

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 52, номер 2, 2021

---

---

## ОБЗОРЫ

- Формирование биомолекулярных конденсатов: регуляция эмбриогенеза на клеточном уровне  
*М. А. Тихомирова, Е. В. Шеваль* 83
- Репродуктивный потенциал хвойных, соматический эмбриогенез и апомиксис  
*И. Н. Третьякова, В. В. Минеев* 94
- 

## БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

- Сравнительно-видовая характеристика липидов и их динамика в процессе эмбрионального и раннего постэмбрионального развития Атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.)  
*В. П. Воронин, С. А. Мурзина, З. А. Нефедова, С. Н. Пеккоева, Т. Р. Руоколайнен, М. А. Ручьев, Н. Н. Немова* 108
- Опосредованное ооцитом влияние серотонина на функциональный статус клеток гранулезы  
*Д. А. Никишин, Ю. В. Храмова, Н. М. Алешина, Л. А. Мальченко, Ю. Б. Шмуклер* 120
- Влияние фотопериода на липидный профиль сеголеток (0+) атлантического лосося *Salmo salar* L. при заводских условиях выращивания  
*Н. Н. Немова, З. А. Нефедова, С. А. Мурзина, С. Н. Пеккоева, В. П. Воронин, Т. Р. Руоколайнен* 129
- 

## БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

- Начальные этапы онтогенеза представителей рода *Hydrangea* L. в условиях культуры  
*Ф. К. Мурзабулатова, Э. Х. Шигапов, Н. В. Полякова* 137
- 

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Влияние инсулиноподобного фактора роста первого типа на развитие *in vitro* эмбрионов мышей после их криоконсервации  
*Е. Ю. Брусенцев, Е. А. Кизилова, Т. Н. Игонина, С. В. Раннева, С. Я. Амстиславский* 146
- Межпопуляционные различия в темпе развития и потреблении кислорода головастиками остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilsson, 1842, Anura: Amphibia)  
*С. М. Ляпков, С. Ю. Клеймёнов* 151
- 
-

# Contents

---

---

Vol. 52, No. 2, 2021

---

---

## REVIEWS

- Formation of Biomolecular Condensates: Regulation of Embryogenesis at the Cellular Level  
*M. A. Tikhomirova and E. V. Sheval* 83
- The Reproductive Potential of Conifers, Somatic Embryogenesis and Apomixis  
*I. N. Tretyakova and V. V. Mineev* 94
- 

## BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

- Comparative Species-Specific Characteristics of Lipids and Their Dynamics During Embryogenesis and Early Postembryonal Development of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and Brown Trout (*Salmo trutta* L.)  
*V. P. Voronin, S. A. Murzina, Z. A. Nefedova, S. N. Pekkoeva, T. R. Ruokolainen, M. A. Ruch'ev, and N. N. Nemova* 108
- Oocyte-Mediated Effect of Serotonin on the Functional Status of Granulosa Cells  
*D. A. Nikishin, Y. V. Khramova, N. M. Alyoshina, L. A. Malchenko, and Y. B. Shmukler* 120
- The Effect of the Photoperiod on the Lipid Profile in Hatchery-reared Underyearlings (0+) of Atlantic Salmon *Salmo salar* L.  
*N. N. Nemova, Z. A. Nefedova, S. A. Murzina, S. N. Pekkoeva, V. P. Voronin, and T. R. Ruokolainen* 129
- 

## DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

- Early Ontogenetic Stages of the *Hydrangea* Species in Floriculture Conditions  
*F. K. Murzabulatova, Z. Kh. Shigapov, and N. V. Polyakova* 137
- 

## BRIEF COMMUNICATIONS

- Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the *in vitro* Development of Mouse Embryos after Cryopreservation  
*E. Yu. Brusentsev, E. A. Kizilova, T. N. Igonina, S. V. Ranneva, and S. Ya. Amstislavsky* 146
- Interpopulation Differences in the Developmental Rate and Oxygen Consumption in Tadpoles of Moor Frog (*Rana arvalis* Nilsson, 1842, Anura: Amphibia)  
*S. M. Lyapkov and S. Yu. Kleymenov* 151
- 
-

УДК 576.31

## ФОРМИРОВАНИЕ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНДЕНСАТОВ: РЕГУЛЯЦИЯ ЭМБРИОГЕНЕЗА НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

© 2021 г. М. А. Тихомирова<sup>a, b, c, \*</sup>, Е. В. Шеваль<sup>c, d</sup><sup>a</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Ленинские горы, 1, стр. 73, Москва, 119991 Россия<sup>b</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия<sup>c</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 40, Москва, 119991 Россия<sup>d</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: mariiatikh@gmail.com

Поступила в редакцию 07.09.2020 г.

После доработки 19.10.2020 г.

Принята к публикации 25.10.2020 г.

Многие морфогенетические процессы в ходе онтогенеза определяются изменениями в структуре и функциях клеток эмбрионов. Наибольшую пластичность клеточной организации придают безмембранные органеллы или биомолекулярные конденсаты, которые могут формироваться в ядре или цитоплазме по механизму разделения фаз на границе жидкость-жидкость (liquid-liquid phase separation). Гибкость биогенеза биомолекулярных конденсатов и высокая динамика их компонентов позволяют быстро менять клеточную организацию, что влечет за собой изменения в судьбе клеток, и, как следствие, в ходе эмбриогенеза. В обзоре на примере одного из типов безмембранных структур — половых гранул, обсуждается связь пластичности клеточной организации с реализацией процессов раннего эмбриогенеза.

**Ключевые слова:** биомолекулярные конденсаты, половые гранулы, архитектурные некодирующие РНК, эмбриогенез

DOI: 10.31857/S0475145021020075

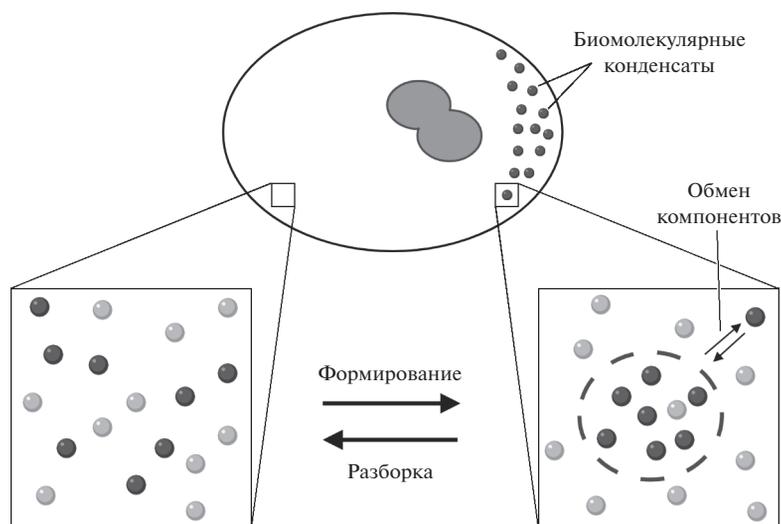
### ВВЕДЕНИЕ

Органеллы в клетке можно подразделить на те, которые окружены мембранами, и те, у которых мембрана отсутствует. Хотя среди безмембранных органелл есть относительно стабильные образования с высоко упорядоченной организацией (микротрубочки, центриоли, рибосомы), большинство таких органелл представляет собой высоко лабильные ассоциаты различных макромолекул (прежде всего, РНК и белков). Такие структуры могут локализоваться как в ядре (ядрышки, тельца Кахаля, тельца гистонового локуса и т.д.), так и в цитоплазме (стресс-гранулы, Р-гранулы и т.д.). Все эти структуры представляют собой результат конденсации специфического набора молекул в локальной, не ограниченной мембранами области клетки. Для обозначения таких структур удобно использовать чисто описательный термин *безмембранные органеллы* (Боголюбов, 2019). Но в последние годы чаще используются термины *конденсаты* (Shin, Brangwynne, 2017) или *биомолекулярные конденсаты* (Sabari et al., 2020), отражающие ключевой принцип формирования этих структур.

Процессы эмбриогенеза сопровождаются формированием специфических биомолекулярных конденсатов. Наиболее известным примером клеточной дифференцировки такого типа является формирование половых гранул, присутствие которых определяет особенности последующей судьбы клеток, в которые эти гранулы попадают (Voronina et al., 2011). Биомолекулярные конденсаты формируются в результате процессов самоорганизации, что позволяет легко изменять их организацию, гибко реагируя на потребности клетки и условия окружающей среды (Misteli, 2001). По-видимому, именно эта гибкость и делает биомолекулярные конденсаты удобным инструментом для регуляции стремительных изменений в ходе эмбриогенеза.

### МЕХАНИЗМЫ БИОГЕНЕЗА БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНДЕНСАТОВ

Биомолекулярные конденсаты не окружены мембранами, что делает возможным постоянный обмен образующих их макромолекул с окружающим пространством клетки (с нуклеоплазмой



**Рис. 1.** Формирование безмембранных органелл. Основным физическим процессом, приводящим к формированию биомолекулярных конденсатов, является разделение фаз на границе жидкость-жидкость. В результате такого разделения, происходящего за счет слабых, но многочисленных взаимодействий между биологическими макромолекулами (РНК и белки), достигается высокая концентрация необходимых компонентов в составе структур, не окруженных мембранами. При этом структуры сохраняют высокую динамику, что выражается как в способности структур быстро собираться и разбираться, так и в постоянном обмене молекул между структурой и окружающим пространством (нуклеоплазма или цитозоль).

или цитозолям). Такие структуры образуются посредством процесса, известного как разделение фаз на границе жидкость-жидкость (liquid-liquid phase separation) (Banani et al., 2017; Sabari et al., 2020; Shin, Brangwynne, 2017). Чтобы разделение фаз происходило в клетках, концентрации макромолекул, которые составляют биомолекулярные конденсаты, должны превышать их концентрации насыщения или “предел растворимости” в цитоплазме или нуклеоплазме (Courchaine et al., 2016). Ниже этого уровня молекулы растворяются в окружающем клеточном растворе и формирование структур не происходит. Если концентрация насыщения превышена, дополнительные полимерные цепи конденсируются в своеобразные жидкие капли, что ведет к увеличению размера органелл. При этом, макромолекулы внутри и вне органелл постоянно обмениваются и находятся в равновесии (рис. 1).

Биомолекулярные конденсаты могут образовывать гомогенные по внутренней структуре образования, но часто они представляют собой сложные по архитектуре гетерогенные структуры, имеющие несколько обособленных частей, образованных несмешивающимися между собой фазами (Shin, Brangwynne, 2017). В частности, представлены данные в пользу того, что белки ядрышка способны формировать обособленные фазы, что лежит в основе формирования сложной структуры ядрышка (Feric et al., 2016).

Биомолекулярные конденсаты могут гибко реагировать на колебания температуры, pH и осмо-

лярности, поэтому некоторые из гранул образуются в условиях стресса (Palangi et al., 2017). Например, изменение тоничности окружающей клетки среды может приводить к изменению объема клетки, т.е. влиять на концентрацию макромолекул. Так, перевод клеток в гипотонические условия приводит к разборке ядрышек (Zatsepina et al., 1997a), а последующий возврат в изотонические условия приводит к формированию из компонентов разобранных ядрышек многочисленных телец, которые были названы интерфазными проядрышками (Zatsepina et al., 1997b). Аналогичным образом, перевод в гипертонические условия индуцирует формирование биомолекулярных конденсатов в цитоплазме (Bounedjah et al., 2012; Aulas et al., 2017; Jalihal et al., 2020). По-видимому, сходные механизмы реализуются и в половых клетках. Так, при задержке овуляции у *Caenorhabditis elegans* в ооцитах формируются крупные РНП-гранулы, которые содержат РНК-связывающие белки и материнские мРНК, подвергающиеся трансляционной репрессии (Jud et al., 2008). Формирование сходных РНП-гранул может быть индуцировано и в нормальных ооцитах под действием теплового шока, осмотического стресса или аноксии (Schisa et al., 2001; Jud et al., 2008; Noble et al., 2008; Patterson et al., 2011), что очень сходно с индукцией стресс-гранул в клетках млекопитающих (Corbet, Parker, 2019), а также стресс-гранул и Р-телец у дрожжей (Buchan et al., 2011; Shah et al., 2013).

Формирование безмембранных структур зависит в наибольшей степени от двух типов взаимодействий между биологическими макромолекулами. Большую роль в формировании конденсатов играют мультивалентные белок-белок и/или белок-РНК взаимодействия (Li et al., 2012; Vanani et al., 2016). Также биомолекулярные конденсаты содержат большое количество белков, в составе которых присутствуют участки с низкой сложностью (low sequence complexity domains), в которых содержатся многочисленные повторы как отдельных аминокислот, так и аминокислотных мотивов. Эти белки относят к группе внутренне неупорядоченных белков (intrinsically disordered proteins), которые содержат протяженные участки, не имеющие четко выраженной конформации (Tompa, 2012). Неупорядоченные участки могут слабо взаимодействовать друг с другом, и такие слабые мультивалентные взаимодействия являются одной из движущих сил разделения фаз (Kato et al., 2012; Lin et al., 2015; Molliex et al., 2015; Nott et al., 2015).

В формировании многих биомолекулярных конденсатов ведущую роль играют молекулы РНК (Mao et al., 2011; Shevtsov, Dundr, 2011; Kato et al., 2012), а выход молекул РНК из структуры может вести к ее разборке (Carron et al., 2012; Musinova et al., 2016). Молекулы РНК достаточно велики, что позволяет им выступать субстратом для мультивалентных взаимодействий (Falkenberg et al., 2017). Центром нуклеации биомолекулярных конденсатов могут выступать кодирующие РНК, как это происходит в случае телец гистонов локуса, формирование которых зависит от транскрипции мРНК коровых гистонов (Shevtsov, Dundr, 2011). Биогенез некоторых биомолекулярных конденсатов зависит от присутствия специальных кодирующих РНК, которые играют структурную роль. Такие РНК иногда называют архитектурными (architectural RNA, arcRNA) (Chujo et al., 2016).

## ПОЛОВЫЕ ГРАНУЛЫ

Половые гранулы представляют собой цитоплазматические биомолекулярные конденсаты, необходимые для дифференцировки клеток половой линии. Эти органеллы были обнаружены в цитоплазме многих животных, и хотя состав половых гранул варьирует в зависимости от вида, белки Vasa, Tudor и Argonaut обнаруживаются в составе гранул от *C. elegans* до человека (Gao, Arkov, 2013).

У разных организмов половые гранулы могут носить разные названия, но во всех случаях они содержат материнские мРНК, необходимые для спецификации половых клеток, и определяют время трансляции мРНК, чтобы способствовать установлению линии половых клеток у ранних

эмбрионов (Marnik, Updike, 2019; Trcek, Lehmann, 2019; Lasko, 2020).

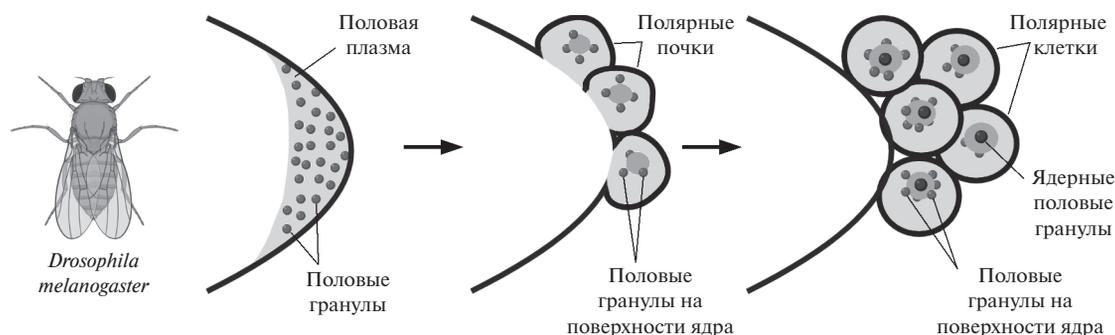
## ПОЛОВЫЕ ГРАНУЛЫ У *Drosophila melanogaster*

Образование половых клеток у насекомых детерминируется расположенной на заднем полюсе ядра половой плазмой (рис. 2). Уже ранние электронно-микроскопические работы Мэховалда показали, что половая плазма содержит многочисленные гранулы, которые у насекомых называют половыми гранулами (Mahowald, 1962). Формирование гранул и специфическое накопление в них макромолекул имеет решающее значение для формирования половых клеток у дрозофилы. Например, эмбрионы, в которых не формируются гранулы или формируются маленькие гранулы, не образуют половых клеток (Arkov et al., 2006).

Формирование половых гранул у *Drosophila melanogaster* зависит от мРНК *osk*, которая накапливается в задней области ооцитов и ранних эмбрионов (Lehmann, Nüsslein-Volhard, 1986; Ephrussi, Lehmann, 1992). Развивающийся ооцит дрозофилы окружен питающими клетками, которые связаны между собой и с ооцитом каналами. Функция питающих клеток состоит в том, чтобы синтезировать мРНК, белки и другие материалы, необходимые для раннего развития, и депонировать их в растущем ооците. мРНК *osk* синтезируется питающими клетками, а затем поступает в ооцит. Транспорт в ооцит транскриптов *osk* и некоторых других мРНК зависит от кортикальных микротрубочек и активности динеинов и кинезинов (Glotzer et al., 1997; Bullock, Ish-Horowicz, 2001; Sinsimer et al., 2013), а накопление транскриптов *osk* зависит от F-актина (Sinsimer et al., 2013).

