оптимизацию развития спорофитов на поверхности талломов гаметофитов.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА ПРОРАСТАНИЕ СПОР

На прорастание спор папоротников влияют различные внешние факторы. Среди них: освещение, температура, элементы питания (Du et al., 2009; Wu et al., 2010; Ballesteros et al., 2012; Juárez-Orozco et al., 2013; Suo et al., 2015), гравитация (Edwards, Roux, 1998), тяжелые металлы и пестициды (Drăghiceanu, Soare, 2016; Soare et al., 2019), почвенные микроорганизмы (Ganger et al., 2019). В условиях *in vitro* споры, как правило, проращивают без добавления регуляторов роста, что косвенно указывает на достаточное количество эндогенных гормонов для запуска и регуляции процесса (Pinto et al., 2013). Тем не менее, экзогенная обработка, в зависимости от концентрации гормонов, способна ускорять либо замедлять прорастание спор (рис. 1). Положительное влияние на прорастание спор оказывают гиббереллины. Так, пятиминутная обработка спор *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching 20 мг/л гибберелловой кислотой (ГК₃), а также внесение 10 мг/л гормона в питательную среду улучшало прорастание (Guo et al., 2007; Zhang, Yang, 2011). ГК₃ в концентрации 0.15×10^{-7} г/л ускоряла прорастание спор *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Zhang, Niu, 1999). Значительно более высокие концентрации гормона (0.5, 5 и 50 μM) активировали прорастание спор *Blechnum spicant* L. (Fernandez et al., 1997). Нами было показано, что высокие концентрации ГК₃ (10^{-5} и 10^{-6} М) существенно тормозили прорастание спор *Polystichum aculeatum* (L.) Roth., тогда как более низкие концентрации (10^{-7} и 10^{-8} М) ускоряли этот процесс (Babenko et al., 2018). В то же время известно, что споры некоторых видов папоротников нечувствительны к гиббереллинам. В частности, ГК₃ не влияла на прорастание спор *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* (Desvaux) L. Underwood ex A. Heller (Zhai et al., 2007) и *Sphenomeris chinensis* (L.) Maxon (Ren et al., 2008). Показано, что ГК₃ улучшала прорастание спор *Pteridium aquilinum*, *Polystichum munitum* (Kaulf.) Presl. и *Polypodium feei* (Bory) Mett. в темноте (Weinberg, Voeller, 1969). Гиббереллины ГК₃, ГК₄, ГК₇ и ГК₁₃ индуцировали прорастание спор *Anemia mexicana* Klotzsch и *Anemia phyllitidis* (L.) Sw. в темноте, причем более чув-

ствительными оказались споры *A. phyllitidis* (Nester, Coolbaugh, 1986). Наибольший эффект проявляли ГК₄ и ГК₇, тогда как ГК₁₃ была менее эффективной (Nester, Coolbaugh, 1986). Положительное влияние ГК₃, ГК₄, ГК₉ на прорастание спор в темноте показано также для *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. (Sugai et al., 1987). Гиббереллины не влияли на прорастание спор *Schizaea pusilla* Pursh в темноте (Guiragossian, Koning, 1986), однако при использовании красного света стимулировали процесс, причем эффект ГК₃ оказался более выраженным, чем ГК₄₊₇. Особенности влияния ГК₃ на прорастание спор *L. japonicum* в темноте и при освещении позволили авторам исследования (Kagawa, Sugai, 1991) предположить, что красный свет активирует биосинтез гиббереллинов, что приводит к улучшению прорастания спор.

Споры *Campyloneurum angustifolium* (Sw.) Fée, *C. phyllitidis* (L.) C. Presl., *Lepisorus thunbergianus* (Kaulfuss) Ching, *Microgramma heterophylla* (L.) Wherry, *Phymatosorus scolopendria* (Burm. f.) Pic. Serm. и *Polypodium pellucidum* Kaulf. прорастали в присутствии собственного антеридиогена, который также индуцировал развитие антеридиев на проталлии (Chiou, Farrar, 1997). Напротив, споры *Phlebodium aureum* (L.) J. Sm. на собственный АГ не реагировали, а прорастали в присутствии антеридиогена вида *Pteridium aquilinum* (АГ_{pt}), при этом АГ_{pt} не проявлял видовой специфичности и положительно влиял на прорастание спор и развитие антеридиев всех перечисленных выше видов папоротников. С другой стороны, антеридиоген *Ph. aureum* стимулировал прорастание спор *Onoclea sensibilis* L. (Chiou, Farrar, 1997).

Исследования эффектов цитокининов и ауксинов на прорастание спор папоротников немногочисленны. Синтетический ауксин 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) не влиял на прорастание спор *Pteris longifolia* L. (Strickler, 1946) и *Alsophila odonelliana* (Alston) Lehnert (Bonomo, 2013). Нами было установлено, что экзогенная обработка 6-бензиламиномурином (БАП) в концентрации 10^{-5} М существенно тормозила прорастание спор *Polystichum aculeatum*, а при концентрации гормона 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М стимулирующий эффект отсутствовал (Babenko et al., 2018). В другом исследовании (Bonomo et al., 2013) сообщалось, что влияние БАП в концентрациях 0.01, 0.1, 1.0 мг/л на прорастание спор *Alsophila odonelliana* было слабо выражено. Добавление в среду БАП и ГК₃ ускоряло прорастания спор *Pteris inermis* (Rosenst.) Sota, тогда как отдельно БАП на прорастание спор существенно не влиял (Tanco et al., 2009). Нами (Romanenko et al., 2019) было показано, что экзогенные ЦК кинетин, БАП, N⁶-2-изопентениладенин (ИПА) ингибировали прорастание спор *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, при этом эффект был прямо пропорционален concentra-

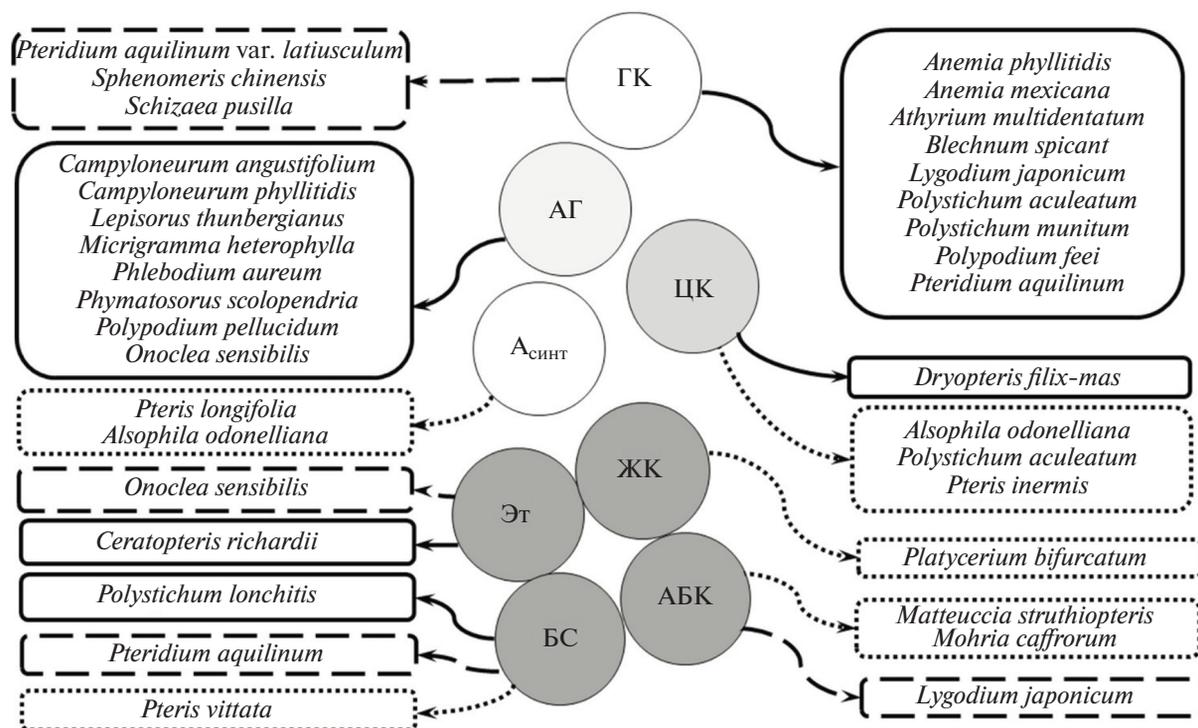


Рис. 1. Фитогормональная регуляция прорастания спор. Обозначения: сплошная линия – положительное действие; линейный пунктир – негативное, точечный пунктир – нейтральное; ГК – гиббереллины, АГ – антеридиоген, ЦК – цитокинины, А_{синт} – ауксины синтетические; ЭТ – этилен, ЖК – жасмоновая кислота, АБК – абсцисовая кислота, БС – брассиностероиды (приведенные сведения адаптированы из Suo et al., 2015 и дополнены).

ции гормона. Оказалось, что наибольший ингибирующий эффект проявлял ИПА. Положительно влиял на прорастание спор зеатин, концентрация гормона 10^{-7} М была самой эффективной (Romanenko et al., 2019).

В работах других авторов (Jarvis, Wklkins, 1973; Chia, Raghavan, 1982) сообщалось, что экзогенная АБК в концентрации 10 мг/л не влияла на прорастание спор *Mohria caffrorum* Sw. и *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. В то же время было показано, что АБК в концентрации 5 мг/л полностью блокировала прорастание спор *Lygodium japonicum* (Swami, Raghavan, 1980).

Этилен в темноте ингибировал прорастание спор *Onoclea sensibilis*, однако при нормальном освещении до 50% спор прорастало (Edwards, Miller, 1972; Fisher, Miller, 1975). Фотоиндуцированное прорастание спор *O. sensibilis* регулировалось на уровне антагонистического взаимодействия между CO_2 и этиленом. Если этилен полностью угнетал прорастание спор в темноте, то в дальнейшем такое ингибирование частично устранялось при освещении и обработке CO_2 (Edwards 1977). Обработка спор этиленпродуктом 2-хлорэтилфосфорной кислоты ускоряла всхожесть свежесобранных и незрелых спор *Ceratopteris richardii* Brongn., однако ингибировала прорастание зрелых

и длительно хранившихся спор (Warne, Nicko, 1987). Полученные результаты позволили авторам предположить, что 2-хлорэтилфосфорная кислота ускоряет процессы созревания незрелых спор и старения зрелых, а объясняется это высвобождением этилена при гидролизе 2-хлорэтилфосфорной кислоты и последующей активацией гормоном вышеупомянутых процессов (Warne, Nickok, 1987).

ЖК не влияла на прорастание спор *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr., однако, активировала раннее развитие и рост ризоидов (Camloh et al., 1996). Следует отметить, что подобные эффекты ЖК и АБК наблюдались при прорастании семян высушенных растений (Wasternack, 2007).

Брассиностероиды улучшали прорастание спор *Polystichum lonchitis* (L.) Roth. Гормон в концентрации 10^{-7} М был наиболее эффективным. В то же время БС угнетали прорастание *Pteridium aquilinum* и не влияли на споры *Pteris vittata* L. (Gómez-Garay et al., 2018). По мнению авторов исследования (Gómez-Garay et al., 2018), влияние БС связано с образованием антеридиогена. Споры *P. aquilinum* и *P. vittata* были достаточно чувствительны к АГ (Gómez-Garay et al., 2018), тогда как в спорах *P. lonchitis* количество синтезируемого гормона оказалось низким (Pangua et al. 2003). Недавние исследования

показали, что экзогенные БС подавляют биосинтез эндогенных БС, а также активируют гены, отвечающие за активность ГК₃-оксидазы, энзима участвующего, в инактивации гиббереллинов (Tong et al., 2014).

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ ГАМЕТОФИОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Гаметофитам папоротников свойственен талломный тип морфологической организации (Арнаутова, 2008). Особенности развития гаметофитов в культуре *in vitro* проанализированы в работах (Шелихан, Некрасов, 2018; Rivera et al., 2018). В табл. 1 мы представили имеющиеся в научной литературе данные о влиянии экзогенных фитогормонов на морфогенез гаметофитов папоротников.

Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) способствовала удлинению протонемы *Onoclea sensibilis* в культуре *in vitro* в темноте (Miller, 1961). Низкие концентрации гормона вызывали увеличение числа клеток и значительное вытягивание протонемы, тогда как при высокой концентрации ИУК протонемы состояли из меньшего количества клеток и приобретали компактную форму (Miller, 1961). В высокой концентрации ИУК угнетала деление клеток в протонемах *Peridium aquilinum* (Sobota, Partanen, 1967). В то же время ауксин не влиял на развитие гаметофита *Anemia tomentosa* (Savigny) Swartz var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel (Castilho et al., 2018). ИУК, индолил-3-ацетонитрил (ИАН) и синтетический ауксин 2,4-Д также активировали деление клеток и индуцировали развитие нитчатых талломов у *Lygodium japonicum* (Swami, Raghavan, 1980), однако, в комбинации с АБК это влияние нивелировалось, вследствие чего развивались менее длинные, расширенные талломы. ИУК контролировала образование ризоидов у *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv. (Kwa, 1995). Синтетические ауксины нафтилуксусная (НУК) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (2,4,5-Т) кислоты подавляли активацию боковой меристемы у *Ceratopteris richardii*, в результате чего изменялась форма таллома (Gregoric, Fisher, 2006). НУК способствовала развитию краевых ризоидов у *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn., тогда как в контроле они формировались в базальной части таллома (Hickok, Kiriluk, 1984). Обработка 2,4-Д увеличивала размеры клеток проталлия *C. thalictroides*, а также инициировала развитие удлинённых талломов. Высокие концентрации эти двух синтетических ауксинов оказывали летальное действие на развитие гаметофитов *C. thalictroides*: после прорастания споры дальнейший рост протонемы прекращался. ИУК и индолил-3-масляная кислота (ИМК) не оказывали существенного влияния на форму талломов и рост ризоидов *C. thalictroides* (Hickok, Kiriluk, 1984). Применение как низких, так и высоких концентраций

ИМК у *Blechnum spicant* отрицательно сказывалось на росте гаметофитов на всех этапах онтогенеза, способствовало появлению большого количества заростков без развитой меристемы (Fernandez et al., 1997). При низкой концентрации 2,4-Д образовывались сильно вытянутые проталлии у *Alsophila odonelliana*, а с увеличением концентрации ауксина рост гаметофитов замедлялся, талломы были вытянутой формы со слабо выраженной выемкой (Wopomo et al., 2013).

ГК₃ в высокой концентрации подавляла рост проталлия *Lygodium japonicum*, тогда как в низкой — не влияла на его развитие (Takeno, Furuya, 1977), или способствовала растяжению клеток (Swami, Raghavan, 1980). У *Blechnum spicant* добавление в среду ГК₃ в концентрациях 0.5, 5 и 50 μM существенно ингибировало рост гаметофитов на всех этапах онтогенеза и препятствовало развитию спорофитов (Fernandez et al., 1997). ГК₃ влияла на клеточное деление в проталлиях *Anemia phyllitidis*, что приводило к уменьшению скорости деления клеток и образованию талломов меньших размеров, а рост проталлия осуществлялся за счет растяжения отдельных клеток (Kaźmierczak, 1998, 2003). Подобные эффекты отмечены и для *Osmundastrum cinnamomeum* (L.) C. Presl, у которого гормон в низкой концентрации значительно увеличивал размеры проталлия, тогда как при увеличении концентрации размер таллома был меньше контроля (Hollingsworth et al., 2012). Наши исследования (Babenko et al., 2018) показали, что высокие концентрации ГК₃ угнетали формирование меристемы и способствовали появлению небольших вытянутых талломов без характерной сердцевидной формы у *Polystichum aculeatum*. С увеличением концентрации ГК₃ наблюдались аномалии в развитии меристемы, сердцевидная форма таллома присутствовала, однако имела неровный край и деформированную выемку (Babenko et al., 2018).

Цитокинины БАП, ИПА и кинетин индуцировали морфогенез у гаметофитов *Ceratopteris richardii*, выращенных в темноте, влияли на скорость роста, деление и дифференциацию клеток (Spiro et al., 2004). Обработка этими ЦК в концентрации 10^{-12} М способствовала уменьшению длины клеток, ускоряла их деление в апикальной зоне проталлия, индуцировала образование ризоидов. С повышением концентрации гормонов активировалось формирование меристемы и апикальной выемки, при этом наиболее активным был БАП (Spiro et al., 2004). После обработки БАП высокой концентрации размер проталлия выращенных на свету гаметофитов *C. richardii* значительно уменьшался. Снижение концентрации гормона существенных изменений в развитии гаметофита не вызывало (Spiro et al., 2004).

Таблица 1. Влияние экзогенных фитогормонов на морфогенез гаметофитов в культуре *in vitro*

Вид	Фитогормон	Концентрация фитогормона	Эффект фитогормона	Источник
АУКСИНЫ				
<i>Onoclea sensibilis</i>	ИУК	10^{-5} М	Укороченные протонемы, уменьшение количества клеток в проталлии	Miller, 1961
		10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М	Вытягивание протонемы, активация деления клеток	
<i>Pteridium aquilinum</i>	ИУК	10^{-5} М	Ингибирование клеточного деления, компактная форма проталлия	Sobota, Partanen, 1967
<i>Lygodium japonicum</i>	ИУК	2 мг/л	Нитчатая форма таллома, активация клеточного деления	Swami, Raghavan, 1980
	2,4-Д	0.01–5.0 мг/л		
	ИАН	5 мг/л		
<i>Ceratopteris thalictroides</i>	2,4-Д	10^{-4} М	Летальное действие	Hickok, Kiriluk, 1984
		10^{-5} , 10^{-6} М	Увеличение размеров клеток, образование удлиненных талломов	
	НУК	10^{-4} М	Летальное действие	
		10^{-6} , 10^{-7} М	Развитие краевых ризоидов	
	ИУК, ИАН	10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} М	Нейтральное действие	
<i>Platyserium coronarium</i>	ИУК	80–100 μ М	Активация роста ризоидов	Kwa, 1995
<i>Blechnum spicant</i>	ИМК	5, 50 μ М	Ингибирование формирования меристемы	Fernandez et al., 1997
<i>Ceratopteris richardii</i>	НУК	10^{-5} М	Ингибирование активности боковой меристемы, формирование талломов округлой формы небольшого размера	Gregoric, Fisher, 2006
	2,4,5-Т	10^{-4} М		
<i>Alsophila odonelliana</i>	2,4-Д	0.1 мг/л	Образование удлиненных нитевидных проталлиев с разветвлениями	Bonomo et al., 2013
		2 мг/л	Образование укороченных нитевидных проталлиев	
<i>Anemia tomentosa</i>	ИУК	2.8; 5.4; 11.4 μ М	Нейтральное действие	Castilho et al., 2018
ГИББЕРЕЛЛИНЫ				
<i>Lygodium japonicum</i>	ГК ₃	10^{-4} , 10^{-5} М	Торможение роста проталлия	Takeno, Furuya, 1977
		10^{-6} , 10^{-7} М	Растяжение клеток проталлия	Swami, Raghavan, 1980
<i>Blechnum spicant</i>	ГК ₃	0.5, 5 и 50 μ М	Ингибирование роста гаметофитов	Fernandez et al., 1997
<i>Anemia phyllitidis</i>	ГК ₃	10^{-5} М, 30 μ М	Растяжение клеток, снижение клеточного деления в вегетативных клетках, образование талломов небольшого размера	Kaźmierczak, 1998; Kaźmierczak, 2003

Таблица 1. Продолжение

Вид	Фитогормон	Концентрация фитогормона	Эффект фитогормона	Источник
<i>Osmundastrum cinnatomeum</i>	ГК ₃	10 ⁻⁴ М	Увеличение размеров проталлия	Hollingsworth et al., 2012
		10 ⁻³ М	Образование талломов небольшого размера	
<i>Polystichum aculeatum</i>	ГК ₃	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ М	Образование талломов небольшого размера вытянутой формы	Babenko et al., 2018
		10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸ М	Образование несимметричных сердцевидных талломов с деформированной выемкой	
ЦИТОКИНИНЫ				
<i>Ceratopteris richardii</i> (без освещения)	БАП, ИПА, кинетин	10 ⁻⁹ , 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁷ М	Активация образования меристемы и выемки, индукция фотоморфогенеза	Spiro et al., 2004
		10 ⁻¹² М	Снижение растяжения клеток, индукция фотоморфогенеза, активация клеточного деления и образования ризоидов	
<i>Ceratopteris richardii</i> (с освещением)	БАП	10 ⁻⁷ М	Уменьшение размеров проталлия	
		10 ⁻⁹ М	Нейтральное действие	
<i>Blechnum spicant</i>	БАП	0.5; 5; 50 μМ	Ингибирование формирования меристемы	Fernandez et al., 1997
		4.44 μМ	Деформация таллома, отсутствие сердцевидной формы	Menéndez et al., 2009
<i>Osmunda regalis</i>	Кинетин	0, 1 нМ	Увеличение размеров таллома, стимулирование развития апикальной меристемы	Greer et al., 2012
		10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ М	Уменьшение размеров таллома, деформация выемки	
<i>Alsophila odonelliana</i>	БАП	0.01, 0.1, 1 мг/л	Образование нитчатых и разветвленных проталлиев	Bonomo et al., 2013
<i>Polystichum aculeatum</i>	БАП	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ М	Блокирование развития нормальной протонемы, появление нескольких инициальных клеток	Babenko et al., 2018
		10 ⁻⁸ М	Образование проталлиев с разветвлениями и неровным краем	
<i>Dryopteris filix-mas</i>	ИПА	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ М	Блокирование развития нормальной протонемы, уменьшение размеров проталлия, ингибирование развития ризоидов	Romanenko et al., 2019
	ИПА	10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸ М	Образование вытянутых талломов	
	БАП, кинетин, зеатин	10 ⁻⁵ М	Активация развития ризоидов, образование талломов с деформациями	
	БАП, кинетин, зеатин	10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸ М	Активация клеточного деления, увеличение размеров таллома	

Таблица 1. Окончание

Вид	Фитогормон	Концентрация фитогормона	Эффект фитогормона	Источник
<i>Lygodium japonicum</i>	Абсцизовая кислота	0.5, 1 мг/л	Ингибирование клеточного деления, формирование укороченных проталлиев	Swami, Raghavan, 1980
<i>Ceratopteris richardii</i>		10 ⁻⁴ М	Ингибирование роста ризоидов, активности меристемы	Hickok, 1983
		10 ⁻⁶ М	Активирование роста ризоидов, развитие талломов меньшего размера	
<i>Onoclea sensibilis</i>	Этилен	0.01–1000 ppm	Ингибирование клеточного деления, растяжение клеток, удлинение нити протонемы, торможение роста ризоидов	Miller et al., 1970
<i>Anemia tomentosa</i>	Жасмоновая кислота	0.01; 1; 10 µМ	Активный рост таллома и развитие спорофитов на его поверхности	Castilho et al., 2018
<i>Platyserium bifurcalum</i>		0.01, 1 µМ	Активация деления клеток, переход от нитчатой к лопатовидной форме, увеличение количества и длины ризоидов	Camloh et al., 1996
		10, 100 µМ	Ингибирование всех ростовых процессов	

Примечание. 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; 2,4,5-Т – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – 6-бензиламиноурин; ГК₃ – гибберелловая кислота; ИМК – индоллил-3-масляная кислота; ИПА – N⁶-2-изопентениладенин; ИУК – индоллил-3-уксусная кислота; НУК – нафтилуксусная кислота.

Добавление микромолярных концентраций БАП в среду выращивания *Blechnum spicant* вызывало задержку развития проталлия (Menéndez et al., 2009), подавление формирования меристемы, ингибировало развитие спорофитов (Fernandez et al., 1997). Внесение кинетина в культуральную среду гаметофитов *Osmunda regalis* L. показало, что с увеличением концентрации гормона размер сердцевидного таллома уменьшился, деформировалась выемка между лопастями, ингибировалось развитие апикальной меристемы (Greer et al., 2012). При выращивании гаметофита *Alsophila odonelliana* в культуре *in vitro* добавление БАП различной концентрации инициировало образование вытянутых нитчатых или разветвленных проталлиев и многочисленных пролифераций таллома (Bonomo et al., 2013). Наши исследования (Vabenko et al., 2018) показали, что БАП блокировал развитие протонемы *Polystichum aculeatum* в культуре *in vitro*, а степень влияния гормона зависела от его концентрации в питательной среде. Так, в высоких концентрациях БАП вызывал появление укороченных протонем с одиночными боковыми ветвлениями. По мере снижения концентрации в среде, происходило образование лопатовидного проталлия, часто с разветвлениями и неровными краями (Vabenko et al.,

2018). Последующие наши эксперименты (Romanenko et al., 2019) показали, что высокие концентрации ИПА, БАП, кинетина и зеатина тормозили развитие протонемы *Dryopteris filix-mas*, инициировали образование сердцевидных талломов деформированной формы. Низкие концентрации этих гормонов активировали клеточное деление, в результате чего количество клеток в проталлиях увеличивалось. Однако под влиянием низкой концентрации ИПА, БАП, кинетина и зеатина продолжали развиваться аномальные сердцевидные талломы. В то же время эти ЦК активировали рост и развитие ризоидов у *D. filix-mas*. Эффект возрастал с повышением концентрации гормонов в питательной среде. Действие ИПА было самым выраженным. Гормон в наивысшей концентрации блокировал развитие протонемы, а в наиболее низкой – сердцевидного таллома. Зеатин в малых концентрациях стимулировал развитие гаметофита, минимизировал появление деформаций таллома, активировал рост и развитие многочисленных ризоидов (Romanenko et al., 2019).

Абсцизовая кислота подавляла деление и удлинение клеток гаметофитов *Lygodium japonicum*, выращенных в режиме красного и синего света, в следствии чего формировались укороченные плос-

кие проталлии (Swami, Raghavan, 1980). При совместном применении АБК и 2,4-Д, в отличие от раздельного действия гормонов, образовывались вытянутые талломы, состоящие из большего количества клеток (Swami, Raghavan, 1980). Ингибирующее действие высокой концентрации АБК на рост меристемы проталлия и ризоидов показано для *Ceratopteris richardii*. В низкой концентрации гормон стимулировал рост ризоидов и индуцировал развитие талломов меньшего размера (Hickok, 1983).

На этапе развития протонемы *Onoclea sensibilis* этилен ингибировал деление клеток, индуцировал их растяжение и удлинение проталлиальной нити, замедлял рост ризоидов (Miller et al., 1970). Гормон ускорял реорганизацию ядерного хроматина и индуцировал синтез ДНК в ядре антеридиальной части клеток мужского гаметофита (Kaźmierczak, 2010).

Жасмоновая кислота активировала клеточные процессы на ранних фазах онтогенеза гаметофита *Platycerium bifurcalum* (Cav.) C. Chr. (Samloh et al., 1996). В низких концентрациях ЖК стимулировала деление клеток и раннее развитие протонемы, ускоряла переход гаметофита от нитчатой к лопатковидной форме, способствовала удлинению и увеличению количества ризоидов (Samloh et al., 1996). Противоположный эффект наблюдали при применении гормона в высоких концентрациях. Авторы исследования (Castilho et al., 2018) объясняют ростстимулирующее действие ЖК активацией синтеза мРНК, вызванное гормоном. Экзогенная ЖК способствовала активному росту гаметофитов и дальнейшему развитию спорофита на поверхности таллома у *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* (Castilho et al., 2018).

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ И АПОГАМИЮ ГАМЕТОФИТОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Половому поколению многих видов папоротников свойственен половой диморфизм, при котором формируются мужские, женские и двуполые (бисексуальные/гермафродитные) фенотипы (Banks, 1999). Индуктором полового фенотипа у равноспоровых папоротников является антеридиоген, секретлируемый гаметофитом первоначально на стадии проталлия (Tanaka et al., 2014). Наиболее активно гормон синтезируется на стадии сердцевидного таллома (Atallah, Banks, 2015). После выделения АГ во внешнюю среду происходит индукция развития мужских гаметангиев в соседних бесполом гаметофитах (Strain et al., 2001).

Исследования (Fernandez et al., 1997; Kaźmierczak, 1998, 2003; Menéndez et al., 2006a) показали, что экзогенные гиббереллины наиболее активно инициируют образование антеридиев у гаметофитов

многих видов папоротников. Установлено, что на ранних этапах онтогенеза гаметофита ГК индуцируют активное образование мужских талломов небольшого размера. Наиболее активными ГК, стимулирующими раннее образование антеридиев на проталлиях *Anemia phyllitidis*, оказались ГК₅ и ГК₈, наименее – ГК₇, ГК₄, ГК₁, тогда как и ГК₉ заняли промежуточное положение (Schraudolf, 1964). Позднее (Kaźmierczak, 1998, 2003) было установлено, что ГК₃ ингибирует митотическую активность вегетативных клеток проталлия *A. phyllitidis*, при этом активируя ее в клетках, отвечающих за антеридиогенез. Такие клетки под действием ГК₃ становились шире апикальных, отличались поперечным ростом, тогда как в апикальной зоне проталлия клетки росли как в поперечном, так и продольном направлении.

Различные формы ГК по-разному влияли на формирование гаметангиев на различных этапах морфогенеза *L. japonicum* (Takeno, Furuya, 1975, 1977). Наиболее активными стимуляторами образования антеридиев на протонеме оказались ГК₇, ГК₄, ГК₉ и ГК₃, наименее – ГК₈ (Takeno, Furuya, 1975). ГК₃ в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} М полностью подавляли развитие архегониев на этапе сердцевидного таллома. При уменьшении концентрации гормона угнетение образования женских гаметангиев нивелировалось (Takeno, Furuya, 1977). Сообщалось, ГК₄ и ГК₉ в концентрации 10^{-9} М подавляли развитие женских половых органов на сердцевидном талломе, тогда как ГК₁, ГК₅ и ГК₈ не тормозили их развитие (Takeno, Furuya, 1977).

ГК₃ в концентрации 50 мкМ ингибировала формирование антеридиев у *Blechnum spicant* (Fernandez et al., 1997), тогда как в более низких концентрациях (0.28 и 2.8 мкМ) не влияла на их развитие (Menéndez et al., 2006a). ГК₄₊₇ в концентрации 1 мг/л инициировала развитие женских гаметофитов, снижение же концентрации гормона до 0.1 мг/л способствовало значительному увеличению доли мужских гаметофитов (Menéndez et al., 2006a). Показано (Hollingsworth et al., 2012), что ГК₃ во концентрации 10^{-3} и 10^{-4} М тормозила развитие антеридиев *Osmundastrum cinnamomeum*, что, по мнению авторов, связано с ингибированием формирования апикальной меристемы.

Влияние других фитогормонов на регуляцию и реализацию полового диморфизма гаметофитов папоротников исследовано частично. Синтетические ауксины НУК и 2,4-Д в концентрации 10^{-6} и 10^{-5} М ингибировали развитие антеридиев и образование мужских талломов, однако способствовали развитию архегониев и женских гаметофитов у *Ceratopteris thalictroides* (Hickok, Kiriluk, 1984). Действие ИУК в таких же концентрациях на развитие мужских гаметангиев было менее выраженным, однако в концентрации 10^{-4} М

гормон существенно ограничивал их образование и способствовал развитию мужских талломов. ИМК в концентрации 10^{-4} – 10^{-7} М стимулировала развитие мужских талломов с небольшим количеством антеридиев (Hickok, Kiriluk, 1984), однако, в концентрации 5 и 50 μ М ингибировала действие собственного антеридиогена у *Blechnum spicant* (Fernandez et al., 1997), в результате чего мужские гаметаангии не развивались.

Экзогенные цитокинины по-разному влияли на образование гаметаангиев. БАП как в низкой (0.3; 3 μ М), так и в высокой (30 μ М) концентрациях ингибировал формирование антеридиев у *Blechnum spicant* (Fernandez et al., 1997). Кинетин в концентрации 10^{-3} и 10^{-6} М способствовал развитию бесполов и мужских талломов и уменьшал долю женских талломов в популяции гаметофитов *Osmunda regalis* (Greer et al., 2012). В более низкой концентрации (10^{-10} М) кинетин стимулировал развитие архегониев и большего количества женских талломов в популяции *O. regalis* (Greer et al., 2012). Наши исследования (Romanenko et al., 2019) показали, что зеатин и кинетин в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} М активировали раннее развитие архегониев у *Dryopteris filix-mas*, тогда как ИПА и БАП в тех же концентрациях оказались стимуляторами развития антеридиев.

АБК является антагонистом антеридиогена (Banks, 1999). В концентрации 10^{-4} М гормон полностью блокировал образование антеридиев у *Ceratopteris richardii*, даже в присутствии собственного антеридиогена АГ_{се} (Hickok, 1983). АБК в концентрации 10^{-6} и 10^{-7} М частично подавляла развитие мужских гаметаангиев *C. richardii*, и не блокировала развитие меристемы и последующее формирование архегониев (Hickok, 1983). В то же время экзогенная АБК в концентрации 0.035, 0.35 и 3.5 μ М не ингибировала развитие антеридиев у *Blechnum spicant* (Menéndez et al., 2006a).

Для некоторых видов папоротников характерно нарушение полового процесса. Апогамия — частый случай апомиксиса у папоротников, характеризуется образованием спорофита из соматических клеток гаметофита (Liu et al., 2012). У папоротников различают облигатную и факультативную апогамию (Sheffield, Bell, 1987; Raghavan, 1989). Облигатная апогамия характерна для видов, спорофиты которых развиваются без слияния половых клеток. Сообщалось, что для 10% известных на сегодня видов папоротников свойственен такой способ развития спорофита, способных к спорогенезу (Liu et al., 2012). Однако факторы, препятствующие половой функции гаметофитов, остаются мало исследованными. На гаметофитах классических апогамных видов часто развиваются антеридии, сперматозоиды которых могут оплодотворять яйцеклетки других родственных видов. Формирующиеся в таких

случаях архегонии не функционируют, что объясняется их “недоразвитием” или “некрозом” яйцеклеток (Gastony, Haufler, 1976). Спорофиты апогамных папоротников образуются, как правило, из соматических клеток, расположенных за апикальной меристемой в области развития архегониев, или в других местах гаметофита (Sheffield, Bell, 1987). Факультативная апогамия чаще всего возникает при изменении условий культивирования *in vitro* (Cordle et al., 2007), в частности, при дефиците воды (Whittier, 1975), повышении уровня освещенности (Sheffield, Bell, 1987), высоких концентрациях углеводов (Whittier, Steeves, 1960; Whittier, Steeves, 1962; Cordle et al., 2007). Применение экзогенных фитогормонов может активировать случайное развитие апогамных спорофитов на талломах гаметофитов (Whittier 1966; Kwa, 1995; Menéndez et al., 2006b).

ИУК индуцировала апогамное развитие спорофита на стерильных гаметофитах *Platyserium coronarium*. Максимальный стимулирующий эффект наблюдался при концентрации гормона 40 μ М (Kwa, 1995). Эндогенный этилен при добавлении ИУК угнетал апогамное развитие спорофитов на гаметофитах *P. coronarium*, что могло быть обусловлено ухудшением транспорта ИУК в клетках гаметофита (Kwa, 1995). Ранее сообщалось (Elmore, Whittier, 1973), что этилен активировал развитие апогамных заростков на гаметофитах *Pteridium aquilinum*. Увеличение концентрации гормона снижало эффективность его действия (Elmore, Whittier, 1973). Формирование апогамных спорофитов на гаметофитах *P. aquilinum* инициировали экзогенные НУК и ГК₃ в концентрации 2 и 15 мг/л (Whittier, 1966). Гормоны НУК и ГК₃ в концентрации 0.53, 5.37 и 2.8 μ М стимулировали развитие соматических спорофитов *Dryopteris affinis*, для которых характерна облигатная апогамия. Добавление БАП в низких и высоких концентрациях (0.44, 4.44, 22 μ М) полностью угнетало формирование спорофита и активировало каллусогенез (Menéndez et al., 2006b).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами анализ и обобщение литературных данных свидетельствует о значительном экспериментальном материале, посвященном изучению гормональной регуляции роста и развития гаметофитов папоротников в условиях *in vitro*. Влияние экзогенных фитогормонов на прорастание спор, морфогенез, половой диморфизм, возникновение апомиксиса в ходе онтогенеза гаметофитов исследовано более чем у тридцати видов. Гаметофиты *Ceratopteris richardii*, *Blechnum spicant*, *Lygodium japonicum*, *Osmunda regalis*, *Pteridium aquilinum*, *Anemia phyllitidis* в большинстве случаев привлекались для анализа. Экзогенные фи-

тогормоны по-разному действуют на прорастание спор и развитие гаметофитов. Направленность и интенсивность оказываемого эффекта определяются концентрацией гормона и зависят от вида папоротника. Фитогормоны гаметофитов папоротников, также как гормоны высших растений, играют ключевую роль в регуляции метаболизма, ростовых и морфогенетических процессов, формировании адаптивных реакций. Для фитогормональной системы гаметофитов характерно наличие антеридиогена, специфического гормона, отсутствующего у высших растений. АГ отвечает за формирование антеридиев, которые могут развиваться на любом этапе онтогенеза гаметофита, а также индуцирует прорастание спор в неблагоприятных условиях, в том числе и спор других видов, выполняя при этом роль аллелопатически активного соединения. Выраженным позитивным эффектом на прорастание спор отличаются гиббереллины, действие которых усиливается в темноте. Гиббереллины, как и АГ, влияют на половую дифференциацию гаметофитов, способствуют развитию мужских талломов небольшого размера, подавляют образование архегониев. В высокой концентрации гиббереллины угнетают деление проталлиальных клеток, в низкой — способствуют растяжению вегетативных клеток и образованию деформированных талломов.

Ауксины в низкой концентрации активируют линейный рост и стимулируют формирование талломов вытянутой формы, в высокой — ингибируют клеточное деление, а в отдельных случаях вызывают гибель гаметофита. ИУК и НУК в низкой концентрации активируют рост ризоидов. Цитокинины задействованы в регуляции виргинильной и дифинитивной стадий онтогенеза гаметофитов папоротников, во время которых происходит активный рост проталлия, многоклеточной меристемы и ризоидов, формируется выемка и архегонияльная подушка. Цитокинины регулируют образование мужских и женских гаметангиев. Участие АБК, ЖК и БС в регуляции онтогенеза гаметофита исследовано фрагментарно. Эффекты этих гормонов видоспецифичны. АБК и этилен угнетают клеточное деление, тогда как ЖК в отдельных случаях его стимулировала и способствовала развитию ризоидов. Вероятно, АБК, как антагонист антеридиогена, причастна к формированию антеридиев, однако имеющиеся литературные данные не дают окончательного ответа на этот вопрос.

Публикация содержит результаты исследований, проведенных в рамках научного проекта Национальной Академии наук Украины № III-71-14.431 “Гормональный контроль роста и развития споровых растений (различной таксономической принадлежности)”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арнаутова Е.М.* Гаметофиты равноспоровых папоротников. СПб: Изд-во СПб ун-та, 2008. 454 с.
- Барабанищкова Н.С.* Формирование меристемы в ходе онтогенеза у гаметофитов кочедыжника женского (*Athyrium filix-femina* (L.) Roth.) в природных условиях // Вестн. Удм. ун-та. Сер. Биология. Науки о земле. 2009. Вып. 1. С. 87–100.
- Державина Н.М.* Классификация гаметофитов равноспоровых папоротников в связи с морфогенезом // Бюлл. Ботан. сада-института ДВО РАН. 2017. Вып. 18. С. 45–50.
- Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 295–319.
- Шелихан Л.А., Некрасов Э.В.* Размножение папоротников посредством спор в культуре *in vitro* (обзор литературы) // Бюлл. Ботан. сада-института ДВО РАН. 2018. Вып. 20. С. 23–42.
- Шорина Н.И.* Возрастные состояния гаметофитов папоротников и возрастнополовая структура их популяций // Популяционная экология растений. М.: Наука, 1987. С. 43–48.
- Arora N., Bhardwaj R., Sharma P. et al.* Effects of 28-homobrassinolide on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in seedlings of *Zea mays* L. under salinity stress. // Acta Physiol. Plant. 2008. V. 30. P. 833–839.
- Atallah N.M., Banks J.A.* Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 100–107.
- Babenko L.M., Kosakivska I.V., Skaterna T.D.* Jasmonic acid: role in biotechnology and the regulation of plants biochemical processes // Biotechnol. Acta. 2015. V. 8. № 2. P. 35–51.
- Babenko L.M., Romanenko K.O., Shcherbatiuk M.M. et al.* Effects of exogenous phytohormones on spore germination and morphogenesis of *Polystichum aculeatum* (L.) Roth gametophyte in vitro culture // Cytol. Genet. 2018. V. 52. № 2. P. 117–126.
- Ballesteros D., Estrelles E., Walters C. et al.* Effects of temperature and desiccation on ex situ conservation of non-green fern spores // Amer. J. Bot. 2012. V. 9. № 4. P. 721–729.
- Banks J.A.* Gametophyte development in ferns // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 163–186.
- Bartoli C.G., Casalongue C.A., Simontacchia M. et al.* Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress // Environ. Exp. Bot. 2013. V. 94. P. 73–88.
- Bonomo M.C., Martínez O.G., Tanco M.E. et al.* Spores germination and gametophytes of *Alsophila odonelliana* (Cyatheaceae) in different sterile media // Phytol. (Buenos Aires). 2013. V. 82. P. 119–126.