Однако, если транспорт зависит от элементов цитоскелета, формирование гранул зависит от взаимодействия транскриптов *osk* друг с другом. Интересно, что в эти взаимодействия вовлечены компоненты комплекса сращивания экзонов (exon-exon junction complex), благодаря чему в половых гранулах накапливаются только сплайсированные транскрипты (Hachet, Ephrussi, 2004). Кроме того, с *osk* связываются факторы, регулирующие трансляцию, например, РНК-связывающий белок Bruno, который репрессирует трансляцию в ходе транспорта (Castagnetti et al., 2000; Chekulaeva et al., 2006; Kim et al., 2015) и одновременно способствует олигомеризации транскриптов мРНК (Chekulaeva et al., 2006).

На заднем полюсе ооцита мРНК *osk* транслируется в две изоформы белка: длинную изоформу, называемую Long Oskar, и короткую изоформу, называемую Short Oskar. В формировании половых гранул ключевую роль играет короткая изоформа белка Oskar (Markussen et al., 1995). Oskar



**Рис. 2.** Организация половых гранул в раннем развитии *D. melanogaster*. В только что оплодотворенном яйце гранулы равномерно распределены по половой плазме, через 1.5–3 ч на заднем конце эмбриона формируются полярные почки, которые потом становятся полярными клетками. В полярных почках половые гранулы располагаются около ядер, во время образования полярных клеток дополнительно формируются ядерные половые гранулы.

взаимодействует с еще одним белком половых гранул — Vasa, что является, по-видимому, ключевым событием в формировании половых гранул (Breitwieser et al., 1996). Показано, что короткая изоформа белка Oskar способна формировать гранулы в отсутствие других компонентов половых гранул в культивируемых клетках дрозофилы и клетках человека (Kistler et al., 2018). Эта способность зависит от присутствия в белке внутренне неупорядоченных участков (Krishnakumar et al., 2018).

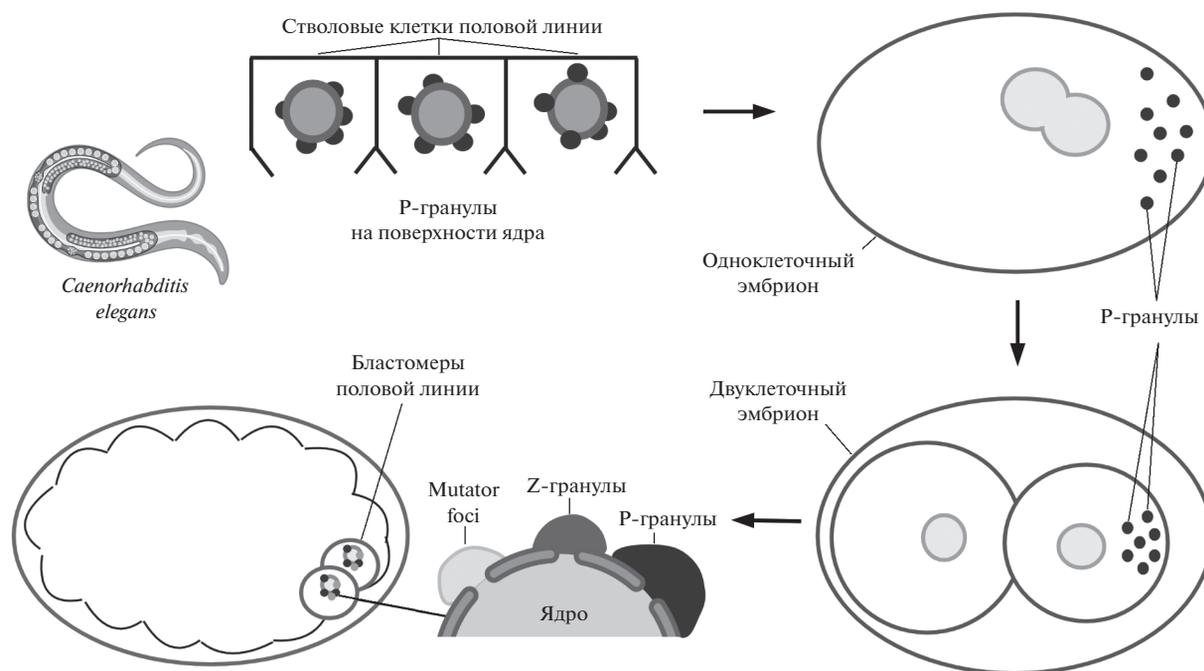
Важную роль в формировании половых гранул также играет белок Tudor (Thomson, Lasko, 2004; Arkov et al., 2006), который содержит 11 доменов Tudor, способных связывать симметрично диметилированные аргинины. Tudor связывает белки, в составе которых есть метилированные аргинины, например, белок Aubergine (Kirino et al., 2010b; Liu et al., 2010), который связывает piRNA. Метилированные аргинины есть также в составе белка Vasa (Kirino et al., 2010a).

Уже в ранних электронно-микроскопических работах было показано, что половые гранулы у *D. melanogaster* имеют неоднородную структуру, во время оогенеза они состоят из гранул размером 150–200 нм и содержат более мелкий гранулярный или фибриллярный компонент, а также часто имеют полость в центре (Mahowald, 1962). Показано, что белки Aubergine и Tudor формируют в половых гранулах частично перекрывающиеся фазы, а после формирования половых клеток в гранулах белок Aubergine располагается вокруг кластера белка Tudor (Vo et al., 2019). Т.е. половые гранулы *D. melanogaster* могут представлять собой гетерогенные конденсаты с сосуществующими двумя фазами.

Функция половых гранул осуществляется за счет накапливающихся в их составе инактивированных транскриптов различных мРНК. В половых гранулах специфически накапливается приблизительно 200 типов молекул мРНК (Frise et al., 2010). Некоторые из этих мРНК кодируют белки,

которые играют важную роль в процессах развития. Так, белок Nanos участвует в формировании передне-заднего градиента, который необходим для закладки передне-задней оси эмбриона (Gavis, Lehmann, 1992). Накопление мРНК связано с диффузией молекул и последующим их закрыванием (entrapment) внутри гранул (Forrest, Gavis, 2003). Интересно, что различные мРНК образуют так называемые гомотипические кластеры, т.е. скопления молекул мРНК одного типа (Tscsek et al., 2015). По-видимому, сначала в гранулы включаются единичные молекулы мРНК, которые затем рекрутируют дополнительные транскрипты тех же генов, что ведет к формированию кластеров молекул мРНК (Niepielko et al., 2018). Механизмы формирования гомотипических кластеров малопонятны. С одной стороны, некоторые данные говорят о том, что формирование таких кластеров зависит от присутствия особых последовательностей в 3' некодирующих регионах транскриптов (Eagle et al., 2018), другие данные свидетельствуют в пользу того, что формирование кластеров не зависит от присутствия в молекулах мРНК каких-либо специальных последовательностей, а представляет собой обособление обогащенных различными мРНК фаз внутри зародышевых гранул (Tscsek et al., 2020).

Также необходимо отметить, что в эмбрионе могут формироваться два типа половых гранул: цитоплазматические гранулы, также называемые “полярными гранулами”, которые связываются с молекулами материнской мРНК и способствуют образованию первичных половых клеток, и внутриядерные половые гранулы, которые способствуют митотическому делению первичных половых клеток (Kistler et al., 2018) (рис. 2). Формирование обоих типов гранул зависит от короткой изоформы белка Oskar.



**Рис. 3.** Формирование Р-гранул у *C. elegans*. Р-гранулы располагаются на поверхности ядер в клетках-предшественниках ооцитов, ко времени созревания ооцитов Р-гранулы отделяются от ядер и распределяются по цитоплазме. У одноклеточного эмбриона Р-гранулы располагаются в задней части, такая неравномерная локализация сохраняется в последующие деления клеток. Между 2 и 8 клеточной стадии, на момент образования примерно 100 клеток, гранулы опять начинают локализоваться на поверхности ядер и на этой стадии формируется три типа гранулы – Р-гранулы, Z-гранулы и Mutator foci.

### Р-ГРАНУЛЫ *Caenorhabditis elegans*

Половые гранулы *C. elegans* называют Р-гранулами, так как эти гранулы накапливаются в бластомерах, из которых формируются половые клетки (Р-линия). Р-гранулы присутствуют в линии половых клеток на протяжении всего цикла жизни червя (рис. 3). Они располагаются на поверхности ядер предшественников ооцитов, которые формируют синцитий, но после целлюляризации постепенно распределяются по цитоплазме. После оплодотворения Р-гранулы сосредотачиваются на заднем конце клетки, ассиметричное распределение Р-гранул повторяется в течении последующих четырех клеточных делений, что в итоге приводит к формированию Р-бластомера, клетки, ответственной за развитие половой линии (Seydoux, 2018). Между 2 и 8 клеточной стадии гранулы опять начинают локализоваться на поверхности ядер, причем имеются данные, что на этой стадии формируется три типа гранул – Р-гранулы, Z-гранулы и Mutator foci (Wan et al., 2018).

После оплодотворения в зиготе Р-гранулы демонстрируют динамичное поведение, они постоянно перемещаются с током цитоплазмы (Hird et al., 1996). Причем, потоки гранул от переднего конца к заднему и обратно уравновешены: по ходу движения от заднего конца к переднему Р-гранулы постепенно разбираются, и наоборот

по мере движения материала Р-гранул к заднему концу конденсируются (Brangwynne et al., 2009).

Р-гранулы гетерогенны по локализации и, вероятно, функциям. Это гетерогенность связана с присутствием белков с внутренне неупорядоченными доменами разных типов, которые отвечают за особенности формирования и функционирования Р-гранул. Так, белки GLH-1, GLH-2, GLH-4, RDE-12 и DDX-19 содержат FG-повторы, которые сходны с FG-повторами нуклеопоринов (Sheth et al., 2010). В синцитии, сформированном половыми клетками, Р-гранулы связаны с ядром, непосредственно контактируя при этом с ядерными порами (Pitt et al., 2000). FG-нуклеопорины образуют барьер в центральном канале ядерной поры, через который проникают белки и РНК в ходе ядерного экспорта и импорта (Hayama et al., 2017; Zilman, 2018). Р-гранулы контролируют проникновение в цитоплазму половых клеток транскриптов некоторых генов, которые вовлечены в процессы функционирования соматических клеток, т.е. выступают в качестве регулятора транскриптома половых клеток (Knutson et al., 2017). Кроме того, у *C. elegans* нуклеопорины необходимы для обеспечения ассоциации Р-гранул с ядерными порами (Updike, Strome, 2009), а гомолог нуклеопорина позвоночных Nup98 (CeNup98) локализуется также и в перинуклеарных Р-грану-

лах синцития линии половых клеток, в которых CeNup98 связан с транскрипционно репрессированной мРНК *nos-2* (Voronina, Seydoux, 2010). По-видимому, экспортируемая мРНК попадает из поры сразу в Р-гранулы, которые накапливают большие количества мРНК в еще неактивных половых клетках, и предположительно репрессивуют трансляцию этих РНК (Sheth et al., 2010).

Некоторые белки Р-гранул содержат более или менее протяженные участки, обогащенные повторами аргининов и глицинов (RG- или RGG-мотивы). Аргинины в составе как RG так и RGG повторов метилируются (Thandapani et al., 2013), также для них характерна неспецифическая РНК-связывающая активность (Chong et al., 2018). Такие повторы есть в белках PGL-1 и PGL-3, а также в белке LAF-1. Для этих белков показана способность формировать конденсаты *in vitro* (Elbaum-Garfinkle et al., 2015; Saha et al., 2016). PGL-1 и PGL-3 способны формировать конденсаты благодаря присутствию димеризационного домена, а RG-повторы необходимы для связывания РНК и привлечения других белков (Hanazawa et al., 2011). По-видимому, участки белков, содержащие RG- и RGG-мотивы, часто вовлечены в формирование различных биомолекулярных конденсатов. Так, недавно было показано, что формирование одного из доменов ядрышка — плотного фибриллярного компонента, зависит от взаимодействий между собой обогащенных RGG-мотивами N-терминальных участков фибрилларина (FBL) (Yao et al., 2019).

Наконец, белки MEG-1, MEG-2, MEG-3 и MEG-4 содержат длинные неупорядоченные N-концевые участки, обогащенные серинами (Wang et al., 2014). MEG-3 способен образовывать конденсаты *in vitro* (Lee et al., 2020), и, по-видимому, формирует относительно стабильную часть Р-гранул, с которой взаимодействуют более динамичные компоненты (Putnam et al., 2019). Благодаря наличию неупорядоченных белковых доменов, белок MEG-3 конденсирует мРНК (Lee et al., 2020). Р-гранулы эмбриона удерживают мРНК, не связанные с рибосомами до момента их деградации или трансляции в бластомере половой линии Р4.

Закладка передне-задней оси в зиготе *C. elegans* определяется токами в цитоплазме, индуцируемыми сперматозоидом при оплодотворении (Kimura, Kimura, 2020). Р-гранулы формируются только в задней части одноклеточного эмбриона благодаря градиенту белка MEX-5 (Brangwynne et al., 2009). По-видимому, этот градиент регулирует фазовый переход, ведущий к формированию Р-гранул, через регулирование пула доступных РНК. В системе *in vitro* показано, что добавление РНК к очищенным PGL-3 и MEG-3 снижает концентрацию белка, необходимую для индукции фа-

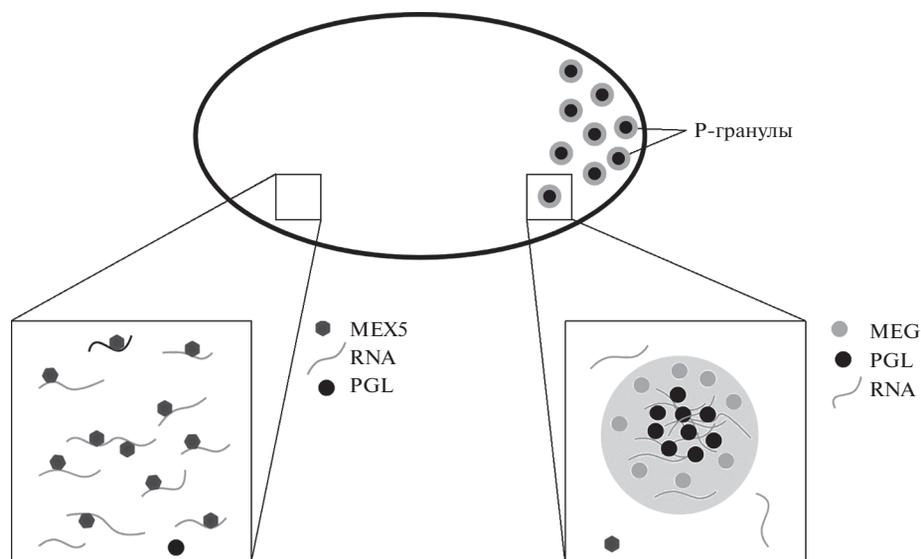
зового перехода (Saha et al., 2016; Smith et al., 2016). MEX-5 связывается с молекулами РНК на переднем конце зиготы, таким образом уменьшая пул молекул РНК, который используется для формирования Р-гранул. На заднем конце клетки отсутствие MEX-5 позволяет MEG-3 и PGL-3 связывать РНК, что облегчает формирование Р-гранул (рис. 3).

### БИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНДЕНСАТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ЗАЩИТЕ КЛЕТОК ПОЛОВОЙ ЛИНИИ ОТ СТРЕССА

Клетки половой линии потенциально бессмертны, поэтому защита этих клеток от стресса имеет особое значение. В ооцитах накапливаются значительные количества материнских мРНК, многие из которых остаются нетранслируемыми в течение длительного времени. Повреждение этих мРНК может представлять особую опасность для последующего развития зародыша. Одним из распространенных вариантов ответа на клеточный стресс с целью защиты гамет, является сборка гранул, состоящих из белков и РНК (Schisa, 2019). Индуцированные стрессом гранулы были описаны у позвоночных и беспозвоночных, однако их функция остается в значительной степени неизвестной.

Среди гранул, которые образуются в соматических клетках в условиях стресса, выделяют стресс-гранулы и тельца процессинга (Р-тельца) (Kedersha et al., 2005). Одной из ключевых реакций на стресс является ингибирование трансляции и формирование стресс-гранул, содержащих консервативные РНК-связывающие белки TIA-1 и TIAR. Стресс-гранулы содержат нетранслируемые мРНК (Khong et al., 2017), и принято считать, что формирование стресс-гранул позволяет быстро восстановить трансляцию после завершения стресса (Buchan, Parker, 2009). Р-тельца, по-видимому, представляют собой сайты деградации мРНК (Decker, Parker, 2012), но они также способны накапливать в себе трансляционно неактивную мРНК (Hubstenberger et al., 2017), защищая ее от деградации с возможностью быстро активировать трансляцию. Р-тельца и стресс-гранулы хотя и отличаются по составу и свойствам, но имеют отдельные общие компоненты (Ivanov et al., 2019).

Несколько компонентов Р-телец участвуют в локализации мРНК *osk* и трансляционной репрессии (Fan et al., 2011). Белок Cup трансляционно репрессивует мРНК *osk* у *D. melanogaster* и играет важную роль в поддержании ее стабильности. В отсутствие Cup компоненты комплекса Oskar не локализируются в развивающемся ооците (Broyer et al., 2017). Локализация мРНК *osk* на заднем полюсе ооцита дрозофилы особенно важна для эмбрионального развития, поскольку она играет важную роль для формирования будущей половой линии.



**Рис. 4.** Регуляция формирования Р-гранул у *C. elegans* путем конкурентного связывания с РНК белков Р-гранул и белка MEX5. Разделение фаз в передней части эмбриона *C. elegans* подавляется за счет присутствия там белка MEX5, взаимодействующего с молекулами РНК. В задней части эмбриона белок MEG связывается с РНК в результате чего, по-видимому, происходит сборка Р-гранул за счет разделения фаз. Белки PGL формируют жидкую фазу вокруг которой конденсируются белки MEG, имеющие более плотную структуру, похожую на гель.

Белок DAZL является важным регулятором развития половых клеток (Rosario et al., 2019), он вовлечен в активацию трансляции мРНК при созревании ооцитов и раннем эмбриональном развитии (Chen et al., 2011). В отсутствие белка DAZL мыши стерильны и не формируют половые клетки (Lin, Page, 2005). В половых клетках самцов мышей DAZL необходим для формирования стресс-гранул, влияющих на выживание половых клеток при тепловом стрессе (Kim et al., 2012).

Белок стресс-гранул TIAR-1 изучался в ооцитах *C. elegans* при различных стрессовых условиях и, по-видимому, защищает зародышевую линию от неблагоприятного действия теплового шока. У червей с мутациями в белке TIAR-1 было значительное снижение фертильности (Huelgas-Morales et al., 2016). У эмбрионов *C. elegans* окислительный стресс, голодание и солевой стресс вызывают перемещение убиквитина, протеасом и белка TIAR-2 в отдельные области, называемые ядерными гранулами, вызванными стрессом (stress induced nuclear granules, SING) (Sampuda et al., 2017). У эмбрионов, содержащих SING прекращается деление клеток.

Интересно, но формирование телец, содержащих мРНК может происходить не только как результат реакции клетки на стресс, но и в нормальных условиях. Недавно были обнаружены новые рибонуклеопротеиновые гранулы в цитоплазме ооцитов *Xenopus laevis*, которые были названы L-тельцами (Neil et al., 2020). L-тельца содержат мРНК, которые накапливаются в цитоплазме ооцитов в ходе созревания. Протеом L-телец более чем на две трети состоит из белков, которые явля-

ются компонентами ранее описанных цитоплазматических гранул, в том числе стресс-гранулы, Р-телец, половых гранул, но остальная часть белков является уникальной для этих органелл. По-видимому, молекулы мРНК в L-тельцах выполняют структурную (архитектурную) функцию. В ооцитах упаковка материнских мРНК в стабильные гранулы, такие как L-тельца, может быть важным механизмом для подавления трансляции в течение длительных периодов времени (Neil et al., 2020). Также важно отметить, что формирование описанных выше органелл, содержащих мРНК, может являться крайней формой обособления молекул в цитоплазме. Накопление отдельных мРНК может происходить и отдельно от каких-либо органелл, причем этот процесс сопряжен с трансляцией (Samacoits et al., 2020).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом обзоре мы сосредоточились на наиболее изученном случае регуляции эмбриогенеза с помощью безмембранных структур (половых гранул), однако приведенный материал не исчерпывает случаи регуляции эмбриогенеза и дифференцировок биомолекулярных конденсатов. Так, например, ядерные тельца вовлечены в процесс перехода от материнского к зиготическому типу экспрессии генов (материнско-зиготический переход) (Arias Escayola, Neugebauer, 2018). Скорее всего, мы находимся в самом начале изучения роли биомолекулярных конденсатов в регуляции процессов эмбриогенеза и дифференцировки. С

чем же связана столь важная роль именно этого типа органелл?

Как уже упоминалось выше, формирование биомолекулярных конденсатов происходит путем самоорганизации. Еще в ранних работах по изучению механизмов самоорганизации было отмечено, что такой способ позволяет добиваться большой гибкости в структуре и составе (а значит и функции) органелл, позволяет гибко реагировать на изменения в составе клетки и вокруг нее (Misteli, 2001). Это особенность ярко проявляется, например, в изменениях структуры Р-гранул в ходе гаметогенеза и раннего развития *C. elegans* (рис. 3). Однако не менее важным является и то, что формирование крупных конденсатов позволяет регулировать целые комплексы макромолекул. Причем, эти комплексы могут быть легко перемещены в определенные части клетки, что особенно важно для процессов раннего эмбриогенеза, когда происходит пространственная дифференцировка зародыша. Также обращает внимание, что высокая пластичность биомолекулярных конденсатов приводит к возможности формировать на единой основе очень разные структуры. Половые гранулы имеют много общего с образующимися при стрессе стресс-гранулами и Р-тельцами. Обе группы структур накапливают мРНК, однако это преследует принципиально разные цели – адаптация клетки к стрессу и обеспечения раннего эмбриогенеза. Т.е. на одной основе могут формироваться разные типы структур, которые могут выполнять функции специфические для определенных этапов развития.

Таким образом, изучение механизмов биогенеза биомолекулярных конденсатов уже сейчас позволяет на новом уровне взглянуть на роль клеточных механизмов в регуляции онтогенетических процессов. Невероятная гибкость, обеспечиваемая основным механизмом формирования – разделением фаз на границе жидкость-жидкость – играет важную роль в обеспечении гибкости процессов эмбриогенеза.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем признательность С.Е. Дмитриеву и Ю.В. Храмовой за обсуждение и ценные замечания.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 18-14-00195 для Е.В.Ш.) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант Аспиранты 20-34-90156 для М.А.Т.).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку и написание текста обзора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боголюбов Д.С.* Безмембранные органеллы эукариотической клетки: основные понятия и принципы формирования // *Цитология*. 2019. Т. 61. С. 683–703.
- Arias Escayola D, Neugebauer K.M.* Dynamics and function of nuclear bodies during embryogenesis // *Biochemistry*. 2018. V. 57. P. 2462–2469.
- Arkov A.L., Wang J-Y.S., Ramos A. et al.* The role of Tudor domains in germline development and polar granule architecture // *Development*. 2006. V. 133. P. 4053–4062.
- Aulas A, Fay M.M., Lyons S.M. et al.* Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci // *J. Cell. Sci.* 2017. V. 130. P. 927–937.
- Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A. et al.* Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. P. 285–298.
- Banani S.F., Rice A.M., Peeples W.B. et al.* Compositional control of phase-separated cellular bodies // *Cell*. 2016. V. 166. P. 651–663.
- Bounedjah O., Hamon L., Savarin P. et al.* Macromolecular crowding regulates assembly of mRNA stress granules after osmotic stress: new role for compatible osmolytes // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 2446–2458.
- Brangwynne C.P., Eckmann C.R., Courson D.S. et al.* Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation // *Science*. 2009. V. 324. P. 1729–1732.
- Breitwieser W., Markussen F.H., Horstmann H. et al.* Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 2179–2188.
- Broyer R.M., Monfort E., Wilhelm J.E.* Cup regulates oskar mRNA stability during oogenesis // *Dev. Biol.* 2017. V. 421. P. 77–85.
- Buchan J.R., Parker R.* Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation // *Mol. Cell*. 2009. V. 36. P. 932–941.
- Buchan J.R., Yoon J.-H., Parker R.* Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. P. 228–239.
- Bullock S.L., Ish-Horowicz D.* Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis // *Nature*. 2001. V. 414. P. 611–616.

- Carron C., Balor S., Delavoie F. et al.* Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. P. 4532–4542.
- Castagnetti S., Hentze M.W., Ephrussi A.* Control of oskar mRNA translation by Bruno in a novel cell-free system from *Drosophila* ovaries // *Development*. 2000. V. 127. P. 1063–1068.
- Chekulaeva M., Hentze M.W., Ephrussi A.* Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles // *Cell*. 2006. V. 124. P. 521–533.
- Chen J., Melton C., Suh N. et al.* Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 755–766.
- Chong P.A., Vernon R.M., Forman-Kay J.D.* RGG/RG motif regions in RNA binding and phase separation // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. P. 4650–4665.
- Chujo T., Yamazaki T., Hirose T.* Architectural RNAs (arcRNAs): a class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1859. P. 139–146.
- Corbet G.A., Parker R.* RNP granule formation: lessons from p-bodies and stress granules // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2019. V. 84. P. 203–215.
- Courchaine E.M., Lu A., Neugebauer K.M.* Droplet organelles? // *EMBO J.* 2016. V. 35. P. 1603–1612.
- Decker C.J., Parker R.* P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 9: a012286.
- Eagle W.V.I., Yeboah-Kordieh D.K., Niepielko M.G. et al.* Distinct cis-acting elements mediate targeting and clustering of *Drosophila* polar granule mRNAs // *Development*. 2018. V. 145. P. dev.164657.
- Elbaum-Garfinkle S., Kim Y., Szczepaniak K. et al.* The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. V. 112. P. 7189–7194.
- Ephrussi A., Lehmann R.* Induction of germ cell formation by oskar // *Nature*. 1992. V. 358. P. 387–392.
- Falkenberg C.V., Carlson J.H., Blinov M.L.* Multivalent molecules as modulators of RNA granule size and composition // *Biophys. J.* 2017. V. 113. P. 235–245.
- Fan S.-J., Marchand V., Ephrussi A.* *Drosophila* Ge-1 promotes P body formation and oskar mRNA localization // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e20612.
- Feric M., Vaidya N., Harmon T.S. et al.* Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. // *Cell*. 2016. V. 165. P. 1686–1697.
- Forrest K.M., Gavis E.R.* Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila* // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 1159–1168.
- Frise E., Hammonds A.S., Celniker S.E.* Systematic image-driven analysis of the spatial *Drosophila* embryonic expression landscape // *Mol. Syst. Biol.* 2010. V. 6. P. 345.
- Gao M., Arkov A.L.* Next generation organelles: structure and role of germ granules in the germline // *Mol. Reprod. Dev.* 2013. V. 80. P. 610–623.
- Gavis E.R., Lehmann R.* Localization of nanos RNA controls embryonic polarity // *Cell*. 1992. V. 71. P. 301–313.
- Glotzer J.B., Saffrich R., Glotzer M. et al.* Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in *Drosophila* oocytes // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. P. 326–337.
- Hachet O., Ephrussi A.* Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization // *Nature*. 2004. V. 428. P. 959–963.
- Hanazawa M., Yonetani M., Sugimoto A.* PGL proteins self associate and bind RNPs to mediate germ granule assembly in *C. elegans* // *J. Cell. Biol.* 2011. V. 192. P. 929–937.
- Hayama R., Rout M.P., Fernandez-Martinez J.* The nuclear pore complex core scaffold and permeability barrier: variations of a common theme // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2017. V. 46. P. 110–118.
- Hird S.N., Paulsen J.E., Strome S.* Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation // *Development*. 1996. V. 122. P. 1303–1312.
- Hubstenberger A., Courel M., Bénard M. et al.* P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 144–157.e5.
- Huelgas-Morales G., Silva-García C.G., Salinas L.S. et al.* The stress granule RNA-binding protein TIAR-1 protects female germ cells from heat shock in *Caenorhabditis elegans* // *G3*. 2016. V. 6. P. 1031–1047.
- Ivanov P., Kedersha N., Anderson P.* Stress granules and processing bodies in translational control // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11. P. a032813.
- Jalihal A.P., Pitchiaya S., Xiao L. et al.* Multivalent proteins rapidly and reversibly phase-separate upon osmotic cell volume change // *Mol Cell*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.004>
- Jud M.C., Czerwinski M.J., Wood M.P. et al.* Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway // *Dev. Biol.* 2008. V. 318. P. 38–51.
- Kato M., Han T.W., Xie S. et al.* Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels // *Cell*. 2012. V. 149. P. 753–767.
- Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M. et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling // *J. Cell. Biol.* 2005. V. 169. P. 871–884.
- Khong A., Matheny T., Jain S. et al.* The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 808–820.e5.
- Kim B., Cooke H.J., Rhee K.* DAZL is essential for stress granule formation implicated in germ cell survival upon heat stress // *Development*. 2012. V. 139. P. 568–578.
- Kim G., Pai C.-I., Sato K. et al.* Region-specific activation of oskar mRNA translation by inhibition of Bruno-mediated repression // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. P. e1004992.
- Kimura K., Kimura A.* Cytoplasmic streaming drifts the polarity cue and enables posteriorization of the *Caenorhabditis elegans* zygote at the side opposite of sperm entry // *Mol. Biol. Cell*. 2020. V. 31. P. 1765–1773.
- Kirino Y., Vourekas A., Kim N. et al.* Arginine methylation of vasa protein is conserved across phyla // *J. Biol. Chem.* 2010a. V. 285. P. 8148–8154.

- Kirino Y., Vourekas A., Sayed N. et al. Arginine methylation of Aubergine mediates Tudor binding and germ plasm localization // RNA. 2010b. V. 16. P. 70–78.
- Kistler K.E., Treck T., Hurd T.R. et al. Phase transitioned nuclear Oskar promotes cell division of *Drosophila* primordial germ cells // Elife. 2018. V. 7. P. e37949.
- Knutson A.K., Egelhofer T., Rechtsteiner A. et al. Germ granules prevent accumulation of somatic transcripts in the adult *Caenorhabditis elegans* germline // Genetics. 2017. V. 206. P. 163–178.
- Krishnakumar P., Riemer S., Perera R. et al. Functional equivalence of germ plasm organizers // PLoS Genet. 2018. V. 14. P. e1007696.
- Lasko P. Patterning the *Drosophila* embryo: A paradigm for RNA-based developmental genetic regulation // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2020. <https://doi.org/10.1002/wrna.1610>
- Lee C.-Y.S., Putnam A., Lu T. et al. Recruitment of mRNAs to P granules by condensation with intrinsically-disordered proteins // Elife. 2020. V. 9. P. e52896.
- Lehmann R., Nüsslein-Volhard C. Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila* // Cell. 1986. V. 47. P. 141–152.
- Lin Y., Page D.C. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice // Dev. Biol. 2005. V. 288. P. 309–316.
- Lin Y., Protter D.S.W., Rosen M.K. et al. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins // Mol Cell. 2015. V. 60. P. 208–219.
- Li P., Banjade S., Cheng H.-C. et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins // Nature. 2012. V. 483. P. 336–340.
- Liu H., Wang J.-Y.S., Huang Y. et al. Structural basis for methylarginine-dependent recognition of Aubergine by Tudor // Genes Dev. 2010. V. 24. P. 1876–1881.
- Mahowald A.P. Fine structure of pole cells and polar granules in *Drosophila melanogaster* // J. Exp. Zool. 1962. V. 151. P. 201–215.
- Mao Y.S., Sunwoo H., Zhang B. et al. Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by non-coding RNAs // Nat. Cell Biol. 2011. V. 13. P. 95–101.
- Markussen F.H., Michon A.M., Breitwieser W. et al. Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly // Development. 1995. V. 121. P. 3723–3732.
- Marnik E.A., Updike D.L. Membraneless organelles: P granules in *Caenorhabditis elegans* // Traffic. 2019. V. 20. P. 373–379.
- Misteli T. The concept of self-organization in cellular architecture // J. Cell Biol. 2001. V. 155. P. 181–185.
- Molliex A., Temirov J., Lee J. et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization // Cell. 2015. V. 163. P. 123–133.
- Musinova Y.R., Lisitsyna O.M., Sorokin D.V. et al. RNA-dependent disassembly of nuclear bodies // J. Cell Sci. 2016. V. 129. P. 4509–4520.
- Neil C.R., Jeschonek S.P., Cabral S.E. et al. L-bodies are novel RNA-protein condensates driving RNA transport in *Xenopus* oocytes // BioRxiv preprint 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.08.084814>
- Niepielko M.G., Eagle W.V.I., Gavis E.R. Stochastic seeding coupled with mRNA self-recruitment generates heterogeneous drosophila germ granules // Curr. Biol. 2018. V. 28. P. 1872–1881.e3.
- Noble S.L., Allen B.L., Goh L.K. et al. Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development // J. Cell Biol. 2008. V. 182. P. 559–572.
- Nott T.J., Petsalaki E., Farber P. et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles // Mol. Cell. 2015. V. 57. P. 936–947.
- Palangi F., Samuel S.M., Thompson I.R. et al. Effects of oxidative and thermal stresses on stress granule formation in human induced pluripotent stem cells // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0182059.
- Patterson J.R., Wood M.P., Schisa J.A. Assembly of RNP granules in stressed and aging oocytes requires nucleoporins and is coordinated with nuclear membrane blebbing // Dev. Biol. 2011. V. 353. P. 173–185.
- Pitt J.N., Schisa J.A., Priess J.R. P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA // Dev. Biol. 2000. V. 219. P. 315–333.
- Putnam A., Cassani M., Smith J. et al. A gel phase promotes condensation of liquid P granules in *Caenorhabditis elegans* embryos // Nat. Struct. Mol. Biol. 2019. V. 26. P. 220–226.
- Rosario R., Crichton J.H., Stewart H.L. et al. Dazl determines primordial follicle formation through the translational regulation of Tex14 // FASEB J. 2019. V. 33. P. 14221–14233.
- Sabari B.R., Dall'Agnese A., Young R.A. Biomolecular condensates in the nucleus // Trends Biochem. Sci. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.06.007>
- Saha S., Weber C.A., Nusch M. et al. Polar positioning of phase-separated liquid compartments in cells regulated by an mRNA competition mechanism // Cell. 2016. V. 166. P. 1572–1584.e16.
- Chouaib R., Safieddine A., Pichon X. et al. A dual protein-mRNA localization screen reveals compartmentalized translation and widespread co-translational RNA targeting // Dev. Cell. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.010>
- Sampuda K.M., Riley M., Boyd L. Stress induced nuclear granules form in response to accumulation of misfolded proteins in *Caenorhabditis elegans* // BMC Cell Biol. 2017. V. 18. P. 18.
- Schisa J.A. Germ cell responses to stress: the role of RNP granules // Front. Cell Dev. Biol. 2019. V. 7. P. 220.
- Schisa J.A., Pitt J.N., Priess J.R. Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults // Development. 2001. V. 128. P. 1287–1298.
- Seydoux G. The P granules of *C. elegans*: a genetic model for the study of RNA-protein condensates // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. P. 4702–4710.
- Shah K.H., Zhang B., Ramachandran V. et al. Processing body and stress granule assembly occur by independent and differentially regulated pathways in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2013. V. 193. P. 109–123.
- Sheth U., Pitt J., Dennis S. et al. Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells // Development. 2010. V. 137. P. 1305–1314.