- Bradford K.J., Trewavas A.J. Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action // *Plant Physiol.* 1994. V. 4. P. 1029–1036.
- Camloh M., Ravnikar M., Zel J. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation of rhizoids and early development of gametophytes // *Physiol. Plant.* 1996. V. 97. P. 659–664.
- Castilho C.V.V., Neto J.F.F., Leitão S.G. et al. *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* in vitro culture: sporophyte development and volatile compound profile of an aromatic fern // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2018. V. 133. P. 1–13.
- Chandler J.W. The hormonal regulation of flower development // *J. Plant Growth Regul.* 2011. V. 30. P. 242–254.
- Chia S.-G. E., Raghavan V. Abscisic acid effects on spore germination and protonemal growth in the fern, *Mohria caffrorum* // *New Phytol.* 1982. V. 92. P. 31–37.
- Chiou W.L., Farrar D.R. Antheridiogen production and response in Polypodiaceae species // *Amer. J. Bot.* 1997. V. 84. № 5. P. 633–640.
- Christenhusz M.J.M., Chase M.W. Trends and concepts in fern classification // *Ann. Bot.* 2014. V. 113. № 4. P. 571–594.
- Cordle A.R., Irish E.E., Cheng C.-L. Apogamy induction in *Ceratopteris richardii* // *Int. J. Plant Sci.* 2007. V. 168. № 4. P. 361–369.
- Davière J.M., Achard P. Gibberellin signaling in plants // *Development.* 2013. V. 140. № 6. P. 1147–1151.
- Davies P.J. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd ed. N.Y.: Springer, 2010. 750 p.
- Del Pozo J.C., Lopez-Mataz M.A., Ramirez-Parra E. et al. Hormonal control of the plant cell cycle // *Physiol. Plant.* 2005. V. 123. P. 173–183.
- Drăghiceanu O.-A., Soare L.C. Effects of chronic toxicity induced by cadmium on the gametophyte of two fern species // *Sci. Papers. Series B. Hort.* 2016. V. 60. P. 279–284.
- Du H., Li Y., Li D. et al. Effects of light, temperature and pH on spore germination and early gametophytic development of *Alsophila metteniana* // *Biodiv. Sci.* 2009. V. 17. P. 182–187.
- Edwards M.E. Carbon dioxide and ethylene control of spore germination in *Onoclea sensibilis* L. // *Plant Physiol.* 1977. V. 59. P. 756–758.
- Edwards M.E., Miller J.H. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. III. Inhibition of spore germination // *Amer. J. Bot.* 1972. V. 59. P. 458–465.
- Edwards E. S., Roux S.J. Influence of gravity and light on the developmental polarity of *Ceratopteris richardii* fern spores // *Planta.* 1998. V. 205. P. 553–560.
- Elmore H.W., Whittier D.P. The role of ethylene in the induction of apogamous buds in *Pteridium* gametophytes // *Planta.* 1973. V. 111. № 1. P. 85–90.
- Fernandez H., Bertrand A.M., Feito I. et al. Gametophyte culture in vitro and antheridiogen activity in *Blechnum spicant* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1997. V. 50. P. 71–74.
- Finkelstein R.R., Reeves W., Ariizumi T. et al. Molecular aspects of seed dormancy // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 387–415.
- Fisher R.W., Miller J.H. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. IV. Involvement of photosynthesis in overcoming ethylene inhibition of spore germination // *Amer. J. Bot.* 1975. V. 62. P. 1104–1111.
- Ganger M.T., Hiles R., Hallowell H. et al. A soil bacterium alters sex determination and rhizoid development in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii* // *AoB Plants.* 2019. V. 11. № 2. P. 1–12.
- García-Cortés H., Catalá M., Rodríguez-Gil J.L. Update on the assessment of chronic phytotoxicity using fern spore biomarkers // *Current Advances in Fern Research* / Ed. Fernández H. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 499–515.
- Gastony G.J., Haufler C.H. Chromosome numbers and apomixis in the fern genus *Bommeria* // *Biotropica.* 1976. V. 8. P. 1–11.
- Gómez-Garay A., Galán J.M.G., Cabezuelo A. et al. Ecological significance of brassinosteroids in three temperate ferns // *Current Advances in Fern Research* / Ed. Fernández H. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 453–466.
- Greer G.K., Dietrich M.A., DeVol J.A. et al. The effects of exogenous cytokinin on the morphology and gender expression of *Osmunda regalis* gametophytes // *Amer. Fern J.* 2012. V. 102. P. 32–46.
- Gregoric M., Fisher R. Auxin regulates lateral meristem activation in developing gametophytes of *Ceratopteris richardii* // *Can. J. Bot.* 2006. V. 84. № 10. P. 1520–1530.
- Guiragossian H.A., Koning R.E. Induction of spore germination in *Schizaea pusilla* (Schizaeaceae) // *Amer. J. Bot.* 1986. V. 73. № 11. P. 1588–1594.
- Guo Q.X., Shen Y.X., Song X.H. et al. The effects of spores germination and planting rate of *Athyrium multidentatum* // *Chin. Agric. Sci. Bull.* 2007. V. 23. P. 343–345.
- Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K. et al. Cytokinin: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. P. 172–179.
- Haufler Ch.H., Pryer K.M., Schuettpelz E. et al. Sex and the single gametophyte: revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research // *BioScience.* 2016. V. 66. № 11. P. 928–937.
- Hickok L. Abscisic acid blocks antheridiogen-induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris* // *Can. J. Bot.* 1983. V. 61. № 3. P. 888–892.
- Hickok L.G., Kiriluk R.M. Effects of auxins on gametophyte development and sexual differentiation in the fern *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. // *Bot. Gaz.* 1984. V. 145. № 1. P. 37–42.
- Hickok L.G., Warne T.R., Slocum M.K. *Ceratopteris richardii*: Applications for experimental plant biology // *Amer. J. Bot.* 1987. V. 74. P. 1304–1316.
- Hollingsworth S., Andres E., Greery G. Pheromonal interactions among gametophytes of *Osmundastrum cinnamomeum* and the origins of antheridiogen systems in leptosporangiate ferns // *Int. J. Plant Sci.* 2012. V. 173. P. 382–390.
- Hu Y., Yu D. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid

- during seed germination in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 4394–4408.
- Hyun Y., Lee I. Generating and maintaining jasmonic acid in *Arabidopsis* // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3. P. 798–800.
- Jarvis S.J., Wklkins M.B. Photoresponses of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. I. Germination // J. Exp. Bot. 1973. V. 24. P. 1149–1157.
- Johari D., Singh A.P. Biotechnology in clone gametophytes: future perspectives in homosporous ferns // Current Advances in Fern Research / Ed. Fernández H. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 75–98.
- Juárez-Orozco S., Orozco-Segovia A., Mendoza-Ruiz A. et al. Spore germination of eight homosporous ferns in a temperature gradient // S. Afr. J. Bot. 2013. V. 87. P. 112–117.
- Kagawa T., Sugai M. Involvement of gibberellic acid in phytochrome-mediated spore germination of the fern *Lygodium japonicum* // J. Plant Physiol. 1991. V. 138. № 3. P. 299–303.
- Każmierczak A. Gibberellic acid and ethylene control male sex determination and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes // Working with Ferns.: Issues and Applications / Eds. Kumar A., Fernández H., Revilla M.A. N.Y.: Springer, 2010. P. 49–65.
- Każmierczak A. Studies on morphology and metabolism of prothalli during GA₃-induced formation of antheridia in *Anemia phyllitidis* // Acta Physiol. Plant. 1998. V. 20. № 3. P. 277–283.
- Każmierczak A. Induction of cell division and cell expansion at the beginning of gibberellin A₃-induced precocious antheridia formation in *Anemia phyllitidis* gametophytes // Plant Sci. 2003. V. 165. P. 933–939.
- Khrpach V., Zhabinskii V., Groot A.D. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for XXI century // Ann. Bot. 2000. V. 86. P. 441–447.
- Korpelainen H. Labile sex expression in plants // Biol. Rev. 1998. V. 73. P. 157–180.
- Kwa S.H., Wee Y.C., Lim T.M. et al. IAA-induced apogamy in *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv. gametophytes cultured *in vitro* // Plant Cell Rep. 1995. V. 14. P. 598–602.
- Liu H.-M., Dyer R.J., Guo Z.-Y. et al. The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from Polystichoid ferns // J. Bot. 2012. Art. 510478. P. 1–11.
- Ludwig-Muller J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 6. P. 1757–1773.
- Menéndez V., Arbesú R., Somer M. et al. From spore to sporophyte: How to proceed *in vitro* // In: Working with Ferns: Issues and Applications / Eds. Kumar A., Fernández H., Revilla M.A. N.Y.: Springer, 2010. P. 97–110.
- Menéndez V., Revilla M.A., Bernard P. et al. Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. // Plant Cell Rep. 2006a. V. 25. № 10. P. 1104–1110.
- Menéndez V., Villacorta N.F., Revilla M.A. et al. Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Frasser-Jenkins // Plant Cell Rep. 2006b. V. 25. № 2. P. 85–91.
- Menéndez V., Revilla M.A., Fal M.A. et al. The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2009. V. 96. P. 245–250.
- Miller J.H. The effect of auxin and guanine on cell expansion and cell division in the gametophyte of the fern, *Onoclea sensibilis* // Amer. J. Bot. 1961. V. 48. P. 816–819.
- Miller P.M., Sweet H.C., Miller J.H. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. I. Effects on protonemal and rhizoidal growth and interaction with auxin // Amer. J. Bot. 1970. V. 57. P. 212–217.
- Nekrasov E.V., Shelikhan L.A., Svetashev V.I. Fatty acid composition of gametophytes of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae, Polypodiophyta) // Botanica Pacifica. 2019. V. 8. № 1. P. 1–4.
- Nester J.E., Coolbaugh R.C. Factors influencing spore germination and early gametophyte development in *Anemia mexicana* and *Anemia phyllitidis* // Plant Physiol. 1986. V. 82. № 1. P. 230–235.
- Pangua E., Quintanilla L.G., Sancho A. et al. A comparative study of the gametophytic generation in the *Polystichum aculeatum* group Pteridophyta // Int. J. Plant Sci. 2003. V. 164. P. 295–303.
- Peng J., Harberd N.P. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 376–381.
- Pierik R., Tholen D., Poorter H. et al. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation // Trends Plant Sci. 2006. V. 11. № 4. P. 178–182.
- Pinto S.C., Leitao G.G., Castellar A. et al. Chemical composition of the volatile fractions from wild and *in vitro* plants of *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* (Pteridophyta) // J. Essent. Oil Res. 2013. V. 25. № 3. P. 198–202.
- Plackett A.R.G., Rabbinowitsch E.H., Langdale J.A. Protocol: genetic transformation of the fern *Ceratopteris richardii* through microparticle bombardment // Plant Methods. 2015. V. 11. P. 1–10.
- PPG I. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns // J. Syst. Evol. 2016. V. 54. № 6. P. 563–603.
- Raghavan V. Developmental Biology of Fern gametophytes. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 376 p.
- Ren B.R., Xia B., Li W.L. et al. Investigation on spore germination of *Sphenomeris chinensis* (Lindsaeaceae) // Acta Bot. Yunnanica. 2008. V. 30. № 6. P. 713–717.
- Rivera A., Cañal M.J., Grossniklaus U. et al. The gametophyte of fern: born to reproduce // Current Advances in Fern Research / Ed. Fernández H. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 3–20.
- Rodríguez-Romero A.J., Sedeño-Díaz J.E., López-López E. et al. Recent advances in the use of mitochondrial activity of fern spores for the evaluation of acute toxicity // Current Advances in Fern Research / Ed. Fernández H. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 481–498.
- Romanenko K.O., Kosakivska I.V., Babenko L.M. et al. Effects of exogenous cytokinins on spore germination and gametophyte morphogenesis of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott *in vitro* culture // Cytol. Genet. 2019. V. 53. № 3. P. 192–201.
- Rutherford G., Tanurdzic M., Hasebe M. et al. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, re-

- verse genetic analyses of gene function in fern gametophytes // *BMC Plant Biol.* 2004. V. 16. P. 4–6.
- Schneller J.J.* Antheridiogens // *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes* / Eds. Ranker T.A., Haufler C.H. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 134–158.
- Schneller J.J.* Spore bank, dark germination and gender determination in *Athyrium* and *Dryopteris*: results and implications for population biology of Pteridophyta // *Bot. Helv.* 1988. V. 98. P. 77–86.
- Schraudolf H.* Relative activity of gibberellins in antheridium induction in *Anemia phyllitidis* // *Nature.* 1964. V. 201. P. 98–99.
- Sharpe J.M., Mehlretter K., Walker L.R.* Ecological importance of ferns // *Fern Ecology* / Eds. Mehlretter K., Walker L.R., Sharpe J.M. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. P. 1–21.
- Sheffield E., Bell P.R.* Current studies of the pteridophyte life cycle // *Bot. Rev.* 1987. V. 53. P. 442–490.
- Smith A.R., Pryer K.M., Schuettpelz E. et al.* Fern classification // *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes* / Eds. Ranker T.A., Haufler C.H. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 417–467.
- Soare L.C., Păunescu A., Ponepal C.M.* The morphophysiological, histological, and biochemical response of some nontarget organisms to the stress induced by the pesticides in the environment // *Pesticides, Anthropogenic Activities and the Health of Our Environment* / Eds. Larramendy M.L., Soloneski S. London: IntechOpen Limited, 2019. P. 1–25.
- Sobota A.E., Partanen C.R.* The growth and division of cells in relation to morphogenesis in fern gametophytes: II. The effect of biochemical agents on the growth and development of *Pteridium aquilinum* // *Can. J. Bot.* 1967. V. 45. № 5. P. 595–603.
- Spiro M.D., Torabi B., Cornell C.N.* Cytokinins induce photomorphogenic development in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii* // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1252–1260.
- Strain E., Hass B., Banks J.* Characterization of mutations that feminize gametophytes of the fern *Ceratopteris* // *Genetics.* 2001. V. 159. P. 1271–1281.
- Strickler B.* Responses of *Pteris longifolia* to applications of ammonium 2,4-dichlorophenoxyacetate // *Bot. Gaz.* 1946. V. 108. P. 101–114.
- Sugai M., Nakamura K., Yamane H. et al.* Effects of gibberellins and their methyl esters on dark germination and antheridium formation in *Lygodium japonicum* and *Anemia phyllitidis* // *Plant Cell Physiol.* 1987. V. 28. № 1. P. 199–202.
- Suo J., Chen S., Zhao Q. et al.* Fern spore germination in response to environmental factors // *Front. Biol.* 2015. V. 10. P. 358–376.
- Swami P., Raghavan V.* Control of morphogenesis in the gametophyte of a fern by light and growth hormones // *Can. J. Bot.* 1980. V. 58. P. 1464–1473.
- Takeno K., Furuya M.* Bioassay of antheridiogen in *Lygodium japonicum* // *Dev. Growth Differ.* 1975. V. 17. № 1. P. 9–18.
- Takeno K., Furuya M.* Inhibitory effect of gibberellins on archegonial differentiation in *Lygodium japonicum* // *Physiol. Plant.* 1977. V. 39. P. 135–138.
- Tanaka J., Yano K., Aya K. et al.* Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway // *Science.* 2014. V. 346. № 6208. P. 469–473.
- Tanco M.E., Martinez O.G., Bonomo M.L.C.* Germination and gametofitic morphogenesis of *Pteris inermis* (rosenst.) de la sota // *Gayana Bot.* 2009. V. 66. № 1. P. 10–17.
- Tong H., Xiao Y., Liu D., et al.* Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice // *Plant Cell.* 2014. V. 26. № 11. P. 4376–4393.
- Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N. et al.* Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 161–173.
- Warne T.R., Hickok L.G.* (2-Chloroethyl)phosphonic acid promotes germination of immature spores of *Ceratopteris richardii* Brongn // *Plant Physiol.* 1987. V. 83. № 4. P. 723–725.
- Wasternack C.* Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development // *Ann. Bot.* 2007. V. 100. P. 681–669.
- Weinberg E.S., Voeller B.R.* External factors inducing germination of fern spores // *Amer. Fern J.* 1969. V. 59. № 4. P. 153–167.
- Whittier D.P.* The influence of growth substances on the induction of apogamy in *Pteridium* gametophytes // *Amer. J. Bot.* 1966. V. 53. P. 882–886.
- Whittier D.P.* The influence of osmotic conditions on induced apogamy in *Pteridium* gametophytes // *Phytomorphology.* 1975. V. 25. P. 246–249.
- Whittier D.P., Steeves T.A.* The induction of apogamy in the bracken fern // *Can. J. Bot.* 1960. V. 38. P. 925–930.
- Whittier D.P., Steeves T.A.* Further studies on induced apogamy in ferns // *Can. J. Bot.* 1962. V. 40. P. 1525–1531.
- Wu H., Liu X.-Q., Ji H. et al.* Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae) // *Sci. Hortic.* 2010. V. 125. P. 417–421.
- Zhai G.Y., Bian K., Jia K.G. et al.* Effect of GA₃ and MS medium ratio treatments on spore germination of wild Brake // *China Veget.* 2007. V. 8. P. 21–23.
- Zhang J.W., Niu J.Y.* The effects of culture ground substances, GA₃ and B, on spores germination and planting rate of *Pteridium aquilinum* // *Acta Pratac Sin.* 1999. V. 8. № 1. P. 62–68.
- Zhang K.M., Shen Y., Fang Y.M. et al.* Changes in gametophyte physiology of *Pteris multifida* induced by the leaf leachate treatment of the invasive *Bidens pilosa* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. P. 3578–3585.
- Zhang Y., Yang L.* Effects of GA₃ and culture media on the development of *Athyrium multidentatum* (Dol.) // *J. Jilin Agric. Univ.* 2011. V. 33. № 4. P. 355–359.

Phytohormonal Regulation of Growth and Development of Fern Gametophytes in Culture *in vitro*

K. O. Romanenko^{1,*}, L. M. Babenko¹, O. V. Vasheka², P. O. Romanenko³, and I. V. Kosakivska¹

¹*Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska st. 2, Kyiv, 01004 Ukraine*

²*Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Hlushkova Avenue 2, Kyiv, 03127 Ukraine*

³*Limit Liability Company "Scientific Production Enterprise "The Fifth Element"", Mikhailivska str. 37, Kherson, 73025 Ukraine*

**e-mail: katerynaromanenko4@gmail.com*

Received July 16, 2019; revised November 24, 2019; accepted November 30, 2019

Interest in ferns as objects of biotechnological research is determined by the characteristics of their development and reproduction, knowledge of which is important for understanding the evolutionary pathways of land plants. The literature data on the phytohormones involvement in the regulation of the ontogenesis of fern gametophytes during *in vitro* cultivation are analyzed and summarized. The possibility of fern reproduction through spores application as explants using *in vitro* methods is considered. The effects of exogenous treatment with cytokinins, auxins, gibberellins, ethylene, jasmonic acid and brassinosteroids on spore germination, morphology and gametophyte development are analyzed. The role of gibberellins and anteridiogen in the formation of sexual dimorphism of fern gametophytes is discussed. Data on disturbances of the sexual process in ferns, the phytohormones involvement in the formation of apogamic sporophytes on the gametophyte prothalli are summarized.

Keywords: Polypodiopsida, spores, gametophyte, sporophyte, culture *in vitro*, phytohormones

УДК 591.3

ЭВОЛЮЦИОННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТАНОВЛЕНИЯ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ У ЖИВОТНЫХ

© 2020 г. Н. Д. Петри*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119923 Россия

*e-mail: petri1543@inbox.ru

Поступила в редакцию 01.11.2019 г.

После доработки 27.11.2019 г.

Принята к публикации 01.12.2019 г.

Асимметрия относительно передне-задней оси тела является важной чертой плана строения билатеральных животных (Bilateria). Нарушения формирования лево-правой асимметрии приводят к патологиям различной степени тяжести, поэтому изучение механизмов ее установления в эмбриональном развитии является важной научной и медицинской задачей. Основным вопросом, на который пытаются ответить исследователи – как и когда запускаются процессы, приводящие к нарушению зеркальной симметрии левой и правой сторон развивающегося организма. Исследования в этой области активно развиваются, у животных разных филогенетических групп уже выявлено множество разнообразных способов установления лево-правой асимметрии. К сожалению, сравнительный анализ этих способов зачастую охватывает лишь несколько филогенетически удаленных объектов биологии развития и не показывает разнообразия, существующего внутри таксономических групп. Поэтому цель данного обзора – показать многообразие механизмов установления лево-правой асимметрии в раннем развитии Metazoa, а также сделать предположения об эволюционной консервативности этих механизмов и о том, какой из обнаруженных на данный момент механизмов эволюционно первичен как для Bilateria, так и для всех Metazoa. В статье систематизируются знания об установлении асимметрии тела на основе сигнального каскада Nodal, проводится сравнение морфологии и функционирования лево-правых организаторов асимметрии разных животных, сравнивается роль механических напряжений в установлении асимметрии у первичноротых животных. Обобщение и анализ данных об установлении лево-правой асимметрии тела позволяет по-новому взглянуть на эволюцию развития многоклеточных животных.

Ключевые слова: лево-правая асимметрия, установление асимметрии, лево-правый организатор, план строения, Metazoa, Bilateria, Nodal, развитие

DOI: 10.31857/S0475145020020056

ВВЕДЕНИЕ

Асимметрия относительно центральной оси тела является нечасто упоминаемой, но важной чертой билатерально-симметричных животных. Вопреки названию, для многих билатерий характерно асимметричное развитие левой и правой сторон тела. У человека установление лево-правой асимметрии выражается в правильном расположении непарных органов, таких как печень, сердце и желудок, в грудной и брюшной полости, и асимметричном развитии парных органов, например, легких (Shiraishi, Ichikawa, 2012). Кроме того, механизмы асимметричного морфогенеза при развитии трубчатых органов, таких как кишечник, обуславливают повороты петель в строго определенном направлении. Для многих органов (например, сердца) правильное функционирование без асимметрии невозможно (Chen et al.,

2010). Таким образом, установление лево-правой асимметрии необходимо для корректного расположения висцеральных органов в грудной и брюшной полостях и для успешного морфогенеза, связанного с функциональностью органов.

Нарушения установления асимметрии встречаются с частотой около 1/5000–1/10000 человек и приводят к патологиям различной степени тяжести – гетеротаксии, декстрокардии, *situs inversus* с синистрокардией, связанным с этим пороком сердца и сосудистой системы, а при сопутствующем диагнозе первичной цилиарной дискинезии – к бесплодию у мужчин и хроническим заболеваниям дыхательных путей (Afzelius, 1976; Zhu et al., 2006). Поэтому изучение механизмов установления лево-правой асимметрии в эмбриональном развитии остается важной научной и медицинской задачей.

Основной вопрос, на который пытаются ответить исследователи — как и когда запускаются процессы, приводящие к нарушению билатеральной симметрии развивающегося организма. Работы, проведенные на животных самых разных групп, выявили множество разнообразных способов установления лево-правой асимметрии. Тем не менее, между ними обнаружилось сходство, позволяющее по-новому взглянуть на эволюцию развития многоклеточных животных.

ПОЗВОНОЧНЫЕ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ УСТАНОВЛЕНИЯ АСИММЕТРИИ ПЛАНА СТРОЕНИЯ

Установление лево-правой асимметрии у всех изученных позвоночных животных происходит благодаря работе сигнального каскада Nodal. Его наличие и роль в установлении асимметрии показаны у представителей млекопитающих — домашних мышей *Mus musculus*, кроликов *Oryctolagus cuniculus*, свиней *Sus scrofa domestica*, коров *Bos taurus* (Blum et al., 2007; Schröder et al., 2016); у курицы *Gallus gallus* (Levin et al., 1995); у представителей амфибий — шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* и *X. tropicalis*, аксолотля *Ambystoma mexicanum* (Schweickert et al., 2007; Yu et al., 2002); костистых рыб — *Danio rerio*, медаки *Oryzias latipes* (Essner et al., 2005; Nojo et al., 2007). Более того, гены, гомологичные генам сигнального каскада Nodal у позвоночных, участвуют в установлении лево-правой асимметрии у вторичноротых беспозвоночных: ланцетника *Amphioxus* sp., оболочников — асцидий *Ciona intestinalis* и *Halocynthia roretzi* (Morokuma et al., 2002), иглокожих — морских ежей *Paracentrotus lividus* и *Strongylocentrotus pallidus* (Duboc et al., 2005; Tisler et al., 2016), что свидетельствует об его высокой эволюционной консервативности.

Сигнальный каскад Nodal у позвоночных функционирует на стадиях нейруляции и сомитогенеза. Ключевым звеном этого каскада является ген *nodal*, принадлежащий к суперсемейству TGF- β . *Nodal* экспрессируется на левой стороне тела эмбриона вблизи средней линии и обуславливает дальнейшее развитие левой стороны тела по “левому” сценарию: если там не произойдет вспышки его экспрессии, у эмбриона сформируются две правые стороны (Saijoh et al., 2003). Далее белок Nodal по внеклеточному матриксу диффундирует в мезодермальные клетки на левой стороне тела (Oki et al., 2007) и там запускает экспрессию гомеобоксного гена *pitx2*, который будет постоянно экспрессироваться в клетках мезодермы боковой пластинки на левой стороне, управляя дальнейшим установлением асимметрии органов (Logan et al., 1998). Вспышка экспрессии белка Nodal на левой стороне тела длится недолго (6–7 ч у мыши) (Shiratori, Hamada, 2006), поскольку он активирует несколько генов, продукты которых подавляют экспрессию и

распространение Nodal. В клетках боковой мезодермальной пластинки он индуцирует экспрессию белка Lefty2. Диффундируя в область средней линии эмбриона, он запускает экспрессию Lefty1. Lefty1 подавляет экспрессию Nodal вблизи средней линии и тем самым не позволяет ему распространиться на правую сторону эмбриона (Meno et al., 1998), а Lefty2 подавляет его экспрессию в боковой мезодерме (рис. 1), таким образом экспрессия Nodal ограничивается с двух сторон. Помимо того, на правой стороне эмбриона экспрессируется ген *cerl2* (*cerberus-like 2*), продукт которого блокирует диффузию белка Nodal, связываясь с ним в комплексы. По-видимому, именно этот ген, вначале экспрессирующийся на обеих сторонах тела, принимает первичный сигнал к установлению асимметрии на левой стороне, прекращает работать, за счет этого белок Nodal высвобождается и усиливает экспрессию собственного гена на левой стороне тела (Schweickert et al., 2010; Shinohara et al., 2012). В отсутствие любого из генов-репрессоров Nodal происходит его неконтролируемое просачивание на правую сторону, что приводит к ошибкам асимметризации и частичному или полному развитию правой стороны по “левому” сценарию.

ПОЗВОНОЧНЫЕ: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ОРГАНИЗАТОРОВ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ

Асимметричная экспрессия Nodal у большинства позвоночных животных (мышь *M. musculus*, кролика *O. cuniculus*, коровы *B. taurus*, амфибий *X. laevis* и *X. tropicalis*, *A. mexicanum*, костистых рыб *D. rerio* и *O. latipes*, осетровой рыбы *A. transmontanus*) возникает в результате работы так называемого лево-правого организатора. Это участок мезодермы, имеющий эпителиальное строение и покрытый подвижными ресничками, недолгое время существующий на стадиях гастрюлы и нейрулы и создающий ток жидкости во внеклеточном пространстве, который запускает сигнальный каскад в мезодерме левой стороны тела эмбриона. Лучше всего строение и работа лево-правого организатора изучены у мыши.

Мышь: лево-правый организатор — узелок

Лево-правым организатором домовой мыши является вентральная часть узелка, появляющегося во время гастрюляции и являющегося гомологом дорзальной губы бластопора. Узелок закладывается к седьмому дню развития в эпибласте в области будущего головного конца эмбриона (рис. 2а). Важно отметить, что у мыши гипобласт, подстилающий эпибласт, не является сплошным слоем. Именно под узелком он расходится в стороны и образует отверстие. Таким образом, зрелый

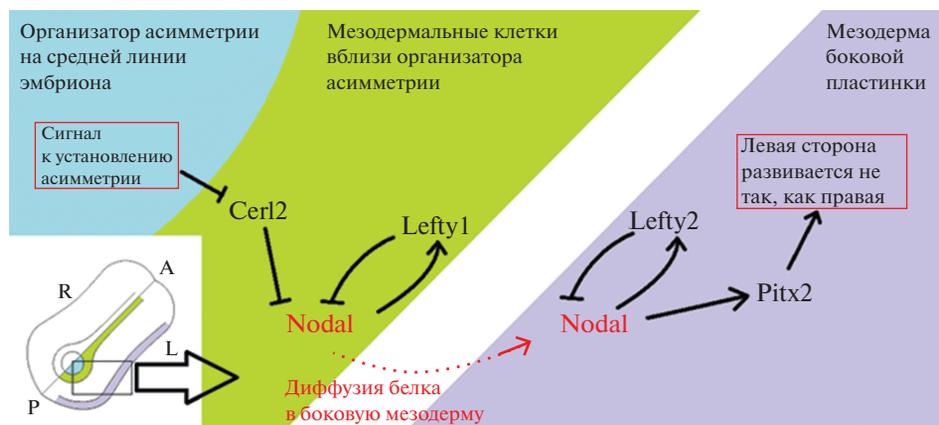


Рис. 1. Схема биохимического сигнального каскада Nodal, запускающего асимметричное развитие левой стороны тела эмбриона мыши. На врезке условная схема эмбриона мыши во время гастрюляции, вид с вентральной стороны. А и Р – передняя и задняя стороны тела эмбриона, L и R – левая и правая стороны. По данным Lee, Anderson, 2008.

узелок выглядит как ямка на вентральной стороне эмбриона длиной около 70 мкм и состоит примерно из 250 клеток (Sulik et al., 1994) (рис. 2б). Узелок окружен 20–30 более плоскими клетками, т.н. паракордальными. На поперечном разрезе узелка можно различить два слоя: слой хордомезодермы и слой эктодермальных клеток, которые впоследствии образуют нервную пластинку (Sulik et al., 1994; Blum et al., 2007) (рис. 2в).

Итак, апикальная сторона мезодермальных клеток узелка (обращенная на вентральную сторону эмбриона) направлена в полость желточного мешка и не прикрыта гипобластом. Это обстоятельство чрезвычайно важно для установления лево-правой асимметрии.

Каждая из мезодермальных клеток узелка несет на апикальной стороне по одной ресничке (рис. 2г), причем эти реснички совершают вращательные движения по часовой стрелке со скоростью около 600 оборотов в минуту (Okada et al., 1999). При потере ресничек (например, при выключении генов моторных белков KIF3A и KIF3B из суперсемейства кинезинов, необходимых для формирования ресничек) лево-правая ось вовсе не формируется, и латерализация органов происходит случайным образом, при этом эмбрионы оказываются нежизнеспособными (Nonaka et al., 1998). Не столько важно, впрочем, наличие ресничек само по себе, сколько их подвижность: показано, что неподвижность ресничек из-за поломки гена аксонемного динеина (*lrd*) приводит к таким же нарушениям, что и их полное отсутствие (Supp et al., 1997; Okada et al., 1999).

Суммарное вращение ресничек создает в области узелка ток жидкости справа налево, причем достаточно быстрый: около 20 мкм/с (Okada et al., 1999; Shiratori, Hamada, 2006). Именно асимметрично направленный ток является ключевым моментом, определяющим дальнейшую асимметри-

зацию правой и левой сторон тела эмбриона (Blum et al., 2009). Гипотеза о важности асимметричного тока жидкости получила название Nodal flow, то есть узелковый ток. Показано, что при создании в узелке мыши искусственного потока жидкости справа налево (то есть в обратном направлении), если он достаточно сильный, чтобы нивелировать эффект биения ресничек, все эмбрионы приобретают состояние *situs inversus*. Искусственный поток также позволяет произвольно задавать *situs inversus* или *situs solitus* у мышей с неподвижными ресничками, в зависимости от направления тока (Nonaka et al., 2002).

На первый взгляд, круговые движения ресничек должны создавать круговой ток, и никакого направленного тока не получится. Тем не менее, наблюдаемый *in vivo* ток в самом узелке отчетливо левонаправленный. Биофизическое моделирование показало, что левонаправленный ток возможен в том случае, если все реснички отклонены назад минимум на 5°–25° (Cartwright et al., 2004). При последующих наблюдениях оказалось, что апикальная поверхность каждой клетки имеет куполообразную форму; базальное тело каждой реснички смещено в постериорном направлении и из-за куполообразной формы клетки оказывается отклонено кзади в среднем на 26.6° (Nonaka et al., 2005). В результате над поверхностью клеток ток становится более-менее однонаправленным. Обратный ток, по-видимому, проходит между ресничками и поверхностью клеток ниже и постериорнее прямого тока, выражен слабее и не влияет на направление главного потока, проходящего над ресничками (рис. 3).

Важную роль в расположении базальных тел ресничек играет цитоскелет, а именно сеть актиновых микрофиламентов. При мутациях белков Cofilin1, Vangl2, отвечающих за перестройки актинового цитоскелета, базальные тела ресничек

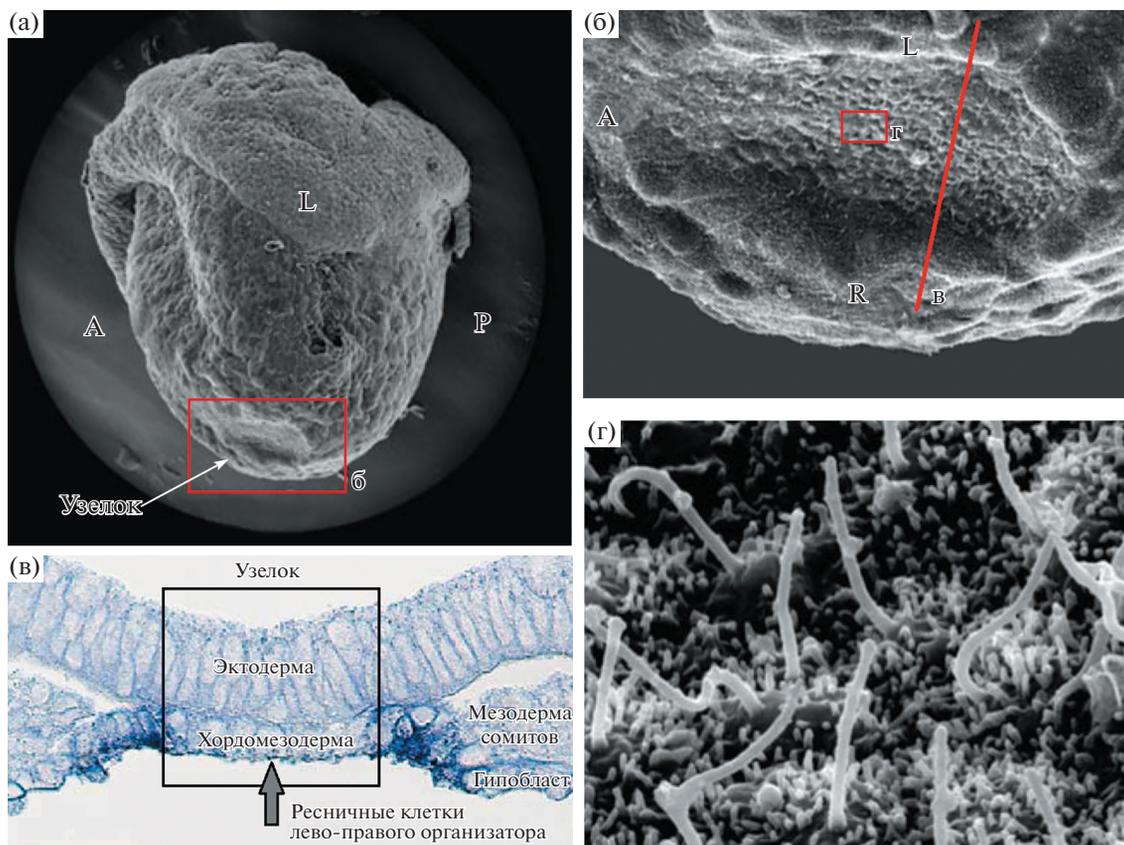


Рис. 2. (а) Общий вид эмбриона мыши на стадии гастрюляции. (б) Узелок эмбриона мыши, вид с вентральной стороны. (в) Поперечный срез через узелок эмбриона мыши. (г). Реснички на клетках узелка. А и Р – передняя и задняя стороны тела эмбриона, L и R – левая и правая стороны; (в) используется с разрешения Schröder et al., 2016. Финальная, опубликованная версия статьи доступна на <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000440951>; (а, б, г) адаптировано из Namada, 2016 согласно условиям Creative Commons Attribution-NonCommercial 2.5 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>).

остаются в центре клетки, и это приводит к нарушениям в определении лево-правой оси (Mahafey et al., 2013).

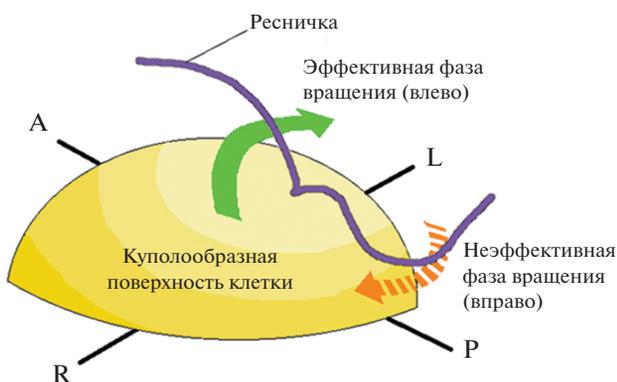


Рис. 3. Модель результирующего тока жидкости в узелке мыши. А и Р – передняя и задняя стороны тела эмбриона, L и R – левая и правая стороны.

Парахордальные клетки, расположенные по бокам от узелка, несут каждая по одной неподвижной ресничке (McGrath et al., 2003). По-видимому, именно парахордальные клетки отвечают за восприятие тока жидкости, созданного биением ресничек. На данный момент сосуществуют две гипотезы о механизмах восприятия этого тока. Первая – химическая, или гипотеза переноса морфогена – утверждает, что клетки узелка выделяют везикулы с ретиноевой кислотой и белком Sonic hedgehog, которые с током жидкости направляются на левую сторону и там сливаются с мембранами парахордальных клеток, запуская в них каскад Nodal (Nonaka et al., 1998; Tanaka et al., 2005) (рис. 4а). Вторая гипотеза – биомеханическая – постулирует, что передача сигнала от асимметричного тока жидкости осуществляется за счет восприятия механического воздействия тока (рис. 4б). Согласно этой гипотезе, неподвижные реснички играют роль антенн, непосредственно воспринимающая давление тока жидкости в узелке. Механический сигнал от реснички передается через трансмембранный сенсорный белок Polycystin-1

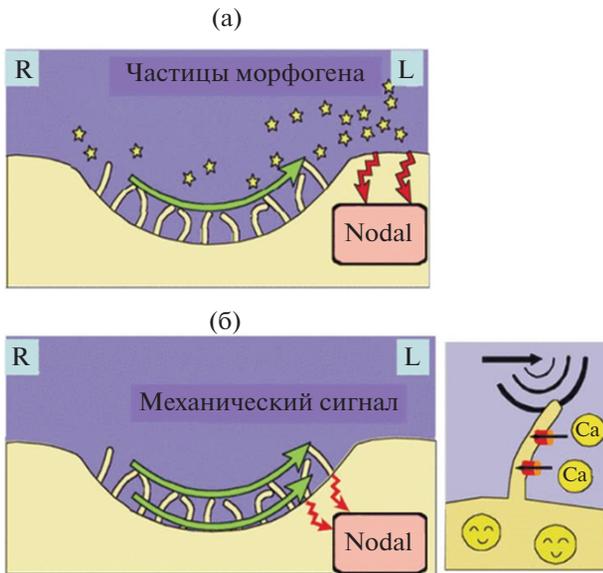


Рис. 4. (а) Иллюстрация гипотезы переноса морфогена. (б) Иллюстрация биомеханической гипотезы. L и R – левая и правая стороны тела, зеленые стрелки – направление тока жидкости, звездочки – частицы морфогена. Адаптировано из Hamada, 2016 согласно условиям Creative Commons Attribution-NonCommercial 2.5 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>).

(Pkd1) на кальциевые каналы Polycystin-2 (Pkd2) (Field et al., 2011), открытие которых приводит к кальциевому пику в паракордальных клетках левой стороны эмбриона и дальнейшей активации молекулярного каскада (McGrath et al., 2003). В пользу второй гипотезы говорит то, что белок Pkd2 действительно необходим для запуска каскада реализации асимметрии в паракордальных клетках, так же как наличие неподвижных ресничек и способность клеток создавать волну Ca^{2+} в цитоплазме (McGrath et al., 2003; Yoshida et al., 2012).

Кролик: лево-правый организатор – хордальная пластинка

Лево-правый организатор кролика функционально идентичен организатору мыши и в значительной степени морфологически сходен с ним. Организатор кролика – это тоже эпителиальный участок мезодермы на вентральной стороне эмбриона, свободный от гипобласта и несущий подвижные реснички. Основное различие состоит в том, что гипобласт кролика прорывается не под узелком, а под прилегающей к нему с головного конца хордальной пластинкой. Поэтому именно апексы клеток хордальной пластинки оказываются экспонированными в полость желточного мешка и формируют реснички. Соответственно, биение ресничек и ток жидкости у кролика про-

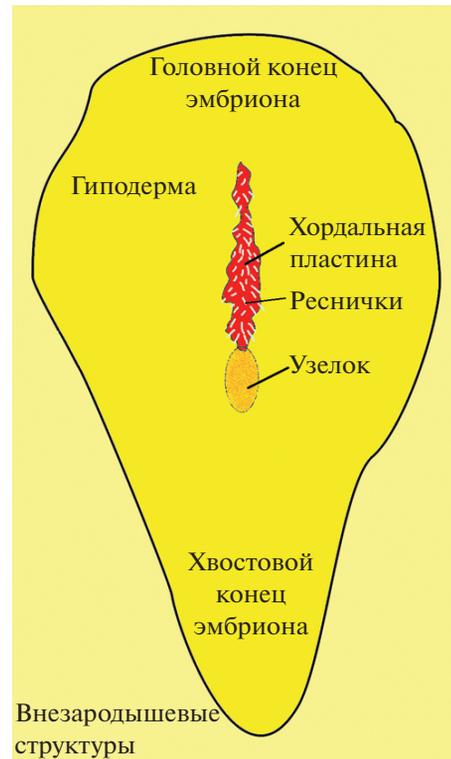


Рис. 5. Схема эмбриона кролика, вид с вентральной стороны. По данным Blum et al., 2007.

исходит не в области узелка, а в области хордальной пластинки (Blum et al., 2007) (рис. 5).

Кроме того, узелок мыши прикрыт так называемой мембраной Рейхардта, состоящей из одного слоя клеток (Lee, Anderson, 2008), и под ней формируется небольшое пространство для циркуляции жидкости. Поэтому у мыши обратный ток жидкости, направленный вправо, “прижат” к поверхности ресничных клеток и протекает непосредственно под левонаправленным током. У кролика же жидкость в лево-правом организаторе свободно сообщается с жидкостью желточного мешка, и пространство для циркуляции намного больше. Вследствие этого обратный ток проходит не под левонаправленным током, а несколько каудальнее, вдоль задней границы хордальной пластинки. Возможно, это свидетельствует о том, что угол наклона ресничек в хордальной пластинке кролика меньше, чем в узелке мыши.

Лягушки: лево-правый организатор – участок крыши гастроцеля

Аналогичный мыши и кролику механизм ресничного тока представлен в лево-правом организаторе асимметрии шпорцевой лягушки. У лягушки этим организатором является мезодермальный участок крыши гастроцеля – так называемая gastrocoel roof plate (GRP), то есть буквально пластин-

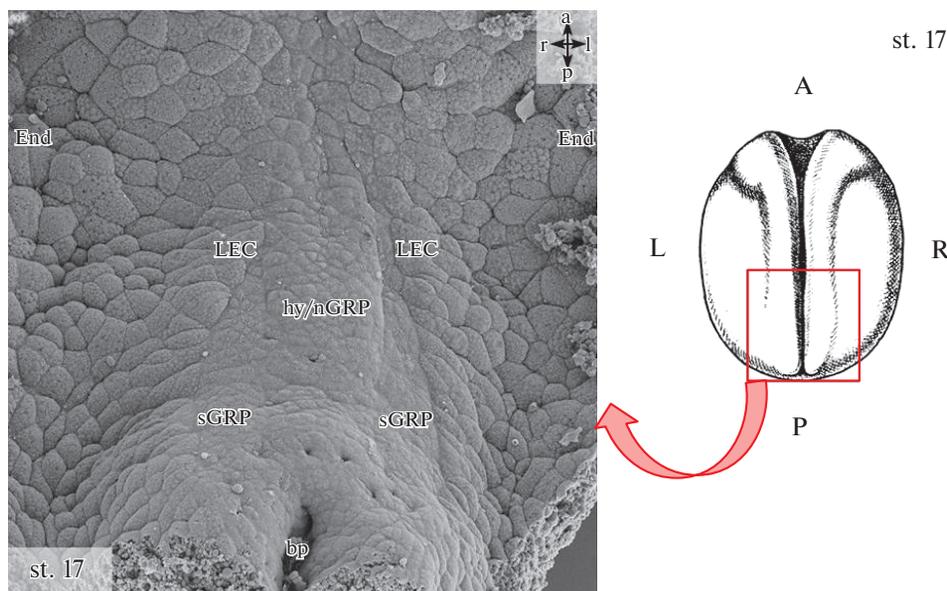


Рис. 6. Морфология лево-правого организатора в крыше гастроцеля шпорцевой лягушки на стадии нейрулы. *hy/pGRP* – гипохорд и поверхностная презумптивная мезодерма хорды, *sGRP* – поверхностная презумптивная мезодерма сомитов, *LEC* – латеральные энтодермальные клетки, *End* – энтодерма, *bp* – бластопор. *A* и *P* – передняя и задняя стороны тела эмбриона, *L* и *R* – левая и правая стороны. Схема зародыша адаптирована из Nieuwkoop, Faber, 1994, с изменениями.

ка крыши гастроцеля (Schweickert et al., 2007). На стадии нейрулы область *GRP* представляет собой вытянутую треугольную пластинку на внутренней поверхности крыши гастроцеля, сложенную мезодермальными клетками презумптивной хорды и сомитов. *GRP* со всех сторон окружена энтодермальным эпителием, от которого отличается меньшим размером клеток (Schweickert et al., 2007) (рис. 6). Важно отметить, что в таком виде *GRP* существует недолго, и уже к началу стадии хвостовой почки клетки области *GRP* уходят с внутренней поверхности первичной кишки, энтодерма крыши гастроцеля смыкается, и поверхность гастроцеля оказывается выстланной только энтодермальными клетками (Shook et al., 2004).

Как и в случае лево-правого организатора у мыши и кролика, клетки *GRP* несут по одной подвижной ресничке. Показано, что для успешного формирования и позиционирования ресничек необходима работа генов *myosin 1d* и *vangl2*, отвечающих за планарную полярность клеток (Tingler et al., 2018). Реснички на клетках *GRP* вращаются по часовой стрелке с частотой 20–25 биений в секунду, их суммарное вращение создает над областью *GRP* ток жидкости справа налево. Как и в случае мыши, для шпорцевой лягушки показано, что наличие левонаправленного тока чрезвычайно важно для установления асимметрии тела эмбриона: в условиях экспериментального блокирования тока жидкости эмбрионы развивались с нарушениями асимметрии (Schweickert et al., 2007). Потеря аксонемного динеина (гомологичного таковому у мыши) вызывала также непо-

движность ресничек и далее нарушения установления асимметрии. Кроме того, у эмбриона лягушки было показано наличие на клетках *GRP* ионного канала Polycystin-2 и его необходимость для правильной латерализации зародыша (Schweickert et al., 2007; Tingler et al., 2018).

Костистые рыбы: лево-правый организатор – купферов пузырек

У костистых рыб (*D. rerio*, *O. latipes*) лево-правым организатором асимметрии является купферов пузырек (Essner et al., 2005). Это специфичная для костистых рыб структура, формирующаяся в конце гастрюляции в заднем отделе тела, вентральнее хорды. Купферов пузырек образован потомками так называемых клеток-лидеров, которые составляют фронт инволюирующей дорзальной бластодермы во время гастрюляции. В конце гастрюляции эти клетки эпителизуются и образуют большую сферическую структуру. Во время начальных стадий сомитогенеза в центре этой сферы появляется полость, а на обращенных к ней апикальных поверхностях клеток начинают формироваться реснички (Lin et al., 2017). В образовании полости купферова пузырька задействован ген *myosin 1d*, при его мутации полость не формируется нормально, и лево-правая асимметрия нарушается (Saydmohammed et al., 2018). Клетки купферова пузырька несут по одной ресничке, обращенной в полость пузырька и отклоненной назад. Было показано, что эти реснички подвижны и вращаются по часовой стрелке, как и рес-

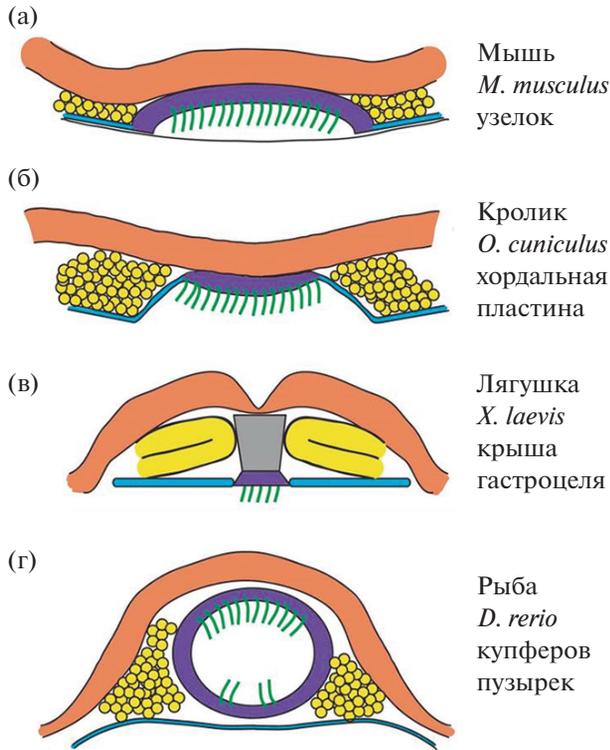


Рис. 7. Строение лево-правых организаторов у отдельных представителей позвоночных животных. Эктодерма показана оранжевым цветом, боковая мезодерма — желтым, энтодерма/гипобласт — голубым, организатор асимметрии — фиолетовый с зелеными ресничками. © 2008 Wiley. Используется с разрешения Lee, Anderson. Morphogenesis of the node and notochord: the cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse // *Developmental Dynamics*, John Wiley & Sons.

нички эмбриона мыши, кролика и лягушки. Несмотря на то, что пузырек имеет сферическую форму, в нем удается создать левонаправленный ток за счет того, что 80% ресничек сосредоточены на крыше пузырька (Lee, Anderson, 2008). Левонаправленный ток приводит к асимметричной экспрессии генов сигнального каскада Nodal — например, у японской медаки ген *charon*, гомологичный *cerl2* (репрессору *nodal*) у мыши, экспрессируется справа и, по-видимому, тоже является репрессором гомолога *nodal* (Hojo et al., 2007). У *D. rerio* экспрессия гена *spaw*, гомологичного гену *nodal* мыши, также зависит от тока жидкости в купферовом пузырьке: при правильной работе ресничек он экспрессируется на левой стороне тела, и его активация запускает работу остальных компонентов сигнального каскада Nodal (*lefty1*, *lefty2*, *pitx2*) (Long et al., 2003). При блокировании экспрессии *spaw* нарушается экспрессия этих генов. В активации сигнального каскада Nodal у данио-рерио, как и у мыши, участвуют кальциевые каналы, кодируемые геном *pkd2* (Yuan et al., 2015).

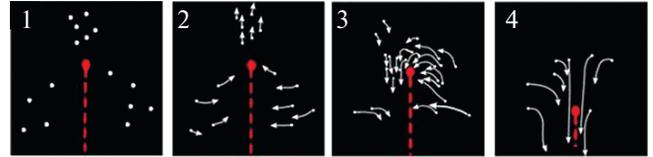


Рис. 8. Схема движения клеток вокруг первичного узелка эмбриона курицы во время гастрюляции, четыре стадии процесса, вид с дорсальной стороны. На третьей стадии видно массовое перемещение клеток на левую сторону эмбриона. Из Gros et al. Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick // *Science*. 2009. V. 324. № 5929. P. 941–944. Используется с разрешения AAAS.

Разнообразие способов установления асимметрии среди позвоночных

Несмотря на то, что механизмы установления асимметрии за счет активности ресничных клеток мезодермальных структур эмбриона, создающих ток жидкости, обнаружены у представителей разных классов позвоночных (рис. 7), экстраполировать их на любого представителя позвоночных следует с осторожностью. Среди позвоночных встречаются и иные механизмы установления асимметрии, не связанные с созданием направленного тока жидкости.

У эмбриона курицы, в отличие от мыши, энтодерма, подстилающая первичный узелок и сопутствующие структуры, сплошная и не имеет разрывов. Мезодерма эмбриона курицы оказывается перекрытой сплошным энтодермальным слоем, и никакая ее часть не экспонируется на вентральной стороне эмбриона. Таким образом, мезодерма не может образовывать реснички и запускать ток жидкости, как это наблюдается у мыши (Schroder et al., 2016; Tsikolia et al., 2012).

Основным механизмом установления асимметрии у эмбриона курицы является клеточная перестройка в районе первичного узелка. На стадии гастрюляции, во время которой длина первичной полоски максимальна, происходит быстрое (3–4 ч) перемещение клеток, окружающих узелок, на левую сторону, а сам узелок немного изгибается (рис. 8).

В результате гены *shh* (*sonic hedgehog*) и *fgf8* (*fibroblast growth factor 8*), ранее экспрессировавшиеся одинаково с обеих сторон от узелка, увеличивают интенсивность экспрессии на левой стороне зародыша. *Shh* запускает экспрессию *nodal* в мезодерме на левой стороне тела зародыша с помощью гена-посредника *caronte* (Esteban et al., 1999), что приводит к активации характерного для всех позвоночных сигнального каскада Nodal (Pagán-Westphal, Tabin, 1998). Экспериментально показано, что при нарушении миграции клеток вокруг узелка сам узелок принимает более симметричную форму, а гены *shh* и *fgf8* продолжают экспрес-

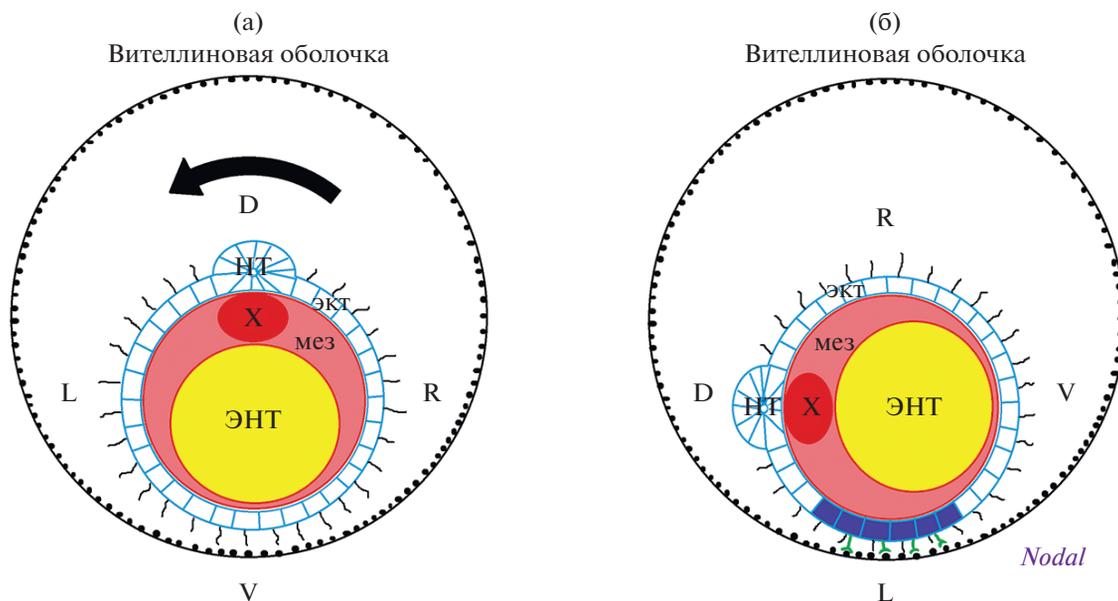


Рис. 9. Схема вращения нейрулы асцидии в вителлиновой оболочке, вид сзади. (а) Начало вращения эмбриона. (б) Конец вращения эмбриона, длительный контакт левой стороны тела с вителлиновой оболочкой запускает экспрессию *Nodal* в эктодерме. X – хорда, нт – нервная трубка, экт – эктодерма, мез – мезодерма сомитов и боковой пластинки, энт – энтодерма. D и V – спинная и брюшная стороны тела эмбриона, L и R – левая и правая стороны. По данным Nishide et al., 2012.

сироваться одинаково по обе стороны от узелка (Gros et al., 2009). Причины этих клеточных движений на данный момент неизвестны.

Интересно, что, как и у курицы, у свиньи не найдено ничего похожего на ресничный организатор асимметрии, и запуск каскада *Nodal* на левой стороне эмбриона свиньи также вызывается миграциями клеток справа налево вокруг первичного узелка (Schröder et al., 2016).

Консервативность роли гена nodal и биения ресничек в установлении асимметрии

Несмотря на вариабельность (возможно, вторичную) механизмов установления асимметрии у позвоночных, механизм, связанный с биением ресничек и током жидкости, имеет, по-видимому, глубокие эволюционные корни. Схожие способы установления лево-правой асимметрии обнаружены у низших хордовых и даже в пределах родственного хордовым типа иглокожих, которые также относятся к группе вторичноротых животных.

Асцидии: роль эктодермальных ресничек в установлении асимметрии

У личинок асцидий *C. intestinalis* и *H. roretzi* на стадии нейрулы на левой стороне тела наблюдается экспрессия гена *nodal*, который к стадии хвостовой почки запускает экспрессию гена *pitx* (Mo-

rokuma et al., 2002). Оба гена гомологичны таковым у позвоночных, хотя и экспрессируются не в мезодерме, а в эктодерме. Более того, стимулом для запуска сигнального каскада *Nodal*, как и у многих позвоночных, служит работа ресничек. На личинках четырех видов асцидий (*H. roretzi*, *C. intestinalis*, *P. mammillata*, *C. inflata*) показано, что к стадии нейрулы эктодермальные клетки по всей поверхности тела, кроме нервной борозды, отрачивают по одной ресничке на клетку. Эти реснички совершают медленные волнообразные движения с частотой 1/7 Герц (Yamada et al., 2018), за счет их работы вся личинка целиком поворачивается внутри вителлиновой оболочки против часовой стрелки (при взгляде сзади) (рис. 9а) и прекращает вращение, когда левая сторона тела оказывается внизу. Дальнейшему повороту физически препятствует выпуклая нервная трубка (рис. 9б).

За счет того, что вителлиновая оболочка вдвое больше самой личинки (560 мкм против 280 мкм), только левая сторона нейрулы непосредственно контактирует с вителлиновой оболочкой. Этот контакт и запускает экспрессию *nodal* на левой стороне тела личинки и ее дальнейшую асимметризацию: в случае искусственно вызванного (центрифугированием или сжатием) контакта вителлиновой оболочки с правой стороной тела эмбриона экспрессия *nodal* возникает также и справа (Nishide et al., 2012). Запуск каскада *Nodal* вызывается белками, локализованными на внутренней

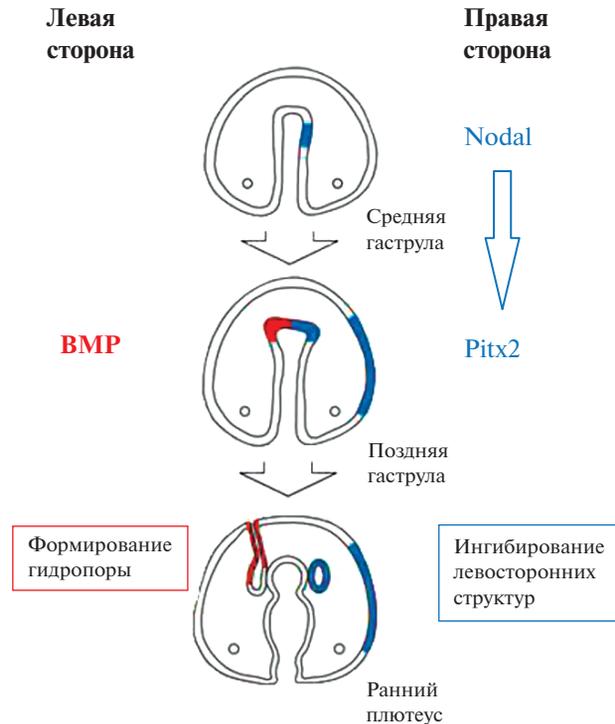


Рис. 10. Сигнальный каскад Nodal и асимметричное развитие личинки морского ежа. © 2014 Wiley. Используется с разрешения Su Y.H. Telling left from right: Left-right asymmetric controls in sea urchins // Genesis, John Wiley & Sons.

поверхности вителлиновой оболочки, а реснички не участвуют в этом процессе (Tanaka et al., 2019).

Морские ежи: лево-правый организатор асимметрии, расположенный в первичной кишке

Лево-правая асимметрия у билатерально-симметричной личинки морского ежа проявляется в формировании зачатка тела взрослого животного: левый целомический мешок прорывается на поверхность тела личинки отверстием-гидропорой, а в дальнейшем образует так называемый рудимент, закладку, из которой разовьется взрослое животное (Duboc et al., 2005). У личинок морских ежей *P. lividus* и *S. pallidus* обнаружена асимметричная экспрессия гена *nodal*, вначале в вентральной эндомезодерме архентерона личинки, а затем и в эктодерме. В отличие от хордовых, у которых *nodal* экспрессируется слева, у иглокожих *nodal* маркирует правую сторону тела, не позволяя ей развиваться по левостороннему сценарию и образовывать эктопическую закладку рудимента (Duboc et al., 2005). При этом важно отметить, что исходная область экспрессии *nodal* находится на вентральной стороне личинки, а не на дорзальной, как у хордовых. Это служит дополнительным аргументом в пользу гомологии дорзальной стороны хордовых и вентральной стороны иглокожих (Blum et al., 2009). Помимо *nodal*, у морского ежа найден его репрессор *lefty*, который не поз-

воляет сигналу *nodal* распространяться на левую сторону тела личинки (Molina et al., 2013), и ген *pitx2*, который находится под контролем *nodal* и вовлечен в регуляцию развития асимметрии тела (рис. 10) (Su, 2014).

На роль лево-правого организатора у морских ежей претендует участок архентерона. У личинок морских ежей на стадии гастрюлы обнаружены реснички, расположенные на мезэктодермальных клетках переднего конца архентерона и обращенные в его полость (рис. 11б). Каждая клетка несет на апикальной поверхности по одной ресничке, смещенной к заднему краю клетки (рис. 11г), и эти реснички совершают вращательные движения. В случае удаления ресничек с клеток архентерона нарушается правильная экспрессия *nodal* (Tisler et al., 2016). Все это позволяет предположить наличие у морского ежа механизма запуска сигнального каскада Nodal при помощи подвижных ресничек и тока жидкости, схожего с таковым механизмом у позвоночных.

СПОСОБЫ УСТАНОВЛЕНИЯ АСИММЕТРИЗАЦИИ У ПЕРВИЧНОРОТЫХ ЖИВОТНЫХ

В группу двустороннесимметричных животных Bilateria, помимо таксона вторичноротых — Deuterostomia, входит обширная и разнообразнейшая группа первичноротых — Protostomia. Среди ее

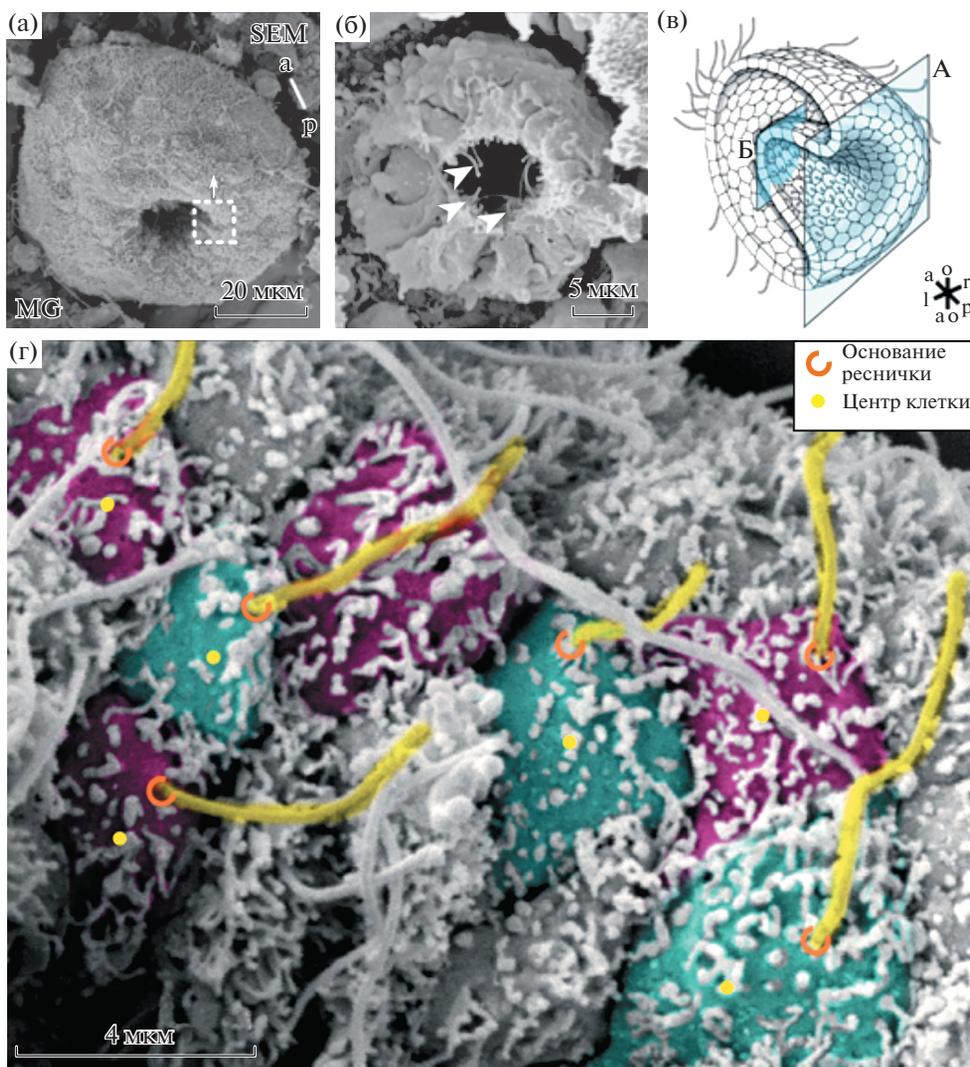


Рис. 11. Лево-правый организатор личинки морского ежа. (а) Срез через бластопор гастрюлы. (б) Срез через переднюю область архентерона, стрелками указаны реснички. (в) Схема гастрюлы морского ежа. (г) Заднее положение ресничек на апикальных поверхностях клеток передней области архентерона. Адаптировано из Tisler et al., 2016, согласно условиям Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

представителей также распространена внешняя и внутренняя асимметрия тела, чрезвычайно интересная для изучения. Protostomia делятся на группы Lophotrochozoa и Ecdysozoa, в каждой из которых представлены свои способы установления лево-правой асимметрии.

Моллюски Gastropoda: спиральное дробление и ген с материнским эффектом

Говоря о лево-правой асимметрии таксона Lophotrochozoa, следует в первую очередь рассмотреть брюхоногих моллюсков. Именно с них началось изучение асимметрии у животных (Boycott, Diver, 1923). Существуют виды с правозакрученной или левозакрученной раковиной, а также виды, у которых закрученность раковины индивидуально

изменчива. Помимо спиральной раковины, внутренние органы гастропод тоже асимметричны. Декстральные и синистральные особи являются зеркальным отражением друг друга, хотя зеркальность процессов эмбриогенеза оспаривается некоторыми авторами (Shibazaki et al., 2004). Показано, что хиральность улитки *Lymnaea stagnalis* обусловлена одним геном с материнским эффектом, причем декстральный аллель является доминантным. Таким образом, если в геноме матери хотя бы один аллель из двух декстральный, ее потомки будут правозакрученными, даже если их собственные аллели этого гена оба синистральны. Если в синистральную яйцеклетку ввести немного цитоплазмы из декстральной, то яйцеклетка сменит хиральность на декстральную, в то время

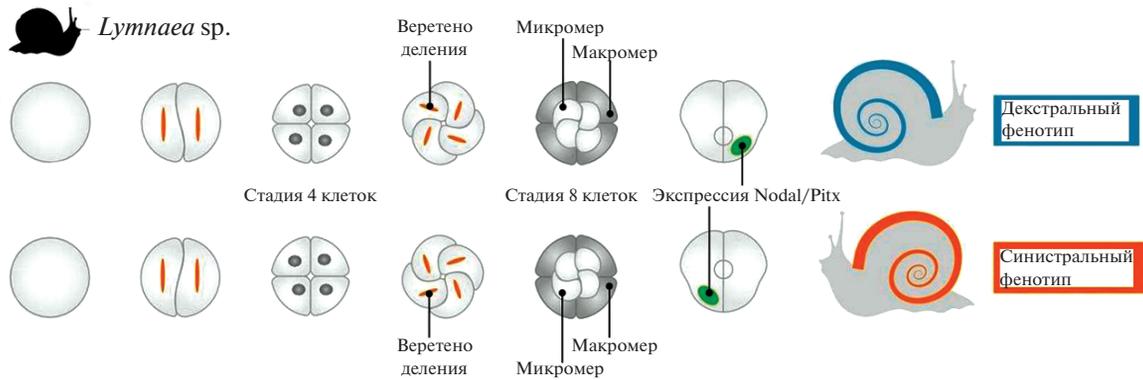


Рис. 12. Зеркальное развитие декстрального и синистрального фенотипов у гастропод. © 2014 Wiley. Используется с разрешения Coutelis et al. Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa // EMBO Reports, John Wiley & Sons.

как обратная операция не приведет к изменению хиральности (Coutelis et al., 2014).

На роль искомого фактора хиральности выдвигаются два гена, кодирующие формины — белки, участвующие в построении актинового цитоскелета (Kuroda et al., 2016). В пользу этой гипотезы говорит то, что разрушение микротрубочек на стадии 4 бластомеров не влияет на установление лево-правой оси, а разрушение актиновых микрофиламентов нарушает формирование этой оси (Shibazaki et al., 2004). По последним данным, полученным с помощью технологии CRISPR/Cas9, нокаут гена формины *lsdia 1* у декстральных улиток приводит к появлению у них строго синистрального потомства, наследующего это изменение. Таким образом, именно *lsdia 1* является искомым “геном хиральности”. Это ген с материнским эффектом: белковый продукт присутствует в яйцеклетке и определяет будущую хиральность эмбриона уже на стадии зиготы на внутриклеточном уровне (Abe, Kuroda, 2019).

Внешние признаки лево-правой асимметрии у гастропод проявляются при третьем делении дробления, когда митотические веретена четырех бластомеров отклоняются от вертикальной оси. Это приводит к визуальному повороту отделившегося квартета микромеров относительно макромеров — по или против часовой стрелки. Такое дробление называют спиральным, и оно характерно для группы Spiralia. Показано, что путем аккуратного искусственного поворота квартета микромеров можно добиться полного изменения хиральности улитки, причем полученные животные были здоровы и фертильны, однако подобные изменения хиральности не наследуются (Kuroda et al., 2009).

У моллюсков отмечены гомологи генов *nodal* и *pitx*, которые у хордовых отвечают за асимметрию. В результате дробления зародыша гомологи *nodal* и *pitx* тоже экспрессируются асимметрично: на правой стороне у декстральных особей и на ле-

вой — у синистральных (рис. 12). В дальнейшем эти белки обуславливают всю асимметрию взрослого организма, вероятно, через посредничество морфогена *Dpp*. При введении ингибитора, специфичного к суперсемейству TGF- β (к которому относятся *Nodal* и *Dpp*), асимметрия пропадала, и раковины улиток имели конусовидную незакрученную форму (Grande, Patel, 2009).

Характерный для брюхоногих моллюсков торсионный поворот (то есть разворот внутренностного мешка на 180° в ходе онтогенеза), являющийся одним из проявлений морфологической асимметрии, долгое время считался результатом мышечного усилия личинки, однако показано (Kurita, Wada, 2011), что он происходит из-за интенсивной пролиферации потомков клеток, экспрессировавших *nodal* на более ранних этапах эмбриогенеза. Воздействие на личинку морского блюдечка *Nipponacmea fuscoviridis* ингибитора к белкам суперсемейства TGF- β приводило к подавлению пролиферации этих клеток, и торсионного поворота не происходило.

НЕМАТОДА: ПОВОРОТЫ БЛАСТОМЕРОВ И НЕКАНОНИЧЕСКИЙ Wnt-ПУТЬ

Среди группы Ecdysozoa излюбленным модельным объектом биологов является нематода *Caenorhabditis elegans*. Нематоды относятся к организмам с хорошо выраженными клеточными линиями, и в многочисленных исследованиях прослежена судьба каждой клетки *C. elegans*. Несмотря на это, первичный стимул к нарушению билатеральной симметрии точно не известен. Первое проявление асимметрии приходится на стадию четырех клеток. При подготовке к делению передний и задний дорсальные бластомеры немного поворачиваются направо, и митотическая ось в каждом из них перестает быть перпендикулярной антериопостериорной оси. В результате после деления этих

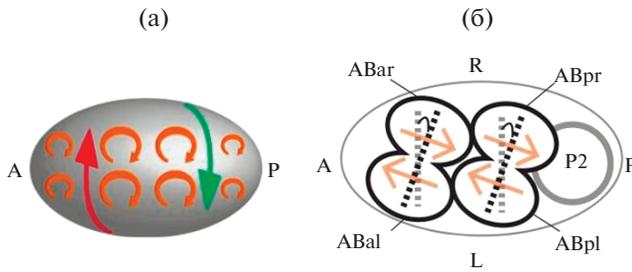


Рис. 13. Эмбрион нематоды на стадии зиготы (а) и шести клеток (б). А и Р – передняя и задние стороны тела эмбриона, L и R – левая и правая стороны. Стрелками показано направление потока кортикального актинового слоя. Адаптировано из Naganathan et al., 2014, согласно условиям Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

модействия миозина с актином в кортикальном слое вызывают механические напряжения и вращательные смещения актинового слоя по часовой стрелке (кортикальный ток). На стадии четырех бластомеров эти же хиральные вращательные моменты в кортикальном слое приводят к смещению веретена деления (Naganathan et al., 2014) (рис. 13б).

У Ecdysozoa не найдено гомологов гена *nodal*. Запуск поворота дорсальных бластомеров осуществляется через неканонический Wnt-путь. Закрепление ранее установленной морфологической лево-правой асимметрии и однозначное определение судьбы клеток происходит начиная со стадии 12 клеток, когда между парными бластомерами возникают различия в работе сигнального пути Notch (Pohl, 2011).

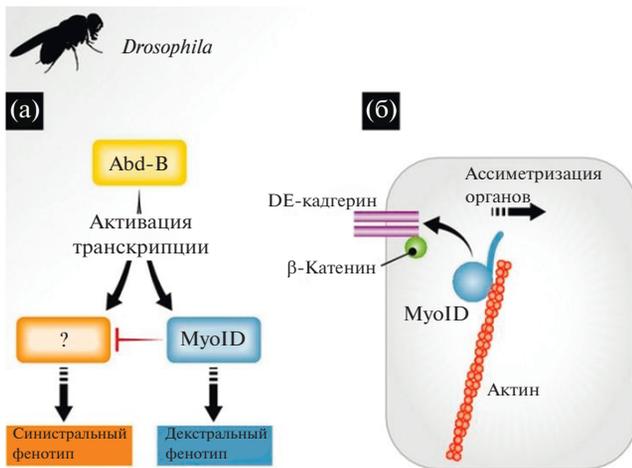


Рис. 14. Установление асимметрии у *D. melanogaster*. (а) Генетический путь определения асимметрии. (б) Взаимодействия белка Myosin Id с актиновым цитоскелетом. © 2014 Wiley. Используется с разрешения Coutelis et al. Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa // EMBO Reports, John Wiley & Sons.

ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ARTHROPODA: МИОЗИН И НАТЯЖЕНИЯ МЕМБРАН КЛЕТОК

Во всех рассмотренных выше случаях асимметрия организма устанавливалась в ходе эмбриогенеза раз и навсегда, обуславливая определенный сценарий развития органов. Тем удивительнее случай дрозофилы *D. melanogaster* (членистоногие, как и нематоды, относятся к группе Ecdysozoa), у которой отдельные органы (кишечник, семенные протоки) приобретают асимметричное строение независимо друг от друга и на разных этапах онтогенеза. Их развитие контролируется одним геном *myosin Id* (гомологичным гену позвоночных), эффекты которого приводят к “декстральному” фенотипу мух. Интересно, что выключение этого гена в конкретном органе приводит не к рандомизации асимметрии органа, как можно было бы ожидать, а к развитию локального “синистрального” фенотипа (Spéder et al., 2006). Сам ген *myosin Id* контролируется одним из Нох-генов *abd-B*, и при выключении этого гена асимметрия вовсе не развивается (Coutelis et al., 2013). Подобные эффекты воздействия на сигнальный каскад позволяют предположить наличие еще не открытого “синистрального” пути, который активируется продуктом гена *abd-B* и ингибируется параллельным “декстральным” путем через *myosin Id*, а в его отсутствие направляет орган по синистральному пути развития (рис. 14а).

Продукт гена *myosin Id* – белок из семейства миозинов, способный перемещать грузы вдоль нити актина за счет энергии АТФ. Для установления асимметрии той или иной структуры в организме дрозофилы этот белок в клетках данной структуры связывается с клеточной мембраной через DE-кадгерин и β-катенин (рис. 14б). Также показана передача сигнала на мембрану через атипичный кадгерин Ds (González-Morales et al., 2015). За счет перемещения миозина вдоль актиновых микрофиламентов возникает асимметричное натяжение мембраны, которое, по-видимо-

бластомеров оказывается, что левый бластомер в каждой паре расположен ближе к будущей голове, чем правый (Pohl, 2011). В движениях бластомеров задействована система актиновых микрофиламентов и система микротрубочек: разрушение любой из них прекращает поворот бластомеров и асимметризацию эмбриона нематоды (Naganathan et al., 2014).

В движениях бластомеров участвуют PAR-белки и G-белки, совместное действие которых вызывает направленные смещения кортикального слоя клетки и митотического веретена (Pohl, Bao, 2010). Хиральные повороты кортикального слоя цитоплазмы отмечены у эмбриона *C. elegans* уже на стадии зиготы (рис. 13а). Показано, что взаи-

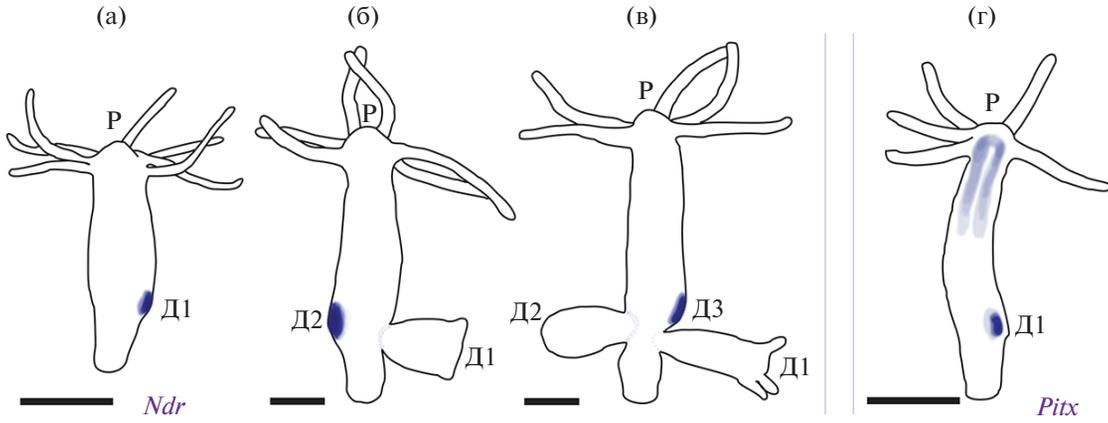


Рис. 15. Экспрессия *Ndr* и *Pitx* в зачатках боковых почек гидры. По данным Watanabe et al., 2014.

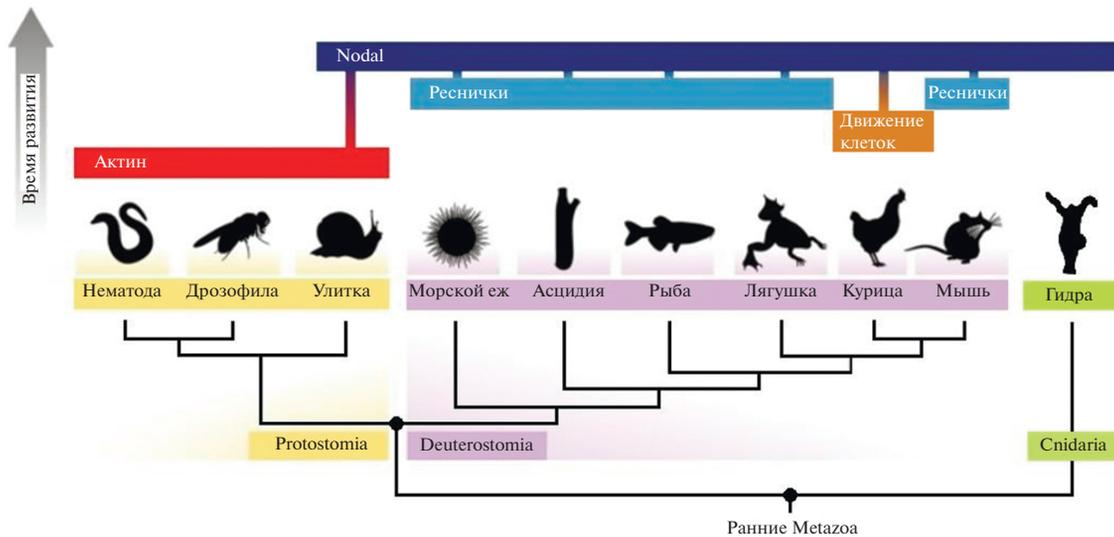


Рис. 16. Способы установления асимметрии на филогенетическом древе Metazoa. © 2014 Wiley. Используется с разрешения Coutelis et al. Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa // EMBO Reports, John Wiley & Sons.

му, и определяет дальнейшую латерализацию. Интересно, что в отсутствие миозина натяжения мембраны все равно наблюдаются, что указывает на сходную с миозином природу пока неизвестного “синистрального” фактора (Coutelis et al., 2014).

CNIDARIA: ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА NODAL ПРИ ПОЧКОВАНИИ

До сих пор асимметрию в строении тела было принято рассматривать у билатерий. Однако недавно было показано (Watanabe et al., 2014), что предпосылки к лево-правой асимметрии имеются и у сестринской с Bilateria группы – радиально-симметричных Cnidaria. Так, пресноводные по-

липы рода *Hydra* временно приобретают черты двусторонней симметрии при почковании. Было показано, что в зачатке почки дочернего полипа экспрессируется ген *ndr*, имеющий значительное сходство с *nodal* у билатерий. Более того, этот ген запускает экспрессию гена *pitx* (рис. 15). Помимо этого, в геноме гидры найдены гены-репрессоры *nodal*, принадлежащие семействам *Cerberus* и *Dan*, и *smad2/3*, задействованные в передаче сигнала от *nodal*. Таким образом, уже у гидры присутствует как минимум часть сигнального каскада Nodal.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы установления асимметрии в разных группах животных можно сгруппировать по

нескольким характерным признакам. Биение ресничек, создающих направленный ток жидкости, как причина запуска асимметричной экспрессии генов характерна для всех групп позвоночных, кроме птиц (изученных на примере курицы) и отдельных видов млекопитающих (свинья). Обнаруживаются значительные сходства в морфогенезе, строении и функционировании лево-правого организатора асимметрии у млекопитающих, амфибий и рыб. Закономерно предположить, что ресничный лево-правый организатор асимметрии является базальным признаком позвоночных, бывшим у их общего предка, а случаи его отсутствия у курицы и свиньи являются результатом вторичной утраты этой структуры и, как следствие, утраты “ресничного” способа установления асимметрии.

Обнаружение “ресничных механизмов” установления асимметрии у асцидий и, главное, у иглокожих позволяет строить еще более смелые предположения. Ресничный организатор асимметрии иглокожих обнаруживает определенные сходства с таковым у позвоночных: расположение в первичной кишке, подвижные реснички, смещенные к заднему краю клетки, асимметрично направленный ток жидкости в первичной кишке, приводящий к экспрессии генов, регулирующих установление асимметрии. Вполне вероятно, что и иглокожие, и хордовые унаследовали сходный механизм асимметризации от общего предка, что отодвигает время возникновения ресничного лево-правого организатора асимметрии на еще более раннее эволюционное время, к предку всей клады вторичноротых.

Перестройки актинового цитоскелета необходимы для установления асимметрии, по крайней мере, у первичноротых. У нематоды *C. elegans*, дрозофилы *D. melanogaster* и улитки *L. stagnalis* натяжение актиновых филаментов вызывает механические напряжения в кортикальном слое клеток, приводящие к смещению веретен деления клеток. Интересно, что в этом процессе задействован ген *myosin Id*, гомологи которого у позвоночных также оказались необходимы для установления асимметрии. Таким образом, роль актинового цитоскелета в установлении лево-правой асимметрии и эволюционная консервативность этой роли остаются интересными темами для изучения.

Сигнальный каскад Nodal является эволюционно консервативной генетической основой асимметрии у представителей всех изученных групп вторичноротых. Это позволяет с уверенностью заключить, что уже у предка вторичноротых этот каскад выполнял важную роль в установлении асимметрии.

В группе первичноротых ситуация не столь однозначная. У Ecdysozoa не найдено генов, гомологичных генам сигнального каскада Nodal, а в

группе Lophotrochozoa роль этого каскада изучена только у брюхоногих моллюсков, у которых механизм установления асимметрии на клеточном уровне отличается от такового у вторичноротых. Поэтому вопрос о том, участвовал ли сигнальный каскад Nodal в установлении асимметрии у общего предка первичноротых, остается в значительной степени открытым и требует дальнейших исследований. Тем не менее, факт участия одного и того же каскада в установлении асимметрии у представителей как первично-, так и вторичноротых позволяет предположить его сходную функцию и у их общих предков — базальных билатерий.

Недавняя находка сигнального каскада Nodal у представителя кишечнополостных, гидры, отодвигает его возникновение до общего предка Cnidaria и Bilateria, что позволяет предположить, что этот каскад был уже у ранних Metazoa, а его отсутствие в группе Ecdysozoa — результат вторичной утраты (рис. 16).

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю моего научного руководителя Станислава Валерьевича Кремнева за помощь в написании статьи, а также Юлию Александровну Краус за ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа сделана в рамках госзадания НИР “Клеточные и молекулярные основы морфогенетических реакций на механические напряжения”, номер договора: 30-2-16, номер ЦИТИС: АААА-А16-116021660089-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abe M., Kuroda R.* The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin Lsdial as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling // *Development*. 2019. V. 146. № 9. P. dev175976.
- Afzelius B.A.* A human syndrome caused by immotile cilia // *Science*. 1976. V. 193. № 4250. P. 317–319.
- Blum M., Andre P., Muders K. et al.* Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo // *Differentiation*. 2007. V. 75. № 2. P. 133–146.
- Blum M., Weber T., Beyer T. et al.* Evolution of leftward flow // *Semin. Cell Dev. Biol. Academic Press*, 2009. V. 20. № 4. P. 464–471.
- Boycott A.E., Diver C.* On the inheritance of sinistrality in *Limnaea peregra* // *Proc. R. Soc. London, Ser. B*. 1923. V. 95. № 666. P. 207–213.
- Cartwright J.H.E., Piro O., Tuval I.* Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates // *PNAS*. 2004. V. 101. № 19. P. 7234–7239.
- Chen C., Norris D., Bhattacharya S.* Transcriptional control of left-right patterning in cardiac development // *Pediatr. Cardiol.* 2010. V. 31. № 3. P. 371–377.