- Shevtsov S.P., Dundr M.* Nucleation of nuclear bodies by RNA // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. P. 167–173.
- Shin Y., Brangwynne C.P.* Liquid phase condensation in cell physiology and disease // *Science.* 2017. V. 357. P. aaf4382.
- Sinsimer K.S., Lee J.J., Thiberge S.Y. et al.* Germ plasm anchoring is a dynamic state that requires persistent trafficking // *Cell Rep.* 2013 V. 5. P. 1169–1177.
- Smith J., Calidas D., Schmidt H. et al.* Spatial patterning of P granules by RNA-induced phase separation of the intrinsically-disordered protein MEG-3 // *Elife.* 2016. V. 5. P. e21337.
- Thandapani P., O'Connor T.R., Bailey T.L. et al.* Defining the RGG/RG motif // *Mol. Cell.* 2013. V. 50. P. 613–623.
- Thomson T., Lasko P.* *Drosophila* tudor is essential for polar granule assembly and pole cell specification, but not for posterior patterning // *Genesis.* 2004. V. 40. P. 164–170.
- Tompa P.* Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. P. 509–516.
- Trcek T., Douglas T.E., Grosch M. et al.* Sequence-independent self-assembly of germ granule mRNAs into homotypic clusters // *Mol. Cell* 2020. V. 78. P. 941–950.e12.
- Trcek T., Grosch M., York A. et al.* *Drosophila* germ granules are structured and contain homotypic mRNA clusters // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7962.
- Trcek T., Lehmann R.* Germ granules in *Drosophila* // *Traffic.* 2019. V. 20. P. 650–660.
- Urdike D.L., Strome S.* A genomewide RNAi screen for genes that affect the stability, distribution and function of P granules in *Caenorhabditis elegans* // *Genetics* 2009 V. 183. P. 1397–419.
- Vo H.D.L., Wahiduzzaman, Tindell S.J. et al.* Protein components of ribonucleoprotein granules from *Drosophila* germ cells oligomerize and show distinct spatial organization during germline development // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 19190.
- Voronina E., Seydoux G.* The *C. elegans* homolog of nucleoporin Nup98 is required for the integrity and function of germline P granules // *Development.* 2010. V. 137. P. 1441–1450.
- Voronina E., Seydoux G., Sassone-Corsi P. et al.* RNA granules in germ cells // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. V. 3. P. a002774.
- Wan G., Fields B.D., Spracklin G. et al.* Spatiotemporal regulation of liquid-like condensates in epigenetic inheritance // *Nature.* 2018. V. 557. P. 679–683.
- Wang J.T., Smith J., Chen B.-C. et al.* Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically disordered proteins in *C. elegans* // *Elife.* 2014. V. 3. P. e04591.
- Yao R.-W., Xu G., Wang Y. et al.* Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus // *Mol. Cell.* 2019. V. 76. P. 767–783.e11.
- Zatsepina O.V., Dudnic O.A., Chentsov Y.S. et al.* Reassembly of functional nucleoli following *in situ* unraveling by low-ionic-strength treatment of cultured mammalian cells // *Exp. Cell Res.* 1997a. V. 233. P. 155–168.
- Zatsepina O.V., Dudnic O.A., Todorov I.T. et al.* Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells // *Chromosoma.* 1997b. V. 105. P. 418–430.
- Zilman A.* Aggregation, phase separation and spatial morphologies of the assemblies of FG nucleoporins // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. P. 4730–4740.

## Formation of Biomolecular Condensates: Regulation of Embryogenesis at the Cellular Level

M. A. Tikhomirova<sup>1, 2, 3, \*</sup> and E. V. Sheval<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119991 Russia*

<sup>2</sup>*Koltsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>3</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 40, Moscow, 119991 Russia*

<sup>4</sup>*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119991 Russia*

\*e-mail: mariiatikh@gmail.com

Morphogenetic processes during ontogenesis are determined by the changes in structure and functions of the embryonic cells. The cellular reorganization is driven by membraneless organelles. These structures, which is called biomolecular condensates, form in the nucleus or in the cytoplasm due to the phenomenon of liquid-liquid phase separation. The plasticity of biomolecular condensates and their dynamic nature make it possible to quickly change the cellular organization, thus leading to the changes of the cells' fate during the embryogenesis. In this review, we discuss the relationship between the versatility of the cellular organization and the course of the early embryogenesis with the focus on the one type of the biomolecular condensates, namely the germ granules.

**Keywords:** biomolecular condensates, germ granules, architectural noncoding RNAs, embryogenesis

УДК 57.017.5:581.3:582.47

## РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ХВОЙНЫХ, СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И АПОМИКСИС

© 2021 г. И. Н. Третьякова<sup>а</sup>, \*, В. В. Минеев<sup>б</sup>, \*\*

<sup>а</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение  
ФИЦ КНЦ СО РАН, ул. Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 Россия

<sup>б</sup>ФГБОУ ВО “Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева”,  
ул. Ады Лебедевой, 89, Красноярск, 660049 Россия

\*e-mail: culture@ksc.krasn.ru

\*\*e-mail: vmineyev@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 01.09.2020 г.

Принята к публикации 07.09.2020 г.

В статье изложены результаты анализа имеющихся данных по размножению растений класса Pinopsida (половая репродукция и бесполое – апомиксис). Рассмотрены возможности реализации апомиксиса у хвойных. Этот способ бесполого размножения проявляется при нарушении формирования семян. Особым типом репродукции у хвойных является соматический эмбриогенез в культуре *in vitro*. Показано, что переход соматических клеток к тотипотентному и эмбрионному состоянию у хвойных происходит на морфогенетическом, физиолого-биохимическом и молекулярно-генетическом уровнях. Установлена общность морфогенетических процессов, лежащих в основе соматического и зиготического эмбриогенеза. Рассматривается место соматического эмбриогенеза в системе репродукции хвойных.

**Ключевые слова:** репродукция, апомиксис, соматический эмбриогенез, хвойные

**DOI:** 10.31857/S0475145021020087

### ВВЕДЕНИЕ

Растения демонстрируют высокую пластичность и индивидуальную изменчивость способов репродукции: у них наблюдается как половое размножение, так и бесполое – апомиксис. У растений отдела Pinophyta (класс Pinopsida) имеется несколько форм апомиксиса: развитие асексуального зародыша, полиэмбриония и кливаж. У голосеменных растений, особенно видов семейства Pinaceae, ярко проявляется так называемая “кливажная полиэмбриония” (cleavage polyembryony), при которой сформированный из зиготы эмбрион разделяется на четыре зародыша (Singh, 1978; Третьякова, 1990).

Особым типом репродукции у данного класса растений является соматический эмбриогенез, открытый у *Picea abies* в 1985 году в культуре *in vitro* (Накман et al., 1985). Переход соматических клеток к тотипотентному и эмбрионному состоянию у хвойных в настоящее время активно изучается на морфогенетическом, физиолого-биохимическом и молекулярно-генетическом уровнях (von Aderkas et al., 1991; Tret'yakova et al., 2019; Peng et al., 2020). Показана общность морфогенетических процессов, лежащих в основе зиготического и со-

матического эмбриогенеза хвойных (von Aderkas et al., 1991; Tret'yakova, Park, 2018). Репродуктивная система *Coniferous*, также, как и других живых организмов, направлена на выживание видов и способность их оставлять потомство.

В данной статье проводится анализ закономерностей половой репродукции хвойных и возможность реализации различных форм апомиксиса у данного класса растений (в сравнении с известными формами апомиксиса у цветковых растений), а также рассматривается место соматического эмбриогенеза в системе репродукции растений.

### ПОЛОВАЯ РЕПРОДУКЦИЯ

Половая репродукция лежит в основе размножения хвойных также, как и значительного большинства эукариот. Несмотря на разную продолжительность генеративного цикла у видов хвойных, развитие репродуктивных структур у данного класса растений идет однообразно на морфологическом уровне (Singh, 1978). В год, предшествующий опылению, происходит заложение флоральных меристем. Весной следующего года идут процессы микро- и мегаспорогенеза, формирование га-

метофитов, затем оплодотворение и эмбриогенез, завершающийся развитием зрелых семян. У *Pinus* от опыления до оплодотворения проходит 1 год, у *Abies*, *Larix*, *Picea* 30–40 дней (Третьякова, 1990). Ход эмбрионального развития обусловлен видовой спецификой, внутренними свойствами организма (физиолого-биохимическими и молекулярно-генетическими), а также находится под влиянием внешней среды. Кульминационными моментами в процессе развития генеративных структур у хвойных, также как у других растений, являются процессы опыления и оплодотворения. Опыление стимулирует развитие семязпочки, а процесс сингамии – развитие зародыша. У хвойных в период опыления гаплоидные клетки мужского гаметофита вступают в контакт с тканями диплоидного спорофита – нуцеллуса. Однако в этот период женский и мужской гаметофиты у большинства хвойных, относящихся к представителям *Abies*, *Larix*, *Picea* и *Pinus* развиваются автономно. В их семязпочках может происходить мегаспорогенез и даже начальные этапы развития женского гаметофита (Третьякова, 1990). Успешное дальнейшее развитие многоядерного женского гаметофита у данных видов наблюдается только при прорастании пыльцы в ткань нуцеллуса. Тесная связь между опылением семязпочек и развитием женского гаметофита отмечена у *Pinus sylvestris*. У представителей данного вида процесс мегаспорогенеза и развития женского гаметофита происходит только после опыления семязпочек первого года развития (через 7–10 дней после опыления). В семязпочках, в которых прорастание пыльцы не идет, женский гаметофит не развивается, и семязпочки деградируют (Третьякова, 1990). Выявлено, что в неопыленных семязпочках сосны обыкновенной разрастаются клетки тапетума, прилегающие к мегаспоре. Разрастающийся тапетум сдавливает мегаспороцит, что приводит к его гибели (Sarvas, 1962). Р. Сарвас (Sarvas, 1962) не исключал возможность конкуренции пыльцевых трубок при прорастании их в ткань нуцеллуса. Любое несоответствие в ритмах и фазах развития мужских и женских генеративных структур приводит к сбою и возможной остановке эмбрионального развития. Следовательно, микро- и мегагаметофиты должны распознавать друг друга, а это не всегда происходит в случае межвидовой гибридизации. Именно в эти периоды проявляются процессы несовместимости, наблюдаемые при контролируемом опылении и особенно межвидовой гибридизации у хвойных (Sarvas, 1962; Tret'yakova, Lukina, 2017). Спорофитная ткань нуцеллуса длительное время разделяет мужской и женский гаметофиты: у *Abies*, *Larix*, *Picea* около 40 дней, у *Pinus* – около года, т.е. тесного контакта между гаметофитами за этот период не происходит. Только в период созревания архегониев (за 7–10 дней до

оплодотворения) происходит вторичный рост пыльцевых трубок и оплодотворение яйцеклеток.

Зиготический эмбриогенез хвойных может быть разделен на три основные фазы: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез (Singh, 1978). Проэмбриогенез (proembryogeny) включает все стадии развития проэмбрио до удлинения суспензора, ранний эмбриогенез – включает стадии после удлинения суспензора и до заложения меристемы корня, поздний эмбриогенез – начинается от заложения меристем корня и побега и включает все последующие события до формирования зрелого зародыша с хорошо развитыми семядолями (Singh, 1978).

У хвойных растений возможны множественные пути реализации их репродуктивного потенциала: полиархегиональность, полиэмбриония и кливаж, а также асексуальное возникновение зародыша. У видов семейства Pinaceae образуется от двух до четырех архегониев, в которых развиваются зрелые яйцеклетки. Оплодотворение всех яйцеклеток в пределах семязачатка приводит к возникновению простой (simple) или архегониальной (archegonial) полиэмбрионии (Singh, 1978). Наряду с простой полиэмбрионией у видов Pinaceae и особенно рода *Pinus*, характерно проявление кливажной полиэмбрионии (Buchholz, Dogra, 1967). Кливажная полиэмбриония (cleavage polyembryony) – это регулярный и организованный феномен. В результате кливажа в коррозийной полости мегагаметофита происходит расщепление инициалей каждого эмбрио на четыре самостоятельные идентичные единицы (четыре зародыша). Таким образом, в результате простой и кливажной полиэмбрионии у видов семейства Pinaceae в одном мегагаметофите может развиваться до 16 зародышей, полученных от разных опылителей (Третьякова, 1990).

На любом этапе репродуктивного цикла хвойных могут произойти нарушения в эмбриональном процессе. Прежде всего, к нарушению половой репродукции и развитию стерильности приводит отсутствие опыления семязпочек или опыление их нежизнеспособной пылью. К развитию стерильности пыльцы приводят, как правило, засуха в период заложения флоральных меристем, продолжительные теплые осени и оттепели в зимний период, заморозки при прохождении мейоза и дождливая погода в период лета пыльцы (Noskova et al., 2009). Кроме того, встречаются отдельные деревья, которые продуцируют стерильную пыльцу или имеют нарушения в процессе мегаспорогенеза, в результате которого женский гаметофит не развивается (Третьякова, 1990). Деградиационные процессы часто развиваются в семязпочках второго года у *Pinus sylvestris*, в период, когда тесного взаимодействия между гаметофитами нет. Однако именно в этот период происходит образо-

вание клеточного мегагаметофита и архегониев и стремительное увеличение размеров женского гаметофита (в 6–7 раз) (Третьякова, 1990). Такая интенсификация роста сопровождается усилением обменных процессов в семяпочке и зародышевом мешке, в первую очередь трофических и гормональных (Минина, Ларионова, 1989). Вероятно, при такой напряженности ростовых и физиологических процессов в мегагаметофите воздействие неблагоприятных факторов среды могут привести к ослабленности женского гаметофита и развитию пустых семян (Третьякова, 1990). Особенно ярко деградиционные процессы проявляются в пред-сингамный период, когда нарушается синхронность развития гаметофитов. Развитие женского гаметофита может остановиться на стадии свободнойядерного гаметофита или вакуолизованных архегониев. Мегагаметофит разрушается и формируются пустые семена (Третьякова, 1990). Такое явление наблюдалось у уникальных деревьев *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом (Третьякова, 1990; Tretyakova, Lukina, 2016) и межвидовой гибридизации *P. sibirica* × *P. armandii*, *P. parviflora*, *P. strobus*, *P. wallichiana*, *P. hokkaidens*, *P. cembra* (Tretyakova, Lukina, 2016).

Согласно Koski (1973), пустые семена у *Pinus sylvestris* и *Picea abies* могут служить индикатором проявления летальных аллелей, действующих на стадии эмбриогенеза. Пустые семена могут быть своеобразным свидетельством наличия генетического груза при перекрестном опылении и особенно самоопылении. При самоопылении оплодотворение обычно происходит (Org-Owing, 1957; Sarvas, 1962; Hagman, Mikkola, 1963; Koski, 1973; Tretyakova et al., 2014). Однако развитие прекращается в период формирования инбридинговых зародышей, что и приводит к пустосемянности. У хвойных нет механизма, который бы ингибировал самооплодотворение (Koski, 1973). Не опровергая мнения указанных выше авторов о возможности проявления пустосемянности у хвойных, следует отметить, что деструктивные процессы, ведущие к развитию пустых семян происходят раньше (до появления архегониев). К моменту оплодотворения клетки мегагаметофита оказываются уже сформированными, физиологически активными и не имеют никаких признаков деградации. В данном случае развиваются семена без зародыша. Последовательность процессов развития такой категории семян можно проследить на примере развития генеративных структур особей у *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития (Третьякова, 1990). У данных особей зародышевый канал формируется при отсутствии зародыша. Клетки мегагаметофита сохраняют свою активность, а образование зародышевого канала детерминировано и происходит в период созревания яйцеклетки. Принято считать, что образование коррозионной полости в мегагаметофите происходит в результате продви-

жения эмбрио в зародышевом канале. Эмбрио питается за счет клеток центральной части мегагаметофита, и таким образом формируется зародышевый канал (Singh, 1978). Отсутствие эмбрио и сформированный зародышевый канал в семяпочках *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития позволяют по-новому оценить характер взаимоотношений между мегагаметофитом и зародышем при эмбриогенезе (Tretyakova, 1992). Вероятно, у *Pinus* действие летальных аллелей, ведущее к пустосемянности, проявляется на более ранних этапах, до сингамии. Нарушения, возникающие в период оплодотворения и эмбриогенеза, как правило, ведут к развитию семян без зародыша, но и не исключено развитие только покровов семян.

На основании цитоэмбриологического анализа *Pinus sibirica*, можно предположить, что категория стерильности семян зависит от стадии дегенерации женского гаметофита (Третьякова, 1990). Остановка развития эмбриональных структур в семяпочке приведет к нарушению полового процесса и возникновению бесполого воспроизведения – апомиксиса.

#### АПОМИКСИС ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

В качестве адаптации к воздействию неблагоприятных факторов среды и для сохранения фертильности у многих видов цветковых растений (более 400 видов, относящихся к 40 семействам) в ходе эволюции возникли различные типы бесполого воспроизведения (Батыгина, 1999; von Arnold et al., 2002; Brukhin, 2017a, 2017b). Одним из них и следует считать апомиксис. В широком смысле к апомиксису относят и вегетативное размножение (вивипарию), в узком – агамоспермию – образование семян с зародышем при отсутствии оплодотворения (Winkler, 1934). Таким образом, апомиксис можно разделить на два типа “агамоспермию” и “вегетативный апомиксис” (Stebbins, 1941; Gustafsson, 1947; Grant, 1981). К типу агамоспермии относят и спорофитную – адвентивную эмбрионию (нуцеллярную и интегументальную, Naumova, 1993). По мнению Т.Б. Батыгиной (Batygina, 2012), соматические зародыши, образующиеся при “адвентивной эмбрионии”, нельзя рассматривать как варианты апомиксиса (“семенного апомиксиса”, по Nogler, 1984). Эти зародыши имеют разный механизм развития (гомофазная и гетерофазная репродукция соответственно).

Многообразие и недостаточная изученность типов апомиксиса привели к путанице терминологии (Хохлов, 1967; Поддубная-Арнольди, 1976; Петров, 1979; Батыгина, 2000).

Одни ученые определяют апомиксис так же широко, как Winkler (Fagerlind, 1940; Gustafsson, 1947; Петров, 1979), другие относят к апомиксису только агамоспермию – размножение посред-

ством семян с зародышем, возникшим без оплодотворения (Asker, 1981; Поддубная-Арнольди, 1976; Хохлов, 1967) или только гаметофитный апомиксис, исключая адвентивную эмбрионию (Battaglia, 1963; Batygina, 2012).

Ряд авторов предлагают использовать равнозначно термины апомиксис и агамоспермию, разделяя последнюю на гаметофитный апомиксис и адвентивную эмбрионию (Asker, 1981; Grant, 1981; Nogler, 1994; Batygina, 2012).

Выделение типов апомиксиса проводилась такими учеными, как Winkler, (1934), Gustafsson (1947), Maheshwari (1950), Bataglia (1963), Хохлов (1967), Поддубная-Арнольди (1976), Петров (1979), Naumova (1993), Батыгина (2000) и др.

Оригинальная классификация типов апомиксиса была разработана С.С. Хохловым (1967). Автор считал апомиксис результатом изменений, происходящих на разных этапах полового процесса. Все случаи таких нарушений, приводящих к апомиксису, он относит к четырем следующим типам:

1. Аспория – отсутствие (выпадение) спорогенеза, как следствие нарушения мейоза. Зародышевый мешок развивается из археспория с редуцированным числом хромосом;

2. Апоархеспория – отсутствие археспорогенеза и спорогенеза. Зародышевой мешок развивается из вегетативных клеток нуцеллуса с редуцированным числом хромосом;

3. Апозиготия – отсутствие оплодотворения, зародышевой мешок развивается из неоплодотворенной яйцеклетки (редуцированный партеногенез);

4. Апогаметия – зародышевый мешок развивается не из яйцеклетки, а из синергид или антипод (редуцированный партеногенез).

Таким образом, зародыш может образовываться из самых разнообразных клеток и тканей. По мнению Петрова (1988), апомиксис можно рассматривать, как бесполое размножение, к которому относятся формы, сохраняющие связь с образованием семян. Агамосперное растение производит семена, в которых зародыши развиваются исключительно бесполом путем.

С.С. Хохлов (1970а, 1970б) рассматривал распространенность апомиксиса в связи с основным эволюционным трендом растений – уменьшение роли гаметофита и повышение роли спорофита. По его мнению, происходит последовательное упрощение эмбриогенеза и роли гаметофита, между тем как развитие спорофита усиливается. Гаплоидная фаза как бы постепенно вытесняется диплоидной. Если у мхов гаплоидное поколение доминирует, то у папоротников спорофит (бесполое поколение) является доминирующей фазой в жизненном цикле. Гаметофит у папоротников развивается внут-

ри спорофита: происходит образование антеридиев и архегониев, осуществляется оплодотворение (Takhtajan, 1997). У голосеменных гаметофит, находясь в очень редуцированном состоянии, развивается в полной зависимости от спорофита. В то же время эндосперм (мегагаметофит), являющийся составной частью гаметофита голосеменных, остается жизнеспособным и сохраняется после оплодотворения, питая развивающееся новое поколение спорофита. На самой высшей ступени эволюции у покрытосеменных триплоидный эндосперм возникает в результате акта оплодотворения. Основные его функции ограничиваются участием в репродуктивных процессах (Хохлов, 1949а, 1949б).

По мнению С.С. Хохлова, независимое появление апомиктов в разных филогенетических группах, фенотипическая пластичность заставляют признать за ними эволюционную перспективность. (Хохлов, 1949а, 1949б). Термин апомиксис понимается в широком и узком значении бесполого воспроизведения, как синоним агамоспермии или бесполосемянности. В широком смысле – подразумевается распространение его на все вторично-бесполье формы воспроизведения (Хохлов, 1967). Кроме того, имеется мнение, что апомиксис у таксонов эволюционизировал независимо от половых предковых форм (Hand et al., 2015). Апомиксис рассматривается, как вариация полового размножения, при котором определенные этапы полового развития утрачены, изменены и десинхронизированы (Cossniklaus et al., 2003).

Бесполое размножение хорошо продемонстрировано у цитрусовых (*Citrus*) (Naumova, 1993). У последних из клеток нуцеллуса и интегумента могут массово развиваться соматические зародыши (до 80 и более) (Ranganath, 2004). Вероятно, в нуцеллярной ткани сосредоточены тотипотентные клетки, обеспечивающие образование потомства. Таким образом, в пределах семязачки любая соматическая клетка может привести к бесполому воспроизведению и дать начало новому организму. Отсюда возник термин “бесполое семенное размножение”, как синоним апомиксиса (Минина, Ларионова, 1979). Однако, если размножение бесполое, то, следовательно, допустимо его принимать как вегетативное. Об этом свидетельствуют факты образования зародыша из соматической ткани, какой, например, является ткань нуцеллуса цитрусовых или в процессе соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Согласно концепции Nogler (1994), к апомиксису можно отнести не только интегументальную эмбрионию, но и монозиготическую кливажную эмбрионию (образование однойяйцевых близнецов – двойней, тройней и т.д., из соматических клеток полового зародыша). Т.Н. Наумова также рассматривала адвентивную эмбрионию в каче-

стве формы апомиксиса, но исключала из него кливажную полиэмбрионию (Naumova, 1993).

При изучении механизма перехода растений на путь апомиксиса привлекаются молекулярно-генетические исследования. Выявлены гены и локусы, влияющие на мегаспорогенез, мегагаметогенез, эмбриогенез и партеногенез в результате экспрессии которых происходит изменения в половом процессе и индукция апомиксиса (Brukhin, 2017a, 2017b).

Таким образом, в литературе нет единого мнения о понятии апомиксиса у растений. Большинство авторов используют термин апомиксис в узком смысле (гаметофитный апомиксис) или несколько шире (гаметофитный апомиксис + адвентивная (нуцеллярная и интегументальная) полиэмбриония).

Т.Б. Батыгиной в качестве новой категории вегетативного размножения растений было введено понятие “эмбриоидогения”. Это один из типов гомофазной репродукции цветковых растений *ex situ*, *in vivo* и *in vitro*. Элементарной структурной единицей является эмбриоид – новый индивидуум, формирующийся в семени или на вегетативных органах асексуально. Эмбриоид имеет биполярную организацию с апексами побега и корня и новой полярной осью, так же, как у полового зародыша. Для эмбриоида, как и для зародыша, характерно образование собственной оси, соединяющей полярно формирующиеся апексы побега и корня. Как правило, он не имеет общей аваскулярной системы с материнским организмом (закрытый радикулярный полюс) (Батыгина, 2000). При выделении эмбриоидогении в особый тип репродукции и размножения использовались два критерия: онтогенетический и морфологический. Кроме того, в зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении, были выделены две основные формы “эмбриоидогении”: репродуктивная, или флоральная (образование проэмбрио в цветке и семени), и вегетативная (формирование адвентивных зародышей на листьях, побегах и корнях) (Батыгина, Васильева, 2002; Митрофанова, 2009). При гаметофитном апомиксисе и адвентивной эмбрионии, а также монозиготической кливажной эмбрионии (Maheschwari, 1950) происходит клонирование материнского организма и образование матроклинного потомства (Brukhin, 2017a, 2017b). Этот феномен, как будет показано далее, четко проявляется в культуре *in vitro*.

#### ВОЗМОЖНОСТЬ АПОМИКСИСА У ХВОЙНЫХ

Признаки проявления апомиксиса были обнаружены у голосеменных растений. Эти признаки связаны с нарушением полового процесса (Минина, Ларионова, 1979). Образование семян с зародышем без оплодотворения было обнаружено у

*Pinus pinaster* (Saxton, 1909), *Pinus nigra*, *Pinus wallichiana* (Mehra, Dogra, 1975), *Pseugotsuga menziesii* (Orr-Ewing, 1957). В семязачатках *Pinus pinaster* ядро яйцеклетки начинает делиться раньше, чем ядро спермия достигнет архегония (Saxton, 1909). Явление, близкое к апомиксису, было обнаружено у *Abies pindrow*, у которой происходило слияние ядра брюшной канальцевой клетки с ядром яйцеклетки (Dogra, 1966).

Курдиани (2014) обнаружил довольно распространенное явление – образование семян с зародышем без оплодотворения у лиственных и хвойных древесных видов. Этот феномен был назван им “партеноспермия”. Описанные явления встречались у *Pinus elliottii*, *Pinus taeda*, *Pinus paluster*, *Pinus virginiana*, *Pinus echinata*, произрастающих на северных участках штата Северная Каролина (McLemore, 1975), и *Pinus sibirica* и *Pinus sylvestris* в Сибири (Третьякова, 1990). Образование семян с зародышами в условиях, исключающих оплодотворение, было отмечено у *Pseugotsuga menziesii* при изоляции женских шишек. (Orr-Ewing, 1957). Для *Pseugotsuga menziesii* характерна ярко выраженная самостерильность и тенденция к агамоспермии (апомиксису). Имеются данные об образовании семян с зародышем в отсутствии мужских шишек у растений класса цикадовых, гинкго, пихты бальзамической (Hutchinson, 1915; Chamberlain, 1935).

Необычная форма апомиксиса была обнаружена у *Cupressus dupreziana* в Северной Африке (Pichot et al., 2008). Этот реликтовый кипарис насчитывал всего 231 дерево. При опылении *C. dupreziana* пыльцой *C. sempervirens* гибридные зародыши оказались диплоидными. Измерение содержания ДНК в пыльцевых зернах обоих видов показало, что пыльца *C. dupreziana* была диплоидной, в то время как пыльца *C. sempervirens* гаплоидной. В диплоидном потомстве *C. dupreziana* были выявлены только отцовские варианты. Эти данные были подтверждены анализом ДНК. Авторы заключили, что в данном случае имеет место уникальное явление “мужской апомиксис”. При опылении *C. dupreziana* пыльцой *C. sempervirens* были получены гаплоидные растения. Это позволило Пихоту с коллегами сделать вывод об отсутствии функциональных яйцеклеток у материнских деревьев *C. dupreziana*. На основании генетического анализа было сделано заключение об андрогенном бесполом типе размножения *C. dupreziana*. Данные Пихота с соавторами (Pichot et al., 2008) показывают, что апомиксис препятствует инбридингу и способствует выживанию кипариса. Не исключено, что апомиксис обнаруженный у данного вида может наблюдаться и у других видов хвойных.

Е.Г. Минина высказала предположение о том, что возникновение апомиксиса у хвойных может происходить при нарушениях в процессе нормаль-

ного семеношения дерева, особенно часто наблюдаемого у гетерозисных форм (Минина, Ларионова, 1979). Такие формы деревьев у *Pinus sibirica* редки, но систематически встречаются в Западном Саяне. Женские шишки и семена их развиваются по однолетнему циклу (вместо двулетнего) и характеризуются высоким физиолого-биохимическим потенциалом вегетативных и генеративных органов, что проявляется в повышении углеводного, аминокислотного и гормонального обмена. Цитоэмбриологические исследования особей сосны сибирской с однолетним репродуктивным циклом показали, что формирование начальных этапов формирования гаметофитов у данных особей шло также как у типичных особей. Однако через один месяц после опыления у аномальных особей резко возросла активность женского гаметофита, через 2 мес. появились архегонии и формировались яйцеклетки. Однако оплодотворение яйцеклетки не происходило из-за отсутствия вторичного роста пыльцевых трубок или их медленного роста по направлению к архегониям. В этот период наблюдалось деление ядра яйцеклетки (Третьякова, 1990). Иногда шло образование проэмбрио, но зародыши у особей *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом не образовывались. Признаки апомиксиса были обнаружены и при нарушении семеношения дерева у *Pinus sylvestris*, произрастающей в условиях экологического стресса (Третьякова, 1990). Деление в неоплодотворенных яйцеклетках сосны сибирской заслуживает особого внимания. Это явление говорит о возможности проявления начального этапа одного из разновидностей апомиксиса — партеногенеза. В данном случае проявляется гиногенез, при котором мужские гаметы приближаются к яйцеклетке, возможно, активируют ее морфогенез, но в дальнейшем развитии не участвуют. Следовательно, в семяпочках *Pinus sibirica* с однолетним циклом развития партеногенетическое развитие не реализуется. Согласно терминологии Т.Б. Батыгиной (2000), у таких особей происходит abortивный партеногенез.

По мнению Хохлова (1967, 1970а, 1970б) и Е.Г. Мининой и Н.А. Ларионовой (1979) апомиксис свойственен эволюционно продвинутым таксонам. Мы предполагаем, что деление неоплодотворенной яйцеклетки и значительное ускорение репродуктивного цикла у описанных выше форм *Pinus sibirica* являются признаками, свидетельствующими о эволюционной продвинутой кедров — акселератов (Tret'yakova, Lukina, 2017). В пользу последнего предположения свидетельствует ряд отличий в прохождении эмбрионального цикла у *Pinus sibirica*, связанных с акселерацией развития генеративных структур у данного вида по сравнению с другими соснами. Первое из них проявляется в период формирования женского гаметофита при опылении семяпочек. В пе-

риод опыления женский гаметофит у сосны сибирской находится в свободной стадии развития, в то время как у других сосен ценоцитная стадия формирующегося женского гаметофита осуществляется только после опыления (Третьякова, 1990). Обычно по такому же пути идет развитие семяпочек у хвойных с однолетним циклом генеративного развития (*Larix, Picea, Abies*). Второе отличие эмбрионального развития связано с акселерацией развития мужского гаметофита. Мужской гаметофит сосны сибирской в год опыления развивается до трехклеточной структуры, т.е. проходит четвертый митоз из пяти, в то время как у других видов сосен развитие мужского гаметофита идет только до двухклеточной структуры (четвертый и пятый митоз идут в семяпочках второго года развития). Таким образом, семяпочки *Pinus sibirica* отличаются признаками продвинутости среди сосен. Об этом же свидетельствует и появление форм-акселератов у сосны сибирской, у которой наблюдается прохождение эмбрионального цикла за один вегетационный период, вместо двух и, наконец, факты деления ядра яйцеклетки, свидетельствующие о том, что семяпочки *Pinus sibirica* могут развиваться по пути апомиксиса, на что указывали Е.Г. Минина и Н.А. Ларионова (1979). В целом, аномальные формы сосны сибирской с ускоренным циклом развития являются ценным материалом для биологических и селекционно-генетических исследований. Появление форм с однолетним репродуктивным циклом развития у *Pinus sibirica* представляют большой интерес для изучения эволюции хвойных.

Как указывалось выше, для эмбриогенеза видов хвойных характерно наличие полиэмбрионии. При этом особого внимания заслуживает кливажная полиэмбриония. Типы кливажной полиэмбрионии у голосеменных были описаны Х. Сингом (Singh, 1978), и нами у представителей семейства Pinaceae (Tret'yakova, Park, 2018). Согласно Ноглер (Nogler, 1984, 1994), у растений имеет место проявление монозиготической кливажной полиэмбрионии, которую он относит к апомиксису. У видов семейства Pinaceae один зиготический зародыш в результате кливажа расщепляется на четыре самостоятельных идентичных эмбриона. Возникновение таких зародышей происходит уже не половым путем. Следовательно, у голосеменных растений зародыши могут формироваться не только половым способом (амфимиксисом), но и бесполом (апомиксисом). Кливажная полиэмбриония у видов семейства Pinaceae успешно воспроизводится *in vitro*.