- Coutelis J.B., Géminard C., Spéder P. et al.* Drosophila left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene abdominal-B // *Dev. Cell.* 2013. V. 24. № 1. P. 89–97.
- Coutelis J. B., González-Morales N., Géminard C. et al.* Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa // *EMBO Rep.* 2014. P. e201438972.
- Duboc V., Röttinger E., Lapraz F. et al.* Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side // *Dev. Cell.* 2005. V. 9. № 1. P. 147–158.
- Essner J.J., Amack J.D., Nyholm M.K. et al.* Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut // *Development.* 2005. V. 132. № 6. P. 1247–1260.
- Esteban C.R., Capdevila J., Economides A.N. et al.* The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry // *Nature.* 1999. V. 401. № 6750. P. 243.
- Field S., Riley K.L., Grimes D.T. et al.* Pkd111 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2 // *Development.* 2011. V. 138. № 6. P. 1131–1142.
- González-Morales N., Géminard C., Lebreton G. et al.* The atypical cadherin dachsous controls left-right asymmetry in Drosophila // *Dev. Cell.* 2015. V. 33. № 6. P. 675–689.
- Grande C., Patel N.H.* Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails // *Nature.* 2009. V. 457. № 7232. P. 1007–1011.
- Gros J., Feistel K., Viebahn C. et al.* Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick // *Science.* 2009. V. 324. № 5929. P. 941–944.
- Hamada H.* Roles of motile and immotile cilia in left-right symmetry breaking // *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease.* Springer, Tokyo, 2016. P. 57–65.
- Hojo M., Takashima S., Kobayashi D. et al.* Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle // *Dev. Growth Differ.* 2007. V. 49. № 5. P. 395–405.
- Kurita Y., Wada H.* Evidence that gastropod torsion is driven by asymmetric cell proliferation activated by TGF- β signalling // *Biol. Lett.* 2011. V. 7. № 5. P. 759–762.
- Kuroda R., Endo B., Abe M. et al.* Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails // *Nature.* 2009. V. 462. № 7274. P. 790–794.
- Kuroda R., Fujikura K., Abe M. et al.* Diaphanous gene mutation affects spiral cleavage and chirality in snails // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 34809.
- Lee J.D., Anderson K.V.* Morphogenesis of the node and notochord: the cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. № 12. P. 3464–3476.
- Levin M., Johnson R.L., Sterna C.D. et al.* A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis // *Cell.* 1995. V. 82. № 5. P. 803–814.
- Lin C.Y., Tsai M.Y., Liu Y.H. et al.* Klf8 regulates left-right asymmetric patterning through modulation of Kupffer's vesicle morphogenesis and spaw expression // *J. Biomed. Sci.* 2017. V. 24. № 1. P. 45.
- Logan M., Pagán-Westphal S.M., Smith D.M. et al.* The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals // *Cell.* 1998. V. 94. № 3. P. 307–317.
- Long S., Ahmad N., Rebagliati M.* The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry // *Development.* 2003. V. 130. № 11. P. 2303–2316.
- Mahaffey J.P., Grego-Bessa J., Liem K.F. et al.* Cofilin and Vangl2 cooperate in the initiation of planar cell polarity in the mouse embryo // *Development.* 2013. V. 140. № 6. P. 1262–1271.
- McGrath J., Somlo S., Makova S. et al.* Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse // *Cell.* 2003. V. 114. № 1. P. 61–73.
- Meno C., Shimono A., Saijoh Y. et al.* lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal // *Cell.* 1998. V. 94. № 3. P. 287–297.
- Molina M.D., de Crozé N., Haillot E. et al.* Nodal: master and commander of the dorsal-ventral and left-right axes in the sea urchin embryo // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. № 4. P. 445–453.
- Morokuma J., Ueno M., Kawanishi H. et al.* HrNodal, the ascidian nodal-related gene, is expressed in the left side of the epidermis, and lies upstream of HrPitx // *Dev. Genes Evol.* 2002. V. 212. № 9. P. 439–446.
- Naganathan S.R., Fürthauer S., Nishikawa M. et al.* Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left-right symmetry breaking // *Elife.* 2014. V. 3. P. e04165.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal Table of *Xenopus laevis*. 1994. P. 268.
- Nishide K., Mugitani M., Kumano G. et al.* Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae // *Development.* 2012. V. 139. № 8. P. 1467–1475.
- Nonaka S., Shiratori H., Saijoh Y. et al.* Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow // *Nature.* 2002. V. 418. № 6893. P. 96–99.
- Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y. et al.* Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein // *Cell.* 1998. V. 95. № 6. P. 829–837.
- Nonaka S., Yoshida S., Watanabe D. et al.* De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 8. P. e268.
- Okada Y., Nonaka S., Tanaka Y. et al.* Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice // *Mol. Cell.* 1999. V. 4. № 4. P. 459–468.
- Okii S., Hashimoto R., Okui Y. et al.* Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo // *Development.* 2007. V. 134. № 21. P. 3893–3904.

- Pagán-Westphal S.M., Tabin C.J.* The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis // *Cell*. 1998. V. 93. № 1. P. 25–35.
- Pohl C., Bao Z.* Chiral forces organize left-right patterning in *C. elegans* by uncoupling midline and anteroposterior axis // *Dev. Cell*. 2010. V. 19. № 3. P. 402–412.
- Pohl C.* Left-right patterning in the *C. elegans* embryo: Unique mechanisms and common principles // *Commun. Integr. Biol*. 2011. V. 4. № 1. P. 34–40.
- Saijoh Y., Oki S., Ohishi S. et al.* Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node // *Dev. Biol*. 2003. V. 256. № 1. P. 161–173.
- Saydmohammed M., Yagi H., Calderon M. et al.* Vertebrate myosin 1d regulates left-right organizer morphogenesis and laterality // *Nat. Commun*. 2018. V. 9. № 1. P. 3381.
- Schröder S.S., Tsikolia N., Weizbauer A. et al.* Paraxial nodal expression reveals a novel conserved structure of the left-right organizer in four mammalian species // *Cells Tissues Organs*. 2016. V. 201. № 2. P. 77–87.
- Schweickert A., Vick P., Getwan M. et al.* The nodal inhibitor Coco is a critical target of leftward flow in *Xenopus* // *Curr. Biol*. 2010. V. 20. № 8. P. 738–743.
- Schweickert A., Weber T., Beyer T. et al.* Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus* // *Curr. Biol*. 2007. V. 17. № 1. P. 60–66.
- Shibasaki Y., Shimizu M., Kuroda R.* Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo // *Curr. Biol*. 2004. V. 14. № 16. P. 1462–1467.
- Shinohara K., Kawasumi A., Takamatsu A. et al.* Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo // *Nat. Commun*. 2012. V. 3. P. 622.
- Shiraishi I., Ichikawa H.* Human heterotaxy syndrome // *Circ. J*. 2012. P. CJ-12-0957.
- Shiratori H., Hamada H.* The left-right axis in the mouse: from origin to morphology // *Development*. 2006. V. 133. № 11. P. 2095–2104.
- Spéder P., Ádám G., Noselli S.* Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila* // *Nature*. 2006. V. 440. № 7085. P. 803–807.
- Su Y.H.* Telling left from right: Left-right asymmetric controls in sea urchins // *Genesis*. 2014. V. 52. № 3. P. 269–278.
- Sulik K., Dehart D.B., Inagaki T. et al.* Morphogenesis of the murine node and notochordal plate // *Dev. Dyn*. 1994. V. 201. № 3. P. 260–278.
- Supp D.M., Witte D.P., Potter S.S. et al.* Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice // *Nature*. 1997. V. 389. № 6654. P. 963–966.
- Tanaka Y., Okada Y., Hirokawa N.* FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination // *Nature*. 2005. V. 435. № 7039. P. 172–177.
- Tanaka Y., Yamada S., Connop S.L. et al.* Vitelline membrane proteins promote left-sided nodal expression after neurula rotation in the ascidian, *Halocynthia roretzi* // *Dev. Biol*. 2019. V. 449. № 1. P. 52–61.
- Tingler M., Kurz S., Maerker M. et al.* A conserved role of the unconventional myosin 1d in laterality determination // *Curr. Biol*. 2018. V. 28. № 5. P. 810–816. e3.
- Tisler M., Wetzel F., Mantino S. et al.* Cilia are required for asymmetric nodal induction in the sea urchin embryo // *BMC Dev. Biol*. 2016. V. 16. № 1. P. 28.
- Tsikolia N., Schröder S., Schwartz P. et al.* Paraxial left-sided nodal expression and the start of left-right patterning in the early chick embryo // *Differentiation*. 2012. V. 84. № 5. P. 380–391.
- Watanabe H., Schmidt H.A., Kuhn A. et al.* Nodal signalling determines biradial asymmetry in *Hydra* // *Nature*. 2014. V. 515. № 7525. P. 112.
- Yamada S., Tanaka Y., Imai K.S. et al.* Wavy movements of epidermis monocilia drive the neurula rotation that determines left-right asymmetry in ascidian embryos // *Dev. Biol*. 2019. V. 448. № 2. P. 173–182.
- Yu J.K., Holland L.Z., Holland N.D.* An amphioxus nodal gene (AmphiNodal) with early symmetrical expression in the organizer and mesoderm and later asymmetrical expression associated with left-right axis formation // *Evol. Dev*. 2002. V. 4. № 6. P. 418–425.
- Yuan S., Zhao L., Brueckner M. et al.* Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry // *Curr. Biol*. 2015. V. 25. № 5. P. 556–567.
- Zhu L., Belmont J.W., Ware S.M.* Genetics of human heterotaxias // *Eur. J. Hum. Genet*. 2006. V. 14. № 1. P. 17.

Evolutionary Diversity of the Mechanisms Providing the Establishment of Left-Right Asymmetry in Metazoans

N. D. Petri*

Department of Embryology, Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie Gory 1-12, Moscow, 199923 Russia

**e-mail: petri1543@inbox.ru*

Received November 1, 2019; revised November 27, 2019; accepted December 1, 2019

Left-right asymmetry is an important feature of the bilaterian animals body plan. Malformations of left-right axis result in pathologies of varying severity, therefore, studying the mechanisms of its establishment in embryonic development is important for the fundamental science and for the medicine. The main question to answer in the course of research work is how and when the symmetry breakage in a developing organism oc-

curs. This area of research is intensely developing, and various mechanisms of left-right axis establishment have already been discovered in animals of different phylogenetic groups. Unfortunately, comparative studies of these mechanisms often focus on a few phylogenetically distant objects of developmental biology and do not analyse the diversity that exists within the taxonomic groups. Therefore, this review aims to show the variety of mechanisms for establishing left-right asymmetry in the early development of metazoans; to make assumptions about the evolutionary conservatism of these mechanisms; to find out which of the mechanisms is basal for the Bilateria and for the Metazoa in general. The article systematizes our knowledge about the establishment of left-right asymmetry on the basis of the Nodal signaling cascade activity; compares the morphology and functioning of the left-right organizers of different animals; compares the role of mechanical tensions in establishing asymmetry in different Protostomia. Generalization and analysis of data on the establishment of left-right asymmetry provides a new insight into the evolution of the development of multicellular animals.

Keywords: left-right asymmetry establishment, left-right organizer, body plan, metazoans, bilaterians, Nodal, development

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 577.217.5+57.085.23:57.017

ПЕПТИДЫ СЕМАКС И HLDF-6, ВВЕДЕННЫЕ КРЫСАМ РАЗНОГО
ВОЗРАСТА, РЕГУЛИРУЮТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА В ГЕПАТОЦИТАХ,
ИСПРАВЛЯЯ НАРУШЕНИЯ ПРИ СТАРЕНИИ

© 2020 г. В. Я. Бродский^{а, *}, Ю. А. Золотарев^б, Л. А. Мальченко^а, Л. А. Андреева^б,
Д. С. Лазарев^с, Н. Н. Буторина^а, В. С. Козик^б, Н. Ф. Мясоедов^б

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бИнститут молекулярной генетики РАН, пл. Академика Курчатова, 2, Москва, 123182 Россия

^сРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117513 Россия

*e-mail: brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 04.06.2019 г.

После доработки 01.10.2019 г.

Принята к публикации 10.10.2019 г.

Для уточнения организующего действия пептидов семакс и HLDF-6 на кинетику синтеза белка в гепатоцитах, в дополнение к исследованию *in vitro* (Бродский и др., 2019) изучили эффекты этих пептидов *in vivo* после внутрибрюшинной их инъекции крысам разного возраста. Исследовали окологосударственной (ультрадианный) ритм синтеза белка, маркер прямых межклеточных отношений. Молодым, половозрелым или старым крысам внутрибрюшинно вводили пептиды – в дозах 50–100 мкг/кг. Выделяли гепатоциты и ставили редкие или плотные культуры. У молодых крыс, получивших тот или иной пептид, в их редких суточных культурах обнаружили ритм синтеза белка; у крыс того же возраста, которым инъецировали физраствор, ритма в таких культурах не было. В плотных культурах старых крыс после введения пептида амплитуды ритма синтеза белка не отличались от ритма молодых крыс; после инъекции физраствора амплитуды ритма были вдвое ниже. Инъекция пептида взрослым крысам, получившим до этого дофамин, обнаружила нормальный для крыс этого возраста ритм синтеза белка; инъекция только дофамина ликвидировала ритм. Регуляторный эффект пептидов сохранялся по меньшей мере 2 дня после однократного их введения крысе. Рекомендуется использование семакса или HLDF-6 для улучшения состояния старых людей, компенсации нарушений кинетики синтеза белка при старении и патологии.

Ключевые слова: пептиды, ритм синтеза белка, старение

DOI: 10.31857/S0475145020020032

ВВЕДЕНИЕ

Ранее, вводя в среду с культурами гепатоцитов крысы пептид семакс или другой регуляторный пептид HLDF6, мы обнаружили изменения кинетики синтеза белка, благоприятные для клеток, выделенных от старых животных (Бродский и др., 2019). Определяли окологосударственной ритм синтеза белка. Ритм, характеризующий синхронизацию клеток путем прямых межклеточных взаимодействий, находят в плотных культурах крыс любого возраста. Но в культурах старых животных амплитуды ритма значительно ниже, чем у молодых. Добавление пептидов в среду с такими культурами повышало амплитуды ритма почти вдвое, до уровня ритма культур, выделенных от молодых животных. Для того чтобы рекомендовать исследуемые пептиды для улучшения состояния старых людей, следовало определить их эффекты

in vivo, при введении их животным. Доходят ли лекарства до печени с кровью и, если поступают в межклеточную среду, действуют ли как в культуре при прямом их действии на клетки? Можно ли также рекомендовать пептиды для компенсации действия веществ, нарушающих кинетику синтеза белка, блокирующих активность соответствующих рецепторов? При положительных ответах следовало выяснить, как долго сохраняется благоприятное для кинетики синтеза белка действие пептидов?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты поставлены на старых (2–2.5 года, вес 480–600 г) и молодых, половозрелых (3–4 мес., вес 200–300 г) крысах самцах Вистар. Крысам внутрибрюшинно вводили пептид – семакс или

HLDF6 в дозах 60–100 мкг/кг для семакса или 50–60 мкг/кг для HLDF6. Предварительно исследовали эффекты меньших и больших доз. Через 60 мин из печени выделяли гепатоциты, ставили плотные или редкие культуры и через сутки исследовали кинетику синтеза белка. В некоторых опытах крысы получали пептид с кормом. Контроли: физиологический раствор, а для семакса – смесь аминокислот, составляющих этот гептапептид.

Методы выделения гепатоцитов, их культивирования и исследования кинетики синтеза белка многократно рассмотрены ранее, а также в недавней статье в журнале “Онтогенез” (Бродский и др., 2019). Коротко, делали следующее. Гепатоциты выделяли из печени при помощи перфузии. Для культивирования гепатоцитов использовали среду 199 без сыворотки (“ПанЭко”, Россия): к среде добавляли 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (“Sigma”, США) и 0.5 мкг/мл инсулина (“Sigma”, США); газовая смесь – 10% CO₂ и 90% воздуха. Для получения плотных культур, суспензию, содержащую ~1 × 10⁶/мл гепатоцитов, наливали в чашки Петри со стеклами, покрытыми коллагеном. Редкие культуры получали из той же суспензии гепатоцитов при разведении ее примерно в 10 раз. Через 2 ч стекла культуры (каждая на отдельном стекле) отмывали от не прикрепившихся клеток и их обломков. Через 24 ч среду меняли на нормальную, свежую среду и через 20 мин в течение 2 ч каждые 10 мин последовательно отбирали пробы по три культуры (три стекла) каждая и инкубировали их с ³H-лейцином.

Культуры каждой пробы инкубировали одновременно в течение 10 мин при 37°C в среде 199 без лейцина (“ПанЭко”, Россия) с внесенным в нее меченым ³H-лейцином (ИМГ РАН, 25–30 мкКи/мл, специфическая молярная активность 70–100 Ки/ммоль). Затем культуры промывали холодным физиологическим раствором с избытком немеченого лейцина и обрабатывали 5%-ной хлорной кислотой в течение 60 мин, после чего промывали спиртом, белки растворяли гиамином (бензетониум хлорид; “Sigma”, США). Включение ³H-лейцина в белки и радиоактивность свободного лейцина (кислоторастворимая фракция) измеряли на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2810TR (“Perkin Elmer”, США). Для каждой культуры рассчитывали относительное к кислоторастворимой фракции включение лейцина в белки Incorr. Такие относительные величины нормализуют культуры по числу клеток, а также по небольшой вариабельности температуры в течение опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку любой популяционный околочасовой ритм организуется в клеточной культуре только путем прямых межклеточных взаимодействий (обзоры: Бродский, 2014, 2018), каждое обнаружение ритма – однозначный показатель таких взаимодействий. Отсутствие ритма также определенно говорит о том, что клетки не взаимодействуют. Опыты, примеры которых даются на рис. 1–7, повторяли, но значимы и единичные результаты. Амплитуды ритма характеризуют выраженность прямых межклеточных взаимодействий, кооперации клеток в организации ритма.

Некоторые другие предварительные замечания. Возраст крысы, как известно, характеризует ее вес (Гамбарян, Дукельская, 1955). Крысы растут всю свою жизнь – до 2–3 лет. Масса тела молодых половозрелых крыс – 180–300 г, вес старых 2-летних крыс около 500 г и более. Второе: гепатоциты молодой половозрелой крысы чрезвычайно слабо пролиферирующая клеточная популяция; в пробах изученных нами культур не было делящихся клеток. Третье: культуры исследовали в бессывороточной среде, предложенной В.В. Терских и тестированной на синтез белка (Бродский и др., 1996).

На рис. 1 приведен пример исследования редких культур у молодых крыс. В таких суточных культурах, как многократно показано нами ранее, сразу после отмывания и переноса в свежую среду, ритм синтеза белка не обнаруживается. Введение крысе физиологического раствора NaCl, выделение через час гепатоцитов и постановка редких культур подтвердила этот вывод. Второй крысе примерно такого же возраста и веса ввели внутрибрюшинно семакс. После такой же, как у первой крысы, обработки в редких культурах нашли четкий околочасовой ритм синтеза белка с высокодостоверными максимумами и минимумами. У третьей крысы, которой ввели пептид HLDF-6, также выявлен ритм с тремя периодами в течение 2 ч.

Следующий опыт поставлен на плотных культурах гепатоцитов старых крыс. Как показано ранее (обзор Бродский, 2014), в клетках старых крыс амплитуда ритма синтеза белка значительно ниже, чем у молодых животных, что говорит о нарушениях кооперации клеток в организации кинетики синтеза белка. На рис. 2 этот вывод подтвержден у контрольной старой крысы. После введения второй старой крысе семакса или третьей крысе пептида HLDF-6 наблюдали ритм с высокими амплитудами.

Попутно выяснилось, что эффект семакса проявляется не только после его инъекции, но также после кормления крыс семаксом (рис. 3). В культурах гепатоцитов старых крыс, которым с кормом дали семакс или физиологический раствор (комбикорм смочили растворами соответствующей

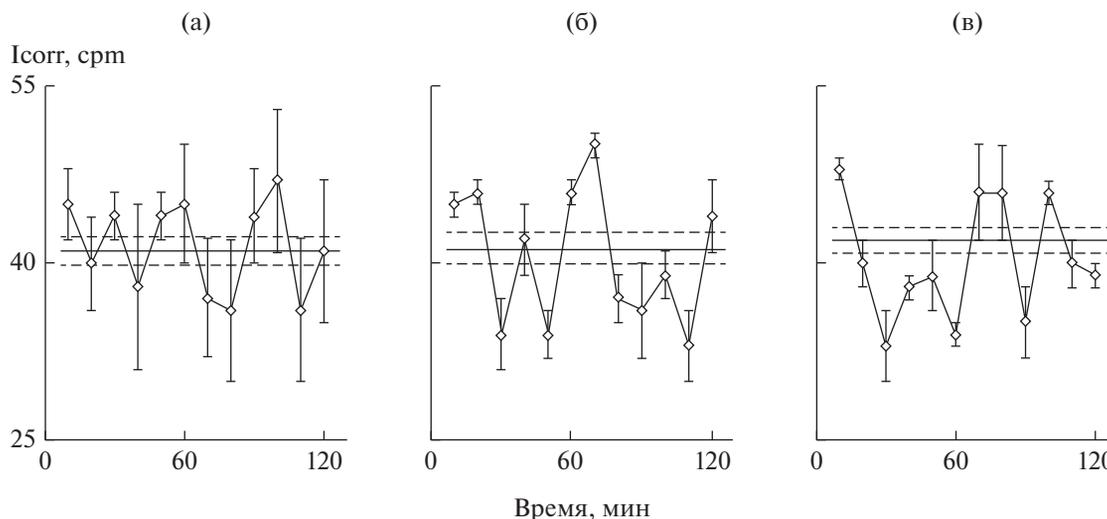


Рис. 1. Суточные редкие культуры гепатоцитов молодых крыс, внутривбрюшинные инъекции. а – крысе весом 280 г ввели физраствор, через 1 ч выделили гепатоциты и поставили культуры, через сутки исследовали кинетику синтеза белка; б – крысе весом 310 г ввели семакс – 100 мкг/кг, далее как а; в – крысе весом 320 г ввели HLDF-6 – 60 мкг/кг, далее как а. Здесь и далее: каждая точка – среднее для пробы из трех культур в данное время ± ошибка этой средней; сплошная прямая линия средний уровень синтеза белка (средняя арифметическая) (срм) для всех культур варианта опыта, в данном случае 36 культур, каждая на отдельном стекле; пунктирные прямые линии выше и ниже средней ± ошибка этой общей средней.

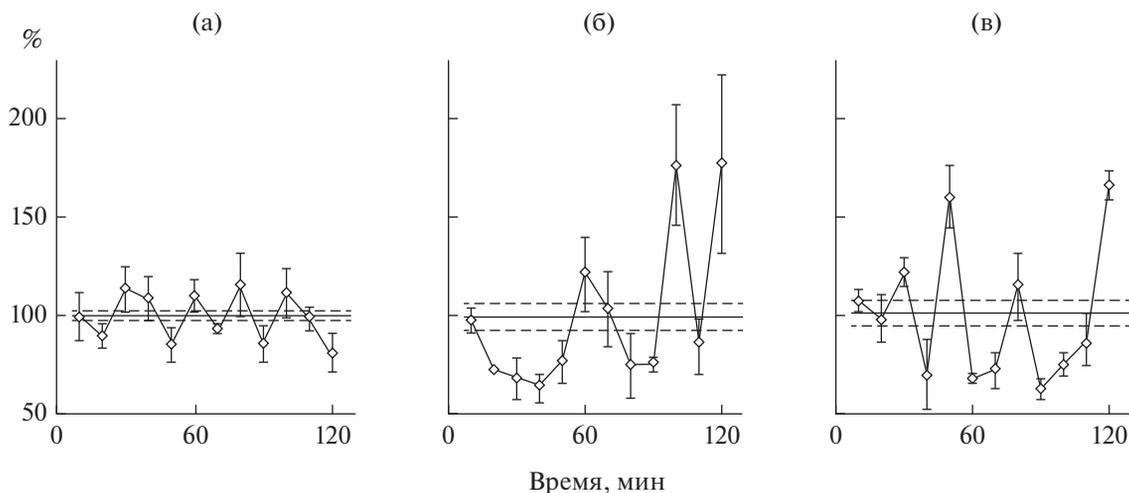


Рис. 2. Суточные плотные культуры гепатоцитов старых крыс, внутривбрюшинные инъекции. а – крысе весом 520 г ввели физраствор, через 1 ч выделили гепатоциты и поставили культуры, через сутки исследовали кинетику синтеза белка; б – крысе весом 550 г ввели семакс – 100 мкг/кг, далее как а; в – крысе весом 480 г ввели HLDF-6 – 60 мкг/кг, далее как а.

концентрации) значительно отличались амплитуды ритмов. В редких культурах молодых крыс, наркормленных семаксом, нашли ритм синтеза белка (рис. 4); в контроле в редких культурах молодой крысы ритма нет (рис. 1 и многократно ранее). Считалось, что в кишечнике пептид распадается до аминокислот. Мы предположили, что колебания синтеза белка синхронизируются при пероральном введении пептида одной из его аминокислот. Такая смесь аминокислот, составляющая семакс, бы-

ла собрана: метионин, глутаминовая кислота, гистидин, фенилаланин, пролин, глицин, пролин. После кормления молодой крысы раствором смеси аминокислот в разных концентрациях ритм синтеза белка не нашли (рис. 4). Эти опыты позволяют рекомендовать использование семакса, как лекарства, в таблетках после испытаний таблеток для нейропротекторного действия семакса, обоснованного во многих работах.

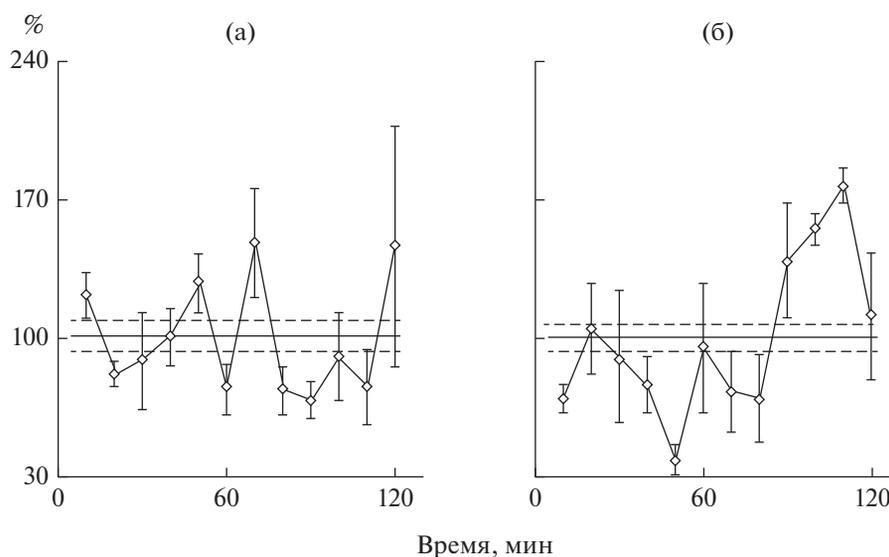


Рис. 3. Суточные плотные культуры гепатоцитов старых крыс, пероральное введение. а — крысу весом 590 г после суток голодания накормили комбикормом, смоченным физраствором, далее как рис. 1 и рис. 2а; б — крысу весом 550 г накормили комбикормом, смоченным семаксом из расчета 100 мкг/кг, далее как рис. 1 и 2.

Околочасовой ритм синтеза белка определили у бактерий, изученных одноклеточных эукариот, а у млекопитающих — в гепатоцитах и кератиноцитах, клетках околоушной и поджелудочной желез, в разных нейронах (обзор, Бродский, 2014). Как и другие фракталы, околочасовые ритмы и, в частности, ритм синтеза белка крайне нерегулярны. Такие ритмы могут быть основой функциональных и метаболических адаптаций, выбора оптимальных частот, что на разных примерах обосновано экспериментально и наблюдали в клинике (обзор, Бродский, 2018). Гепатоциты лишь модель для таких исследований, а ритм в нашем случае используется как маркер межклеточных взаимодействий (см. также стр. 3). Чем сильнее клетки взаимодействуют друг с другом, синхронизируя индивидуальные колебания, тем больше амплитуды популяционного ритма синтеза белка. Ранее в культурах гепатоцитов, полученных от крыс разного возраста, мы обнаружили значительное уменьшение амплитуд ритма в культурах старых крыс сравнительно с молодыми; пептиды, введенные в среду с такими культурами, увеличили амплитуды ритма (Бродский и др., 2019). В настоящей работе пептиды — семакс или HLDF-6 — вводили крысам. Эффект подтвердился *in vivo*: пептиды компенсируют старческие изменения межклеточных взаимодействий. Известно, что нарушения связей между клетками — одна из причин нейродегенеративных заболеваний (лит. Угрюмов, 2014), в основном, присущим старым людям. Усиление межклеточных взаимодействий пептидами — ранее неизвестное их свойство. Поэтому наряду с уже обоснованными нейропротекторными их эффектами, пептиды семакса и HLDF-6 могут

быть рекомендованы для широкой профилактики в старости.

Исследование эффектов пептидов *in vivo* при инъекции их крысам обосновали вывод работы на клеточной культуре о возможности компенсации отрицательного влияния некоторых лекарств на межклеточные взаимодействия. Так, дофамин, широко используемый при сосудисто-сердечной недостаточности, ликвидирует ритм синтеза белка в печени и, судя по рецепторам, также в поджелудочной железе и почках (Brodsky et al., 2012). Инъекция семакса или HLDF-6 после дофамина восстанавливает ритм синтеза белка (например, рис. 5). Опыт поставлен на плотных культурах молодых крыс. В контроле (инъекция физраствора), как всегда, четкий ритм синтеза белка. Инъекция крысе близкого веса и возраста дофамина ликвидировало ритм. Третьей крысе через час после инъекции дофамина ввели семакс. Ритм восстановился. Можно рекомендовать после необходимого введения дофамина человеку, через несколько часов инъектировать один из пептидов.

Как долго сохраняется эффект семакса или HLDF-6? Исследовали плотные культуры старых крыс. Результаты аналогичны для двух пептидов. На рис. 6 пример для HLDF-6. Одной крысе ввели физраствор, через 60 мин выделили плотные культуры и через сутки исследовали синтез белка. Второй крысе ввели HLDF-6 и в те же сроки исследовали синтез белка. У третьей крысы гепатоциты выделили через сутки после инъекции HLDF-6. У такой крысы, как и у второй, был четкий ритм синтеза белка в течение двух дней после инъекции HLDF-6. В опыте с семаксом (рис. 7)

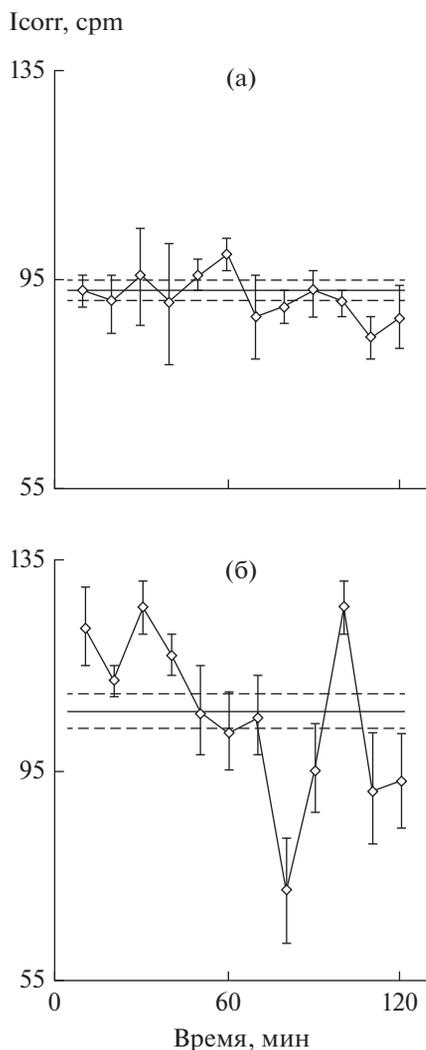


Рис. 4. Суточные редкие культуры молодых крыс, пероральное введение. а – крысу весом 350 г после суток голодания накормили комбикормом, смоченным раствором смеси аминокислот (из состава семакса) из расчета 100 мкг/кг, далее как рис. 1–3; б – крысу весом 330 г таким же способом накормили комбикормом, смоченным семаксом из расчета 100 мкг/кг.

исследовали редкие культуры молодых крыс. Постановка опытов была такой же как со старыми. В контроле в редких культурах ритма синтеза белка не было. Семакс организовал ритм. Эффект сохранялся по меньшей мере 2 дня.

Итак, пептиды семакс и HLDF-6 после введения их крысе регулируют кинетику синтеза белка в клетках печени. Семакс – фармацевтический препарат, обладающий ноотропной и нейропротекторной активностью (Мясоедов, Гривенников, 2004; Левицкая и др., 2008, 2010; Dmitrieva et al., 2010). Семакс влияет на процессы, связанные с формированием памяти, усиливает избирательное внимание при обучении и анализе информации, улучшает адаптацию организма к гипоксии,

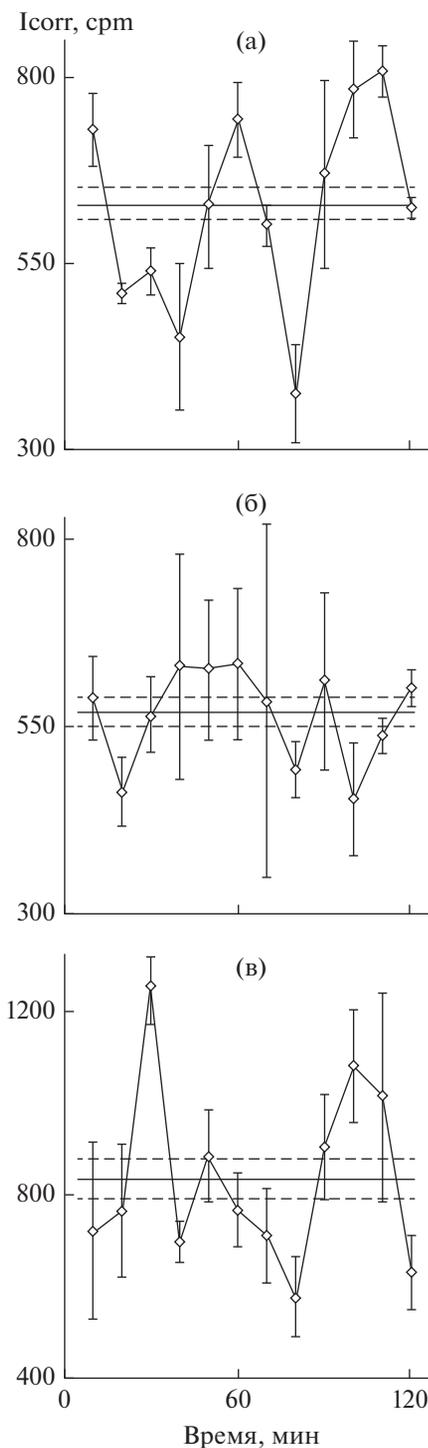


Рис. 5. Суточные плотные культуры молодых крыс, внутривбрюшинные инъекции. а – крысе весом 280 г ввели физраствор, через 120 мин выделили гепатоциты и поставили плотные культуры, дальнейшие процедуры см. предыдущие рисунки; б – крысе весом 300 г ввели 15 мкг/кг дофамина, через 120 мин выделили гепатоциты и оставили плотные культуры, далее как а; в – крысе весом 310 г ввели 15 мкг/кг дофамина и через 60 мин семакс 100 мкг/кг еще на 60 мин, после чего выделили гепатоциты и поставили плотные культуры, далее как раньше.

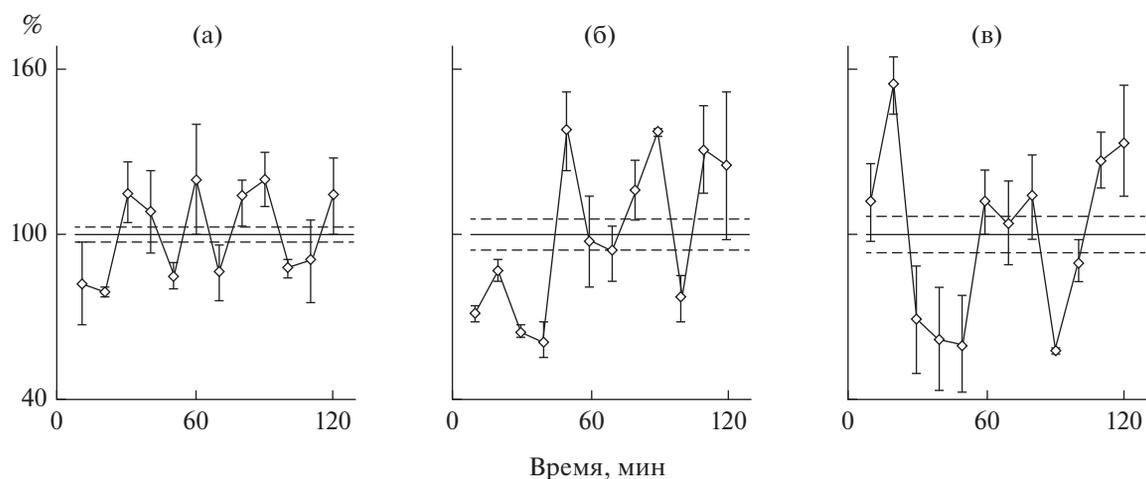


Рис. 6. Плотные культуры старых крыс, внутрибрюшинная инъекция пептида. Сохранение эффекта пептидов. а – крысе весом 500 г ввели физраствор, через 60 мин выделили гепатоциты и поставили плотные культуры, далее как раньше; б – крысе весом 480 г ввели 60 мкг/кг HLDF-6, через 60 мин выделили гепатоциты и поставили плотные культуры, через сутки исследовали синтез белка; в – крысе весом 350 г ввели HLDF-6, через сутки выделили гепатоциты и поставили плотные культуры, еще через сутки исследовали синтез белка.

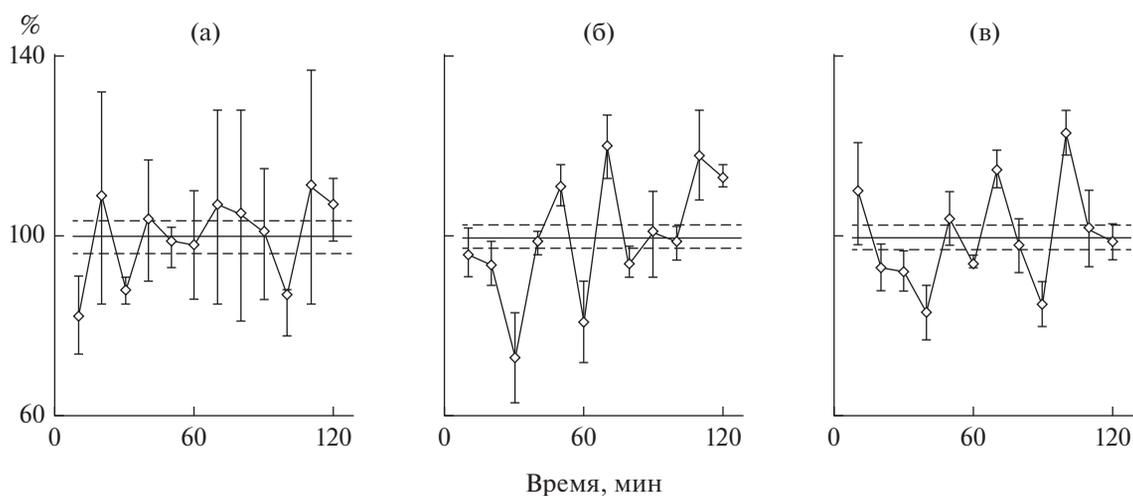


Рис. 7. Опыт, аналогичный рис. 6, но исследовали редкие культуры молодых крыс. а – крысе весом 300 г внутрибрюшинно ввели физраствор, поставили редкие культуры и через сутки исследовали синтез белка; б – крысе весом 260 г ввели 100 мкг/кг семакса, далее как а; в – крысе весом 290 г ввели семакс, через сутки поставили культуры.

церебральной ишемии, наркозу и другим повреждающим воздействиям. Его особенно рекомендуют после инсультов и других нарушениях функций и метаболизма мозга. Для нейропротекторного пептида HLDF-6, в рамках создания фармацевтического препарата для лечения болезни Альцгеймера и ишемического инсульта, были выполнены в полном объеме доклинические исследования (Золотарев и др., 2014; Vodachouk et al., 2016; Zolotarev et al., 2016). Была установлена высокая нейропротекторная активность пептида HLDF-6, его применение приводит к практически полному восстановлению памяти при этих нейродегенеративных патологи-

ях. Пептид HLDF-6 предохраняет нейроны гиппокампа (орган, повреждающийся при болезни Альцгеймера) от токсического действия бета-амилоида. При этом HLDF-6 абсолютно нетоксичен, и даже тысячекратное превышение терапевтической дозы не приводит к патологическим изменениям. Для сравнения можно сказать, что все препараты, используемые в терапии нейродегенеративных заболеваний, обладают высокой токсичностью уже при превышении лечебной дозы в несколько раз.

Нами показано влияние этих двух пептидов на синтез белка в клетках печени, ранее при прямом

действию на гепатоциты после введения пептида в культуральную среду, теперь после инъекции крысе. Особенно значимо наблюдение влияния семакса и HLDF-6 на кинетику синтеза белка гепатоцитов старых крыс. Как уже отмечалось, гепатоциты в этом случае, модель для изучения межклеточных взаимодействий. Ранее сходные отношения определены в разных клетках, включая нервные (обзор, Бродский, 2018). Опыты *in vivo* позволяют рекомендовать каждый пептид как профилактическое и компенсаторное средство для улучшения состояния старых людей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим Центр коллективного использования ИБР РАН за использование оборудования ЦКП.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 17-04-00460), государственного задания по плану НИР ИМГ РАН № АААА-А19-119022590101-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я.* Околочасовые метаболические ритмы // Биохимия. 2014. Т. 79. № 6. С. 621–634.
- Бродский В.Я.* Биохимия прямых межклеточных взаимодействий. Сигнальные факторы организации клеточных популяций // Биохимия. 2018. Т. 83. № 8. С. 1130–1147.
- Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф.* Нейропротекторные пептиды регулируют кинетику синтеза белка в гепатоцитах крыс разного возраста // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 5.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Терских В.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И.* Бессывороточная среда, сохраняющая нормальную морфологию и высокий уровень синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* // Известия РАН. Сер. биол. 1996. № 4. С. 398–401.
- Васильева Е.В., Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И.* Влияние ноотропных препаратов на метаболитные глутаматные рецепторы мозга мышей BALB/c и C57BL/6 // Нейрохимия. 2013. Т. 30. № 2. С. 135–148.
- Гамбарян П.П., Дукельская Н.М.* Крыса. М.: Советская наука, 1955.
- Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И., Дадаян А.К., Козик В.С., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Липкин В.М.* Исследование фармакокинетики и фармакодинамики амидной формы нейропротекторного пептида HLDF-6 с использованием равномерно меченных изотопами водорода соединений // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Под ред. Угрюмова М.В. М.: Научный мир, 2014. С. 763–777.
- Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Виленский Д.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ4-10 гептапептида семакс // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1. С. 111–118.
- Левицкая Н.Г., Виленский Д.А., Себенцова Е.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Влияние семакса на эмоциональное состояние белых крыс в норме и на фоне действия холецистокинина-тетрапептида // Известия РАН. Сер. биол. 2010. № 2. С. 231–237.
- Мясоедов Н.Ф., Гривенников И.А.* Нейропептиды и их аналоги в регуляции функций нервной системы млекопитающих, включая человека. От синтеза и изучения механизмов их действия до создания лекарственных средств нового поколения // Проблемы и перспективы молекулярной генетики. М.: Наука, 2004. Т. 2. С. 195–236
- Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Под ред. Угрюмова М.В. М.: Научный мир. 2014.
- Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Y.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M.* Comparative study of the neuroprotective and nootropic activities of the carboxylate and amide forms of the HLDF-6 peptide in animal models of Alzheimer's disease // Psychopharmacol. 2016. V. 30. № 1. P. 78–92.
- Brodsky V.Y., Konchenko D.S., Zvezdina N.D., Malchenko L.A., Dubovaja T.K.* Unlike norepinephrine and serotonin, dopamine disorganizes direct cell-cell communication in hepatocyte cultures // J. Cell and Tissue Res. 2012. V. 12. P. 3265–3271.
- Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V.* Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral Ischemia // Cell Mol. Neurobiol. 2010. V. 30. № 1. P. 71–79.
- Zolotarev Y.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* Anxiolytic activity of the neuroprotective peptide HLDF-6 and its effects on brain neurotransmitter systems in BALB/c and C57BL/6 mice // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. № 9. P. 922–935.

The Peptides Either Semax or HLDF-6 Injected to Rats Regulate Protein Synthesis Rhythm in Hepatocytes Correcting Senescent Disturbances

V. Y. Brodsky^{1,*}, Y. A. Zolotarev², L. A. Malchenko¹, L. A. Andreeva², D. S. Lazarev³,
N. N. Butorina¹, V. S. Kozik², and N. F. Myasoedov²

¹*Koltsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

²*Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, pl. Academician Kurchatov 2, Moscow, 123182 Russia*

³*The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov,
ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117513 Russia*

**e-mail: brodsky.idb@bk.ru*

Received June 4, 2019; revised October 1, 2019; accepted October 10, 2019

To clarify the organizing effect of peptides Semax and HLDF-6 on the kinetics of protein synthesis in hepatocytes, in addition to an *in vitro* study (Brodsky et al., 2019), the effects of these peptides *in vivo* have been studied. The circadian (ultradian) rhythm of protein synthesis, a marker of the direct cell-cell communication, was investigated in rats of different ages. Peptides were injected intraperitoneally to young (2–3 month old) or old (1.5–2 year old) rats in doses of 50–100 µg/kg. Hepatocytes were isolated and sparse or dense cultures were established. In young rats that received one or another peptide, in their sparse cultures a rhythm of protein synthesis was found; in rats of the same age, which were injected with saline, there was no rhythm in such cultures. In dense cultures of old rats after the action of the peptide, the amplitudes of the rhythm of protein synthesis did not differ from the rhythms of young rats; after injection of saline, the rhythm amplitudes were twice as low. Injection of the peptide to adult rats that had previously received dopamine, found a normal protein synthesis rhythm for rats of this age; the only dopamine injection abolished the rhythm. The synchronizing effect of the peptides was maintained for at least 2 days after their single administration to the rat. The use of Semax or HLDF-6 is recommended to compensate for violations of the kinetics of protein synthesis in humans during aging and pathology.

Keywords: peptides, rhythm of protein synthesis, aging

БИОЛОГИЯ
РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 582.26/27

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ *NITZSCHIA PALEA* (KÜTZING)
W. SMITH (BACILLARIOPHYTA)

© 2020 г. В. Б. Багмет^a, Ш. Р. Абдуллин^{a, *}, С. Е. Мазина^{b, c},
А. Ю. Никулин^a, В. Ю. Никулин^a, А. А. Гончаров^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, пр. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

^cРоссийский университет дружбы народов, экологический факультет,
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198 Россия

*e-mail: crplant@mail.ru

Поступила в редакцию 30.10.2019 г.

После доработки 26.11.2019 г.

Принята к публикации 30.11.2019 г.

Диатомея *Nitzschia palea* – широко распространенная эврибионтная водоросль, обитающая в бентосе пресноводных водоемов и водотоков, почвах и пещерах. Этот вид имеет биотехнологический потенциал, поэтому данные о его биологии представляют практический интерес. Хотя он изучается давно, полной информации о жизненном цикле *N. palea*, включая данные по кардинальным точкам, по-прежнему недостаточно. В этой статье, основанной на наших собственных исследованиях и данных литературы, мы дополняем и обобщаем имеющуюся информацию о жизненном цикле вида, включая данные о морфологии, морфометрии, тератологических структурах створок и кардинальных точках. Также впервые для *N. palea* показано, что потомки наследуют участок митохондриального гена *cox1* только от родителя одного пола. Полученные данные будут важны при исследовании филогеографии вида, а также обеспечат фундаментальную основу технологии длительного поддержания *N. palea* в культуре.

Ключевые слова: диатомовая водоросль, *Nitzschia palea*, жизненный цикл, кардинальные точки, участок гена *cox1*, унипарентальное наследование

DOI: 10.31857/S0475145020020020

ВВЕДЕНИЕ

Представители Bacillariophyta все чаще становятся объектами промышленного культивирования с целью получения полезных веществ, поскольку они способны синтезировать жиры, жирные кислоты, полисахариды, пигменты, наноразмерные кремнистые структуры и т.д. (Davidovich et al., 2015; Hess et al., 2018; Jin et al., 2018; Zhang et al., 2018). Однако длительное поддержание большинства клонов диатомовых водорослей в жизнеспособном состоянии проблематично из-за особенностей их жизненного цикла, в результате которого происходит уменьшение размера клеток во время вегетативного размножения (правило Макдональда-Пфитцера; Рошин, 1994; Edlund, Stoermer, 1997). При отсутствии полового воспроизведения восстановление размера клеток не происходит, и клон погибает. Но клон также “умрет” (потеряет генетическую идентичность) из-за рекомбинации при половом воспроизведе-

нии. Следовательно, гетероталлические виды, как правило, невозможно поддерживать в качестве клонов в течение длительного времени, поскольку при отсутствии совместимых типов спаривания половое воспроизведение не происходит. Таким образом, через несколько месяцев или лет (в зависимости от скорости роста культуры и уменьшения размера особей) клетки достигнут минимального жизнеспособного размера и, затем, погибнут. Технологии поддержания культур необходимо разрабатывать для каждого вида, основываясь на знании ключевых особенностей его жизненного цикла (Chernurnov et al., 2004). Следовательно, исследования жизненных циклов диатомей, включая половое воспроизведение, при котором восстанавливаются размеры клеток, актуальны и важны.

Жизненные циклы диатомовых ранее были описаны многими авторами (Drebes, 1977; Mann, 1993; Рошин, 1994; Davidovich, 2002; Chernurnov et al., 2004; Amato et al., 2005; Trobajo et al., 2005;

Fuchs et al., 2013). Различают несколько фаз жизненного цикла диатомей: дорепродуктивную – воспроизведение клеток только вегетативным способом с уменьшением их размера; репродуктивную (половое воспроизведение, рост зиготы (ауксоспоры), преобразование ауксоспоры в инициальную клетку); пострепродуктивную – вегетативный рост после прекращения полового воспроизведения (Drebes, 1977; Рошин, 1994). Л. Гайтлер (Geitler, 1932) выделил кардинальные точки вида – максимальные и минимальные размеры клеток, соответствующие верхней и нижней границам диапазона ауксоспорообразования (полового воспроизведения), имея в виду их устойчивое постоянство при незначительных колебаниях. Этим кардинальным точкам, вероятно, соответствуют пороговые уровни метаболической активности ядра, обуславливающие предел размеров клеток вида в процессе ауксоспорообразования, границы диапазона половозрелости и предел уменьшения клеток (Geitler, 1932; Рошин, 1994). Фактически кардинальные точки можно соотнести с критическими периодами онтогенеза, которые характеризуются наибольшей скоростью развития организма, и в результате детерминации он вступает в новый период жизненного цикла (Голиченков, 1991). Поэтому информация о кардинальных точках может быть важна для разработки методов поддержания диатомовых водорослей в культуре.

Способ наследования генетической информации – одна из важных характеристик жизненного цикла. Наследование митохондриальной ДНК и митохондрий у большинства многоклеточных организмов, в том числе и человека, происходит по материнской линии (Bag et al., 2005). У диатомовых водорослей подобный способ унипарентального (однородительского) наследования митохондрий по линии одного из полов был установлен лишь недавно для единственного вида – *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen. Знание способа наследования ДНК органелл открывает возможности для исследований в области филогеографии и реконструкции расселения раздельнополых диатомовых (Gastineau et al., 2013).

Диатомея *Nitzschia palea* – широко распространенная эврибионтная водоросль, которая обычно обитает в бентосе пресноводных водоемов и водотоков, почвах и пещерах (Trobajo et al., 2009, 2010; Abdullin, 2009; Abdullin, Bagmet, 2015, 2016). Спектр липидов у представителей этого вида позволяет рассматривать *Nitzschia palea* как многообещающий источник сырья для производства биодизеля (Abdel-Hamid et al., 2013; Hassan et al., 2013). Этот организм также характеризуется антибактериальной (Vinea et al., 2009) и фунгицидной активностью (Abdullin et al., 2014), способен к ге-

теротрофному питанию (Abdullin, Bagmet, 2015). Несмотря на то, что *Nitzschia palea* изучена достаточно полно, исчерпывающая информация о ее жизненном цикле, включая сведения о кардинальных точках, по-прежнему отсутствует. В этой статье, основанной на наших собственных исследованиях и данных литературы, мы дополняем и обобщаем имеющуюся информацию о жизненном цикле вида, включая данные о морфологии, морфометрии, тератологических структурах створок, кардинальных точках и способе наследования митохондрий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы тринадцать клонов *Nitzschia palea*. Из них девять были выделены из различных местообитаний в западной части Российской Федерации (рис. 1), четыре наиболее репрезентативных модельных клона – их потомки, полученные в лаборатории с использованием полового воспроизведения (табл. 1). Все клоны были получены методом микропипетирования (Andersen, 2005) и культивировались в среде DM (Mann, Cherpurnov, 2004) в люминостате с интенсивностью света 2500–3000 лк (17.9–21.4 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) с периодом 16 : 8 ч (свет : темнота) и температуре от 20 до 22°C.

Клетки изучали с использованием световой (Микмед-1, ЛОМО, Россия; Levenhuk 320, USA) и сканирующей электронной микроскопии (CamScan S2, Oxford, United Kingdom). Для морфологических исследований створки очищали путем кипячения в перекиси водорода, несколько раз промывали дистиллированной водой и помещали в среду Эльяшева (Эльяшев, 1957) с показателем преломления 1.67–1.68. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на очищенный и высушенный материал напыляли 20 нм сплава золота с палладием (Au 95%, Pd 5%). Полученные морфометрические данные обрабатывали с использованием программного пакета Statistica 8.0 и Microsoft Office Excel 2007.

Пары клонов в фазе экспоненциального роста инокулировали в чашки Петри и инкубировали при 18°C при естественном освещении в среде DM. Чтобы стимулировать половое воспроизведение, в минеральную среду добавляли морскую соль в концентрации 2 мг/л (Drebes, 1977; Bagmet et al., 2017). После того, как клетки образовали парные гаметангии, культуры переносили в дистиллированную воду. Обозначения типа спаривания были сделаны *a posteriori* на основе результатов экспериментальных скрещиваний и согласно рекомендациям В.А. Чепурнова с соавт. (Cherpurnov et al., 2005).

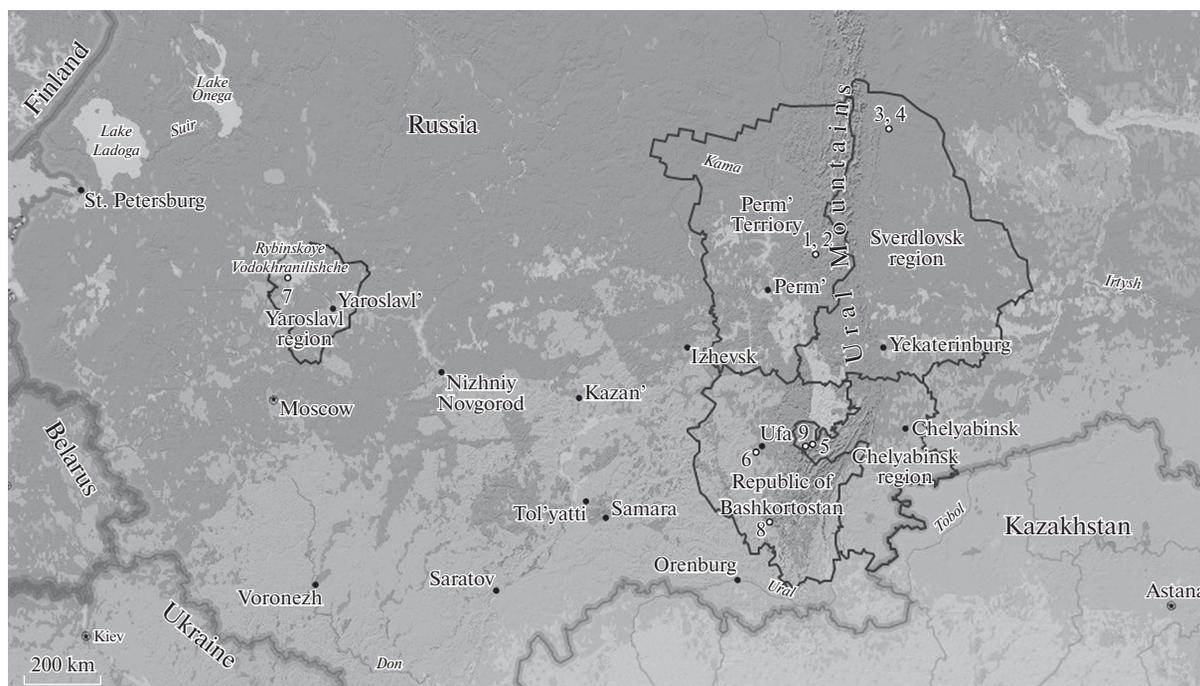


Рис. 1. Происхождение 9 природных клонов *Nitzschia palea* (Google Maps, 2019). 1 – Pk10; 2 – Pk9; 3 – Sv30; 4 – Sv26; 5 – Che70; 6 – ChH23; 7 – Br; 8 – Sht18; 9 – Ch3ch.

Для анализа ДНК культуры *N. palea* отбирали во время экспоненциальной фазы роста и концентрировали центрифугированием. Общая геномная ДНК была выделена согласно Ц.С. Эхту с соавт. (Echt et al., 1992) с некоторыми модификациями К.В. Киселева с соавт. (Kiselev et al., 2015). ПЦР-амплификацию кодируемой пластидой области *rbcL* проводили согласно А. Амато с соавт. (Amato et al., 2007) с использованием праймеров *rbcL11F*, *rbcL11R*, участка гена *cox1* – с использованием праймеров *GazF2* и *KEdtmR* (Evans et al., 2007) в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) с набором ПЦР Epcyclo Plus (Евроген, Москва, Россия). Продукты ПЦР очищали реагентом для очистки продуктов ПЦР EхоSAP-IT (Affymetrix Inc., USA) и секвенировали в обоих направлениях в Центре коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН с использованием генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) с набором для секвенирования BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Maryland, USA) и теми же праймерами, которые использовались для ПЦР. Последовательности были собраны с помощью пакета Staden v. 1.4 (Bonfield et al., 1995) и выровнены вручную в программе SeaView (Galtier et al., 1996). Все вновь полученные последовательности были помещены в GenBank под регистрационными номерами МК887232–МК887243 (табл. 1) и сравне-

ны с другими клонами *Nitzschia palea*, доступными с помощью поиска BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секвенирование участка митохондриального гена *cox1* у 12 из 13 проанализированных клонов выявило наличие двух генотипов, отличающихся друг от друга, по меньшей мере, 73 заменами. Первый генотип с фрагментом участка гена *cox1* длиной 695 пар нуклеотидов был обнаружен у семи природных клонов (Pk10, Pk9, Sv30, Sv26, Che70, ChH23, Br) и двух их потомков (PкВ и CheP) (табл. 1). Результаты поиска BLAST показали сродство этого генотипа к клонам *Nitzschia palea* SriLanka2 (FN557063) и India (FN557056) с идентичностью последовательностей 92.03 и 92.61% соответственно. Второй генотип с фрагментом участка гена *cox1* длиной 679 пар нуклеотидов характеризовал природный клон Sht18 и два его потомка ShtS и SvSh (табл. 1) и был сходен с клоном Japan C (FN557054; Trobajo et al., 2009) и клоном *N. palea* TCC570 (KC736651; Kermarrec et al., 2013) с идентичностью последовательностей 94.99 и 94.83% соответственно. Согласно результатам генотипирования *cox1*, родители лабораторных клонов (табл. 1) представляли разные генотипы, но у их потомков был выявлен только один генотип, что подтверждает наблюдение Р. Гастино с

Таблица 1. Происхождение и регистрационный номер в базе данных GenBank изученных клонов *Nitzschia palea*

№	Клон	Местообитание и расположение	Дата выделения	Регистрационный номер в базе данных GenBank
1.	Pk10	Донные отложения из ручья Наклонный, пещера Геологов-2, Пермский край	27.09.2013	MK887232
2.	Pk9	Донные отложения из ручья Марсианский, пещера Геологов-2, Пермский край	04.10.2013	MK887233
3.	Sv30	Донные отложения из ручья, пещера Северная, Свердловская область	17.07.2013	MK887234
4.	Sv26	Соскоб со стены, пещера Северная, Свердловская область	15.07.2013	MK887235
5.	Che70	Отложения возле озера, пещера Аленушка, Челябинская область	05.07.2011	MK887236
6.	ChH23	Грунт, пещера Под висячим камнем, Республика Башкортостан	06.10.2012	MK887237
7.	Bг	Донные отложения, Рыбинское водохранилище, Ярославская область	15.09.2014	MK887238
8.	Sht18	Донные отложения, ручей Харала, Республика Башкортостан	11.08.2014	MK887239
9.	Ch3ch	Грунт, Игнатьевская пещера, Челябинская область	15.09.2011	KJ729150
10.	ShtS	Потомок клонов Sht18 и Sv26	27.09.2014	MK887240
11.	PkB	Потомок клонов Pk10 и Bг	20.09.2014	MK887241
12.	SvSh	Потомок клонов Sv30 и Sht18	27.09.2014	MK887242
13.	CheP	Потомок клонов Che70 и Pk10	10.10.2014	MK887243

соавт. (Gastineau et al., 2013) об унипарентальной передаче митохондриальной ДНК, отмеченное у *Haslea ostrearia*. Для клона Ch3ch был секвенирован участок пластидного гена *rbcL*. Фрагмент длиной 365 пар нуклеотидов показал близкое родство к изоляту *N. palea* TCC 480 (KJ542465; Rimet et al., 2014) и клону New Scot2 (HF675128; Rovira et al., 2015) с идентичностью последовательностей 99.73 и 99.18% соответственно. Идентичность последовательностей *cox1* и *rbcL* наших образцов с представителями других видов *Nitzschia* была значительно ниже (≤ 84 и $\leq 98\%$ соответственно).

Общая морфология клеток и ультраструктура створок клонов, исследованных как в световой, так и в сканирующей электронной микроскопии, соответствуют описаниям, приведенным для *Nitzschia palea* различными авторами (Krammer, Lange-Bertalot, 1988; Trobajo et al., 2009; Hofmann et al., 2011). Размеры створок, плотности фибул и

штрихов наших клонов приведены в табл. 2. Среди измеренных створок средняя плотность фибул варьировала от 10.53 до 12.76 в 10 мкм, а средняя плотность штрихов – от 31.57 до 33.84 в 10 мкм. Средняя ширина створок изменялась от 3.03 до 4.46 мкм. Значительнее всего варьировала средняя длина створок (от 10.48 до 50.74 мкм), что было связано с уменьшением размера в течение жизненного цикла. У всех изученных клонов из всех показателей статистически значимо различалась ($p \leq 0.05$) только длина. При этом все клоны показали прогрессивное уменьшение длины клеток с течением времени. У всех клонов створки были линейно-ланцетными (табл. 2, рис. 2, 1–5) или ланцетными (табл. 2, рис. 2, 6–12) с клювовидными (табл. 2, рис. 2, 1–5) или оттянуто-клювовидными (табл. 2, рис. 2, 6–12) концами. Только створки клона Ch3ch были широко эллиптическими (табл. 2, рис. 2, 13), с широко закругленными концами (табл. 2, рис. 2, 13). Длина створок этого

Таблица 2. Морфометрические и биологические характеристики 13 клонов *Nitzschia palea*

Клон	Длина, мкм	Ширина, мкм	Фибулы/ 10 мкм	Штрихи/ 10 мкм	Форма створки	Форма концов	Способность к половому воспроизведению
min–max ($X \pm s$)							
Pk10	16.94–24.05 (21.07 ± 0.18) (n = 73)	2.67–3.64 (3.03 ± 0.03) (n = 73)	9.86–12.39 (10.98 ± 0.10) (n = 43)	29.95–35.60 (33.53 ± 0.19) (n = 47)	Ланцетная	Оттянуто-клювовидные	+
Pk9	26.85–32.26 (29.89 ± 0.17) (n = 55)	2.78–3.66 (3.29 ± 0.03) (n = 55)	9.65–13.77 (11.03 ± 0.12) (n = 46)	31.49–35.13 (33.53 ± 0.13) (n = 46)	Линейно-ланцетная	Клювовидные	±
Sv30	17.08–25.76 (20.97 ± 0.22) (n = 79)	2.94–3.64 (3.30 ± 0.02) (n = 79)	10.02–13.84 (11.53 ± 0.12) (n = 59)	29.99–35.34 (32.92 ± 0.22) (n = 46)	Ланцетная	Клювовидные	+
Sv26	20.04–27.08 (24.69 ± 0.25) (n = 64)	2.96–3.62 (3.36 ± 0.02) (n = 64)	10.47–15.03 (12.21 ± 0.16) (n = 52)	30.49–35.08 (33.73 ± 0.16) (n = 45)	Линейно-ланцетная	Клювовидные	+
Che70	12.44–17.91 (15.15 ± 0.24) (n = 38)	2.88–4.30 (3.49 ± 0.05) (n = 38)	10.10–14.90 (12.63 ± 0.22) (n = 38)	31.72–36.13 (33.84 ± 0.22) (n = 41)	Ланцетная	Клювовидные	+
ChH23	11.35–16.84 (15.57 ± 0.20) (n = 47)	2.86–3.58 (3.17 ± 0.02) (n = 47)	10.68–14.82 (12.63 ± 0.16) (n = 47)	30.44–35.07 (33.13 ± 0.14) (n = 42)	Ланцетная	Клювовидные	+
Br	23.10–26.47 (24.85 ± 0.05) (n = 177)	2.68–3.69 (3.21 ± 0.02) (n = 177)	9.73–13.83 (11.28 ± 0.11) (n = 68)	29.94–35.25 (32.78 ± 0.18) (n = 75)	Ланцетная	Оттянуто-клювовидные	+
Sht18	17.62–27.74 (23.28 ± 0.18) (n = 97)	2.88–3.69 (3.27 ± 0.02) (n = 97)	9.80–13.94 (11.45 ± 0.11) (n = 58)	30.13–34.65 (32.95 ± 0.18) (n = 49)	Ланцетная	Оттянуто-клювовидные	+
Ch3ch	8.92–12.41 (10.48 ± 0.07) (n = 159)	3.57–5.06 (4.46 ± 0.02) (n = 159)	10.11–14.82 (12.76 ± 0.18) (n = 46)	30.55–34.98 (33.02 ± 0.19) (n = 38)	Широко эллиптическая	Широко закругленные	–
ShtS	46.81–51.89 (50.74 ± 0.13) (n = 45)	2.87–3.65 (3.12 ± 0.02) (n = 45)	10.17–12.52 (11.04 ± 0.07) (n = 45)	30.18–35.21 (32.02 ± 0.16) (n = 45)	Линейно-ланцетная	Клювовидные	–
PkB	48.49–53.45 (50.61 ± 0.13) (n = 76)	3.03–3.69 (3.35 ± 0.02) (n = 76)	9.49–12.84 (10.95 ± 0.15) (n = 36)	31.51–35.35 (32.94 ± 0.18) (n = 36)	Линейно-ланцетная	Клювовидные	–
SvSh	40.92–46.0 (44.28 ± 0.14) (n = 70)	2.87–3.70 (3.32 ± 0.03) (n = 70)	9.70–11.46 (10.53 ± 0.08) (n = 43)	31.14–34.60 (32.68 ± 0.15) (n = 43)	Линейно-ланцетная	Клювовидные	–
CheP	36.24–42.55 (40.00 ± 0.15) (n = 102)	2.84–3.70 (3.34 ± 0.02) (n = 102)	10.16–13.01 (11.69 ± 0.12) (n = 46)	30.22–33.76 (31.57 ± 0.15) (n = 41)	Линейно-ланцетная	Клювовидные	–

Примечание. X – среднее, s – ошибка среднего, n – число измерений.

Таблица 3. Результаты экспериментов по скрещиванию между природными клонами *Nitzschia palea*

	Sv30 (a)	Sv26 (a)	Pk10 (a)	Pk9 (a)	Che70 (b)	Sht18 (b)	Br (b)	ChH23 (b)	Ch3ch
Sv30 (a)	0								
Sv26 (a)	–	0							
Pk10 (a)	–	–	0						
Pk9 (a)	–	–	–	0					
Che70 (b)	+	+	CheP	–	0				
Sht18 (b)	SvSh	ShtS	+	–	–	0			
Br (b)	+	+	PkB	+	–	–	0		
ChH23 (b)	+	+	+	–	–	–	–	0	
Ch3ch	–	–	–	–	–	–	–	–	0

Примечание. “+” – половое воспроизведение наблюдалось в смешанной культуре; “–” – половое воспроизведение отсутствовало в смешанной культуре; “0” – половое воспроизведение отсутствовало в моноклональной культуре; “a” – тип спаривания 1; “b” – тип спаривания 2.

клона также была наименьшей среди всех исследованных (табл. 2, рис. 2). Кроме того, у Ch3ch появлялись тератологические структуры створок при

уменьшении длины клеток до 9–10 мкм (рис. 3), хотя при более крупных размерах они не отмечались. Наблюдалось образование второго ряда фи-

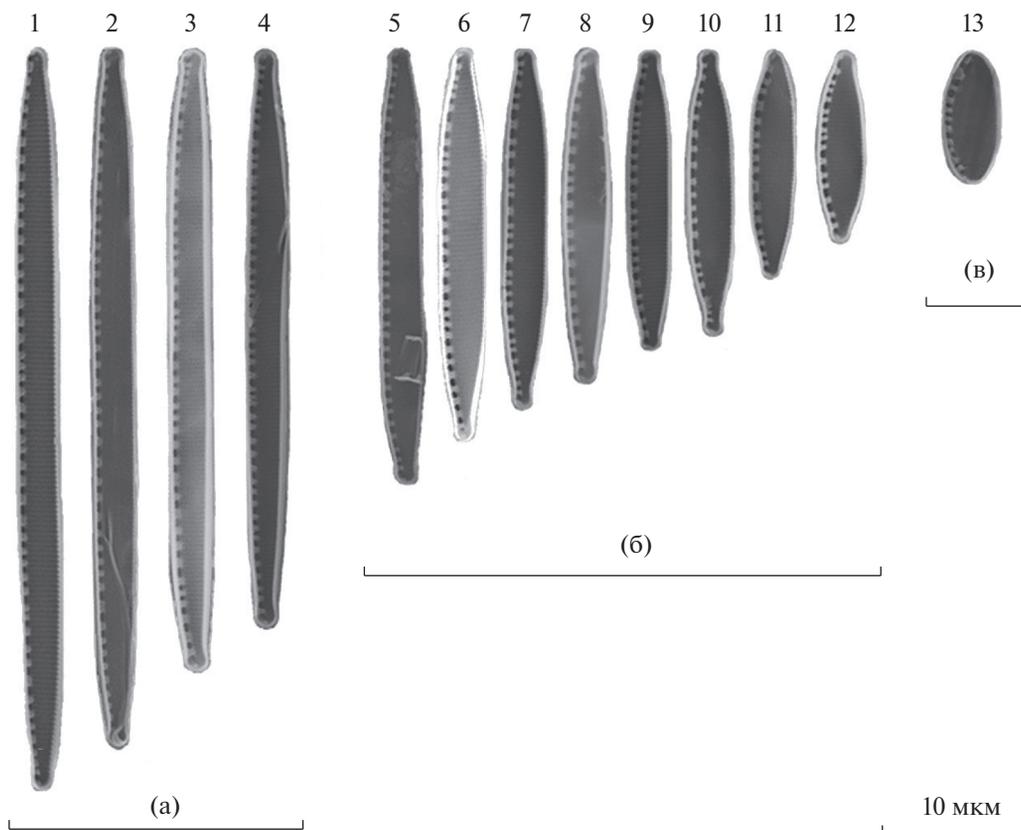


Рис. 2. Морфология створок 13 клонов *Nitzschia palea*. 1 – ShtS; 2 – PkB; 3 – SvSh; 4 – CheP; 5 – Pk9; 6 – Br; 7 – Sv26; 8 – Sht18; 9 – Sv30; 10 – Pk10; 11 – Che70; 12 – ChH23; 13 – Ch3ch. Различные фазы жизненного цикла: а – дорепродуктивная; б – репродуктивная; в – пострепродуктивная.

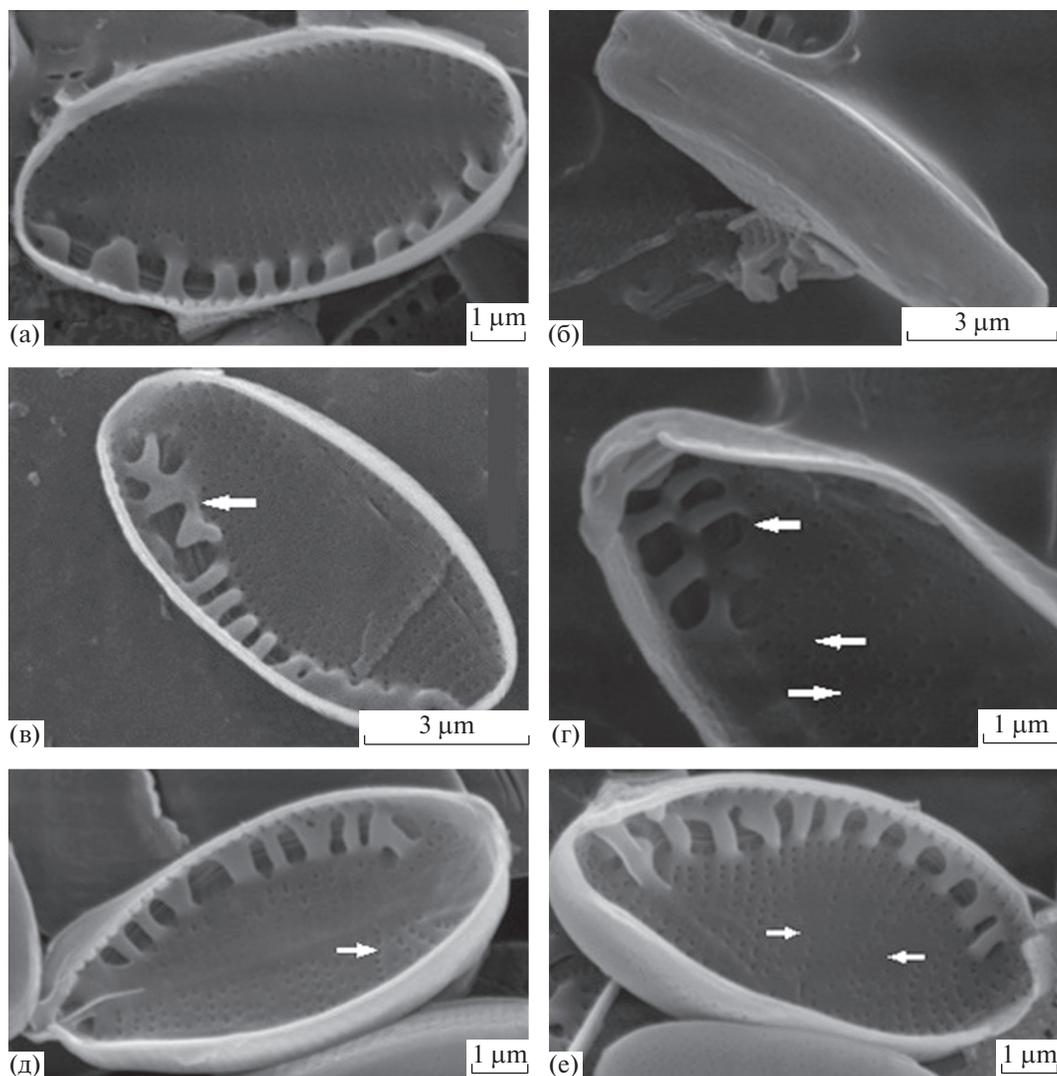


Рис. 3. Тератологические структуры створок у клона Ch3ch. а, б – общий вид створок; в, г – образование второго ряда фибул; д – дугообразное расположение штрихов; е – полная редукция некоторых ареол.

бул (рис. 3в, 3г), дугообразное расположение штрихов (рис. 3д), а также полная редукция некоторых ареол (рис. 3е).

Ни один из клонов *N. palea* не обнаруживал каких-либо признаков полового воспроизведения в моноклональных культурах. Поэтому мы провели гетероталлическое тестирование путем смешивания клонов попарно, что в некоторых случаях вызывало половое воспроизведение (табл. 3). Клоны Sv30, Sv26 и Pk10 принадлежали к одному типу спаривания (пола), который мы обозначаем “а”, и этот тип был совместим с противоположным типом спаривания (пола) “б”, представленным клонами Che70, Sht18, Bg и ChH23 (табл. 3). Отсутствие репродуктивной изоляции между этими

клонами может свидетельствовать об их принадлежности к одному виду согласно биологической концепции вида. Клон Pk9 (тип спаривания “а”) успешно спаривался только с Bg (“б”), с другими клонами типа спаривания “б” половое воспроизведение не наблюдалось (табл. 3). Клон Ch3ch не показал признаков половой активности с остальными клонами. Мы полагаем, что это связано с тем, что длина его створок была наименьшей среди всех исследованных (табл. 2), и, вероятнее всего, он уже был вне диапазона скрещивания. Ни один из клонов, полученных в лаборатории (ShtS, PkB, SvSh, CheP), не обнаруживал каких-либо признаков полового воспроизведения, как с природными клонами, так и друг с другом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Некоторые фазы жизненного цикла *Nitzschia palea* частично были описаны Р. Тробахо с соавт. (Trobajo et al., 2009), ниже мы дополняем и обобщаем все эти данные.

Было обнаружено, что морфология створок, их длина и способность к половому воспроизведению всех 13 исследованных клонов *Nitzschia palea* варьировали в зависимости от фазы их жизненного цикла (рис. 2, табл. 2).

Дорепродуктивная фаза. Все четыре наших клона (ShtS, PkB, SvSh и CheP), полученные в результате лабораторного скрещивания, находились на этой фазе жизненного цикла, поскольку длина их створок была наибольшей среди изученных клонов, и они воспроизводились только путем вегетативного деления клеток (табл. 2). Створки этих клонов характеризовались средней длиной от 50.74 до 40.00 мкм и створками линейно-ланцетной формы с клювовидными концами (табл. 2, рис. 2). Сходные данные были получены и Р. Тробахо с соавт. (Trobajo et al., 2009).

Репродуктивная фаза. Согласно Р. Тробахо с соавт. (Trobajo et al., 2009), две клетки противоположного типа спаривания соединяются сбоку и образуют две гаметы в каждой. Затем гаметы мигрируют через две короткие копуляционные трубки и сливаются с образованием двух зигот, которые изначально эллипсоидальные или удлинённые и лежат внутри гаметангиев. Поведение гаметангиума и гамет является, по-видимому, одинаковым у обоих типов спаривания (или противоположного пола). Каждый гаметангий противоположного типа спаривания в любой группе спаривания производит одну активную гамету и одну пассивную гамету (транс-тип физиологической анизогамии), в отличие от полового размножения в близком роде *Pseudo-nitzschia*, где гаметангии являются либо мужскими, либо женскими (цис-тип физиологической анизогамии) (Cherapunov et al., 2005; Amato et al., 2007). Затем зиготы расширяются (в виде ауксоспор) параллельно апикальным осям гаметангия и образуют инициальные клетки, появляется следующее поколение (Trobajo et al., 2009). В нашем исследовании весной, летом и осенью парные гаметангии формировались на 2-й день от начала эксперимента, ауксоспоры — на 3-й, инициальные клетки — на 5-й день. Зимой, однако, парные гаметангии формировались на 3-й день от начала эксперимента по спариванию, ауксоспоры — на 4-й день и инициальные клетки — на 7-й день. Возможно, это было связано с уменьшением интенсивности освещения зимой. Аналогичная картина была отмечена у некоторых других ви-

дов диатомовых (Drebes, 1977; Mann, 1993; Рошин, 1994; Davidovich, 2002; Cherapunov et al., 2004).

Эксперименты по скрещиванию показали, что восемь клонов (Pk10, Pk9, Sv30, Sv26, Che70, ChH23, Bg и Sht18) находились на репродуктивной фазе. Средняя длина створок на этой фазе варьировала от 29.89 до 15.15 мкм (табл. 2), форма створок изменялась от линейно-ланцетных к ланцетным с клювовидными или оттянуто-клювовидными концами (рис. 2). В целом это соответствует данным, приведенным Р. Тробахо с соавт. (Trobajo et al., 2009). На этой фазе сохраняется типичная морфология створок, но существует тенденция к уменьшению их длины при сохранении ширины и расширению концов.

Пострепродуктивная фаза. На этой фазе жизненного цикла находился только клон Ch3ch, поскольку он не был способен к половому размножению и имел значительно более короткие створки, чем было выявлено для створок на репродуктивной фазе (средняя длина составляла 10.48 мкм; табл. 2). Уменьшение длины створок, но не их ширины, привело к изменению их внешнего вида и переходу к широко эллиптическим створкам с широко закругленными концами. На этой фазе появились тератологические структуры створок, которые ранее не наблюдались нами в течение жизненного цикла *N. palea*. Основными факторами, вызывающими формирование тератологии, являются загрязнение тяжелыми металлами и длительное культивирование, связанное с малым размером клеток (длиной) (Генкал, Елизарова, 1989; Estes, Dute, 1994; Falasco et al., 2009). В нашем случае загрязнение тяжелыми металлами может быть исключено, и мы можем предположить, что к образованию тератологических структур у клона Ch3ch привело длительное его культивирование (с 2011 года) и значительное уменьшение длины его клеток. Клон Che70 также культивируется с 2011 года, но средняя длина его клеток была больше, чем у клона Ch3ch. Р. Тробахо с соавт. (Trobajo et al., 2009) также сообщали о сходной морфологии и размерах створок (средняя длина от 13.44 до 11.97 мкм) у двух клонов (Japan A1 и Japan E), но какие-либо аномалии створок у этих клонов не наблюдались.

Кардинальные точки. На основании проведенных наблюдений и данных литературы можно сделать вывод, что *Nitzschia palea* способна к половому воспроизведению при средней длине створок в диапазоне 29.89–15.15 мкм. Было отмечено, что клон Pk9 успешно спаривался только с Bg, но не с другими клонами (табл. 3). Возможно, что способность к половому воспроизведению снижается к нижней границе этого диапазона. Таким образом, для этого вида диатомей верхняя карди-

нальная точка составляет около 30 мкм; нижняя кардинальная точка — около 15 мкм.

Известно, что у диатомовых водорослей размер клеток, находящихся в верхней кардинальной точке, определяющей переход от дорепродуктивной фазы к репродуктивной, составляет примерно 50% от максимального видоспецифического размера (Davidovich, 2000). В случае с *Nitzschia palea* это соотношение составляло около 47%, что подтверждает ранее выявленную закономерность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основе наших исследований и данных литературы, описан жизненный цикл широко распространенной эврибионтной диатомовой водоросли *Nitzschia palea*, включающий дорепродуктивную, репродуктивную и пострепродуктивную фазы с описанием морфологии и морфометрии створок на каждой фазе. Впервые для данного вида выявлены кардинальные точки, связь тератологических структур створок с пострепродуктивной фазой развития, а также унипарентальный способ наследования митохондрий. Полученные данные важны для изучения филогеографии данного организма, а также обеспечат фундаментальную основу технологии длительного поддержания *Nitzschia palea* в культуре.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Генкал С.И., Елизарова В.А. Новые данные по изменению водоросли *Diatoma elongatum* Ag. в культуре // Биология внутренних вод. 1989. № 81. С. 32–36.
- Голиченков В.А. Биология развития. М.: Изд-во МГУ, 1991. 144 с.
- Роштин А.М. Жизненные циклы диатомовых водорослей. Киев: Наукова думка, 1994. 171 с.
- Эльязев А.А. О простом способе приготовления высокопреломляющей среды для диатомового анализа // Труды НИИ геологии Арктики. 1957. № 4. С. 74–76.
- Abdel-Hamid I.M., El-Refaay A.D., Abdel-Mogib M. et al. Studies on biomass and lipid production of seven diatom species with special emphasis on lipid composition of *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae) as reliable biodiesel feedstock // Algological Studies. 2013. V. 143. P. 65–87.
- Abdullin Sh.R. Cyanobacterial-algal cenoses of the Shulgán-Tash cave, Southern Urals // Russian J. Ecology. 2009. V. 40. № 4. P. 301–303.
- Abdullin Sh.R., Bagmet V.B. Experimental analysis for the possibility of heterotrophy in algae: the example of some strains from the Propashchaya Yama Cave // Russian J. Ecology. 2015. V. 46. № 5. P. 481–482.
- Abdullin Sh.R., Bagmet V.B. Мyxotrophy of cyanobacteria and algae inhabiting caves // Zhurnal Obshchei Biologii. 2016. V. 77. № 1. P. 54–62.
- Abdullin Sh.R., Urazbakhina D., Bagmet V.B. Preliminary study of fungicidal and fungistatic activity of some cave microalgae // Abstracts of BIT's 3rd Annual International Congress of Algae-2014 (Dalian, 16–18, October, 2014. China). Dalian, 2014. P. 203.
- Amato A., Orsini L., D'Alelio D. et al. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) // J. Phycology. 2005. V. 41. № 3. P. 542–556.
- Amato A., Kooistra W.H.C.F., Ghiron J.H.L. et al. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms // Protist. 2007. V. 158. № 2. P. 193–207.
- Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. N.Y.: Elsevier Academic Press, 2005. 578 p.
- Bagmet V.B., Abdullin Sh.R., Kuluev B.R. et al. The effect of salinity on the reproduction rate of *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Smith (Bacillariophyta) clones // Russian Journal of Ecology. 2017. V. 48. № 3. P. 287–289.
- Barr C.M., Neiman M., Taylor D.R. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals // New Phytol. 2005. V. 168. P. 39–50.
- Binea H.K., Kassim T.I., Binea A.K. Antibacterial activity of diatom *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. extract // Iraqi J. Biotechnology. 2009. V. 8. № 2. P. 562–566.
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. Website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [accessed 14.03.2019].
- Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucleic Acids Research. 1995. V. 23. P. 4992–4999.
- Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K. et al. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms // International Review of Cytology. 2004. V. 237. P. 91–154.
- Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K. et al. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta) // European J. Phycology. 2005. V. 40. P. 379–395.
- Davidovich N.A. Species specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // Proc. 16th Int. Diatom Symp. (Athens and Aegean Islands, Aug. 25–Sept. 1, 2000). Athens: Univ. Athens, 2001. P. 191–196.
- Davidovich N.A. Photoregulation of sexual reproduction in *Bacillariophyta* (review) // International J. Algae. 2002. V. 4. № 2. P. 56–71.
- Davidovich N.A., Davidovich O.I., Podunai Yu.A. et al. Reproductive properties of diatoms significant for their cultivation and biotechnology // Russian J. Plant Physiology. 2015. V. 62. № 2. P. 153–160.
- Drebes G. Sexuality // The Biology of Diatoms: Botanical Monographs / Eds. Werner D. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. P. 250–283.
- Echt C.S., Erdahl L.A., McCoy T.J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa // Genome. 1992. V. 35. № 1. P. 84–87.