В литературе приводится описание опытов по индукции апомиксиса, как у покрытосеменных, так и голосеменных растений. При этом, кроме генетических способов, получивших широкое распространение (Петров, 1979), активно используются физиологические приемы с приме-

нением регуляторов роста. Обработка растворами гибберелловой кислоты сосны ладанной (*Pinus taeda*) и сосны румелийской (*P. peuce*) вызывало разрастание женских шишек, но семена в них не образовывались (Stuard, Gathe, 1961). При обработке дуглассии растворами индолмасляной кислоты и гибберелловой кислоты происходило образование вполне развитых семян с зародышами (Stuard, Gathe, 1961). Под действием стимулирующих веществ у *Pinus pinaster* (Saxton, 1909), *Abies pindrow* (Dogra, 1966) и *Pseudotsuga menziessi* (Org-Ewing, 1957) образуются семена с зародышами без оплодотворения. Приведенные выше примеры деления неоплодотворенной яйцеклетки у *Pinus sibirica* (Третьякова, 1990), можно рассматривать в качестве предпосылки для появления бесполого размножения у голосеменных.

Для преодоления стерильности семян и выращивания недоразвитых зародышей наиболее перспективным является использование новых биотехнологий, направленных на культивирование мегагаметофитов и изолированных зародышей. Важным этапом в образования растений в культуре *in vitro* является определение факторов, вызывающих активацию мегагаметофитов и развития зародышей у разных форм сосны сибирской и особенно аномальных семяпочек с однолетним циклом развития женских шишек.

Методы активации мегагаметофитов и партеногенетического развития зародыша в настоящее время разработаны только для покрытосеменных растений (Кашин и др., 2000, 2006). При этом было показано, что активация семяпочек у неоплодотворенных завязей *in vitro* представителей семейства Asteraceae происходит при смещении баланса фитогормонов в сторону цитокининов. Ранний эмбриогенез осуществляется при смещении баланса гормонов в сторону ауксинов.

Культивирование мегагаметофитов *Pinus sibirica*, в том числе и с однолетним циклом развития, проведенное на стадии развития вакуолизованных архегониев показало, что эмбриональные процессы продолжались. У 10% эксплантов осуществлялось деление яйцеклетки, и шли этапы формирования проэмбрио. Однако дальнейшее развитие останавливалось (Tret'yakova, Novoselova, 2002). При этом были получены эмбриогенные клеточные культуры, способные к самоподдержанию и продуцированию эмбриоидов, из мегагаметофитов. Проведенные исследования по культивированию мегагаметофитов позволили нам подойти к проблемам размножения уникальных особей кедров сибирского с однолетним циклом развития.

### СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

Особым типом репродукции у растений является соматический эмбриогенез, который наиболее

ярко проявляется в культуре *in vitro*. Соматический эмбриогенез – асексуальный способ размножения, при котором формирование зародыша происходит из соматической клетки растения (von Aderkas, Bonga, 1988; von Aderkas et al., 1990; Lelu et al., 1994; Klimaszewska, Cyr, 2002; von Arnold et al., 2002). Это уникальное явление бесполой репродукции, открытое в 1985 г. у *Picea abies* (Hakman et al., 1985; Chalupa, 1985), можно отнести к одной из разновидностей апомиксиса (вегетативного апомиксиса), т.к. зародыши возникают из соматических клеток, а развитие их идет по типу зиготических (половых) зародышей. Соматический зародыш, или эмбриоид (по Т.Б. Батыгиной, 2000), – зачаток нового организма, образующийся асексуально, имеющий биполярную структуру с апексом побега и корня и новой полярной осью, как у полового зародыша. В результате формируются полноценные растения, идентичные родительскому экземпляру (Tret'yakova et al., 2016). Деревья *Larix*, полученные через технологию соматического эмбриогенеза, в течение 8 лет успешно растут в почве лесопитомника (Tret'yakova, Park, 2018).

Феномен соматического эмбриогенеза основан на тотипотентности растительных клеток – любые соматические клетки, могут сохранять или приобретать эмбриогенную компетентность (Feher et al., 2003). Соматический эмбриогенез был индуцирован у 45 видов голосеменных растений, включая пять родов *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga menzesii* (Becwar et al., 1990; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla, Yeung, 2003; Park et al., 2006; Klimaszewska et al., 2009; Tret'yakova, Barsukova, 2012; Lelu-Walter et al., 2013; Tret'yakova, Shuvaev, 2016 и др.). Эксплантами могут быть зиготические зародыши незрелых семян, семядоли прорастающих семян (Lelu et al., 1994), а также однолетние побеги (Malabadi, van Staden, 2005) и незрелые микроспоры (андроклинные культуры) (Tret'yakova et al., 2006).

Выделяют два пути соматического эмбриогенеза. Первый путь – прямой соматический эмбриогенез, когда зародыши образуются непосредственно из клеток эксплантата без этапа каллусообразования. В этом случае соматические зародыши формируются из соматических клеток эксплантата (Tret'yakova, Park, 2018). Второй – непрямой, или косвенный, эмбриогенез, когда пролиферация каллуса является необходимым этапом. В непрямом соматическом эмбриогенезе задействованы “индуцированные эмбриогенные детерминированные клетки”. Наряду с первичным соматическим эмбриогенезом происходит вторичный эмбриогенез, когда на поверхности сформировавшихся соматических зародышей образуются добавочные эмбриоиды (Митрофанова, 2009).

Экспериментальным путем было показано, что индукция и реализация соматического эм-

бриогенеза у хвойных – процесс многоступенчатый, включающий применение разнообразных химических соединений, в том числе и гормональных.

Он включает:

- индукцию эмбрионных культур – формирование эмбрионально-суспензорной массы;
- пролиферацию эмбрионально-суспензорной массы и мультипликацию соматических зародышей;
- созревание соматических зародышей;
- прорастание соматических зародышей;
- формирование растений-регенерантов.

Все эти фазы характеризуются определенными молекулярными событиями (Klimaszewska et al., 1997; Mac-Kay et al., 2006; Trontin et al., 2015; Zang et al., 2019). Первая фаза (фаза индукции) соматического эмбриогенеза характеризуется проявлением у дифференцированных соматических клеток эмбрионной компетентности как прямой (без дедифференциации клеток), так и непрямой, через каллусообразование. Можно представить себе и третий путь соматического эмбриогенеза – комбинированный, когда образование соматических зародышей происходит непосредственно из соматических клеток (прямой путь) и образуется эмбрионный каллус с дальнейшей мультипликацией соматических зародышей в течение длительного периода времени (десятки лет).

Индукция клеточной компетентности к соматическому эмбриогенезу идет под влиянием сигналов – гормонов (ауксины, цитокинины), факторов стресса (осмотический, оксидазный и водный стрессы), ионы тяжелых металлов, рН, температуры, света, механических или химических повреждений и др. (Ikeda-Iwai et al., 2003). Любой стресс может вызвать реорганизацию хроматина и изменение экспрессии генов, а также изменение клеточного метаболизма и физиологических процессов и вызвать переход соматической клетки на эмбрионный путь развития (Feher et al., 2003). Имеются данные об изменении паттерна метилирования ДНК в процессе соматического эмбриогенеза (Morcillo et al., 2008; Duarte-Ake et al., 2016).

Разными исследователями были предложены следующие механизмы формирования соматических зародышей:

- формирование соматических зародышей в результате асимметричного деления отдельных клеток экспланта (von Arnold et al., 2002; Belorussova, Tret'yakova, 2008);
- кливажная полиэмбриония (von Aderkas et al., 1991; Stasolla, Yeung, 2003; Tret'yakova, Park, 2018).

В основе соматического эмбриогенеза, также, как и зиготического, лежит полярность и асим-

метричное деление. Апикально-базальная полярность оси проявляется уже в яйцеклетке и зиготе, которая сохраняется при дальнейшем развитии зародыша (Pullman, Webb, 1994; von Arnold et al., 2002). Первое деление зиготы асимметрично и приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая дает начало зародышу и большой базальной клетке, дающей начало клетке-трубки и суспензору, при этом полярность, заложенная в зиготе, в результате ее деления, поддерживается и передается дочерним клеткам. При индукции соматического эмбриогенеза происходит вытягивание клеток под действием ауксинов в питательной среде. Вытянутые клетки поляризуются и асимметрично делятся. Эти признаки, по-видимому, и являются основными морфологическими критериями, указывающими на переход соматических клеток на путь соматического эмбриогенеза (Tret'yakova, 2013; Tret'yakova, Park, 2018). В результате асимметричного деления на одном из полюсов вытянутой клетки образуется маленькая клетка, из которой будет формироваться и длинная вытянутая клетка суспензора (von Aderkas et al., 1991; Filonova et al., 2002; Tret'yakova, Park, 2018).

У голосеменных растений, особенно из семейства Pinaceae, ярко выражен феномен кливажной полиэмбрионии *in vivo*, в результате которого эмбриональные инициалы зиготического зародыша, полученные от одной оплодотворенной яйцеклетки, распадаются на четыре идентичные эмбриональные единицы, каждая из которых дает начало четырем зародышам-близнецам (Третьякова, 1990). Кроме того, наличие в мегагаметофите нескольких архегониев (как правило, 2–4) и развитие нескольких зигот, в том числе от разных мужских гамет, приводит к дополнительному образованию зародышей, которые также активно кливажируют (Buchholz, 1933). У *Pinus sibirica* в зародышевом канале одного мегагаметофита (одной семечки) может развиваться 12–16 зародышей (Третьякова, 1990). Не исключено, что в растительных клетках видов Pinaceae архивировано наличие кливажа, который может реализовываться у соматических зародышей в культуре *in vitro* под действием гормонов.

Кливажная полиэмбриония – наиболее загадочный феномен соматических зародышей. Этот процесс протекает в течение всей жизни эмбрионной культуры. Так, например, в полученных нами пролиферирующих эмбрионных культурах *Larix sibirica* в течение десяти лет идет активная мультипликация соматических зародышей через кливаж (Tret'yakova, Park, 2018), которые при переводе на среду с АБК созревают и образуют регенеранты. Соматический полиэмбриогенез у *Larix sibirica*, также как у других хвойных, можно рассматривать как повторяющийся кливажный процесс (receptive cleavage process),

заложенный в зиготе (Gupta, Dursan, 1987). Реализация этого процесса активно происходит у лиственницы сибирской в культуре *in vitro* на стадии глобулы, где создаются оптимальные условия для кливажирования.

Как указывалось выше, к апомиксису относят и монозиготическую кливажную эмбрионию (образование однойцевых близнецов – двойней, тройней и т.д.) (Nogler, 1986, 1994). В отличие от цветковых растений, где кливажая полиэмбриония, как правило, встречается спорадически, в виде отклонений, у хвойных растений кливаж зародыша – естественный (закономерный) процесс, связанный с особенностью их размножения, и проявление его в культуре *in vitro* при соматическом эмбриогенезе закономерно. Активную кливажную полиэмбрионию у *Larix* на стадии развития глобулярного зародыша, вероятно, можно связать с компетентностью его клеток к различным воздействиям, в частности ауксинам. Импульс в виде притока ауксина в зародыш из питательной среды приводит к перепрограммированию клеток глобулы и приобретению способности ее к восприятию и транспорту ауксина. Возможное накопление ауксина в глобуле и снижение его в базальной части, создает градиент полярности, в результате которой образуются эмбриональные трубки (суспензор) и в которых, по данным нашего иммуно-гистохимического исследования (Tret'yakova et al., 2019) ауксина накапливается очень мало. Вероятно, разделение глобулы приводит к полному расщеплению суспензора и обособлению эмбрио. Кроме того, массовое размножение соматических зародышей у лиственницы происходит и в результате разобшения эмбриональных трубок суспензора (Stasolla, Yeung, 2003; Tret'yakova, Park, 2018). Разобшение эмбриональных трубок суспензоров в пролиферирующей эмбриональной-суспензорной массе лиственницы сибирской приводит к множественному формированию глобулярных соматических зародышей через асимметричное деление. При этом процесс развития новых соматических зародышей не отличается от описанного нами процесса инициации соматического эмбриогенеза: такие же вытянутые поляризованные клетки (эмбриональные трубки) асимметрично делятся и, формируют эмбриональные глобулы и суспензоры (Tret'yakova, Park, 2018).

Как указывалось выше, Nogler (1986, 1994) относил монозиготическую кливажную полиэмбрионию к разновидности апомиксиса. Кливажную полиэмбрионию, наблюдаемую у зиготических и особенно соматических зародышей хвойных, вероятно также можно отнести к апомиксису. Полиэмбриогенез соматических зародышей через кливаж у лиственницы сибирской в культуре идет уже более десяти лет (Tret'yakova, Park, 2018). Соматические зародыши вызревают на среде с АБК, и прорастают. Клонированные деревья успешно растут уже в

течении 8 лет в почве лесопитомника. Это бесполой тип размножения.

Ранее нами было показано, что размножение соматических зародышей в культуре *in vitro* происходит не только в результате кливажной полиэмбрионии, но и (значительно реже) за счет образования адвентивных почек на суспензоре (Tret'yakova, Park, 2018). Аналогичное почкообразование было описано у *Picea abies* (von Aderkas et al., 1990).

Подобная пролиферативная активность эмбриогенных культур была показана ранее в культуре мегагаметофитов *L. decudua* и культуре зародышей гибридов лиственницы (*Larix × eurolepis* и *Larix × marschlinsii*) (Lelu-Walter, Pâques, 2009), где образование ЭСМ шло в течение 9–17 лет. Таким образом, процесс соматического полиэмбриогенеза хвойных *in vitro* на примере *Larix sibirica* может идти за счет кливажной полиэмбрионии и почкования суспензора. Общность морфогенетических процессов, лежащих в основе развития зиготических и соматических зародышей хвойных видов (Tret'yakova, Park, 2018), подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной (2000) о параллелизме их развития *in vivo* в культуре *in vitro*.

Известно, что соматический эмбриогенез идет под строгим генетическим контролем. Только отдельные деревья-доноры способны формировать эмбриогенный каллус и соматические зародыши в культуре *in vitro* (MacKay et al., 2001, 2006; Tret'yakova et al., 2012). В настоящее время проводятся активные исследования по выяснению молекулярно-генетических механизмов соматического эмбриогенеза не только у покрытосеменных, но и голосеменных растений. Большое внимание уделяется геномике, транскриптомике, протеомике и метаболомике (Trontin et al., 2015). Выявлены ключевые гены, контролирующие соматический эмбриогенез у *Arabidopsis thaliana* – модельного растения в различного рода биологических исследованиях, в том числе и молекулярно-генетических. Несмотря на то, что модель эмбриогенеза у голосеменных растений значительно отличается от модели эмбриогенеза арабидопсиса, большинство генов (78%), контролирующих соматический эмбриогенез у представителей голосеменных растений являются генами-ортологами, кодирующими белки, выполняющие идентичные или сходные функции (Dong, Dunstan, 2000; MacKay et al., 2006; Cairney, Pullman, 2007; Li et al., 2013, 2014, 2016; Zhang et al., 2014; Rupps et al., 2016). Несмотря на многочисленные экспериментальные данные, мы еще далеки от понимания ключевых этапов перехода дифференцированных соматических клеток к тотипотентному и эмбриогенному состоянию. Идентификация генов (*SERK*, *BBM*, *LEC1*, *LEC2*, *LEC3*, *FUS3* и др.), экспрессия которых предположительно ассоциирована с апомиксисом у покрытосеменных растений

(Brukhin, 2017a, 2017b) или переходом соматических клеток в эмбрионное состояние у голосеменных растений *in vitro* (Aquea, Arce-Johnson, 2008; Li et al., 2013, 2014, 2016; Rupps et al., 2016), имеет важное значение для дальнейшего изучения механизма регуляции развития растений и их клонального размножения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У видов класса *Penopsida*, наряду с половой репродукцией, наблюдаются разные типы бесполого размножения (апомиксиса). К ним относятся слияние брюшной канальцевой клетки с яйцеклеткой, нуцелярная эмбриония, гемигамия и андрогенез. Наиболее ярко бесполое размножение у хвойных проявляется при соматическом эмбриогенезе в культуре *in vitro*. Закономерности морфогенеза соматических и половых зародышей у хвойных идут по одной схеме: асимметричное деление клеток, образование глобулярных зародышей и длинных суспензоров, формирование тканей и органов зародыша в процессе созревания глобулярных соматических зародышей. Это подтверждает концепцию Т.Б. Батыгиной (1999, 2000) о параллелизме развития соматических и половых зародышей цветковых растений. Особого внимания заслуживает кливажная полиэмбриония. В естественных условиях у половых зародышей хвойных происходит разделение эмбрио на четыре самостоятельных зародыша. Этот тип бесполого размножения у хвойных реализуется в процессе соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* под действием регуляторов роста. Длительный кливажный процесс при соматическом эмбриогенезе растягивается на долгие годы и способствует активной мультпликации глобулярных зародышей, а затем и клонируемых растений. Клональное воспроизводство растений через соматический эмбриогенез и криоконсервация эмбрионных клеточных линий, идентичных материнскому генотипу, является отличной платформой для лесовозобновления и лесовосстановления. Создание сортовых генетически тестированных плантаций через соматический эмбриогенез уже в течение 20 лет практикуется в Канаде, США и ряде евроейских стран (программа *Multi-Variety Forestry, MVF, Park*, 2014). Идентификация генов, регулирующих ключевые этапы соматического эмбриогенеза, будет способствовать развитию генной инженерии для получения самоконирующих растений с признаками гетерозиса. В качестве примера мы неоднократно приводили уникальные особи *Pinus sibirica* с однолетним репродуктивным циклом. Согласно теории немецкого ученого Ганса Винклера, созданной в начале XX в., к термину “апомиксис” относятся все типы бесполого размножения. Апомиктические зародыши возникают не в результате слияния женских и мужских клеток, а благодаря клонированию материн-

ских тканей. Соматический эмбриогенез у хвойных в культуре *in vitro* является ярким проявлением бесполого типа размножения. Мы предлагаем отнести тип репродукции через соматический эмбриогенез у хвойных к апомиксису — вегетативному апомиксису.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Рецензенту за ценные советы при написании рукописи.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ФГБНУ ИЛ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН (проект № 0356-2019-0024 “Биоразнообразии коренных хвойных и производных лесных экосистем”), а также при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ-Бел а № 18-54-00010 “Молекулярно-генетические маркеры соматического эмбриогенеза у хвойных” и гранта РФФИ и Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки № 19-44-240009 “Регенерационный потенциал эмбрионных культур хвойных *in vitro*, обработанных антимикробными пептидами грибного и растительного происхождения”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в обсуждении результатов анализа имеющихся данных по размножению растений класса *Pinopsida* и подготовку статьи для публикации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиол раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Батыгина Т.Б. Семенное размножение. Амфимиксис и апрмиксис. Часть 3. В кн. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 142–146.
- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб: СПбГУ, 2002. 232 с.