- Edlund M.B., Stoermer E.F.* Evolutionary, and systematic significance of diatom life histories // *J. Phycology*. 1997. V. 33. № 6. P. 897–918.
- Estes A.M., Dute R.R.* Valve abnormalities in diatom clones maintained in long-term culture // *Diatom Research*. 1994. V. 9. № 2. P. 249–258.
- Evans K.M., Wortley A.H., Mann D.G.* An assessment of potential diatom “barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta) // *Protist*. 2007. V. 158. № 3. P. 349–364.
- Falasco E., Bona F., Ginepro M. et al.* Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions // *Water SA*. 2009. V. 35. № 5. P. 595–606.
- Fuchs N., Scalco E., Kooistra W.H.C.F. et al.* Genetic characterization and life cycle of the diatom *Fragilariopsis kerguelensis* // *European J. Phycology*. 2013. V. 48. № 4. P. 411–426.
- Gastineau R., Leignel V., Jacqueline B. et al.* Inheritance of mitochondrial DNA in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Naviculaceae) during auxosporulation suggests a uniparental transmission // *Protist*. 2013. V. 164. № 3. P. 340–351.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C.* Seaview and phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny // *Computer Applications in the Biosciences*. 1996. V. 12. № 6. P. 543–548.
- Geitler L.* Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen) // *Archiv für Protistenkunde*. 1932. V. 78. P. 1–226.
- Google Maps [online]. Website <https://www.google.com/maps/> [accessed 27.05.2019].
- Hassan F.M., Aljibory I.F., Kassim T.I.* An attempt to stimulate lipids for biodiesel production from locally isolated microalgae in Iraq // *Baghdad Science J.* 2013. V. 10. № 1. P. 97–108.
- Hess S.K., Lepetit B., Kroth P.G. et al.* Production of chemicals from microalgae lipids – status and perspectives // *European J. Lipid Science and Technology*. 2018. V. 120. № 1. P. 1–26.
- Hofmann G., Werum M., Lange-Bertalot H.* Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Rugell: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2011. 908 p.
- Jin C., Yu Zh., Peng Sh. et al.* The characterization and comparison of exopolysaccharides from two benthic diatoms with different biofilm formation abilities // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2018. V. 90. № 2. P. 1503–1519.
- Kermarrec L., Franc A., Rimet F. et al.* Next generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms // *Molecular Ecology Resources*. 2013. V. 13. № 4. P. 607–619.
- Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Tyunin A.P.* The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency // *J. Plant Physiology*. 2015. V. 175. P. 59–67.
- Krammer K., Lange-Bertalot H.* Bacillariophyceae. 2 Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae // *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 2/2 / Eds. Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D.; Jena: Gustav Fischer Verlag, 1988. P. 1–596.
- Mann D.G.* Patterns of sexual reproduction in diatoms // *Hydrobiologia*. 1993. V. 269. P. 11–20.
- Mann D.G., Chepurnov V.A.* What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematic // *Nova Hedwigia*. 2004. V. 79. № 1–2. P. 237–291.
- Rimet F., Trobajo R., Mann D.G. et al.* When is sampling complete? The effects of geographical range and marker choice on perceived diversity in *Nitzschia palea* (Bacillariophyta) // *Protist*. 2014. V. 165. № 3. P. 245–259.
- Rovira L., Trobajo R., Sato S. et al.* Genetic and physiological diversity in the diatom *Nitzschia inconspicua* // *J. Eukaryotic Microbiology*. 2015. V. 62. № 6. P. 815–832.
- Trobajo R., Mann D.G., Cox E.J.* Sexual reproduction in *Nitzschia fonticola*: the importance of studying the entire life cycle in diatoms // *Phycologia*. 2005. V. 44. № 4. P. 103.
- Trobajo R., Clavero E., Chepurnov V.A. et al.* Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae) // *Phycologia*. 2009. V. 48. № 6. P. 443–459.
- Trobajo R., Mann D.G., Clavero E. et al.* The use of partial *cox1*, *rbcL* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae) // *European J. Phycology*. 2010. V. 45. № 4. P. 413–425.
- Zhang W., Wang F., Gao B. et al.* An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricorutum* biomass // *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 2018. V. 32. P. 193–200.

Life Cycle of *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (Bacillariophyta)

V. B. Bagmet¹, Sh. R. Abdullin^{1,*}, S. E. Mazina^{2,3}, A. Yu. Nikulin¹,
V. Yu. Nikulin¹, and A. A. Gontcharov¹

¹Federal Scientific Center of East Asian Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

²Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³RUDN University, Moscow, 117198 Russia

*e-mail: crplant@mail.ru

Received October 30, 2019; revised November 26, 2019; accepted November 30, 2019

The diatom *Nitzschia palea* is a widespread eurybiontic alga that inhabits the benthos of freshwater ponds and watercourses, soils and caves. This species has a potential for biotechnological applications; therefore, knowl-

edge of its biology is important. Although the species has been studied quite extensively, comprehensive information on its life cycle properties, including cardinal points, is still lacking. In this contribution, based on our studies and literature data, we supplement and summarize the available information on the species' life cycle, including data on morphology, morphometry, teratological structures of valves and cardinal points. It was also shown for the first time for *N. palea* that progenies inherit a site of the mitochondrial gene *cox1* only from a parent of the same sex. The data obtained will be important in the study of the phylogeography of the species, as well as provide the fundamental basis for the technology of long-term maintenance of *N. palea* in culture.

Keywords: diatom, *Nitzschia palea*, life cycle, cardinal points, site of gene *cox1*, uniparental transmission

БИОЛОГИЯ
РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 528.29

ОНТОГЕНЕЗ ЛИШАЙНИКА *LOBARIA PULMONARIA* (L.) HOFFM.
В РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВАХ БОРЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ

© 2020 г. Р. В. Игнатенко^{a, b, *}, В. Н. Тарасова^a, Е. Ф. Марковская^a

^aПетрозаводский государственный университет, пр. Ленина, 33, Петрозаводск, 185910 Россия

^bФедеральный исследовательский центр “Карельский научный центр Российской академии наук”,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185000 Россия

*e-mail: ocean-9@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2019 г.

После доработки 29.10.2019 г.

Принята к публикации 07.11.2019 г.

Представлен онтогенез эпифитного лишайника *Lobaria pulmonaria*. Исследования проведены в лесных фитоценозах Карелии с давностью нарушения от 80 до 450 лет. На основе концепции дискретного описания растений и лишайников выделено 4 периода и 14 возрастных состояний в онтогенезе *L. pulmonaria*. Каждое онтогенетическое состояние *L. pulmonaria* характеризуется определенными размерами таллома, наличием и степенью развития вегетативных диаспор и плодовых тел на поверхности слоевища. Описаны возможные варианты онтогенеза вида.

Ключевые слова: онтогенез, лишайники, *Lobaria pulmonaria*

DOI: 10.31857/S0475145020020044

ВВЕДЕНИЕ

В современной лихенологии одним из важных направлений исследований является изучение онтогенетической структуры видов (Михайлова, Воробейчик, 1999; Суетина, 2001; Михайлова, 2005; Суетина, Глотов 2010, 2015; Игнатенко, Тарасова, 2017). Выделение разнокачественных возрастных талломов способствует лучшему пониманию закономерностей онтогенетического развития и формирования популяционной структуры видов лишайников в конкретный момент времени, а также позволяет прогнозировать их развитие в будущем (Михайлова, 2005; Суетина, Глотов 2010). Данный подход особенно важен для формирования стратегии охраны при изучении редких и находящихся под угрозой исчезновения видов лишайников, нуждающихся в охране (Gauslaa, 1997; Scheidegger, 1998; Tarasova et al., 2008; Суетина, Глотов, 2010; Микрюков, 2011; Фенько, Тарасова, 2016; Игнатенко, 2018; Игнатенко, Тарасова, 2018).

Крупный эпифитный цианобионтный лишайник лобария легочная (*Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., Lobariaceae, Ascomycotina), широко распространенный в бореальных, умеренных, горных и океанических районах мира (Yoshimura, 1971, 1998), занесен в Красную книгу Российской Федерации (2008) со статусом уязвимого вида с сокращающейся численностью (26). *L. pulmonaria* — это трехкомпонентный лишайник, образованный микобионтом (аскомицетным грибом), первичным

фотобионтом — эукариотической зеленой водорослью *Dictyochloropsis reticulata* Tschermak-Woess (Tschermak-Woess, 1995), и вторичным фотобионтом — азотфиксирующей цианобактерией *Nostoc* sp. (Tschermak-Woess, 1988).

Считается, что лишайник *L. pulmonaria* крайне чувствителен к любому типу антропогенного воздействия и в умеренном климате приурочен к старовозрастным лесам (Andersson, Appelqvist, 1987; Rose, 1992; Gauslaa, 1994; Andersson et al., 2003; Liira, Sepp, 2009). Кроме того, имеются сведения, что этот крупный, хорошо известный в литературе лишайник, ассоциирован с другими редкими и исчезающими видами организмов, и его можно рассматривать в качестве показателя (*umbrella species*) их присутствия в сообществе (Campbell, Fredeen, 2004; Pykälä, 2004; Radies, Coxson, 2004; Ravera et al., 2006; Scheidegger, Werth, 2009; Nascimbene et al., 2010).

L. pulmonaria является одним из самых изученных видов лишайников: в мировой базе данных лихенологической литературы “Recent Literature on Lichens” (Culberson et al., 2019) ключевые слова с названием данного вида содержатся в 313 статьях. Несмотря на это, в отношении исследования его онтогенеза имеется еще достаточно много вопросов. Так, И.Н. Михайлова (2005) выделила онтогенетически разнокачественные талломы и разделила их на разные функционально-возрастные группы — от стерильных до фертильных (см.

раздел Методы). В эту работу не были включены талломы длиной <0.2 см; вызывает сомнение положение фертильной группы в конце функционально-возрастного спектра (после сенильной группы) и не логично включение в одну стерильную группу талломы разных онтогенетических состояний.

Другие авторы – В.В. Горшков и Н.А. Семенова (2008) – на основе концепции дискретного описания лишайников (Суетина, 2001), которая в большей степени соответствует классической схеме онтогенеза растений (Работнов, 1950; Уранов, 1975), выстроили логическую последовательность онтогенетических возрастных состояний вида, но не рассматривали талломы размером <0.5 см и не дали подробного описания разных возрастных состояний.

Проведенный анализ показал, что в литературе в целом отсутствует полное описание онтогенетического развития вида *L. pulmonaria*, не известны морфометрические показатели талломы на ранних этапах онтогенеза. Очевидно, что имеющиеся в литературе данные требуют обобщения, унификации, проведения соответствий между выделяемыми разными авторами групп и состояний, изучения их размерной структуры, морфогенеза и экологических особенностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в 2014–2016 гг. в лесных сообществах Республики Карелия: в подзоне средней тайги – в заповеднике “Кивач”, национальном парке “Водлозерский”, заказнике “Кижский”, Петрозаводском городском округе; в подзоне северной тайги – в заповеднике “Костомукшский”, национальном парке “Паанаярви”.

Сбор данных осуществлялся на сети постоянных пробных площадей (ПП) размером 1 га. На каждой ПП были выполнены полные геоботанические описания фитоценозов (Андреева и др., 2002), в ходе которых оценивали сомкнутость крон деревьев (сквозистомером Ипатова) и относительную сумму площадей поперечных сечений стволов живых деревьев, сухостоя и валежа (полнотомером Биттерлиха), производили описания напочвенного покрова. Для оценки давности нарушения в сообществах использовался метод изучения возрастной структуры ценопопуляций ели (*Picea spr.*) (Ставрова и др., 2016).

Всего было описано 33 ПП, расположенных в различных типах леса с давностью нарушения от 80 до 450 лет. В подзоне **средней** тайги все изученные фитоценозы принадлежат к единому эколого-динамическому ряду, представляющему собой восстановительную динамику ельника чернично-зеленомошного: 1) средневозрастные осинники чернично-злаковые (80–110 лет), 2) смешан-

ные елово-осиновые сообщества злаково-черничные (150–190 лет); 3) ельники черничные зеленомошные субклимаксовые (210–260 лет) и 4) условно климаксовые (410–450 лет). Средневозрастные осинники в подзоне **северной** тайги в результате рекогносцировочных маршрутов (~110 км) не были зарегистрированы. На данной территории еловые сообщества, как правило, возобновляются через березовые леса. Поэтому исследования здесь проводились только в двух типах лесных фитоценозов: 1) смешанных елово-березовых сообществах злаково-черничных (180–200 лет) и 2) ельниках черничных зеленомошных субклимаксовых (210–270 лет).

Изучение показателей талломы *L. pulmonaria* выполнены методом сплошного учета на всех субстратах (ветвях и стволах живых и мертвых деревьев) на высоте 0–2 м от земли с регистрацией характеристик местообитания (параметров деревьев и микроусловий). Для каждого таллома при помощи рамки 25 × 25 см отмечали общую площадь и площадь некрозов (см²), а также принадлежность к функционально-возрастной группе по методике И.Н. Михайловой (2005): стерильные (*st*), без репродуктивных структур; гипосоредиезные (*s1*), с маргинальными сораями; мезосоредиезные (*s2*), с обильными маргинальными и единичными ламинальными сораями; гиперсоредиезные (*s3*), с обильными ламинальными сораями; фертильные (*fert*), с апотециями; субсенильные (*s/sen*), частично разрушенные в центре с регенеративными структурами на старых лопастьях; сенильные (*sen*) – отмирающие лопасти, с регенеративными структурами, образовавшиеся в результате распада крупного таллома.

Для изучения талломы площадью <1 см² со стволов не менее 5 деревьев с каждой ПП отбирались образцы корки ствола дерева в местах произрастания крупных талломы (на расстоянии от 2 до 10 см) и с участков, где талломы не визуализировались (как правило, на противоположной стороне ствола, на участках корки без мхов) (на основании Разрешения № 18 на добычу объектов животного и растительного мира, принадлежащих к видам, занесенным в Красную книгу РФ от 28.03.2016 Росприроднадзора). Образцы субстрата изучались в лабораторных условиях при помощи бинокля (Микромед МС2), при этом регистрировали следующие признаки талломы вида (при их наличии): длина, ширина (мм), наличие ризин и шероховатостей, наличие и число выемок (шт.), форма (плоская/неплоская, округлая), число лопастей (шт.), цвет, налет, ямчатые углубления.

Начальные этапы онтогенеза *L. pulmonaria* (латентный период, возрастные состояния прототаллюс и протероталлюс прегенеративного периода) не были исследованы и их описание дано с учетом литературных данных, общих для лишай-

Таблица 1. Объем анализируемого материала

Тип данных	Количество
Число пробных площадей, шт.	33
Число учетных деревьев и кустарников, шт.	676
Число описаний талломов площадью >1 см ² <i>L. pulmonaria</i> , шт.	3709
Число описаний талломов площадью <1 см ² <i>L. pulmonaria</i> , шт.	819
Число и площадь образцов корки, отобранных с субстратов для изучения микроталломов, шт./см ²	632/11967

ников в целом (Суетина, 2001, 2006; Семенова, 2005; Суетина, Готов, 2015). Ювенильное и иматурные возрастные состояния описаны на основе результатов исследования талломов площадью <1 см². Описания последующих онтогенетических состояний — от виргинильного до сенильного, частично или полностью, совпадают с имеющимися сведениями в литературе (Михайлова, 2005; Горшков, Семенова, 2008). Так, функционально-возрастным группам (Михайлова, 2005) соответствуют (полностью или частично) следующие онтогенетические состояния: стерильные — виргинильное 1, гипосоредиозные — виргинильное 2a, мезосоредиозные — виргинильное 2b, гиперсоредиозные — виргинильное 2c, фертильные — генеративные; субсенильные — субсенильные, сенильные — сенильные.

Размерная структура онтогенетических состояний ювенильное — сенильное изучалась на основе линейных размеров (длина, ширина) и площади талломов.

Статистическая обработка результатов выполнена на основе регрессионного анализа с использованием уравнения линейной функции: $y = aX + b$ (Андреева и др., 2002; Ивантер, Коросов, 2003). При наличии взаимосвязей линии на графиках проводили в соответствии с уравнением регрессии. При отсутствии достоверных изменений на графике изображали горизонтальную прямую на уровне среднего значения. Средние значения характеристик талломов *L. pulmonaria* сравнивали друг с другом, используя непараметрический критерий Манна–Уитни (Ивантер, Коросов, 2003).

Анализ выполнен на основе описания 4528 талломов, произрастающих на 676 субстратных единицах (отдельно стоящих или лежащих деревьях и кустарниках) (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полный жизненный цикл *L. pulmonaria*, включающий развитие от споры до споры, начинается с прорастания аскоспоры гриба, включает процессы лихенизации с эукариотической зеленой водорослью (*Dictyochloropsis reticulata*), долихенизации — с цианобактерией (*Nostoc* sp.), и заканчи-

вается образованием плодовых тел, процессами старения и отмирания таллома.

Как известно, полового размножения у водорослей и цианобактерий в теле лишайника не наблюдается — оно характерно только для грибного компонента. Споры полового размножения у вида *L. pulmonaria* формируются в плодовых телах открытого типа (апотециях). Апотеции красновато-коричневого цвета образуются на верхней поверхности вдоль ребер и краям таллома, имеют размер 2–4 мм в диаметре (Denison, 2003). В каждом апотеции содержатся сумки со спорами, количество которых превышает десятки тысяч штук. По мере созревания, споры высыпаются из сумок и, подхватываемые воздушными и водными потоками, являются легкими агентами для распространения и колонизации новых субстратов. Однако на данном этапе популяции вида проходят своеобразное “узкое горлышко” (bottle neck), связанное с необходимостью прорастающих из споры гиф гриба встретить в данном местообитании нужную водоросль для последующего процесса лихенизации (Walser et al., 2001). Возрастные состояния прототаллюс (прорастание гифы из споры) и протероталлюс (лихенизация) в данном исследовании нами не наблюдались, в виду микроскопических размеров, кратковременности протекания и технических трудностей в определении видовой принадлежности. Однако, имеющиеся в литературе данные (Суетина, 2001, 2006; Семенова, 2005; Суетина, Готов, 2015), и общая логика хода онтогенеза предполагают их наличие, по крайней мере, в тех ценопопуляциях вида, в которых присутствуют генеративные талломы.

Полученные в настоящей работе данные позволяют внести изменения в имеющуюся в литературе схему онтогенеза *L. pulmonaria* (Горшков, Семенова, 2008) (табл. 2). Так, в прегенеративном периоде можно выделить 4 возрастных состояния: ювенильное, иматурное 1, иматурное 2, иматурное 3.

Ювенильное и иматурные состояния. В ходе развития на начальных стадиях онтогенеза талломы *L. pulmonaria* площадью <1 см² претерпевают ряд последовательных (качественно различных) морфологических состояний (в скобках указано

Таблица 2. Онтогенетические состояния *Lobaria pulmonaria*

Период	Онтогенетические состояния и их индексы	Признаки
Латентный	Спора гриба (<i>sp</i>)	Спора четырехклеточная, веретеновидная, бесцветная
Прегенеративный	Прототаллус (<i>pr</i>)	Образование из спор гиф мицелия
	Протероталлус (<i>prt</i>)	Обвивание гифами клеток зеленой водоросли и образование зачатка слоевища
	Ювенильный таллом (<i>j</i>)	Округлый, выпуклый, каплевидной формы (накипное слоевище)
	Имматурное 1 (<i>im1</i>)	Листоватое слоевище, в форме плоской пластинки овальной формы
	Имматурное 2 (<i>im2</i>)	Слоевище продолговатой формы, с 0–1 выемкой
	Имматурное 3 (<i>im3</i>)	Сильнорассеченное слоевище (2 и > выемки), появляются ямчатые углубления (характерная “легочная” складчатость), и/или первые зачаточные лопасти, формирование цефалодий
	Виргинильное 1 (<i>v1</i>)	Таллом имеет характерную взрослую форму, хорошо сформированные лопасти с ямчатыми углублениями и ребрами; стерильный, без репродуктивных структур
	Виргинильное 2а (<i>v2a</i>)	Слоевище с маргинальными сораями, цефалодии становятся заметными на верхней и/или нижней поверхности слоевища
	Виргинильное 2b (<i>v2b</i>)	Слоевище с обильными маргинальными и единичными ламинальными сораями
	Виргинильное 2с (<i>v2c</i>)	Слоевище с обильными ламинальными сораями, с хорошо заметными цефалодиями, формируются изидии
Генеративный	Генеративное (<i>g</i>)	Крупное слоевище с апотециями, с обильными ламинальными сораями, на старых участках таллома имеются изидии
Постгенеративный	Субсенильное (<i>ss</i>)	Частично разрушенное слоевище, на старых участках имеются изидии и лобули (регенеративные структуры, не способные к распространению)
	Сенильное (<i>s</i>)	Распад крупного таллома, наличие большого количества некротических образований, отмирающие лопасти с регенеративными структурами, не способными к распространению

число исследованных талломов): 1) накипное слоевище округлой, выпуклой, каплевидной формы (209 шт.), 2) листоватое слоевище в форме плоской пластинки овальной формы (соотношение длины к ширине 3 : 2) (182 шт.), 3) листоватое слоевище продолговатой формы (соотношение длины к ширине 7 : 3), без выемок или с одной выемкой (214 шт.), 4) сильнорассеченное слоевище с 2-мя и более выемками, с ямчатыми углублениями (“легочной” складчатостью) и/или с первыми зачаточными лопастями, с формирующимися цефалодиями (214 шт.). Выявлено, что в последовательном морфологическом ряду состояний, при переходе от округлой формы к рассеченной, средняя длина и ширина талломов *L. pulmonaria* увеличивается (рис. 1а, 1б, табл. 3), растет площадь талломов (рис. 2а–2г, табл. 4). Важно отметить, что округлые талломы не превышают 0.15 см в длину и

0.12 см в ширину, овальные – ≤0.45 и ≤0.24 см, продолговатые – ≤0.82 и ≤0.71 см и рассеченные – ≤1.04 и ≤0.86 см соответственно.

Установлено, что среди изученных признаков первыми в ходе онтогенеза появляются щетинки (опушение), ризины (на нижней стороне таллома) и шероховатости (на верхней стороне); позднее формируются выемки, и только после этого образуются выраженные ямчатые углубления.

Основываясь на полученных данных и имеющихся в литературе сведениях об онтогенезе растений и лишайников (Работнов, 1950; Уранов, 1975; Суетина, 2001; Горшков, Семенова, 2008; Суетина, Готов, 2010; Суетина, Ямбердова, 2010 и др.), все изученные микроскопические талломы можно отнести к двум возрастным состояниям прегенеративного периода онтогенеза: округлые выпуклые талломы – к ювенильному (*j*) состоя-

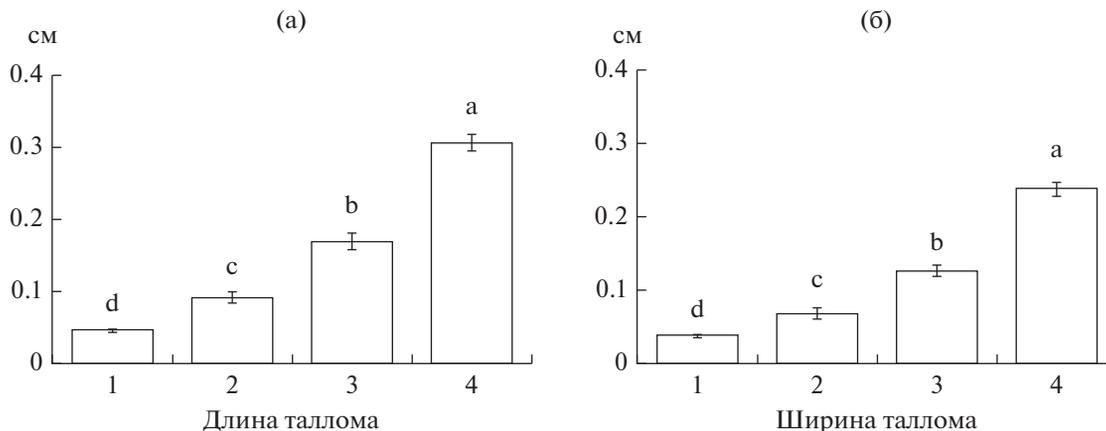


Рис. 1. Средние значения длины (а) и ширины (б) талломов *Lobaria pulmonaria* разных морфологических форм в исследованных фитоценозах Карелии. Примечание: формы талломов обозначены следующими цифрами: 1 – округлая, 2 – овальная, 3 – продолговатая, 4 – рассеченная. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними значениями при $p < 0.01$.

нию, а остальные 3 морфологические фазы, развивающиеся последовательно друг за другом, – к имматурному (*im1*, *im2*, *im3* соответственно).

Талломы, находящиеся в ювенильном состоянии, не имеют признаков взрослого организма. Начиная с имматурного 1 до имматурного 3 состояний у *L. pulmonaria* формируется листоватое слоевище, у талломов увеличиваются линейные размеры и площадь (табл. 3, табл. 4, рис. 2а–2г), начинают появляться и постепенно развиваются характерные видовые особенности. Важно отметить, что в возрастном состоянии имматурное 3 в теле лишайника начинают формироваться цефалодии, что свидетельствует о завершении процесса лихенизации и образовании трехкомпонентной системы: гриба, зеленой водоросли и цианобактерии. Так, в работе С. Cornejo и С. Scheidegger (2013) описан процесс образования цефалодий у молодых талломов *L. pulmonaria*. Авторы отмечают, что данные структуры у молодых талломов могут быть как внешними, так и внутренними.

Как показали проведенные исследования, ювенильные и имматурные талломы *L. pulmonaria* обнаружены только в тех местообитаниях, где растут макроталломы, то есть в непосредственной близости к крупным талломам, которые, вероятно, являются материнскими. С противоположной стороны ствола не было обнаружено ни одного таллома площадью $< 1 \text{ см}^2$. Важно отметить, что в лесных сообществах подзоны средней тайги на стволах *Populus tremula* с увеличением общей площади талломов на дереве с 50 до 750 см^2 плотность ювенильных и имматурных талломов повышается в 30 раз: с 0.01 до 0.3 шт./см^2 (рис. 3).

Виргинильные состояния. Как и у растений, формирование типичной жизненной формы лишайников, сохраняющейся на последующих

этапах онтогенеза, происходит в виргинильном (*v*) онтогенетическом состоянии (Суетина, Ямбердова, 2010). Так, в возрастном состоянии **виргинильное 1 (v1)** прегенеративного периода талломы *L. pulmonaria* имеют характерный взрослый облик – хорошо сформированные лопасти, ямчатые углубления и ребра, но являются стерильными, без репродуктивных структур. Большинство талломов этого состояния (75%) имеют площадь $\leq 10 \text{ см}^2$ (рис. 2д, табл. 4). При дальнейшем развитии лишайника в состоянии **виргинильное 2а (v2a)** площадь таллома увеличивается: у 74% она варьирует от 1.3 до 30 см^2 и в среднем составляет 14 см^2 (рис. 2е). По краям лопастей появляются вегетативные диаспоры, которые занимают до 10% площади таллома, ребра становятся более выпуклыми. На верхней и/или нижней поверхности таллома становятся заметными цефалодии, в виде коричневых или темно-коричневых выпуклостей. В онтогенетическом состоянии **виргинильное 2б (v2b)** значительная часть талломов (71%) имеет площадь от 10 до 70 см^2 (рис. 2ж) со средним значением $\sim 30 \text{ см}^2$. Большое количество вегетативных пропагул формируется по краям таллома, появляются единичные ламинальные сорали. Доля площади с вегетативными диаспорами от общей площади таллома составляет от 10 до 30%. Заканчивается прегенеративный период онтогенетическим состоянием **виргинильное 2с (v2c)**. При этом площадь таллома в данном состоянии сильно варьирует от 6.25 до 3437 см^2 (табл. 4, рис. 2з) и в среднем составляет 265.9 см^2 . У 78% талломов площадь превышает 40 см^2 . Сорали обильно распространены по краям и ребрам таллома, площадь их поверхности составляет $> 30\%$, на верхней и/или нижней поверхности таллома хорошо про-

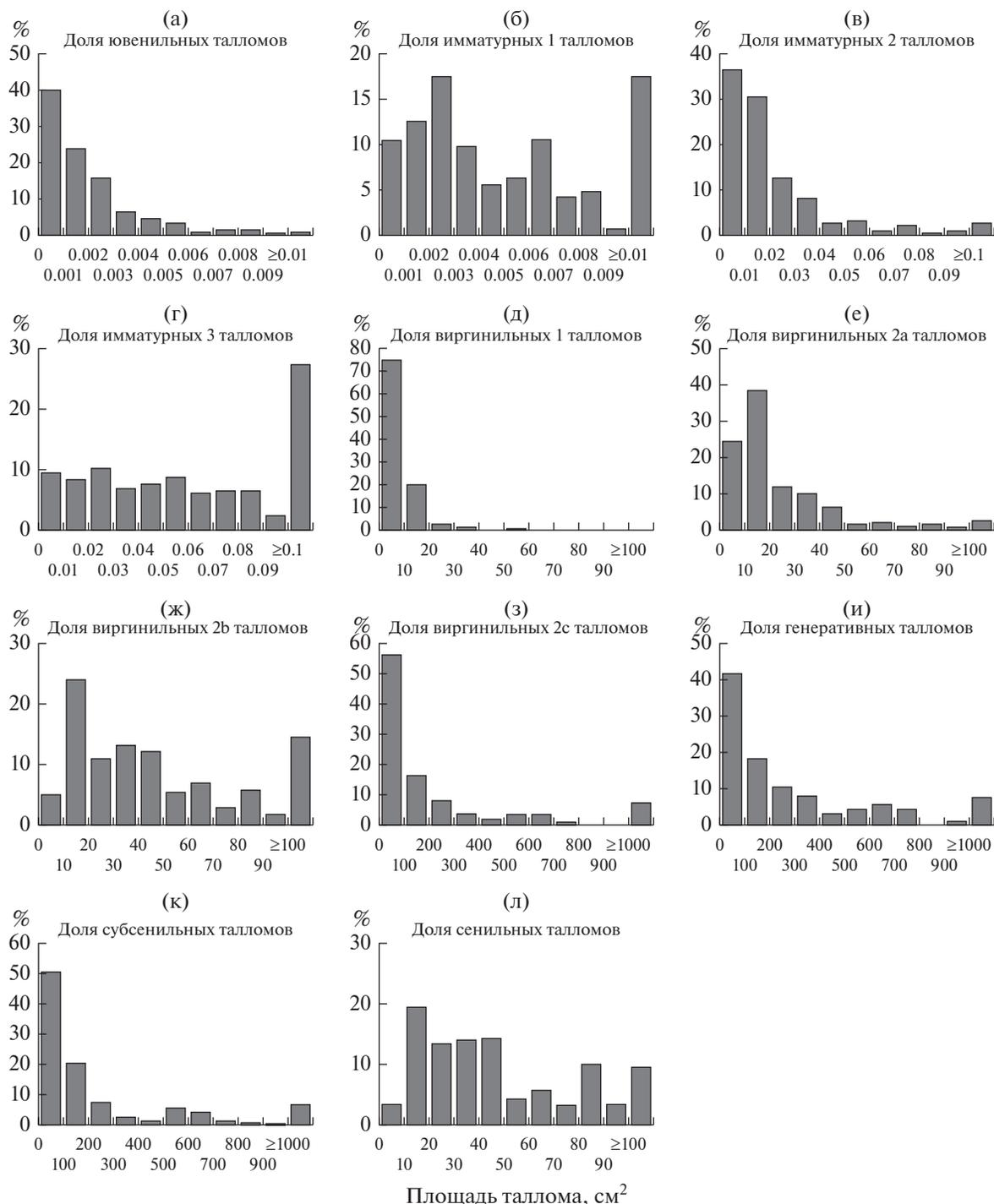


Рис. 2. Площадь талломов *Lobaria pulmonaria* в разных онтогенетических состояниях.

смагиваются цефалодии, а на старых участках таллома начинают формироваться изидии.

Генеративное состояние. *L. pulmonaria* размножается и распространяется преимущественно с помощью вегетативных диаспор и плодовые тела появляются редко (Gauslaa, 2006; Edman et al., 2008; Jüriado et al., 2011). Считается, что апотеции

формируются только в генетически гетерогенных популяциях (Zoller et al., 1999). В изученных лесных сообществах Карелии только у 4% талломов обнаружены плодовые тела. Генеративные (g) талломы имеют достаточно крупные размеры. Так, у ~60% талломов площадь составляет $\geq 100 \text{ cm}^2$ (рис. 2и). Важно отметить, что апотеции

Таблица 3. Линейные размеры талломов *Lobaria pulmonaria*, относящихся к разным онтогенетическим состояниям

Онтогенетические состояния	Число талломов	Длина таллома			Ширина таллома		
		минимальные/максимальные значения, см	среднее значение, см	CV ¹ , %	минимальные/максимальные значения, см	среднее значение, см	CV ¹ , %
<i>j</i>	209	0.01–0.15	0.05 ± 0.002	53	0.01–0.12	0.04 ± 0.001	52
<i>im1</i>	182	0.01–0.45	0.09 ± 0.007	61	0.01–0.24	0.06 ± 0.005	49
<i>im2</i>	214	0.03–0.82	0.17 ± 0.008	61	0.02–0.71	0.12 ± 0.007	65
<i>im3</i>	214	0.04–1.04	0.32 ± 0.01	56	0.02–0.86	0.23 ± 0.01	57
<i>v1</i>	1136	1–30	3.72 ± 0.11	78	1–13	2.54 ± 0.06	59
<i>v2a</i>	1117	2–40	8.01 ± 0.23	82	1–25	5.43 ± 0.11	57
<i>v2b</i>	279	2–39	12.15 ± 0.44	52	2–29	9.17 ± 0.36	56
<i>v2c</i>	192	2–76	20.16 ± 1.13	66	1–44	14.05 ± 0.69	59
<i>g</i>	156	5–91	29.79 ± 1.78	60	3–59	20.01 ± 1.19	59
<i>ss</i>	326	5–84	26.2 ± 1.09	67	1–64	16.8 ± 0.65	65
<i>s</i>	503	2–63	19.39 ± 0.58	63	1–49	13.1 ± 0.39	63

Примечание. ¹ Здесь и далее CV – коэффициент вариации.

формируются на богатых соралиями талломах, с ярко выраженными ребрами. На старых участках таллома имеются изидии.

Субсенильное и сенильное состояния. В постгенеративном периоде у **субсенильных (ss)** талломов *L. pulmonaria* начинает разрушаться слоевище, на

старых, отмирающих участках имеются изидии, а также начинают формироваться регенеративные структуры, не способные к распространению (лобули). Однако площадь у 50% талломов, принадлежащих к субсенильному состоянию, составляет ≥ 100 см² (рис. 2к). В данном онтогенетическом состоянии площадь поверхности таллома с вегетативными пропругами составляет $>30\%$. Завершает онтогенез **сенильное (s)** состояние, при котором большая часть таллома разрушается, а на оставшихся лопастях имеются крупные некротические участки, а также регенеративные структуры, не способные к распространению. Площадь некрозов от общей площади таллома составляет в среднем $\sim 20\%$. Большая часть талломов ($\sim 60\%$) этого состояния имеет площадь от 20 до 50 см² (рис. 2л). При этом на оставшихся частях таллома присутствуют вегетативные пропруги (сорали, изидии), которые, по-видимому, успешно распространяются до момента отмирания таллома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе изученной выборки талломов *L. pulmonaria*, с учетом литературных данных (Михайлова, 2005; Горшков, Семенова, 2008), в онтогенезе вида было выделено 4 периода и 14 возрастных состояний.

После объединения грибного компонента с водорослью зачаток слоевища обретает округлую, каплевидную форму (ювенильное возрастное состояние); со временем таллом становится листо-

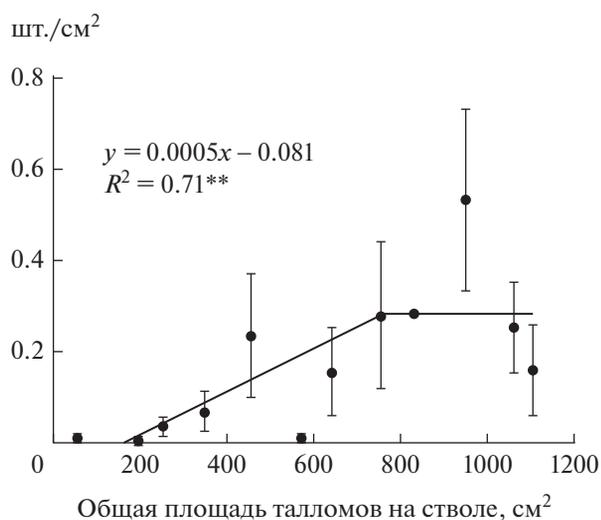


Рис. 3. Плотность микроталломов *Lobaria pulmonaria* при разной общей площади талломов на стволах *Populus tremula* в лесных сообществах среднетаежной подзоны. Примечание: вертикальными линиями показана ошибка среднего, R^2 – коэффициент детерминации; ** – уровень значимости, $p < 0.01$.

Таблица 4. Площадь таллома и доля некротических образований в талломах *Lobaria pulmonaria* разных онтогенетических состояний

Онтогенетические состояния	Число талломов	Площадь таллома			Площадь некрозов		
		минимальные/максимальные значения, см ²	среднее значение, см ²	CV, %	минимальные/максимальные значения, см ²	среднее значение, см ²	CV, %
<i>j</i>	209	0.0001–0.048	0.0022 ± 0.0003	171	–	–	–
<i>im1</i>	182	0.0003–0.057	0.0065 ± 0.0007	121	–	–	–
<i>im2</i>	214	0.001–0.76	0.034 ± 0.0067	288	–	–	–
<i>im3</i>	214	0.001–0.89	0.095 ± 0.0075	119	–	–	–
<i>v1</i>	1136	0.3–69	7.9 ± 0.26	110	0–50	1.2 ± 0.21	594
<i>v2a</i>	1117	1.25–443	27.0 ± 1.19	147	0–67	4.5 ± 0.32	240
<i>v2b</i>	279	3.1–544	58.1 ± 3.97	114	0–50	5.6 ± 0.58	174
<i>v2c</i>	192	6.25–3437	265.9 ± 34.84	182	0–50	11.4 ± 3.73	698
<i>g</i>	156	12.5–3750	330.2 ± 41.04	155	0–86	8.1 ± 0.92	142
<i>ss</i>	326	6.25–1937	292.7 ± 30.65	189	0–54	9.2 ± 0.49	96
<i>s</i>	503	1.9–564	96.6 ± 5.59	128	0–80	19.7 ± 0.79	91

ватым, сильнорасщепленным, появляется ямчатая бугристость. В состоянии имматурное 3 начинает происходить внедрение цианобактерий в состав таллома. Таким образом, в возрастном состоянии виргинильное 1 талломы приобретают взрослый облик, однако все еще остаются стерильными.

В ходе индивидуального развития, в возрастном состоянии виргинильное 2, таллом увеличивается в размере на его поверхности образуются сорали, развивающиеся сначала по краям лопастей, а впоследствии и на их верхней поверхности, формируются изидии, цефалодии становятся хорошо заметными на верхней и/или нижней поверхности таллома. Вегетативные диаспоры содержат в себе клетки гриба и зеленой водоросли. После отделения от материнского таллома соредии закрепляются на стволе дерева гифами гриба и образуют новый таллом. Однако для того чтобы выжить, ему необходимо включить в состав своего тела цианобактерию (Werth et al., 2006).

Когда таллом достигает крупных размеров, а его поверхность обильно покрывают сорали, он становится потенциально генеративным. В результате полового размножения на поверхности таллома образуются плодовые тела – апотеции.

С течением времени таллом начинает разрушаться. При этом на старых лопастях имеются изидии, которые могут разрастаться в лобули (регенеративные структуры не способные к распространению) (Михайлова, 2005). Заканчивается жизненный цикл лишайника распадом крупного таллома и наличием большого количества некротических образований. Важно отметить, что на поверхности старых субсенильных и сенильных талломов присутствуют в большом

количестве вегетативные пропагулы, что свидетельствует о способности данного вида лишайника к вегетативному размножению до конца жизни.

В результате механического воздействия от таллома могут отделяться не только специализированные вегетативные диаспоры, но и целые фрагменты. Такие части таллома при попадании в благоприятные условия способны прикрепиться к субстрату и образовать новый таллом. В таком случае необходимость в процессе долихенизации отпадает.

Таким образом, в жизненном цикле *L. pulmonaria* есть несколько вариантов образования нового слоевища: от аскоспоры, вегетативной диаспоры или фрагмента таллома. При этом талломы, образовавшиеся разными способами, могут в процессе онтогенеза проходить через генеративное состояние, а могут его пропустить. Это связано с тем, что плодовые тела формируются только в генетически гетерогенных популяциях, т.е. при наличии гетероталлических талломов *L. pulmonaria* (Zoller et al., 1999). Установлено, что на процесс формирования апотециев оказывают влияние условия местообитания, прежде всего – давность нарушения сообщества, от которой зависит наличие подходящих условий для развития ценопопуляций и продолжительность колонизации (Игнатенко, Тарасова, 2018).

В ходе исследований стало очевидно, что крупные талломы вида в подходящих условиях среды обладают высоким потенциалом к образованию новых жизнеспособных талломов. Несмотря на то, что определить, из каких именно (половых или вегетативных) диаспор образовались те или иные

ювенильные и имматурные талломы без генетических исследований невозможно, полученные данные позволяют предположить, что большая часть описанных ювенильных и имматурных талломов возникла вегетативным путем, поскольку фертильные талломы *L. pulmonaria* в изученных сообществах встречаются достаточно редко.

Приведенная в настоящей работе схема онтогенеза имеет ряд существенных отличий от имеющихся в литературе данных (Михайлова, 2005; Горшков, Семенова, 2008). Как показали наши данные, ювенильные талломы не превышают 0.15 см в длину и 0.12 см в ширину, а имматурные 1 – ≤0.45 и ≤0.24 см соответственно. Исходя из принципов дискретного выделения возрастных (онтогенетических) состояний у лишайников (Суетина, 2006; Суетина, Глотов, 2015) к ювенильному следует относить слоевища только накипной жизненной формы, а не в виде лопасти (чешуйки) (Горшков, Семенова, 2008), которые, на наш взгляд, являются имматурными. Момент появления цефалодиев на талломах – важнейший признак, который до этого в литературе не учитывался.

Способность к образованию вегетативных пропагул является одним из главных признаков, появляющихся в ходе онтогенеза лишайника, и, как правило, сохраняющийся в течение всей жизни таллома. Однако в работе В.В. Горшкова и Н.А. Семеновой (2008) наличие соредиев учитывается только в виргинильном 2а состоянии. В наших исследованиях, как и в работе И.Н. Михайловой (2005), при выделении виргинильных состояний (v1, v2a, v2b, v2c) ключевым признаком являлось обилие и расположение сорелей, а также площадь таллома. Известно, что в онтогенетическом ряду от виргинильного 2а до виргинильного 2с увеличивается число и доля сорелей, возрастают линейные размеры талломов (Михайлова, 2005). Показано, что изидии появляются на старых лопастях талломов, которые обильно покрыты сорелями (виргинильное 2с). Важно, что вегетативные пропагулы продолжают существовать на старых, погибающих талломах и способны к распространению. Изидии и лобули в работе В.В. Горшкова и Н.А. Семеновой (2008) используются как отдельные признаки для выделения онтогенетических состояний виргинильное 2b и виргинильное 2с соответственно. В наших исследованиях, как и в работе И.Н. Михайловой (2005), установлено, что лобули формируются на старых, отмирающих лопастях на талломах, которые относятся к постгенеративному периоду. Таким образом, полученные данные существенно дополняют имеющуюся в литературе схему онтогенеза лишайника *L. pulmonaria*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность родственникам и друзьям авторов, студентам и преподавателям кафедры ботаники и физиологии растений Петрозаводского государственного университета за помощь в сборе полевого материала, а также администрациям и сотрудникам ООПТ за помощь в организации и проведении полевых исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта “Комплексная оценка восстановительного потенциала мохового и лишайникового покрова в ходе вторичных автогенных сукцессий в таежных экосистемах Северо-Запада России” (Госзадание Минобрнауки 5.8740.2017/БЧ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Е.Н., Баккал И.Ю., Горшков В.В. и др. Методы изучения лесных сообществ. СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 2002. 240 с.
- Горшков В.В., Семенова Н.В. Структура популяций *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. в лесах с разной давностью последнего нарушения в средней тайге Республики Коми // Современное состояние и пути развития популяционной биологии: Материалы X всероссийского популяционного семинара (Ижевск, 17–22 ноября 2008 г.). Ижевск, 2008. С. 113–115.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию. Учебное пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2003. 304 с.
- Игнатенко Р.В. Экология лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. в растительных сообществах Карелии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: БИН РАН, 2018. 26 с.
- Игнатенко Р.В., Тарасова В.Н. Оценка состояния лишайника лобария легочная (*Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.) в лесных сообществах с разной давностью нарушения на Северо-западе Европейской России // Экология. 2018. № 4. С. 245–253.
- Игнатенко Р.В., Тарасова В.Н. Характеристика ювенильного и имматурного состояний прегенеративного периода онтогенеза охраняемого лишайника лобария легочная (*Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.) // Современная микология в России. М.: Нац. акад. микол., 2017. Т. 6. С. 324–327.
- Микрюков В.С. Популяционная экология эпифитного лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. на территории Урала и Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН, 2011. 20 с.
- Михайлова И.Н. Анализ субпопуляционных структур эпифитных лишайников (на примере *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.) // Вестник Нижегородского

- университета им. Н.И. Лобачева. 2005. № 1. Вып. 9. С. 124–134.
- Михайлова И.Н., Воробейчик Е.Л. Размерная и возрастная структура популяций эпифитного лишайника *Hurogymnia physodes* (L.) Nyl. в условиях атмосферного загрязнения // Экология. 1999. № 2. С. 130–137.
- Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. БИН АН СССР. Сер. 3. Геоботаника. М., 1950. Вып. 6. С. 7–204.
- Семенова Н.А. Критерии для выделения онтогенетических состояний лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Th. Fr. // Актуальные проблемы биологии и экологии: Тезисы докладов XII молодежной научной конференции Института биологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, Республика Коми, Россия 4–7 апреля 2005 г.). Сыктывкар, 2005. С. 212–213.
- Ставрова Н.И., Горшков В.В., Катютин П.Н. Формирование структуры ценопопуляций лесообразующих видов в процессе послепожарного восстановления северотаежных лесов // Тр. КарНЦ РАН. Сер. Биогеография. 2016. № 3. С. 10–28.
- Суетина Ю.Г. Морфологический подход в популяционно-онтогенетических исследованиях лишайников // Особь и популяция – стратегия: сборник материалов IX Всероссийского популяционного семинара (Уфа, 2–6 октября 2006 г.). Уфа, 2006. Ч. 2. С. 366–371.
- Суетина Ю.Г. Онтогенез и популяционная структура *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. в различных экологических условиях // Экология. 2001. № 3. С. 203–208.
- Суетина Ю.Г., Глотов Н.В. Онтогенез и морфогенез кустистого лишайника *Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg. // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 1. С. 32–40.
- Суетина Ю.Г., Глотов Н.В. Популяционно-онтогенетические исследования эпифитных лишайников // Теоретические проблемы экологии и эволюции: Шестые Люблинские чтения, 11-й Всероссийский популяционный семинар и Всероссийский семинар “Гомеостатические механизмы биологических систем” с общей темой “Проблемы популяционной экологии” (Тольятти, 6–10 апреля 2015 г.). Тольятти, 2015. С. 288–292.
- Суетина Ю.Г., Ямбердова Е.И. Онтогенез и возрастновиталитетная структура популяции лишайника *Evernia prunastri* (L.) Ach. // Вестник Удмуртского университета. Серия “Биология”. Науки о земле. 2010. Вып. 3. С. 44–52.
- Уранов А.А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов // Биол. науки. 1975. № 2. С. 7–34.
- Фенько А.А., Тарасова В.Н. Распространение и состояние охраняемого лишайника бриория Надворника (*Bryoria nadvornikiana* (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw.) в лесных сообществах Петрозаводского городского округа // Тр. КарНЦ РАН. Сер. Экологические исследования. 2016. № 4. С. 83–91.
- Andersson L., Appelqvist T. *Lobaria pulmonaria* and *Gyalecta ulmi* as indicators of deciduous woodland with high nature qualities // Svensk Botanisk Tidskrift. 1987. V. 81. P. 185–194.
- Andersson L., Martverk R., Kylvik M. et al. Woodland Key Habitat Inventory in Estonia 1999–2002. Tartu: Regio Publishing, 2003. 192 p.
- Campbell J., Fredeen A.L. *Lobaria pulmonaria* abundance as an indicator of macrolichen diversity in Interior Cedar-Hemlock forests of east-central British Columbia // Canadian J. Botany. 2004. V. 82. 970–982.
- Cornejo C., Scheidegger C. New morphological aspects of cephalodium formation in the lichen *Lobaria pulmonaria* (Lecanorales, Ascomycota) // The Lichenologist. 2013. V. 45(1). P. 77–87.
- Culberson W.L., Egan R.S., Esslinger T.L., Hodgkinson B.P. Recent literature on lichens. 2019. <http://nhm2.uio.no/lichens/rll.html>. [Presented on the Web by E. Timdal. First posted 1997.04.14, continuously updated.]
- Denison W.C. Apothecia and ascospores of *Lobaria oregana* and *Lobaria pulmonaria* investigated // Mycologia. 2003. V. 95. P. 513–518.
- Edman M., Eriksson A.-M., Villard M.-A. Effects of selection cutting on the abundance and fertility of indicator lichens *Lobaria pulmonaria* and *Lobaria quercizans* // Journal of Applied Ecology. 2008. V. 45(1). P. 26–33.
- Gauslaa Y. *Lobaria pulmonaria*, an indicator of species-rich forest of long ecological continuity // Blyttia. 1994. V. 52. P. 119–128.
- Gauslaa Y. Population structure of the epiphytic lichen *Usnea longissima* in a boreal *Picea abies* canopy // Lichenologist. 1997. V. 29(5). P. 455–469.
- Gauslaa Y., Lie M., Solhaug K.A. et al. Growth and ecophysiological acclimation of the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* in forests with contrasting light climates // Oecologia. 2006. V. 147(3). P. 406–416.
- Jüriado I., Liira J., Csencsics D. et al. Dispersal ecology of the endangered woodland lichen *Lobaria pulmonaria* in managed hemiboreal forest landscape // Biodiversity Conservation. 2011. V. 20. P. 1803–1819.
- Liira J., Sepp T. Indicators of structural and habitat natural quality in boreo-nemoral forests along the management gradient // Annales Botanici Fennici. 2009. V. 46. P. 308–325.
- Nascimbene J., Brunialti G., Ravera S. et al. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. as an indicator of lichen conservation importance of Italian forests // Ecological Indicators. 2010. V. 10. P. 353–360.
- Pykälä J. Effects of new forestry practices on rare epiphytic macrolichens // Conservation Biology. 2004. V. 18. P. 831–838.
- Radies D.N., Coxson D.S. Macrolichen colonization on 120–140 year old *Tsuga heterophylla* in wet temperate rainforests of central-interior British Columbia: a comparison of lichen response to even-aged versus old-growth stand structures // Lichenologist. 2004. V. 36(3–4). P. 235–247.
- Ravera S., Massari G., Genovesi V. Phytoclimatic characterization of lichen habitats in central Italy // Nova Hedwigia. 2006. V. 82. P. 143–165.
- Rose F. Temperate forest management: its effects on bryophyte and lichens florae and habitats // Bryophytes and Lichens in a Changing Environment / Eds. Bates J.W., Farmer A.M. Oxford: Oxford Scientific Publications, Clarendon Press, 1992. P. 211–233.

- Scheidegger C., Frey B., Walser J.C.* Reintroduction and augmentation of populations of the endangered *Lobaria pulmonaria*: methods and concepts // *Lobarion Lichens as Indicators of the Primeval Forests of the Eastern Carpathians* / Eds. Kondratyuk S.Y., Coppins B.J. (Kiev, 25–30 May 1998). Kiev, 1998. P. 33–52.
- Scheidegger C., Werth S.* Conservation strategies for lichens: insights from population biology // *Fungal Biol. Rev.* 2009. V. 23. P. 55–66.
- Tarasova V.N., Favorskaja M.A., Shreders M.A.* State of *Evernia divaricata* (L.) Nyl. populations in forest communities of “Kivach” strict nature reserve (South Karelia) // *Field Meeting “Lichen of Boreal Forests” and the Fourth Russian Lichenological Workshop: Proceedings.* Syktyvkar, 2008. P. 183–196.
- Tschermak-Woess E.* *Dictyochloropsis splendida* (Chlorophyta), the correct phycobiont of *Phlyctis argena* and the high degree of selectivity or specificity involved // *Lichenologist.* 1995. V. 27. P. 169–187.
- Tschermak-Woess E.* The algal partner // *CRC handbook of lichenology* / Ed. Galun M. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Inc., 1988. V. 1. P. 39–92.
- Walser J.-C., Zoller S., Büchler U.* Species-specific detection of *Lobaria pulmonaria* (lichenized ascomycete) diaspores in litter samples trapped in snow cover // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10(9). P. 2129–2138.
- Werth S., Wagner H.H., Gugerli F. et al.* Quantifying dispersal and establishment limitation in a population of an epiphytic lichen // *Ecology.* 2006. V. 87(8). P. 2037–2046.
- Yoshimura I.* Lung lichens and their vegetation in Japan and the other regions // *Lobarion Lichens as Indicators of the Primeval Forests of the Eastern Carpathians* / Eds. Kondratyuk S.Y., Coppins B.J. (Kiev, 25–30 May 1998). Kiev, 1998. P. 53–63.
- Yoshimura I.* The genus *Lobaria* of Eastern Asia // *J. Hattori Bot. Lab.* 1971. V. 34. P. 231–364.
- Zoller S., Lutzoni F., Scheidegger C.* Genetic variation within and among populations of the threatened lichen *Lobaria pulmonaria* in Switzerland and implications for its conservation // *Molec. Ecol.* 1999. V. 8(12). P. 2049–2059.

***Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. Lichen Ontogenesis in Plant Communities of the Boreal Zone**

R. V. Ignatenko^{1,2,*}, V. N. Tarasova¹, and E. F. Markovskaya¹

¹*Petrozavodsk State University, Lenin st., 33, Petrozavodsk, 185910 Russia*

²*Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya st., 11, Petrozavodsk, 185000 Russia*

**e-mail: ocean-9@mail.ru*

Received April 8, 2019; revised October 29, 2019; accepted November 7, 2019

The ontogenesis of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* was presented. The studies were conducted in the forest communities of Karelia with times since disturbance from 80 to 450 years. It has been noticed that there were 4 periods and 14 age-related states in the ontogenesis of the *L. pulmonaria* according to the concept of a discrete description of plants and lichens. Each ontogenetic state of the *L. pulmonaria* was characterized by certain sizes of thallus, the presence and degree of vegetative diaspores development and apothecia on the thallus surface. Possible variants of the species ontogenesis were described.

Keywords: ontogenesis, lichens, *Lobaria pulmonaria*

УДК 597:591.1:577.115(98)

**СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ
И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО
ОБМЕНА У МОЛОДИ ЛЕПТОКЛИНУСА ПЯТНИСТОГО *LEPTOCLINUS
MACULATUS* (FRIES, 1838) РАЗНЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ
В УСЛОВИЯХ ПОЛЯРНОЙ НОЧИ**

© 2020 г. С. А. Мурзина^{а, *}, С. Н. Пеккоева^а, М. В. Чурова^а, З. А. Нефедова^а,
К. А. Филиппова^а, С. Фальк-Петерсен^{б, с}, Н. Н. Немова^а

^аИнститут биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,
ул. Пушкинская 11, Петрозаводск, 185910 Россия

^бAkvaplan-niva AS, Fram Centre, N-9296, Tromsø, Norway

^сUiT The Arctic University of Norway, Department of Arctic and Marine Biology, N-9037, Tromsø, Norway

*e-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2019 г.

После доработки 02.01.2020 г.

Принята к публикации 09.01.2020 г.

Впервые проведено сравнительное исследование суточной динамики липидного и жирнокислотного профиля, уровня энергетического обмена у молоди пятнистого лептоклинуса L2, L3, L4, L4*, L5 стадий развития, являющихся звеньями пелагической (L2, L3, L4) и бентосной (L4, L4*, L5) пищевой цепи из залива Конгс-фьорд в условиях полярной ночи. Суточная динамика липидных компонентов и активности ферментов анаэробного обмена может рассматриваться как один из механизмов генетически детерминированной онтогенетической и экологически ориентированной фенотипической разноразнообразности жизненной стратегии вида, направленной на поддержание его существования в конкретных условиях среды и адаптацию к ним на разных уровнях организации живого.

Ключевые слова: рыбы, онтогенез, биохимические адаптации, суточные ритмы, липиды, жирные кислоты, энергетический обмен, Арктика

DOI: 10.31857/S047514502002007X

ВВЕДЕНИЕ

Рыбы семейства Стихеевых (Stichaeidae) большую часть жизни проводят на дне прибрежных акваторий континентального шельфа морских экосистем, глубина их обитания сильно варьирует, некоторые из видов обитают в зоне приливно-отливных течений. Специфические условия обитания и широкий диапазон варьирования экологических факторов для рыб этого семейства определяют высокую степень адаптивности и пластичности.

Следует заметить, что информация о биологии данных видов семейства Стихеевые немногочисленна (Ochiai, Fuji, 1980; Miki et al., 1987; Keats et al., 1993; Smith, Wootton, 1999; Kolpakov, Klimkin, 2004; Rose, 2005; Murzina et al., 2008). Пятнистый лептоклинус (*Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838)) – морской донный вид, относящийся к арктическо-борельной (Долгов, Бензик, 2012; Мухина, Долгов, 2012) зоогеографической группе. Извест-

но, что репродуктивная функция и последующее развитие организма этих рыб протекает в условиях низких температур, икрометание лептоклинуса приходится на зимний сезон или зимне-весенний (Murzina et al., 2012) и тесно связано с температурой среды, а также трофикой, особенно, принимая во внимание тот факт, что личинки являются пелагическими (Андряшев, 1954; Пеккоева и др., 2014, 2017а, 2017б, 2018). Молодь лептоклинуса характеризуется длительным развитием в пелагиали и относительно недавно установленной многостадийностью) и в предложенной системе (Meyer Ottesen et al., 2011, 2014; Пеккоева, 2018) стадии обозначаются латинской буквой и цифрой: стадии ранжированы от L1 до L5, из которых L2, L3 обитают в пелагиали, L4, L4* – имеют переходный образ жизни от пелагиали к донному, а L5 – донное обитание. Стадии развития молоди различаются по морфофизиологическим характеристикам, а также разделяются по при-



Рис. 1. Стадии развития лептоклинуса пятнистого (по С.Н. Пеккоевой, 2018).

надлежности к экологическим группам (пелагической, “переходной”, донной) (Meyer Ottesen et al., 2011, 2014; Пеккоева и др., 2017а, 2018). В работе С.Н. Пеккоевой (Пеккоева, 2018) впервые представлены данные о липидном и жирнокислотном составе молоди *L. maculatus* в процессе постэмбрионального роста и развития в зимний период, приведены сведения по изменению длины и состояния особого провизорного образования тела – “липидного мешка” в процессе развития личинки. Формирование липидного мешка с началом экзогенного питания у личинок рассматривается как пример физиолого-биохимической адаптации к обитанию рыб в пелагиали, способствующей их успешному росту (Мурзина, 2010; Пеккоева, 2018). Полученные ранее результаты о закономерностях роста и смене питания по мере развития молоди лептоклинуса (Пеккоева и др., 2018; Пеккоева, 2018) свидетельствуют в пользу гипотезы об особенностях функционирования морской экосистемы в условиях полярной ночи. Несмотря на специфический фотопериод зимой, компоненты экосистемы активно, согласно сезону, взаимодействуют друг с другом, фито- и зоопланктон продолжают составлять определенную долю в структуре пелагических сообществ, обеспечивая пищей пелагических рыб (Berge et al., 2015). Ранее считалось, что в полярную ночь высокоширотные экосистемы характеризуются отсутствием выраженных миграций, суточных или ежемесячных, в частности у зоопланктона (р. *Calanus*, преимущественно), который рассматривается основным компонентом пищевых цепей Арктики. Результаты недавних научных исследований (Berge

et al., 2015; Last et al., 2016), демонстрируют неопровержимые доказательства адаптаций, морфологических, поведенческих, как на уровне популяции, так и на экосистемном. Показано, что, вертикальные миграции зоопланктона и их интенсивность являются компенсаторной реакцией не только на солнечное излучение летом, но и регулируются фазами Луны и ее положением над горизонтом – “лунная вертикальная миграция”/“lunar vertical migration” (Last et al., 2016). Влияние лунного света в полярную ночь на структуру и функционирование морских экосистем имеет глубоко эволюционное значение, в результате чего даже в зимнее время осуществляется перенос углерода и осуществляется взаимодействие в системе “хищник-хозяин” как внутри отдельных водных слоев, так и между ними.

В настоящей работе впервые провели сравнительное исследование суточной динамики липидов и жирных кислот, а также активности ферментов энергетического и углеводного обмена (цитохром с оксидазы, лактатдегидрогеназы, альдолазы) у лептоклинуса пятнистого (*Leptocephalus maculatus*, Fries, 1838) постэмбрионального периода L2, L3, L4, L4* и L5 стадии развития из акватории арх. Шпицберген (залив Конгс-фьорд) в полярную ночь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор проб пелагической молоди и донных особей лептоклинуса пятнистого проводились с использованием пелагического и донного тралов на борту НИС “Хельмер Ханссен” (R/V Helmer Hanssen, the Arctic University of Norway, UiT) в январе в акватории залива Конгс-фьорд (78°57’ с.ш. 11°56’ в.д.) в рамках международного рейса Marine Night field campaign 2014. Для исследования суточной динамики липидного профиля молоди в зимний период были исследованы мышцы молоди лептоклинуса пятнистого L2, L3, L4, L4* и L5 стадий развития (рис. 1), а также липидный мешок L3, L4, L4* стадий развития.

В полевых условиях, на борту судна, как можно быстрее после разбора улова и сортировки стадий молоди исследуемой рыбы проводили извлечение липидного мешка и мышц. В условиях лаборатории проводили фиксацию проб в хлороформ : метаноле (2 : 1, по объему). До проведения экстракции, индивидуальные пробы тканей хранились в смеси хлороформ : метанол (2 : 1, по объему) в стеклянных пробирках надлежащего объема. Общие липиды экстрагировали по методу Фолча (Folch et al., 1957), затем концентрировали с помощью роторно-вакуумной установки Hei-VAP Advantage HL/G3 (Heidolph, Germany).

Разделение классов липидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Merck” (“Merck”, Германия). Все анализируемые пробы наносили на пластинку с помощью шприца в объеме 15 мкл (360 мкг липида), в двух–трех повторностях. Фракционирование общих липидов проб проводили элюированием в системе растворителей: петролейный эфир–диэтиловый эфир–уксусная кислота (90 : 10 : 1 по объему) в хроматографической камере при комнатной температуре (Шталь, 1965). Для количественного определения общих фосфолипидов (ФЛ), триацилглицеринов (ТАГ), эфиров холестерина со следами восков (ЭХС + В) использовали гидроксаматный метод, принцип которого заключается в образовании темно-коричневых комплексов между ионами трехвалентного железа и гидроксамовыми кислотами, которые образуются при взаимодействии сложноэфирных связей липидов с гидроксиламином (Walsh et al., 1965; Сидоров и др., 1972). Далее проводили измерение оптической плотности каждой пробы на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия) при длине волны 540 нм. Количественное определение холестерина (ХС) проводили по методу Ф. Энгельбрехта (Engelbrecht et al., 1974) с использованием трихлоруксусного железа, растворенного в хлорной кислоте. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия) при длине волны 550 нм.

Для анализа жирнокислотного состава ОЛ проводили метанолиз жирных кислот (ЖК) общих липидов (Новак, 1978). Разделение метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе “Кристалл 5000.2” (ЗАО “ХРОМАТЭК”, Йошкар-Ола, Россия) с капиллярными колонками Zebron ZB-FFAP (Phenomenex, USA), используя в качестве внутреннего стандарта бегеновую кислоту (22:0) (Sigma Aldrich, USA). Обработку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы “Хроматэк Аналитик” (ЗАО “ХРОМАТЭК”, Йошкар-Ола, Россия). В качестве стандартов метиловых эфиров ЖК использованы наборы Supelco 37 Component FAME Mix, Bacterial acid methyl ester (BAME) mix, PUFA No. 1 (Supelco, USA).

Для исследования активности ферментов энергетического и углеводного обмена молодежи в зимний период были исследованы мышцы молодой лептоклинусы пятнистого L2, L3, L4, L4* и L5 стадий развития. Ткань рыбы хранилась до анализа при температуре -80°C . Активность цитохром с оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Л. Смита (Smith, 1995) измеряя увеличение количества окисленного цитохрома с. Общую активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) определяли, измеряя количества восстановленных

НАД⁺ и НАДФ⁺ по общепринятой методике (Кочетов, 1980). Активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Веск в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность ферментов выражали в мкмоль/мин/г ткани.

Статистический анализ полученных результатов производили с помощью критерия Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Исследования выполнены на базе лаборатории экологической биохимии с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика липидов и жирных кислот

Исследована динамика липидов и их ЖК-компонентов у разновозрастной молодежи *Leptoclinus maculatus*, обитающей в заливе Конгс-фьорд в ответ на суточный цикл (“дневной” трал и “ночной” трал) в полярную ночь зимой (январь) (табл. 1–4).

Не установлено изменений в содержании липидов и ЖК в мышцах и липидном мешке наиболее адаптированной к обитанию в пелагической среде молодежи L3 стадии развития в ответ на суточный цикл в полярную ночь зимой (табл. 1–4). При этом, для пелагической молодежи L2 стадии и переходной L4 стадии показано достоверное снижение минорного класса энергетических липидов ЭХС и восков, а также структурных липидов в форме ХС (табл. 1) в ночные часы по сравнению с таковым в дневные часы сбора проб. Показано, что в мышцах молодежи L2, L3, L4* и L5 стадий развития ЖК-состав ОЛ в ответ на суточный цикл достоверно не изменялся. Однако, в мышцах молодой лептоклинусы пятнистого L4 стадии происходит снижение содержания ФЛ и существенное повышение ТАГ от “дневных” к “ночным” часам в зимний период (7.8, 6.5 и 4.5 и 8.0% сухой массы, соответственно) (табл. 1), а также снижение содержания ПНЖК (за счет незаменимой докозагексаеновой, 22:6(n-3), ЖК). Содержание МНЖК за счет 20:1(n-9) ЖК, имеющей пищевое происхождение, в мышцах молодежи L4 стадии развития было выше в ночное время по сравнению с таковым в дневное время сбора проб (38.86 и 13.96 против 46.52 и 17.11% суммы ЖК соответственно) (табл. 3).

Таблица 1. Содержание липидов (% сухой массы) в мышцах молоди лептоклинуса пятнистого *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838), выловленного в разное время суток в акватории арх. Шпицберген (залив Конгс-фьорд) в зимний период (январь)

Стадия развития	L2		L3		L4		L4*		L5	
	день	ночь	день	ночь	день	ночь	день	ночь	день	ночь
Кол-во проб	15	15	20	20	15	15	6	6	8	9
Общие липиды	13.7 ± 0.6	14.6 ± 0.7	14.9 ± 0.9	13.0 ± 0.5	16.0 ± 0.7	17.9 ± 0.9	24.4 ± 0.8	21.3 ± 1.3	20.3 ± 3.4	22.3 ± 2.3
Фосфолипиды	7.6 ± 0.3	8.2 ± 0.4	7.4 ± 0.5	7.0 ± 0.4	7.8 ± 0.3	6.5 ± 0.4 [^]	5.7 ± 0.5	6.4 ± 0.4	4.3 ± 0.3	4.9 ± 0.3
Триацилглицерин	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.6	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.2	4.5 ± 0.6	8.0 ± 1.0 [^]	14.4 ± 1.1	11.2 ± 1.4	13.3 ± 3.5	13.5 ± 2.1
Эфиры холестерина + воска	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1 [^]	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.5	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4 [^]	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.3 [^]
Холестерин	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.1 [^]	3.8 ± 0.2	3.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.2 [^]	1.7 ± 0.9	2.5 ± 0.3

Примечание. [^] Содержание достоверно отличается от такового в мышцах у рыб, выловленных днем ($p \leq 0.05$).

Таблица 2. Содержание липидных компонентов (% сухой массы) в липидном мешке молоди лептоклинуса пятнистого *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838), выловленного в разное время суток в акватории арх. Шпицберген (залив Конгс-фьорд) в зимний период (январь)

Стадии развития	L3		L4		L4*	
	день	ночь	день	ночь	день	ночь
Кол-во проб	6	15	3	4	5	2
Общие липиды	90.9 ± 15.0	75.0 ± 5.6	84.1 ± 3.2	85.1 ± 2.8	91.9 ± 1.1	93.4 ± 1.1
Фосфолипиды	0.8 ± 0.5	1.4 ± 0.9	17.0 ± 8.7	10.2 ± 5.9	25.4 ± 5.7	45.0 ± 0.2
Триацилглицерин	81.5 ± 1.9	67.7 ± 15.1	49.7 ± 4.2	59.3 ± 8.0 [^]	61.7 ± 6.5	42.1 ± 0.0
Эфиры холестерина + воска	4.4 ± 1.0	1.9 ± 2.6	6.1 ± 1.3	4.3 ± 1.7	0	0
Холестерин	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.4	11.2 ± 1.9	11.4 ± 2.2	4.1 ± 1.3	4.4 ± 0.1

Примечание. [^] Содержание достоверно отличается от такового в липидном мешке лептоклинуса, выловленного днем ($p \leq 0.05$).

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена

Установлены различия в активности ферментов у лептоклинуса разных стадий развития. Активность ЦО у молоди L2–L4 стадий развития уменьшается, а на стадиях L4*–L5 увеличивается. Показано, что вне зависимости от времени суток активность ЛДГ увеличивается и наиболее высокая у молоди старших возрастных групп (рис. 2).

Сравнительный анализ активности ферментов у пятнистого лептоклинуса стадий развития L2, L3, L4 в ночное и дневное время показывает, что активность ферментов углеводного обмена ЛДГ и альдолазы выше в ночное время на стадиях L3 и L4 (рис. 2). На стадии L3 активность ЦО так же выше в ночное время (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность показателей липидного статуса мышц и липидного мешка молоди L3 стадии в ответ на суточные флуктуации экологических условий (особенно качественного и количественного состава кормовых объектов) указывает на высокую устойчивость данной молоди и ее адаптированность к условиям пелагиали. Наибольшая динамика липидов показана для молоди *L. maculatus* L4 стадии развития, ведущей переходный образ жизни, которая связана, скорее всего, с усилением функциональной нагрузки на мышцы (снижение ФЛ), вызванной, вероятно, суточными вертикальными миграциями молоди в определенном диапазоне глубин, связанной с питанием и поиском кормовых объектов в ночное время (увеличение содержания ТАГ). В пользу данного предпо-

Таблица 3. Жирнокислотный спектр (% суммы ЖК) мышц молодого лептоклинуса пятнистого *Lepidoclinus maculatus* (Fries, 1838), выловленного в разное время суток в акватории арх. Шпицберген (зал. Конгс-фьорд) в зимнее время (январь). Обозначения: НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

Стадии развития	L2		L3		L4		L4*		L5	
	день	ночь	день	ночь	день	ночь	день	ночь	день	ночь
Время запуска тралла										
Кол-во проб	15	15	20	20	15	15	6	6	8	9
14:0	3.54 ± 0.21	3.48 ± 0.16	2.75 ± 0.09	2.86 ± 0.11	3.04 ± 0.11	3.48 ± 0.12	3.84 ± 0.08	3.91 ± 0.15	3.46 ± 0.40	3.67 ± 0.28
16:0	11.41 ± 0.40	11.66 ± 0.45	12.34 ± 0.25	12.15 ± 0.15	11.12 ± 0.26	10.12 ± 0.25	9.10 ± 0.15	9.25 ± 0.17	8.73 ± 0.53	9.14 ± 0.52
18:0	2.09 ± 0.12	2.32 ± 0.14	2.47 ± 0.11	2.27 ± 0.07	2.19 ± 0.06	2.08 ± 0.09	1.77 ± 0.07	1.78 ± 0.03	2.04 ± 0.34	1.93 ± 0.28
ΣНЖК	19.43 ± 0.59	19.95 ± 0.60	19.76 ± 0.34	19.43 ± 0.25	17.93 ± 0.28	17.54 ± 0.45	16.12 ± 0.17	16.36 ± 0.14	15.83 ± 0.66	16.33 ± 0.62
16:1(n-7)	3.79 ± 0.32	3.70 ± 0.28	3.73 ± 0.14	3.84 ± 0.19	3.52 ± 0.12	4.99 ± 0.27 [^]	5.41 ± 0.13	4.91 ± 0.50	5.07 ± 0.39	5.35 ± 0.32
18:1(n-9)	6.71 ± 0.20	6.85 ± 0.27	7.40 ± 0.16	7.53 ± 0.12	6.87 ± 0.18	6.32 ± 0.15	5.87 ± 0.12	5.91 ± 0.20	5.72 ± 0.56	5.92 ± 0.33
18:1(n-7)	1.67 ± 0.04	1.68 ± 0.04	1.83 ± 0.06	1.91 ± 0.04	1.67 ± 0.05	1.77 ± 0.04	1.72 ± 0.04	1.60 ± 0.14	2.13 ± 0.37	1.98 ± 0.37
18:1(n-5)	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.48 ± 0.03	0.50 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.54 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.03
20:1(n-9)	13.40 ± 0.93	13.02 ± 0.99	11.83 ± 0.52	12.56 ± 0.43	13.96 ± 0.64	17.11 ± 0.71 [^]	21.29 ± 0.45	19.61 ± 0.89	17.20 ± 2.14	18.93 ± 1.83
22:1(n-11)	12.31 ± 0.78	11.50 ± 0.82	7.75 ± 0.52	8.36 ± 0.42	10.30 ± 0.94	13.14 ± 0.78	16.15 ± 0.51	16.57 ± 0.79	17.61 ± 2.71	16.25 ± 0.95
22:1(n-9)	1.11 ± 0.08	1.17 ± 0.11	0.84 ± 0.06	0.81 ± 0.06	1.02 ± 0.1	1.46 ± 0.09	1.74 ± 0.04	1.79 ± 0.07	1.93 ± 0.31	1.72 ± 1.20
ΣМНЖК	40.29 ± 1.76	39.24 ± 1.81	34.62 ± 1.02	36.20 ± 0.99	38.86 ± 1.45	46.52 ± 1.67 [^]	54.01 ± 0.69	52.16 ± 1.30	51.65 ± 4.36	52.07 ± 3.38
18:2(n-6)	1.77 ± 0.05	1.68 ± 0.04	1.71 ± 0.04	1.81 ± 0.05	1.89 ± 0.08	1.68 ± 0.04	1.56 ± 0.06	1.95 ± 0.18	1.31 ± 0.08	1.58 ± 0.08
20:4(n-6)	0.54 ± 0.03	0.59 ± 0.05	0.59 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.41 ± 0.03 [^]	0.29 ± 0.41	0.34 ± 0.03	0.94 ± 0.43	0.68 ± 0.40
Σ(n-6) ПНЖК	3.39 ± 0.10	3.50 ± 0.15	4.09 ± 0.25	4.22 ± 0.39	3.64 ± 0.10	3.34 ± 0.15	3.17 ± 0.08	3.69 ± 0.22	4.07 ± 0.76	3.50 ± 0.51
18:3(n-3)	0.73 ± 0.03	0.69 ± 0.03	0.80 ± 0.02	0.80 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.05	0.82 ± 0.04	0.58 ± 0.06	0.75 ± 0.06
20:5(n-3)	10.37 ± 0.40	10.67 ± 0.45	11.54 ± 0.33	11.40 ± 0.37	10.04 ± 0.51	8.63 ± 0.36 [^]	7.22 ± 0.39	6.91 ± 0.31	8.63 ± 1.39	7.80 ± 1.17
22:5(n-3)	5.01 ± 0.26	4.69 ± 0.25	6.06 ± 0.19	5.16 ± 0.19 [^]	0.88 ± 0.03	0.75 ± 0.02	0.70 ± 0.03	0.71 ± 0.03	1.01 ± 0.14	0.94 ± 0.18
22:6(n-3)	15.36 ± 0.85	15.93 ± 0.88	16.19 ± 0.50	16.23 ± 0.53	14.98 ± 0.65	11.93 ± 0.59 [^]	9.47 ± 0.30	10.14 ± 0.33	10.92 ± 1.86	10.36 ± 1.24
Σ(n-3) ПНЖК	34.20 ± 1.41	34.65 ± 1.26	38.47 ± 0.79	37.33 ± 0.88	31.17 ± 0.98	27.08 ± 0.82 [^]	23.62 ± 0.61	23.93 ± 0.48	25.83 ± 2.91	24.88 ± 2.12
ΣПНЖК	40.28 ± 1.50	40.81 ± 1.34	45.62 ± 0.84	44.38 ± 1.05	43.21 ± 1.25	35.94 ± 1.48 [^]	29.87 ± 0.62	31.47 ± 1.20	32.52 ± 3.72	31.60 ± 2.76
16:0/18:1(n-9)	1.70 ± 0.04	1.71 ± 0.04	1.67 ± 0.02	1.64 ± 0.03	1.62 ± 0.02	1.60 ± 0.02	1.55 ± 0.03	1.57 ± 0.06	1.56 ± 0.05	1.55 ± 0.04
Σ22:1/Σ20:1	0.99 ± 0.03	0.96 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.79 ± 0.05	0.84 ± 0.02	1.08 ± 0.09	0.92 ± 0.05	1.08 ± 0.09	0.92 ± 0.05

Примечание. [^] Содержание достоверно отличается от такового в мышцах у рыб, выловленных днем ($p \leq 0.05$).

Таблица 4. Жирнокислотный спектр (% суммы ЖК) липидного мешка молоди лептоклинуса пятнистого *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838), выловленного в разное время суток в акватории арх. Шпицберген (Конгс-фьорд) в зимний период. Обозначения: НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

Стадии развития	L3		L4		L4*	
Время запуска трала	день	ночь	день	ночь	день	ночь
Кол-во проб	6	15	3	4	5	2
14:0	6.37 ± 0.29	5.85 ± 0.12	6.76 ± 0.75	6.29 ± 0.50	5.66 ± 0.17	6.26 ± 0.05*
16:0	6.87 ± 0.26	6.86 ± 0.14	7.15 ± 0.28	6.93 ± 0.51	6.54 ± 0.15	7.31 ± 0.15*
18:0	0.70 ± 0.03	0.73 ± 0.02	0.75 ± 0.08	0.75 ± 0.04	0.67 ± 0.02	0.82 ± 0.02*
ΣНЖК	15.39 ± 0.59	14.84 ± 0.27	15.99 ± 0.79	15.50 ± 0.99	14.10 ± 0.39	15.87 ± 0.08*
16:1(n-7)	6.12 ± 0.33	5.95 ± 0.33	6.0 ± 0.95	6.29 ± 0.35	7.04 ± 0.09	6.56 ± 0.69
18:1(n-9)	4.88 ± 0.14	4.92 ± 0.07	4.55 ± 0.08	4.37 ± 0.35	3.98 ± 0.04	4.39 ± 0.06*
18:1(n-7)	1.17 ± 0.04	1.24 ± 0.03	1.11 ± 0.06	1.15 ± 0.06	1.26 ± 0.009	1.28 ± 0.09
18:1(n-5)	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.003
20:1(n-9)	26.67 ± 0.54	27.17 ± 0.54	27.12 ± 0.27	27.55 ± 0.57	28.18 ± 0.40	30.17 ± 0.74
22:1(n-11)	25.22 ± 1.30	25.69 ± 0.66	28.01 ± 1.25	27.11 ± 0.76	26.91 ± 0.76	28.71 ± 1.15
22:1(n-9)	2.17 ± 0.16	2.18 ± 0.11	2.45 ± 0.21	2.40 ± 0.05	2.47 ± 0.17	2.69 ± 0.13
ΣМНЖК	67.62 ± 1.50	68.48 ± 0.59	70.82 ± 0.61	70.46 ± 0.69	71.63 ± 1.33	75.55 ± 0.32*
18:2(n-6)	2.14 ± 0.04	2.13 ± 0.07	1.93 ± 0.22	1.75 ± 0.12	1.63 ± 0.09	1.56 ± 0.12
20:4(n-6)	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.002*
Σ(n-6) ПНЖК	3.11 ± 0.28	2.89 ± 0.10	2.76 ± 0.24	2.54 ± 0.13	2.42 ± 0.13	2.16 ± 0.14
18:3(n-3)	1.24 ± 0.04	1.18 ± 0.05	0.98 ± 0.14	0.90 ± 0.08	0.75 ± 0.07	0.54 ± 0.03*
20:5(n-3)	2.61 ± 0.13	2.84 ± 0.14	1.55 ± 0.28	1.96 ± 0.38	2.15 ± 0.42	0.78 ± 0.00*
22:5(n-3)	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.30 ± 0.07	0.38 ± 0.09	0.42 ± 0.07	0.18 ± 0.05*
22:6(n-3)	3.05 ± 0.13	3.34 ± 0.17	2.36 ± 0.39	2.59 ± 0.32	2.60 ± 0.41	1.18 ± 0.09*
Σ(n-3) ПНЖК	12.17 ± 0.49	12.35 ± 0.33	8.98 ± 1.29	9.94 ± 1.48	10.28 ± 1.51	5.11 ± 0.28*
ΣПНЖК	16.99 ± 0.96	16.69 ± 0.42	13.19 ± 1.38	14.04 ± 1.62	14.27 ± 1.67	8.58 ± 0.40*
16:0/18:1(n-9)	1.41 ± 0.02	1.40 ± 0.02	1.57 ± 0.06	1.59 ± 0.05	1.64 ± 0.03	1.66 ± 0.01
Σ22:1/Σ20:1	1.01 ± 0.00	1.05 ± 0.03	1.11 ± 0.06	1.06 ± 0.04	1.03 ± 0.02	1.03 ± 0.07

Примечание. * Содержание достоверно ($p \leq 0.05$) отличается от такового в липидном мешке у рыб, выловленных днем.