- Кашин А.С., Блюднева Е.А., Седлецкая О.В., Григорьева В.В. Особенности развития мегагамет апомиктических и половых форм *Asteraceae* в культуре неоплодотворенных завязей *in vitro* // Физиол. раст. 2000. Т. 47. № 4. С. 548–554.
- Кашин А.С. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. Саратов: Научная книга, 2006. 309 с.
- Курдиаки С.З. Из биологии плодоношения лесных пород. О партенокарпии и партеноспермии // Сельское хозяйство и лесоводство. 1914. № 1. С. 60–74; № 2. С. 270–291; № 3. С. 455–476.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПбН-Л., 2010. 432 с.
- Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и пол у хвойных. М.: Наука, 1979. 216 с.
- Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения растений // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 496–509.
- Носкова Н.Е., Третьякова И.Н., Муратова Е.Н. Микроспорогенез и формирование пыльцы у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) в условиях современного климата Сибири // Известия РАН. Серия биол. 2009. Т. 3. С. 379–384.
- Петров Д.Ф. Генетически регулируемый апомиксис. Новосибирск: Наука, 1979. 278 с.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 500 с.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных (Физиологические аспекты). Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
- Хохлов С.С. Бесполосеменные растения // Учен. зап. Сарат. Гос. ун-та, 1949а. Вып. 11. С. 5–197.
- Хохлов С.С. Перспективы эволюции высших растений, Саратовский Госпединститут, 1949б.
- Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных растений // Успехи современной генетики. 1967. Вып. 1. С. 43–105.
- Хохлов С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса у покрытосеменных растений. Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970а. С. 105–115.
- Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распределение у покрытосеменных растений. Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970б. С. 7–21.
- Ainsworth C. Sex redefined: The idea of two sexes is simplistic. Biologists now think there is a wider spectrum than that // Nature. 2015. V. 518(7539). P. 288–291.
- Aquea F., Arce-Johnson P. Identification of genes expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata* // Plant Physiology and Biochemistry. 2008. V. 46. P. 559–568.
- Asker S.E. Viewpoints on apomictic and sexual reproduction in angiosperms // Acta Soc. Bot. Polon. 1981. V. 50. № 1–2. P. 195–200.
- Battaglia E. Apomixis // Recent Advances in the Embryology of Angiosperms / Ed. Maheshwari P. Delhi, 1963. P. 221–264.
- Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // Intern. J. Plant Reprod. Biol. 2012. V. 4. № 2. P. 107–120.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. Initiation of embryonic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. Forest. Res. 1990. V. 20. P. 810–817.
- Belorussova A.S., Tretyakova I.N. Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: Embryological aspects // Russ. J. Dev. Biol. 2008. V. 39. № 2. P. 83–91.
- Brukhin V. Is sex irreplaceable? Towards the molecular regulation of apomixis // The International J. Plant Reproductive Biology. 2017a. V. 9(2) Jul. P. 153–169.
- Brukhin V. Molecular and genetic regulation of apomixis // Russian Journal of Genetics. 2017b. V. 53. № 9. P. 943–964.
- Buchholz J.T. Suspensor and early embryo of *Pinus* // Bot. Gaz. 1918. V. 66. № 3. P. 185–228.
- Buchholz L.T. Determinate cleavage polyembryony with special reference to *Darcudium* // Bot. Gaz. 1933. V. 94. P. 579–588.
- Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // Karst. Com. Inst. For. Cech. 1985. V. 14. P. 57.
- Cairney J., Pullman G. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // New Phytologist. 2007. V. 176. P. 511–536.
- Dogra P.D. Observation on *Abies pindrow* with a discussion on the question of occurrence of apomixis in gymnosperms // Silvae Genet. 1966. V. 15. № 1. P. 11–20.
- Dogra P.D. Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in *Pinaceae* // Stockholm: Studia Forestalia Suecica. 1967. V. 45. P. 5–97.
- Dong J.Z., Dunstan D.I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers // Molecular Biology of Woody Plants / Eds. Jain S.N., Minorca S.C. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 2000. P. 51–87.
- Duarte-Aké F., Castillo-Castro E., Pool F.B., Espadas F., Santamaría J.M., Robert M.L., De-la-Peña C. Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process // Plant Cell Reports. 2016. V. 35. № 12. P. 2489–2502.
- Fagerlind F. Die Terminologie der Apomixis Prozesse // Hereditas. 1940. V. 25. № 1. P. 17–22.
- Fehér A., Pasternak T.P., Dutits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2003. V. 74. № 3. P. 201–228.
- Filonova L.H., von Arnold S., Daniel G., Bozhkov O.V. Programmed cell death eliminates all but inembryo in a polyembryonic plant seed // Cell Death and Differentiation. 2002. V. 9. P. 1057–1062.
- Grant V. Plant Speciation. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1981. P. 1–528.
- Grossniklaus U., Moore J.M., Brukhin V. et al., Engineering of apomixis in crop plants: what can we learn from sexual model systems // Plant Biotechnology 2002 & Beyond / Ed. Vasil J.K. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 309–314.
- Gupta P.K., Durzan D.J., Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine // Bio. Technology. 1987. V. 5. P. 147–151.

- Gustafsson A.* Apomixis in higher plants. II. The causal aspects of apomixis // *Lunds Univ. Arsskr. NF Avd. II.* 1947. V. 43. 69 p.
- Hagman M., Mikkola L.* Observations on cross-self and interspecific pollination in *Pinus peuce* Grieseb // *Silvae Genet.* 1963. V. 12. № 3. P. 73–79.
- Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S.* The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // *Plant Sci.* 1985. V. 38. P. 53–59.
- Hand M.L., Vit P., Krahulcová A. et al.* Evolution of apomixes in *Pilapsella* and *Hieracium* (Asteraceae) inferred from the conservation of apomixes – liked markers in natural and experimental populatins // *Heredity* (Edinburgh), 2015. V. 114. № 1. P. 17–26.
- Hutchinson A.H.* Fertilization in *Abies balsamea* // *Bot. Gaz.* 1915. V. 69. P. 457–470.
- Ikeda-Iwai M., Umehara M., Saton S., Kamada H.* Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant J.* 2003. V. 34. P. 107–114.
- Klimaszewska K., Devantier Y., Lachance D., Lelu M.-A., Charest P.J.* *Larix laricina* (tamarack) somatic embryogenesis and genetic transformation // *Can. J. Forest Res.* 1997. V. 27. № 4. P. 96–208.
- Klimaszewska K., Noceda C., Pelletier G., Label P., Rodriguez R., Lelu-Walter M.-A.* Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.) // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2009. V. 45. № 1. P. 20–33.
- Klimaszewska K., Cyr D.R.* Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.* 2002. V. 48. P. 31–39.
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F.* Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. / *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants.* New York: Humana Press, 2016. P. 131–166.
- Koski V.* On self-pollination, genetic load, and subsequent inbreeding in some conifers // *Comm. Inst. For. Fenn.* 1973. V. 78. № 10. P. 1–40.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J.* Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* // *Can. J. For. Res.* V. 1994. 24. № 1. P. 100–106.
- Lelu-Walter M.A., Pâques L.E.* Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*). Perspectives for breeding // *Annals of Forest Science.* 2009. V. 66. № 1. P. 194.
- Lelu-Walter M.A., Thompson D., Harvengt L., Sanchez L., Toribio M., Paques L.* Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction // *Tree Genetics and Genomics.* 2013. V. 9. P. 883–899.
- Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L.* Stage-specific regulation of four HD-ZIPIII transcription factors during polar pattern formation in *Larix letolepis* somatic embryos // *Gene.* 2013. V. 522. P. 177–183.
- Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L.* The post-transcriptional regulation of LaSCL6 by miR 171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kampferi* (Lamb) // *Carr Tree Genetics and Genomics.* 2014. V. 100. № 1. P. 223–229.
- Li S., Li W., Han S., Li W., Xu H., Yang W., Lin Y., Fan Y., Qi I.* Over-expression of mi R166a inhibits cotyledons formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis* // *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 2016. V. 127. № 2. P. 461–473.
- MacKay J., Becwar M., Park Y., Perfetti C., Cordero J., Pullman G., Lockhart L.* Genetics of somatic embryogenesis in loblolly pine // *Proceedings (publ no 48) 26th Southern Forest Tree Improvement Conference.* University of Georgia Athens, 2001. P. 40–47.
- MacKay J., Becwar M., Park V.-S., Cordero J.P., Pullman G.S.* Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // *Tree Genetics & Genomes.* 2006. V. 2. № 1. P. 1–9.
- Maheshwari P.* An Introduction to the Embryology of Angiosperms. N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1950. P. 1–453.
- Malabadi R.B., Van Staden J.* Somatic embryogenesis from vegetative shoots apices of mature trees of *Pinus patula* // *Tree Physiology.* 2005. V. 25. P. 11–16.
- McLemore B.F.* Anomalous growth of unpollinated sort leaf of *Pinus* conelets // *Forest Sci.* V. 1975. 21. № 4. P. 399–400.
- Mehra P.N., Dogra P.D.* Embryogeny of Pinaceae I. Proembryogeny II Proc. // *Indian. Nat. Sci. Acad.* 1975. V. 41. № 5. P. 486–497.
- Merkle S.A., Parrott W.A., Flinn B.S.* Morphogenic aspects of somatic embryogenesis // *In vitro Embryogenesis in Plants.* Dordrecht: Springer. 1995. P. 155–203.
- Morcillo F., Gagneur C., Adam H., Richand F., Singh H., Chean S.C., Rival Y., Duval Y., Tregeur J.W.* Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin // *Tree Physiol.* 2008. V. 26. P. 585–594.
- Naumova T.K.* Apomixis in Angiosperms (Nucellar and Integumentary Embryony). London, Tokyo, CRC. Press. 1993. 141 p.
- Nogler G.A.* Gametophytic apomixis // *Embryology of Angiosperms* / Ed. Johri B.M. Berlin: Springer-Verlag, 1984. P. 476–518.
- Nogler C.A.* Gametophytes of apomixes – histological aspects // *Polish. Bot. Stud.* 1994. № 5. P. 5–11.
- Noskova N.E., Trtyakova I.N., Muratova E.N.* Microsporangogenesis and pollrn formation of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) under moder climatic conditions of Siberia // *Biology Bulletin.* 2009. V. 3. P. 317–322.
- Orr-Ewing A.L.* Possible occurrence of viable unfertilized seeds in *Douglas fir* // *Forest Sci.* 1957. V. 3. № 3. P. 243–248.
- Orr-Ewing A.L.* Female sterility in Duglas-fir // *Silvae Genet.* 1966. Bd 26. № 2–3. P. 73–77.
- Park Y.S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M.* Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. silvestris* at three laboratories in Canada and France // *Plant Cell Tissues and Organ Culture.* 2006. V. 86. P. 87–101.
- Park Y.-S.* Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry // *Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century.* Forestry Sciences / Ed. Fenning T. Springer: Dordercht. 2014. V. 81. P. 425–439.

- Peng C., Gao F., Wang H., Shen H., Yang L. Physiological and biochemical traits in Korean pine // *Forest*. 2020. V. 11. P. 577–592.
- Pichot C., Liens B., Nava J.R. Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen // *Genetics*. 2008. V. 178. № 1. P. 379–383.
- Pullman G.S., Webb D.T. An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development // *Division Biological Sciences Symposium TAPPI*. Minneapolis. 1991. P. 31–34.
- Ranganath R.M. Harnessing the developmental potential of nucellar cells: barriers and opportunities // *Trends Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 504–510.
- Rupps A., Rasche J., Rummler V., Linke B., Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to Baby Boom (BBM) Leafy Cotyledon1 (LEG1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) during somatic embryogenesis // *Planta*. 2016. V. 243. № 2. P. 473–478.
- Saxton W.T. Parthenogenesis in *Pinus pinaster* // *Bot. Gaz.*, 1909. V. 47. P. 406–409.
- Sarvas R. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus silvestris* // *Metsätieteellisen Tutkimuslaitoksen Julkaisu*. 1962. V. 53. № 4. P. 1–198.
- Singh H. Embryology of Gymnosperms. Berlin: Steudert; Gebrüder Borntraeger, 1978. 241 p.
- Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003. V. 74. № 1. P. 15–35.
- Stattler R.F., Bawa K.S., Livingstone G.K. Experimental induction of haploid parthenogenesis in forest tree. Induced mutations in plants // Vienna: Intern. Atomic Energy Agency. 1969. P. 611–619.
- Stebbins G.L.J. Apomixis in angiosperms // *Bot. Rev.* 1941. V. 7. № 10. P. 507–542.
- Stuart N.W., Cathey H.M. Applied aspects of the gibberellins // *Annual Review of Plant Physiology*. 1961. V. 12. № 1. P. 369–394.
- Takhtajan A. Diversity and Classification of Flowering Plants. N.Y.: Columbia University Press, 1997. 643 p.
- Tret'yakova I. Possibility of apomixis in Conifers // *Apomixis Newsletter*. Mexico 1992. № 4. P. 11–13.
- Tret'yakova I.N. Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in *in vitro* culture of Siberian larch // *Doklady Biological Sciences*. 2013. V. 45. № 1. P. 139–141.
- Tret'yakova I.N., Pak M.E., Ivanitskaya A.S., Oreshkova N.V. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro* // *Russian J. Plant Physiology*. 2016. V. 63. № 6. P. 800–810.
- Tret'yakova I.N., Barsukova A.S. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three Larch species // *Russian J. Developmental Biology*. 2012. V. 43. № 6. P. 353–383.
- Tret'yakova I.N., Kudoyarova G.R., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Akhmyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2019. V. 136. № 3. P. 511–522.
- Tret'yakova I.N., Lukina A.V. Acceleration of embryonic development of *Pinus sibirica* trees with a one year reproductive cycle // *Russian J. Developmental Biology*. 2016. V. 47. № 1. P. 41–48.
- Tret'yakova I.N., Lukina A.V. Embryological peculiarities of interspecific hybridization of *Pinus sibirica* // *Russian J. Developmental Biology*. 2017. V. 48. № 5. P. 340–346.
- Tret'yakova I., Novoselova N. Culture *in vitro* of megagametophytes and embryos of Siberian pine and formation of adventitious buds // *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. № 86. Yalta, Ukraine, 2002. P. 23–26.
- Tret'yakova I.N., Park M.E. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture // *Russian J. Developmental Biology*. 2018. V. 49. № 4. P. 222–233.
- Tret'yakova I.N., Shuvaev D.N. Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation *in vitro* // *Russian J. Developmental Biology*. 2018. V. 49. № 4. P. 222–233.
- Tret'yakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N. Callusogenesis and somatic embryogenesis induction in hybrid embryos from seed of *Pinus sibirica* // *Russian J. Plant Physiology*. 2014. V. 61. № 4. P. 274–280.
- Tret'yakova I.N., Vyazovetskova A.S., Ivanova A.N. Induction of Androgenic Cultures of Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) // *Eurasian J. For. Res.* 2006. V. 9-1. P. 37–44.
- Trontin J.F., Klimaszewska K., Morel A., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A. Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights // *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*. 2015. V. 46. № 5. P. 276–693.
- Winkler H. Fortpflanzung der Gewishe / Vii Apomixis. Yandwörterbuch der Naturwissenschaft. Jena. 1934. № 4. P. 451–461.
- Von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploid embryos of *Larix decidua*: early embryogenesis // *American J. Botany*. 1988. V. 75. P. 690–700.
- Von Aderkas P., Bonga J., Klimaszewska K., Owens J. Comparison of larch embryology *in vivo* and *in vitro* // *Woody Plant Biotechnology* / Ed. Ahuja N.R. Plenum press. N.Y., 1991. P. 139–155.
- Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua* and their reciprocal hybrids // *Can. J. For. Res.* 1990. V. 20. P. 9–14.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyacho K.J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2002. V. 69. P. 233–249.
- Zhang L., Li W.F., Xu H.Y., Qi L.W., Han S.Y. Cloning and characterization of four differentially expressed cDNAs encoding NEYA homologs involved in response to ABA during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis*) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2014. V. 117. P. 293–304.
- Zang Q., Li W., Qi L. Regulation of *LaSCL6* expression by genomic structure, alternative splicing, and microRNA in *Larix kaempferi* // *Tree Genetics and Genomes*. 2019. V. 15. P. 57–67.