ложения (об увеличении функциональной нагрузки мышц в ночное время) указывает и снижение уровня ПНЖК, за счет 22:6(n-3) ЖК, вариации которого, в том числе, связаны с поддержанием метаболических процессов двигательной активности. При этом уровень МНЖК, за счет 20:1(n-9), синтезируемой *de novo* копеподами, возрастал в мышцах молоди L4 стадии именно в ночное время (38.86 и 13.96 против 46.52 и 17.11% суммы ЖК соответственно). Известно, что значительную долю в спектре кормовых объектов у молоди L4 стадии развития составляют копеподы (Пеккоева и др., 2017а). Кроме того, согласно последним исследованиям особенностей функционирования арктической биоты в условиях специфического фотопериода, показаны суточ-

ные вертикальные миграции зоопланктона в ответ на интенсивность лунного света, которые имеют консервативный характер и затрагивают функциональные процессы в морских экосистемах во всем арктическом домене, сформировались в ходе адаптации животных к обитанию в условиях специфического фотопериода в Арктике (Last et al., 2016). Обнаружено, что в полярную ночь, в ночные часы зоопланктон опускается на глубину около 50 м, избегая лунного света, а в дневные часы снова поднимается, возвращается в зону эпипелагиали (Last et al., 2016). Кроме того, нами показано, что в зимнее время в пелагическом слое воды могут находиться копеподиты веслоногих рачков, которые не уходят в состояние диапаузы ввиду недостатка нужного количества

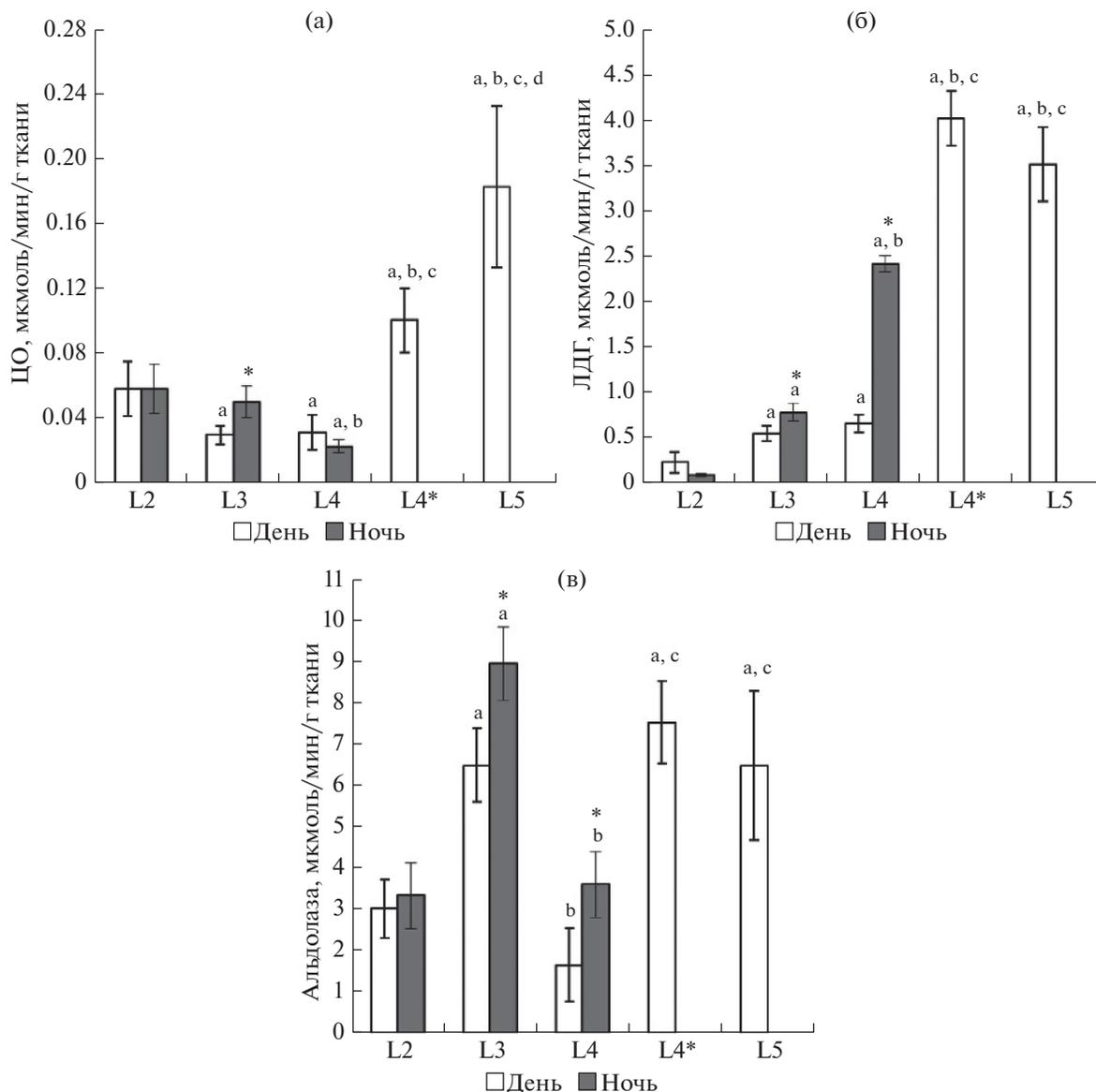


Рис. 2. Активность ферментов ЦО (а), ЛДГ (б), альдолазы (в) (мкмоль/мин/г) в мышцах пятнистого лептоклинуса разных стадий развития в дневное и ночное время. ^a – различия достоверны в сравнении со стадией L2 в соответствии с временем суток ($p < 0.05$), ^b – различия достоверны в сравнении со стадией L3 в соответствии с временем суток, ^c – различия достоверны в сравнении со стадией L4 в соответствии с временем суток, ^d – различия достоверны в сравнении со стадией L4*, * – различия достоверны в сравнении со значениями, полученными в дневное время.

липидов в их липидном мешке, такие копеподы могут продолжать питаться (Немова и др., 2014).

Отсутствие различий по содержанию ЖК в ОЛ мышц молоди L2, L3, L4* и L5 стадий развития в ответ на суточный цикл свидетельствует об адаптированности молоди к жизнедеятельности на определенной глубине, которую на соответствующем этапе развития населяет молодь лептоклинуса. При этом суточная динамика отдельных липидных классов и ЖК общих липидов мышц молоди L4 стадии указывает на их переходный образ жизни, который обеспечивается высоким темпом

липидного метаболизма. Индикаторами этого процесса является изменение ТАГ и некоторых ЖК пищевого происхождения, которые обеспечивают поддержание плавательной функции мышц молоди в течение суток, а также свидетельствуют об их активности, связанной, по-видимому, с вертикальными миграциями.

В пользу различий двигательной активности у исследованной молоди лептоклинуса свидетельствует динамика активности ферментов энергетического и углеводного обмена. На ранних стадиях развития (L2) молоди уровень аэробного об-

мена, определяемого по активности ЦО, выше по сравнению с таковым у рыб L3 и L4 стадий развития. Увеличение уровня аэробного обмена у рыб L5 стадии развития может быть связано с переходом на другие объекты питания при перемещении в толще воды (с пелагиали ко дну). При этом продемонстрировано, что вне зависимости от времени суток активность ЛДГ увеличивается и наиболее высокая у рыб старших возрастных групп. Это указывает на то, что уровень анаэробного обмена и использование углеводов в гликолизе увеличивается у рыб с возрастом, что связано с повышенными потребностями в энергии для осуществления активности у более крупных рыб. Согласно результатам исследований, проведенных на атлантической треске (Couture et al., 1998; Koedijk et al., 2010), молоди сайды (Mathers et al., 1992), пятнистой зубатке (Imsland et al., 2006), радужной форели (Чурова и др., 2010) и мальках лосося (Чурова и др., 2015), активность ЛДГ в мышцах белых рыб положительно коррелирует с их массой и длиной тела, а также с темпом их роста.

Относительно суточной динамики активности ферментов обнаружено, что уровень активности ферментов углеводного обмена ЛДГ и альдолазы у рыб L3 и L4 стадий выше в ночное время, что указывает на увеличение уровня анаэробного обмена в данный период суток, связанное с пищевой активностью. На стадии L3 возрастание анаэробного обмена в ночное время суток происходит наряду с аэробным. Таким образом, повышение уровня использования углеводов у особей на стадии L3 связано с их расходом в процессах аэробного и анаэробного синтеза АТФ. Следует отметить, что различия по активности ЛДГ и альдолазы более выражены у особей на стадии L4 (в 3 и 2 раза соответственно), что согласуется с данными липидного анализа и выделяет эту стадию среди других по энергетическому статусу.

Ранее было показано, что активность некоторых ферментов различается у рыб разных экологических групп по местообитанию – пелагических, дemersальных или глубоководных, что связывают с различиями в локомоторной активности и уровне аэробного обмена (Sullivan, Somero, 1980; Somero, Childress, 1990; Drazen, Seibel, 2007). Более того установлено, что образ жизни определяет скорость энергетического обмена, его возрастание в ряду от медленно плавающих рыб до пелагических, стайных и активных рыб: *Pleuronectes platessa* – *Gryptocephalus cynoglossus* – *Anarhichas lupus* – *Gadus morhua*. Тем самым, высокие энергетические затраты у активных рыб, обусловленные экологическими особенностями обитания вида, экологические особенности обитания вида, связаны с высокой скоростью энергетического обмена (Винберг, 1976; Карамушко, 2007).

Таким образом, обнаруженная динамика ОЛ и их липидных классов в мышцах молоди демонстрирует их важную роль в развитии метаболических адаптаций, соответствующих стадии развития, а также косвенно свидетельствует о генетической детерминированности молоди в ответ на суточный цикл (ночное и дневное время), сопряженной с особенностями функционирования биоты и трофическими взаимодействиями у молоди лептоклинуса в условиях полярной ночи зимой. Адаптивные изменения липидов затрагивают пелагическую стадию развития L2, а к переходной стадии L4 эти различия уже четко выражены. Установленные различия в активности ферментов энергетического обмена в дневное и ночное время связаны с динамикой пищевой активности. Это свидетельствует о том, что, постепенный переход с эндогенного типа питания на экзогенный, и смена образа жизни молоди лептоклинуса сопровождаются началом ее активного взаимодействия со средой обитания, в частности, с формированием суточных ритмов в обмене веществ, связанных со световым режимом, питанием и двигательной активностью. Установлено, что ЖК-спектр напрямую отражает возрастные и сезонные особенности питания молоди лептоклинуса пятнистого. Суточная динамика липидных компонентов и различия в активности ферментов анаэробного обмена могут рассматриваться как один из механизмов генетически детерминированной онтогенетической и экологически ориентированной фенотипической разнокачественности жизненной стратегии вида, направленной на поддержание его существования в конкретных условиях среды и адаптацию к ним на разных уровнях организации живого.

БЛАГОДАРНОСТИ

Сбор материала в акватории архипелага Шпицберген проведен при содействии Арктического университета Норвегии (UiT, Тромсе, Норвегия), Международного университетского центра арх. Шпицберген (UNIS, Лонгиер, Норвегия) и при участии специалистов в области ихтиологии и гидробиологии – проф. Йоргена Берге, проф. Оле Йоргена Ленне, которым авторы выражают глубочайшую благодарность за поддержку и организацию полевых работ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансовое обеспечение работы осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (№ темы 0218-2019-0076), а также РФФИ № 17-04-00466 и международного проекта ES504895 “Timing of ecological processes in Spitsbergen fjords” (SpitsEco) (сбор материала в ходе экспедиции).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.А. Мурзина, С.Н. Пеккоева – сбор материала в ходе экспедиции, проведение анализа липидов и жирных кислот в тканях молоди исследованных рыб, статистический анализ, написание и подготовка публикации, З.А. Нефедова – обсуждение результатов исследования, подготовка отдельных разделов публикации, М.В. Чурова – проведение анализа по активности ферментов энергетического и углеводного обмена в тканях молоди исследованных рыб, обсуждение результатов исследования, подготовка отдельных разделов публикации, К.А. Филиппова – статистический анализ результатов исследования, С. Фальк-Петерсен – координирование полевых работ в ходе экспедиции, Н.Н. Немова – обсуждение результатов исследований, подготовка публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андряшев А.П. Рыбы северных морей СССР. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 566 с.
- Винберг Г.Г. Зависимость энергетического обмена от массы тела у водных пойкилотермных животных // Журн. общ. биол. 1976. Т. 37. № 1. С. 56–69.
- Долгов А.В., Бензик А.Н. Пищевые рационы и потребление пищи у черного палтуса Баренцева моря // Вестник Мурманского государственного технического университета. 2012. Т. 15. № 3. С. 509–516.
- Карамушко Л.И. Биоэнергетика рыб северных морей. М.: Наука, 2007. 256 с.
- Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Пособие для врачей-лаборантов. Минск, Беларусь, 1976. 312 с.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. 272 с.
- Мурзина С.А. Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в биохимических адаптациях люмпена пятнистого *Leptoclonus maculatus* F. северо-западного побережья о. Шпицберген: Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2010. 184 с.
- Мухина Н.В., Долгов А.В. Состав и структура ихтиоценоза Баренцева моря на ранних стадиях онтогенеза по данным российских ихтиопланктонных съемок 1959–1993 годов // Вестник Мурманского государственного университета. 2012. С. 818–826.
- Немова Н.Н., Мурзина С.А., Нефедова З.А. и др. Липидный статус двух массовых видов веслоногих рачков рода *Calanus* архипелага Земля Франца-Иосифа // Сборник статей “Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации”. 2014. С. 1–10.
- Новак И. Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир, 1978. 180 с.
- Пеккоева С.Н. Изменение липидного состава мышц и липидного мешка представителя арктической ихтиофауны люмпена пятнистого *Leptoclonus maculatus* в постэмбриональном развитии: Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2018. 164 с.
- Пеккоева С.Н., Мурзина С.А., Иешко Е.П. и др. Экологические группы арктическо-бореального вида люмпена пятнистого *Leptoclonus maculatus* (Fries, 1838) в процессах роста и раннего развития // Экология. 2018. № 3. С. 225–233.
- Пеккоева С.Н., Мурзина С.А., Нефедова З.А. и др. Экологическая роль липидов и жирных кислот в раннем постэмбриональном развитии люмпена пятнистого *Leptoclonus maculatus* (Fries, 1838) из Конгсфьорда (о. Западный Шпицберген) в зимний период // Экология. 2017а. № 3. С. 186–191.
- Пеккоева С.Н., Мурзина С.А., Нефедова З.А. и др. Роль фосфолипидов в развитии молоди арктическо-бореального вида *Leptoclonus maculatus* (Stichaeidae) // Вопросы ихтиологии. 2017б. Т. 57. № 4. С. 467–471.
- Пеккоева С.Н., Мурзина С.А., Нефедова З.А. и др. Липидный статус беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Berg Двинского залива Белого моря в осенний сезон // Труды Карельского научного центра РАН. Экспериментальная биология. 2014. № 5. С. 86–94.
- Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М. и др. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Тканевая специфичность ряпушки *Coregonus albula* L. // Лососевые (Salmonidae) Карелии. Петрозаводск: Карел. Фил. АН СССР, 1972. Вып. 1. С. 152–163.
- Чурова М.В., Мещерякова О.В., Немова Н.Н. и др. Соотношение роста и некоторых биохимических показателей рыб на примере микижи (*Parasalmo mykiss* Walb.) // Известия РАН. Сер. Биол. 2010. № 3. С. 289–299.
- Чурова М.В., Мещерякова О.В., Веселов А.Е. и др. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена и уровень некоторых молекулярно-генетических показателей у молоди лосося (*Salmo salar* L.) различающейся возрастом и массой // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. С. 304–312.
- Шмаль Э. Хроматография в тонких слоях. М.: Мир, 1965. 508 с.
- Berge J., Renaud P.E., Darnis G. et al. In the dark: A review of ecosystem processes during the Arctic polar night // Progress in Oceanography. 2015. V. 139. P. 258–271.
- Couture P., Dutil J.D., Guderley H. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland // Canadian J. Fisheries and Aquatic Sciences. 1998. V. 55(7) P. 1591–1598.
- Drazen J.C., Seibel B.A. Depth-related trends in metabolism of benthic and benthopelagic deep-sea fishes // Limnol. Oceanogr. 2007. V. 52. P. 2306–2316.

- Engelbrecht F.M., Mari F., Anderson J.T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // S.A. Med. J. 1974. V. 48. № 7. P. 250–356.
- Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
- Imsland A.K., Le Francois N.R., Lammare S.G. et al. Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for monitoring growth rates // Can J. Fish Aquat. Sci. 2006. V. 63. P. 1959–1967.
- Keats D.W., Steele D.H., Green J.M. et al. Diet and population size of the Arctic shanny, *Stichaeus punctatus* (Pisces: Stichaeidae), at sites in eastern Newfoundland and the eastern Arctic // Environ Biol Fish. 1993. V. 37. P. 173–180.
- Koedijk R.M., Le François N.R., Blier P.U. et al. Ontogenetic effects of diet during early development on growth performance, myosin mRNA expression and metabolic enzyme activity in Atlantic cod juveniles reared at different salinities // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mole-cular & Integrative Physiology. 2010. 156(1): 102–109.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.007>
- Kolpakov N.V., Klimkin A.F. Specific features of biology of shannies *Stichaeus grigorjewi* and *S. nozawae* (Stichaeidae) in waters of Northern Primorye // J. Ichthyology. 2004. V. 44. № 8. P. 592–599.
- Last K., Hobbs L., Berge J. et al. Moonlight drives ocean-scale mass migration of zooplankton during the Arctic winter // Current Biology. 2016. V. 26. № 2. P. 244–251.
- Mathers E.M., Houlihan D.F., Cunningham M.J. Nucleic acid concentrations and enzyme activities as correlates of growth rate of the saithe *Pollachius virens*: growth-rate estimates of open-sea fish // Marine Biology. 1992. V. 112. P. 363–369.
- Meyer Ottesen C.A., Haakon H., Falk-Petersen S. et al. Growth of daubed shanny (Teleostei: *Leptoclinus maculatus*) in Svalbard waters // Polar Biology. 2014. V. 37. P. 809–815.
- Meyer Ottesen C.A., Haakon H., Schou Christiansen J. et al. Early life history of the daubed shanny (Teleostei: *Leptoclinus maculatus*) in Svalbard waters // Marine Biodiversity. 2011. V. 41. № 3. P. 383–394.
- Miki T., Yoshida H., Amaoka K. Rare stichaeid fish, *Pseudoaletrias tarasovi* (Popov), from Japan and its larvae and juveniles // Bull. Fish Sci. Hokkaido Univ. 1987. V. 38. P. 1–13.
- Murzina S.A., Falk-Petersen S., Nemova N.N. Lipids in the arctic fish, *Leptoclinus maculatus* larvae // Chemistry and Physics of Lipids. 2008. V. 154. № S. P. S26.
- Murzina S.A., Meyer Ottesen C.A., Falk-Petersen S. et al. Oogenesis and lipids in gonad and liver of daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*) females from Svalbard waters // Fish Physiology and Biochemistry. 2012. V. 38. № 5. P. 1393–1407.
- Ochiai T., Fuji A. Energy Transformations by a Blenny (*Opisthocentrus ocellatus*) population of Usu Bay, Southern Hokkaido // Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University. 1980. V. 31. № 4. P. 314–326.
- Smith C., Wootton R.J. Parental energy expenditure of the male three-spined stickleback // J. Fish Biology. 1999. V. 54. P. 1132–1136.
- Somero G.N., Childress J.J. Scaling of ATP-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit // J. Exp. Biol. 1990. V. 149. P. 319–333.
- Somero G.N., Childress J.J. A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger size fish // Physiol. Zool. 1980. V. 53. P. 322–337.
<https://doi.org/10.1086/physzool.53.3.30155794>
- Sullivan K.M., Somero G.N. Enzyme activities of fish skeletal muscle and brain as influenced by depth of occurrence and habits of feeding and locomotion // Marine Biology. 1980. V. 60. P. 91–99.
- Walsh D.E., Banasik O.J., Gilles K.A. Thin-layer chromatographic separation and colorimetric analysis of barley or malt lipid classes and their fatty acids // Chromatography. 1965. V. 17. № 2. P. 78–85.

Daily Dynamics of Lipids and Fatty Acids and the Activity of Enzymes of the Energy and Carbohydrate Metabolism in Young Fish of the Daubed Shanny *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838) at Different Developmental Stages during Polar Night

S. A. Murzina^{1,*}, S. N. Pekkoeva¹, M. V. Churova¹, Z. A. Nefedova¹,
K. A. Filippova¹, S. Falk-Petersen^{2,3}, and N. N. Nemova¹

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

²Akvaplan-niva AS, Fram Centre, N-9296, Tromsø, Norway

³UiT The Arctic University of Norway, Department of Arctic and Marine Biology N-9037, Tromsø, Norway

*e-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Received October 1, 2019; revised January 2, 2020; accepted January 9, 2020

For the first time, a comparative study of the daily dynamics of the lipid and fatty acid profile, the level of energy metabolism in young fish of the daubed shanny (L2, L3, L4, L4*, L5 stages of development, which

are the links of the pelagic (L2, L3, L4) and benthic (L4, L4*, L5) food webs in the Kongs-fjord Bay was carried out at polar night. The daily dynamics of lipid components and the activity of anaerobic metabolism enzymes can be considered as one of the mechanisms of genetically determined ontogenetic and ecologically oriented phenotypic heterogeneity the life strategy of the species, aimed at maintaining its existence in specific environmental conditions and adapting to them at different levels of biological life organization.

Keywords: fishes, ontogenesis, biochemical adaptations, circadian rhythms, lipids, fatty acids, energetic metabolism, Arctic

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал “Онтогенез” публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи, посвященные исследованию механизмов индивидуального развития, дифференцировки и роста. Особое внимание уделяется исследованиям механизмов эмбрионального и постэмбрионального развития в норме и при патологии, выполненным на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях.

Журнал “Онтогенез” выпускается на русском языке и одновременно на английском языке под названием “Russian Journal of Developmental Biology” – Издательствами ООО “ИКЦ “АКАДЕМКНИГА” (<http://sciencejournals.ru/>) и Pleiades Publishing, Inc. (<http://pleiades.online>).

Журнал Онтогенез был основан как журнал, принимающий к печати статьи на русском языке. Однако редакционная коллегия призывает исследователей из зарубежных стран публиковать в журнале статьи на английском языке. Мы принимаем все статьи на английском языке, подходящие нашему журналу по тематике, и гарантируем их своевременное рецензирование и рассмотрение редколлекцией.

Статьи, публикуемые в журнале, индексируются и реферируются в следующих базах данных: Science Citation Index Expanded (SciSearch), Chemical Abstracts Service (CAS), Google Scholar, EBSCO, CSA, Academic OneFile, AGRICOLA, Biological Abstracts, BIOSIS, Current Abstracts, EMBiology Gale, INIS Atomindex, Journal Citation Reports/Science Edition, OCLC, Summon by Serial Solutions, Zoological Record, PubMed (as “Ontogenez”).

Основные типы публикаций

1. Оригинальные исследования

Статьи должны содержать новую информацию, которая способствует более полному пониманию процессов и механизмов развития. Содержащаяся в статье информация может быть получена в ходе экспериментов, морфологических исследований, а также с помощью моделирования *in silico*. Методические или “описательные” статьи (например, содержащие данные об экспрессии отдельных генов) принимаются только в том случае, если представленные в них данные связаны с процессами развития и способствуют решению актуальных проблем биологии развития. Статья не должна превышать 20 страниц (Times New Roman 12 pt, межстрочный интервал 1.5).

2. Краткие сообщения

Статья может быть принята к печати, если в ней представлены новые данные, которые могут быть оценены как приоритетные для изучаемой области биологии развития. Статья не должна превышать 6 страниц (Times New Roman 12 pt, межстрочный интервал 1.5), может включать 1 иллюстрацию и 10 ссылок в списке литературы.

3. Обзоры

Обзоры должны быть проблемно ориентированными, аналитическими, с четко видимой позицией авторов по рассматриваемому вопросу, при этом предпочтение отдается обзорам, посвященным новым перспективным областям биологии развития. Статья не должна превышать 24 страницы (Times New Roman 12 pt, межстрочный интервал 1.5).

Основные тематические рубрики

1. Биология развития животных (беспозвоночных и позвоночных)
2. Биология развития растений
3. Биология развития представителей других царств живых организмов
4. Механизмы нормального и патологического развития
5. Молекулярная биология развития
6. Механизмы пролиферации и дифференцировки клеток
7. Морфогенез (физические, клеточные и молекулярные основы)
8. Регенерация
9. Методы и модели биологии развития
10. Эволюционная биология развития
11. Экологическая биология развития
12. Новости биологии развития (популярные синопсисы, отчеты о конференциях)
13. Рецензия на книгу

Оформление электронной версии статьи

Для предоставления статьи к публикации авторам необходимо прислать в Редакцию электронную версию статьи в формате DOC или DOCX (MSWord) по электронной почте – ontogenez@list.ru или через онлайн-форму на сайте журнала <http://ontogenez.org/?show=content10>. В один файл в формате DOC включается аннотация, текст статьи, список литературы, таблицы и подписи к рисункам, графики и рисунки (рисунки должны быть помещены в конце статьи), а так-

же перевод аннотации на английский язык. В сопроводительном письме следует указать, что рукопись не была ранее нигде опубликована и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях. На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

После рецензирования и окончательного решения о принятии статьи к публикации авторы должны дополнительно выслать графики и рисунки в формате JPG и EPS с разрешением не менее 300 dpi (каждую иллюстрацию – в виде отдельного файла).

Файлы должны быть названы с использованием только латинских букв. Файлы больших объемов желательно архивировать общеизвестными архиваторами. В этом случае файлы должны иметь расширения этих программ (ZIP, ARJ, RAR и т.д.). Недопустимо предоставление в Редакцию самораспаковывающихся EXE-файлов.

Структура публикации

Статья должна быть написана четко, логично и тщательно отредактирована. Оригинальные статьи следует разделять на отдельные части: “Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Список литературы”. Не допускается дублирование материала в таблицах, на рисунках и в тексте. Все страницы рукописи, включая таблицы, список литературы и подписи к рисункам, следует пронумеровать.

Титульная страница.

На первой странице статьи указываются название рубрики, индекс статьи по УДК (см. <http://www.udkcodes.net>), название статьи, инициалы и фамилии авторов, полное название учреждений, в которых работают авторы, почтовый адрес этих учреждений с индексом (если авторы работают в разных институтах, необходимо привести названия и адреса всех институтов). Далее приводятся краткая аннотация и ключевые слова (образец оформления первой страницы см. в Приложении 1).

Название статьи должно быть кратким и отражать суть работы. Следует по возможности избегать использования сокращений.

Аннотация должна быть краткой и содержать цель, основные результаты и наиболее существенные выводы работы. Аннотация не должна превышать 350 слов.

Ключевые слова должны отражать основные аспекты работы (модель, объект исследования, ключевые методы, принципиальные процессы). Следует избегать сокращений и частиц “и”.

Обратите внимание на то, что ключевые слова должны использоваться в названии и аннотации,

а также многократно встречаться в тексте статьи. Пожалуйста, внимательно проверяйте ключевые слова и их встречаемость в английском варианте Вашей статьи. Выполнение этих правил сделает более эффективным поиск статьи в базах данных и увеличит число ее цитирований.

Введение.

Введение должно отражать современное состояние проблемы, содержать обоснование использованных методических подходов и четко сформулированные цели и задачи исследования.

Материалы и методы.

Описание методик должно содержать достаточно информации для воспроизведения работы, но быть достаточно кратким, и для стандартных методик ограничиваться ссылкой на оригинальные работы. Более подробно следует останавливаться на редко используемых методах и методах, разработанных или модифицированных самими авторами. Особое внимание следует уделить описанию всех использованных контролей. Необходимо указывать названия фирм-производителей для использованных реактивов и оборудования. При статистической обработке материала необходимо указать использованные статистические методы и программы.

Авторы должны указывать видовые названия и число использованных в работе объектов. При работе с животными необходимо отметить соответствие экспериментальных манипуляций международным нормам по биоэтике, указать применяемые методы обезболивания, эвтаназии и ухода за экспериментальными животными до и после экспериментальных вмешательств. Более подробно с правилами проведения работ с экспериментальными животными и клинической практики в Российской Федерации можно ознакомиться на сайте Института биологии развития РАН (<http://idbras.comcor.ru>) в разделе “Комиссия по биоэтике”.

Результаты должны быть представлены четко и сжато, с минимальным числом иллюстративного материала. Все иллюстрации необходимо хотя бы один раз процитировать в тексте.

Обсуждение должно содержать оценку достоверности, новизны и ценности полученных результатов, перспективы дальнейшей работы. Следует избегать избыточного цитирования и слишком обширного обсуждения опубликованных ранее статей. Допустимо объединять результаты и обсуждение в один раздел (особенно если статья состоит из нескольких относительно независимых частей). В этом случае желательно в конце статьи суммировать основные положения и выводы работы в разделе “Заключение”.

Журнал является членом Committee on Publication Ethics (COPE), в связи с этим в конце статьи должны располагаться следующие разделы, содержащие справочную информацию.

1) БЛАГОДАРНОСТИ (ACKNOWLEDGMENTS)

Общая информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи, кроме финансовой: а) благодарности коллегам и рецензентам (в особых случаях); б) информация о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; в) информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; г) помощь в подготовке иллюстраций и т.п.

2) ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ (FUNDING)

Информация о грантах и любой другой финансовой поддержке исследований. Просим не использовать в этом разделе сокращенные названия организаций-спонсоров.

Пример: Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № XX-XX-XXXX-а). Работа выполнялась в рамках программы исследований XXXX, запланированных в Университете XXXX. Автор Х.Х.Х. получил поддержку от Министерства XXXX (грант XXXX).

3) СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ (COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS)

Это **ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ** раздел для журналов биологической тематики.

Этот раздел должен присутствовать во ВСЕХ статьях (независимо от того, были ли вовлечены животные и люди в эксперименты в данном исследовании). Просьба включать эту информацию не в основной текст статьи, а именно в данный раздел. Пожалуйста, принимайте во внимание очевидные соображения, что к царству животных относятся не только млекопитающие, а исследования могут проводиться и за пределами лаборатории.

Примеры:

“Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены”;

“При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.”

“При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов”;

“Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов”.

Если в статье не содержится описание исследований с участием людей или животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе “Соблюдение

этических стандартов” указывается: “Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов”.

4) КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ (CONFLICT OF INTEREST)

Конфликт интересов — это любые отношения, которые могут прямо или косвенно повлиять на вашу работу или сделать ее предвзятой.

Примеры:

а) “Конфликт интересов: Автор Х.Х.Х. владеет акциями Компании Y, которая упомянута в статье. Автор Y.Y.Y. — член комитета XXXX”.

б) “Конфликт интересов: Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.”

5) ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ (AUTHOR CONTRIBUTIONS)

Публикуется для определения вклада каждого автора в исследование.

Например:

“Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследование методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов”.

Символами в верхнем регистре можно отметить авторов, внесших равный вклад в работу. Например:

“X1*, X2*, X3, X4, X5

* — авторы внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи”.

6) ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Вместе с файлом рукописи приветствуется передача в редакцию файлов с дополнительными материалами (например, с видеоматериалами, большими таблицами, презентациями) для размещения на сайте издательства.

Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье и подписать авторский договор на прилагаемые материалы.

Более подробная информация размещена на сайте:

<http://pleiades.online/ru/authors/guidelines/prepare-electronic-version/supplementary-materials/>.

Список литературы.

Печатается с новой страницы, должен содержать только цитированные в статье работы. Фамилии авторов статей располагаются в порядке алфавита. Сначала приводят литературу на рус-

ском, затем – на иностранных языках. В случае, если в списке приводят несколько работ одного автора, опубликованных в одном году, им дают буквенные обозначения: 2009а, б и т.д.; для публикаций на иностранных языках – 2009а, b, c и т.д. Кроме этого, желательно дать DOI статьи.

Для книг: указывают фамилию и инициалы авторов, название книги, место издания и издательство, год издания и общее число страниц, например: Корочкин Л.И. Название книги (обязательно полное). М.: Наука, 1977. 280 с. Ссылки на книги, переведенные на русский язык, по возможности, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для статей: Васильева Т.В., Мичурина Т.В., Хрущов Н.Г. (если авторов больше трех, то после трех фамилий пишут “и др.”). Название статьи // Журнал (сокращенно, без кавычек). 1978. Т. 9. № 3. С. 288–290. Для публикаций на иностранных языках: том – V., Bd., номер – №, страницы – P., S., doi:

Для диссертации: Чупринова С.И. Название работы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков: Мед. ин-т, 1970. 20 с.

Таблицы и подписи к рисункам располагаются на отдельных страницах.

Перевод аннотации на английский язык является аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов (Приложение 2).

Требования к оформлению статьи

Более подробную версию можно найти на сайте <http://pleiades.online/ru/authors/guidlines/>.

Для набора текста рекомендуется использовать редактор Microsoft Word. Текст набирается с полуторным интервалом между строками стандартным шрифтом Windows TrueType (Times New Roman – для текста, Symbol – для греческих букв), размер шрифта – 12. Для сохранения текста рекомендуется использовать формат DOC (DOCX).

Размерности физических величин выражаются в международной системе СИ, а относительные атомные массы элементов по шкале I2C. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется точкой, а не запятой.

Сокращения. Для обозначения химических соединений в тексте статьи (за исключением аннотации) можно пользоваться общепринятыми аббревиатурами: диметилсульфоксид – ДМСО (DMSO), диметилформамид – ДМФА (DMFA), полиакриламидный гель – ПААГ (PAAG), аминокислоты – Gly, Ala, Val и т.п.

Стандартные биохимические и молекулярно-биологические методы анализа и связанные с ними термины обозначаются в тексте общепринятыми

аббревиатурами из заглавных букв русского или английского алфавита: ПЦР – полимеразная цепная реакция, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, SDS-электрофорез – электрофорез с додецилсульфатом натрия и т.п. Все используемые авторами нестандартные обозначения и сокращения поясняются в тексте при первом упоминании.

Таблицы.

Для создания таблиц следует использовать программы MS Word или MS Excel. Таблицы должны иметь порядковые номера и заглавия, указывающие на их содержание. Сокращение слов в таблицах не допускается. Каждая таблица печатается на отдельной странице. Если таблица не помещается на вертикальном листе, допускается развернуть ее на горизонтальный. Необходимо строго следить за выравниванием горизонтальных строк и вертикальных столбцов в таблице.

Не следует включать в таблицы столбцы и строки, состоящие из одинаковых значений (т.е. из значений, не меняющихся от опыта к опыту или от строки к строке). Эти случаи следует особо оговорить в Примечании к таблице. Для нумерации сносок в таблице применяются латинские буквы, которые должны быть расположены в таблице в соответствии с алфавитным порядком (при чтении по горизонтали).

Следует четко различать случаи, когда в ячейках таблицы отсутствуют данные: если имеется в виду отсутствие данных, ставится прочерк, а если принципиально невозможно их получить, остается пустое место.

Цитирование.

В тексте фамилии иностранных авторов дают в русском написании, при первом упоминании в скобках указывается оригинальное написание, например: “Согласно Тидеману (Tiedemann, 1976)...”. При ссылках на работы без упоминания авторов в тексте в скобках приводят фамилии в оригинальном написании, с указанием года опубликования работы и располагают эти ссылки в хронологическом порядке, например: “В таблицах, составленных для разных видов рыб (Girh, 1934; Vernier, 1957; Смирнов, 1958; LeMeur, 1976), имеются сведения...”. Ссылки на работы более, чем двух авторов оформляются следующим образом: (Доброхотов и др., 1962; Gateby et al., 1966).

Графический материал.

При представлении статьи в Редакцию фотографии, рисунки, схемы и другой иллюстративный материал включаются в один файл с текстом статьи. Желательно, чтобы фотографии имели разрешение не менее 300 dpi (точек на дюйм).

После окончательного принятия статьи к печати авторы должны дополнительно выслать иллюстрации, содержащие надписи и обозначения на фотографиях. Каждый файл должен содержать

один рисунок и быть назван так, чтобы было понятно, какая иллюстрация в нем содержится.

Векторные иллюстрации должны быть предоставлены в формате EPS.

Остальные иллюстрации принимаются в любых стандартных графических форматах, предпочтительно – JPEG и TIFF.

Если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у Издателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Технические требования к иллюстрациям.

1) Общие требования:

Иллюстрации должны иметь размеры: 8–8.5 см (на одну колонку), либо 17–17.5 см (на две колонки). На микрофотографиях помещают масштабный отрезок. Рисунки и фотографии должны быть снабжены необходимыми цифровыми или буквенными обозначениями, которые поясняются в подписях к ним. Надписи и обозначения на иллюстрациях могут меняться при переводе с русского на английский язык, поэтому для фотографий желательно предоставить второй вариант без текста и обозначений, для остальных иллюстраций – располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались ни с какими ее частями. Для надписей и обозначений используйте стандартные TrueType шрифты. Просьба не добавлять на задний план иллюстраций серый (цветной) фон или сетки.

2) Графики и диаграммы (штриховые иллюстрации):

Графики и диаграммы желательно готовить в векторных графических редакторах. Они должны иметь разрешение не ниже 600 dpi. Толщина линий не должна быть меньше 0.5 pt. Векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как “Noise” “Black&white noise” “Top noise”. Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл.

3) Полутоновые иллюстрации:

Должны иметь разрешение не ниже 300 dpi.

4) Комбинированные полутоновые/штриховые иллюстрации:

Должны иметь разрешение не ниже 600 dpi.

Публикация цветных иллюстраций.

Публикация цветных иллюстраций возможна только в online версии журнала. Желательно выполнение определенных требований к оформлению иллюстраций, учитывающих тот факт, что печатная версия журнала остается черно-белой (см. <http://pleiades.online/ru/authors/guidelines/prepare-electronic-version/images/>).

Иллюстрации должны содержать только 8-битный цвет; цветовое пространство – CMYK.

Неправильно оформленная статья к рассмотрению Редакцией не принимается.

Рецензирование и подготовка рукописи к печати

Рецензирование. Статья, поступившая в Редакцию, направляется на рецензию к специалисту в данной области исследований. В спорных случаях по усмотрению редколлегии статья направляется на дополнительную рецензию. Рукописи, не соответствующие профилю журнала, отклоняются без рецензии.

Редактирование.

Статья, принятая к публикации, но нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента. Авторы должны вернуть исправленный вариант статьи вместе с ответом на все замечания рецензентов. Редакция оставляет за собой право сокращать статьи и вносить редакционную правку, согласуя изменения с авторами. Статья, задержанная на исправлении более одного месяца или требующая серьезной переработки, рассматривается как вновь поступившая, то есть снова направляется рецензентам. На первой странице статьи указываются: дата получения рукописи редакцией, дата получения окончательного (переработанного) варианта статьи, дата принятия статьи в печать.

Редакционная коллегия может обращаться к специалистам в различных областях биологии развития с просьбой о подготовке коротких сообщений – комментариев к наиболее интересным (неоднозначным) статьям, поступившим в редакцию.

Авторам статей, прошедших рецензирование и принятых к публикации, следует оформить и выслать в редакцию договоры о передаче авторских прав для издания русской и английской версий статьи для русской и английской версий журнала соответственно. Договоры подписываются всеми авторами статьи и отправляются в отсканированном виде. Тексты авторских договоров можно распечатать из интернета по адресам: для русской версии – <http://www.sciencejournals.ru/journal/ont/>, для английской версии – <http://pleiades.online/ru/authors/agreement/>. Принимаются сканированные версии договоров. Только при наличии оформленного и подписанного всеми авторами Договора статья сдается в печать.

Корректурa, оттиски.

Корректурa высылается авторам Издательством в виде PDF-файла по электронной почте для проверки и исправления типографских опечаток; никакие другие изменения и дополнения в корректуре не допускаются. Корректурa должна быть выслана обратно в Издательство в течение двух дней с момента получения.

Высылаемый PDF-файл верстки статьи можно прочитать и отредактировать с помощью программы Acrobat Reader (версии 9 и выше), которую можно бесплатно скачать через интернет:

<http://get.adobe.com/reader/>. Замечания нужно вносить прямо в PDF-файл статьи, используя панель инструментов “Комментарии и пометки” бесплатной программы Adobe Reader версии 9+. Не используйте другие программы для правки PDF-файлов, иначе авторские замечания могут быть потеряны при автоматической обработке ответов. Нельзя изменять название PDF-файла статьи и тему e-mail сообщения по той же причине. Подробные рекомендации по внесению исправлений в PDF-файл можно найти на сайте по адресу: <http://pleiades.online/ru/authors/guidelines/electronic-proofreading/>.

Версия статьи на английском языке является построчным переводом текста русской версии. Редакция не принимает стилистическую и логическую правку текстов после публикации русской версии. Убедительная просьба тщательно готовить (в частности, внимательно вычитывать корректуры) русский вариант статей. Корректурa английского текста высылается авторам для проверки и на вычитку предоставляется не более 5 дней.

После опубликования статьи издательство высылает автору бесплатно электронные файлы статьи в формате PDF. В бумажном виде оттиски не предоставляются.

Контактная информация

Почтовый адрес редакции: 119334, Москва, ул. Вавилова, 26, комн. 108.

E-mail: ontogenez@list.ru

Сайт журнала: <http://ontogenez.org>

Главный редактор — Андрей Валентинович Васильев, зав. редакцией — Елена Дмитриевна Гасило

Электронная версия журнала: <http://pleiades.online/ru/journal/devbio/>; <http://www.sciencejournals.ru/journal/ont/>; <https://link.springer.com/journal/11174>; <http://ontogenez.org/?show=content4>.

СОБЛЮДЕНИЕ УКАЗАННЫХ ПРАВИЛ СУЩЕСТВЕННО ОБЛЕГЧИТ РАБОТУ РЕЦЕНЗЕНТОВ И РЕДАКТОРОВ ЖУРНАЛА И УСКОРИТ ПОДГОТОВКУ ВАШЕЙ СТАТЬИ К ПЕЧАТИ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Пример оформления первой страницы статьи.

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 576.08:578.23

СОЗДАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ НА ОСНОВЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В-КЛЕТОК RPM1 8866 С ПОСТОЯННОЙ И ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ТАТ БЕЛКА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

М. А. Горбачева^a, М. А. Тихомирова^b, Д. М. Поташникова^{c,d}, Б. Акбай^e,
Е. В. Шеваль^{b,c}, Я. Р. Мусинова^{a,b,*}

^aИнститут биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, д. 26, Москва, 119334 Россия

^bНИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, Москва, 119992 Россия

^cБиологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119992 Россия

^dЛаборатория атеротромбоза МГМСУ имени А.И. Евдокимова, улица Яузская, д. 11, корпус 4, Москва, 109240 Россия

^eUMR8126, Национальный Центр Научных Исследований Франции, Вильжюиф, Франция

*e-mail: musinova@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 03.04.2019 г.

После доработки 26.04.2019 г.

Принята к публикации 06.05.2019 г.

Высокоэффективная антиретровирусная терапия позволяет контролировать вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и предотвращать развитие иммунодефицита. Однако на фоне проводимой терапии могут развиваться различные осложнения, включая В-клеточные лимфомы. Один из механизмов онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов связан с действием вирусного Тат белка, который способен проникать в В-клетки. Для изучения действия Тат белка на В-клетки в настоящей работе получены и охарактеризованы клеточные линии на основе культивируемых В-клеток линии RPM1 8866 с постоянной и индуцибельной экспрессией Тат белка.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, Тат белок, В-клетки, онкогенез

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Пример оформления перевода аннотации.

Developing of Stable Cell Lines RPMI 8866 with Constant and Inducible Expression of Tat Human Immunodeficiency Virus

**M. A. Gorbacheva¹, M. A. Tikhomirova², D. M. Potashnikova^{3, 4},
B. Akbay⁵, E. V. Sheval^{2, 3}, Y. R. Musinova^{1, 2, *}**

¹*Koltsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

²*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1, str. 40, Moscow, 119991 Russia*

³*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, d. 1, str. 12, Moscow, 119991 Russia*

⁴*Atherothrombosis Laboratory, Evdokimov Moscow State Medical University,
ul. Yauzskaya 11, building 4, Moscow, 109240 Russia*

⁵*UMR 8126, Université Paris-Sud Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

**e-mail: musinova@genebee.msu.ru*

Received April 3, 2019; revised April 26, 2019; accepted May 5, 2019

Highly effective antiretroviral therapy makes it possible to control the human immunodeficiency virus (HIV) and prevent the development of immunodeficiency. Despite ongoing therapy, various complications can develop, including B-cell lymphomas. One of the mechanisms of oncogenesis in HIV-infected patients is associated with the action of the viral Tat protein, which is able to penetrate uninfected B-cells. To study the effect of Tat protein on B-cells, cell lines based on cultured B-cells RPMI 8866 line with constant and inducible expression of Tat protein were obtained and characterized.

Keywords: human immunodeficiency virus, Tat protein, B-cells, oncogenesis