## The Reproductive Potencial of Conifers, Somatic Embryogenesis and Apomixis

I. N. Tretyakova<sup>1,\*</sup> and V. V. Mineev<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Sukachev Institute of Forest Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center SB RAS, Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

<sup>2</sup>*Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V.P. Astafiev, Ada Lebedeva ul. 89, Krasnoyarsk, 660049 Russia*

*\*e-mail: culture@ksc.krasn.ru*

*\*\*e-mail: vvmineyev@mail.ru*

The article presents the results of the analysis of available data on the reproduction of plants of the Pinopsida class (sexual reproduction and asexual – apomixis). The possibilities of implementing apomixis in conifers are considered. This method of asexual reproduction is manifested when seed formation is disturbed. A special type of reproduction in conifers is somatic embryogenesis in in vitro culture. It is shown that the transition of somatic cells to the totipotent and embryogenic state in conifers occurs at the morphogenetic, physiological-biochemical, and molecular-genetic levels. The commonality of morphogenetic processes underlying somatic and zygotic embryogenesis is established. The place of somatic embryogenesis in the coniferous reproduction system is considered.

*Keywords:* reproduction, apamixis, somatic embryogenesis, Conifers

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 597.552.51:577.115:591.3

СРАВНИТЕЛЬНО-ВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДОВ  
И ИХ ДИНАМИКА В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И РАННЕГО  
ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ  
(*SALMO SALAR* L.) И КУМЖИ (*SALMO TRUTTA* L.)

© 2021 г. В. П. Воронин<sup>а, \*</sup>, С. А. Мурзина<sup>а, \*\*</sup>, З. А. Нефедова<sup>а</sup>, С. Н. Пеккоева<sup>а</sup>,  
Т. Р. Руоколайнен<sup>а</sup>, М. А. Ручьев<sup>а</sup>, Н. Н. Немова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра  
“Карельский научный центр Российской академии наук”, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

\*e-mail: voronen-viktor@mail.ru

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

Поступила в редакцию 07.07.2020 г.

После доработки 10.11.2020 г.

Принята к публикации 16.11.2020 г.

Проведено сравнительно-видовое исследование содержания общих липидов и липидов отдельных классов (общих фосфолипидов и их фракций, триацилглицеринов, диацилглицеринов, эфиров холестерина, холестерина, свободных жирных кислот) в неоплодотворенной икре, в процессе эмбрионального (оплодотворение, бластула, гаструла, органогенез, пигментация глаз, предличинка) и раннего постэмбрионального развития (личинка с желточным мешком) атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.). Сравнительно высокое содержание общих липидов (за счет фракции запасных триацилглицеринов) в икре исследованных видов перед оплодотворением, особенно у лосося, можно рассматривать как необходимую предпосылку их дальнейшего эмбрионального и постэмбрионального развития. Динамика липидного состава в икре исследованных видов в процессе эмбриогенеза различалась, что является особенностью метаболизма липидов у этих видов. На этапах активного клеточного деления (бластула, гаструла, органогенез) в эмбриогенезе атлантического лосося и кумжи отмечено увеличение концентрации лизофосфатидилхолина. На более поздних стадиях их эмбрионального (пигментация глаз, предличинка) и раннего постэмбрионального (личинка с желточным мешком) развития обнаружено возрастание концентрации фосфатидилсерина. Биохимическая разнокачественность, обусловленная разным количественным содержанием липидов отдельных классов на исследованных стадиях развития, связана, по-видимому, с особенностями эмбрионального развития исследованных видов, в частности, одновременностью этих процессов.

**Ключевые слова:** лососевые рыбы, атлантический лосось, кумжа, эмбриогенез, раннее постэмбриональное развитие, липиды, жирные кислоты

**DOI:** 10.31857/S0475145021020099

## ВВЕДЕНИЕ

Атлантический лосось (*Salmo salar* L.) и кумжа (*Salmo trutta* L.) являются одними из наиболее ценных видов лососевых рыб пресноводных экосистем Кольского полуострова и характеризуются высокой вариабельностью жизненных стратегий (Павлов и др., 2008). Реализация всего комплекса сформировавшихся на протяжении эволюции вида адаптаций, направленных на поддержание репродуктивной функции и выживание потомства, в конечном счете, приводит к формированию фенотипа, наиболее устойчивого к изменению факторов среды. Так, для кумжи известна самая высокая экологическая пластичность по сравнению с

другими видами лососевых рыб (Шустов, Веселов, 2006; Jonsson, Jonsson, 2011), а ее широкая изменчивость обеспечивает возможность освоения и использования ресурсов населенной акватории, чем объясняется популяционная дифференциация вида на ряд подвидов, наличие различных экологических форм, географических рас (Шустов, Веселов, 2006; Тагизадэ, 2007; Павлов, Савваитова, 2008). Кумжа Белого моря демонстрирует развитые способности и потенциал к заселению новых пространств и успешно освоила разнообразные и различающиеся по ряду характеристик пресноводные водоемы (ручьи, озерно-речные системы), она благополучно обитает в открытых,

**Таблица 1.** Даты сбора (по градусодням, г.д.) икры двух видов лососевых рыб (*Salmo salar* L. и *Salmo trutta* L.) на разных стадиях развития

Номер этапа	Стадия развития икры	Вид	Дата	Градусодни (г.д.)
0 этап	Неоплодотворенная икра	Атлантический лосось	10 октября	0 г.д.
		Кумжа	12 октября	0 г.д.
1 этап	Оплодотворенная икра	Атлантический лосось	10 октября	2.5 г.д.
		Кумжа	12 октября	2.4 г.д.
2 этап	Бластула	Атлантический лосось	14 октября	38 г.д.
		Кумжа	14 октября	18 г.д.
3 этап	Гастрюла	Атлантический лосось	26 октября	129 г.д.
		Кумжа	26 октября	110 г.д.
4 этап	Органогенез	Атлантический лосось	15 ноября	209 г.д.
		Кумжа	15 ноября	189 г.д.
5 этап	Пигментация глаз	Атлантический лосось	2 февраля	287 г.д.
		Кумжа	2 февраля	267 г.д.
6 этап	Предличинка	Атлантический лосось	18 апреля	331 г.д.
		Кумжа	18 апреля	312 г.д.
7 этап	Личинка	Атлантический лосось	18 апреля	331 г.д.
		Кумжа	18 апреля	312 г.д.

прибрежных и эстуарных участках моря (Кузичин, 1997).

Генетически детерминированная дифференциация эмбрионов, личинок и мальков, приводящая при действии различных факторов среды к образованию сложной возрастной и субпопуляционной структуры лососевых рыб, обусловлена целым комплексом физиолого-биохимических адаптаций, определяющих выбор оптимальной стратегии раннего развития молоди лососевых рыб и специфику их жизненного цикла (Веселов, Калюжин, 2001; Tocher, 2003; Murzina et al., 2014). Биохимические адаптации формируются комплексом показателей различных метаболических путей, включая липиды и их жирнокислотные компоненты, которые, как было показано ранее (Павлов и др., 2008; Johnson, 2009; Нефедова и др., 2010, 2014, 2018; Jonsson, Jonsson, 2011; Arslan et al., 2016; Мурзина и др., 2017; Mueller et al., 2017), выступают в качестве одного из ключевых показателей успешного эмбрионального развития и последующего расселения сеголеток лососевых рыб из нерестовых гнезд по биотопам.

Целью настоящего исследования являлось выявление общих и специфических (видовых) особенностей липидного профиля и динамики содержания отдельных липидов в процессе эмбрионального и раннего постэмбрионального развития кумжи (*Salmo trutta* L.) и атлантического лосося (*Salmo salar* L.).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Неоплодотворенная икра была получена от самок атлантического лосося, выловленного в р. Су-ма (басс. Белого моря), и кумжи, выловленной в озере Янисъярви (басс. Ладожского озера), в октябре при температуре воды 8.6 и 9.6°C соответственно. После оплодотворения икру перевезли в рыбное хозяйство в пос. Суйстамо и поместили в заводской инкубационной лоток с естественной проточностью из р. Улмасен-йоки (61°54'51" с.ш.; 31°08'56" в.д.) (Supplementary materials 1). На биохимический анализ отбирали как неоплодотворенную икру лосося и кумжи, так и икру на разных стадиях эмбрионального развития (табл. 1).

На каждой стадии развития брали по 20 икринок (индивидуально) лосося и кумжи. После гомогенизации проб в 10-кратном объеме смеси хлороформ-метанол (2 : 1 по объему) проводили экстракцию общих липидов (ОЛ) по методу Фолча (Folch et al., 1957) смесью хлороформ-метанол (2 : 1 по объему). Содержание общих липидов определяли весовым методом (Сидоров и др., 1972). Качественное и количественное определение липидов отдельных классов – общих фосфолипидов (ФЛ), диацилглицеринов (ДАГ), триацилглицеринов (ТАГ), эфиров холестерина (ЭХС), холестерина (ХС), свободных жирных кислот (СЖК) осуществляли при помощи метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Фракционирование общих липидов проводили

на ультратонких пластинках HPTLC Silicagel 60 F<sub>254</sub> Premium Purity (Merck, Германия). Нанесение пробы (объем 2 мкл) проводили с использованием полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (САМАГ, Швейцария). В качестве элюента, а также раствора для насыщения автоматической хроматографической камеры ADC2 (САМАГ, Швейцария), использовали систему растворителей гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (32 : 8 : 0.8 по объему) (Olsen, Henderson, 1989). Влажность в хроматографической камере поддерживали перенасыщенным раствором цинка азотнокислого (ZnNO<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O). Проявление липидных пятен осуществляли в растворе медного купороса (CuSO<sub>4</sub>) с ортофосфорной кислотой (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) и нагреванием до 160°C с последующим качественным и количественным определением липидных компонентов при длине волны 350 нм на дейтериевой лампе (Hellwig, 2008) на спектроденситометре TLC Scanner 4 (САМАГ, Швейцария). Идентификацию липидов разных классов проводили с использованием референтных стандартов соответствующих веществ (“Sigma-Aldrich”, США) с учетом соответствия значений R<sub>f</sub>.

Качественное и количественное определение отдельных фосфолипидных фракций — фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СФМ) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ выполняли с использованием жидкостного хроматографа “Стайер” (ООО “Аквилон”, Россия) с колонкой размером 250 × 4 мм, наполненной сорбентом Нуклеосил 100-7 (“Элсико”, Россия). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил—метанол—гексан—85% фосфорная кислота (918 : 30 : 30 : 17.5 по объему) со скоростью потока 540 мкл/час. Определение анализируемых липидных компонентов осуществляли на спектрофотометре по поглощению в ультрафиолетовом свете при длине волны 206 нм (Arduini et al., 1996).

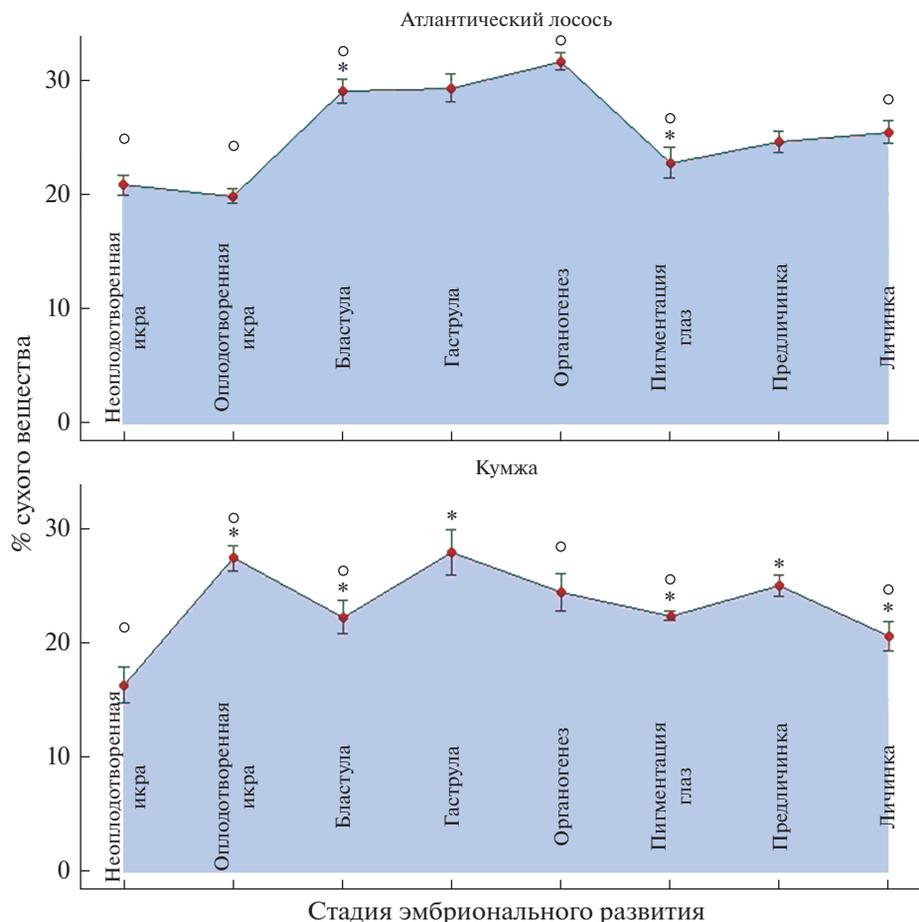
Статистическую обработку результатов проводили в открытой программируемой среде R (версия 3.6.1) с использованием дополнительных пакетов “dplyr” (версия 0.8.3), “psych” (версия 1.8.12), “coin” (версия 1.3-1), “ggplot2” (версия 3.3.0), “corrgram” (версия 1.13). Достоверность различий между липидными компонентами на отдельных стадиях развития определяли непараметрическим критерием Вилкоксона—Манна-Уитни (Ивантер, Коросов, 2003; Кабаков, 2016; Уикем, Гроулмунд, 2019). Различия между отдельными липидными показателями считали достоверными при  $p \leq 0.05$ . Корреляцию липидных компонентов на отдельных стадиях развития рассчитывали по методу Пирсона.

Исследование было выполнено на базе лаборатории экологической биохимии с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования содержания общих липидов (ОЛ) в неоплодотворенной икре и сразу после оплодотворения, а также на отдельных стадиях эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося и кумжи представлены на рис. 1. Установлено, что содержание ОЛ в неоплодотворенной икре атлантического лосося и кумжи достоверно различалось (20.79 и 16.27% сухого вещества соответственно), в основном за счет запасных липидов — триацилглицеринов (ТАГ). В процессе эмбрионального развития икры на этапе активного клеточного деления (бластула, гастрюла, органогенез, пигментация глаз) у обоих видов лососевых рыб отмечено общее увеличение содержания ОЛ до 27.91% сухого вещества у кумжи и до 31.55% у лосося с последующим снижением соответственно до 20.56 и 25.40% сухого вещества в период выклева личинки. При этом динамика изменения содержания ОЛ на разных стадиях эмбриогенеза лосося и кумжи различалась. Во время эмбрионального развития содержание ОЛ варьирует (в среднем) в пределах 23—24% сухого вещества. На стадии гастрюлы и органогенеза содержание ОЛ достигает 27.91 и 31.55% сухого вещества у кумжи и лосося соответственно.

На рис. 2 приведены результаты качественного и количественного анализа липидов отдельных классов. Показано, что в количественном отношении доминирует фракция запасных ТАГ как в неоплодотворенной икре лосося и кумжи, так и в икре в процессе эмбрионального развития. Содержание ТАГ в неоплодотворенной икре составило 11.42 и 8.93% сухого вещества у лосося и кумжи соответственно. В процессе эмбрионального развития содержание ТАГ варьировало в пределах 10.83—17.95 и 12.08—15.03% сухого вещества, а на стадии личинки (с желточным мешком) — 13.93 и 10.33% сухого вещества у атлантического лосося и кумжи соответственно. В икре кумжи установлено достоверное увеличение содержания ТАГ на стадии оплодотворения, тогда как у атлантического лосося — на стадии формирования бластулы. На данных стадиях развития установлены корреляции этого показателя с увеличением содержания общих фосфолипидов (ФЛ) ( $r = 0.84$  и  $0.84$  соответственно) и диацилглицеринов (ДАГ) ( $r = 0.44$  и  $0.62$  соответственно), а также с общим снижением содержания свободных жирных кислот (СЖК) ( $r = 0.27$  и  $-0.04$  соответственно) (Supplementary materials 1). Для кумжи и атлантиче-

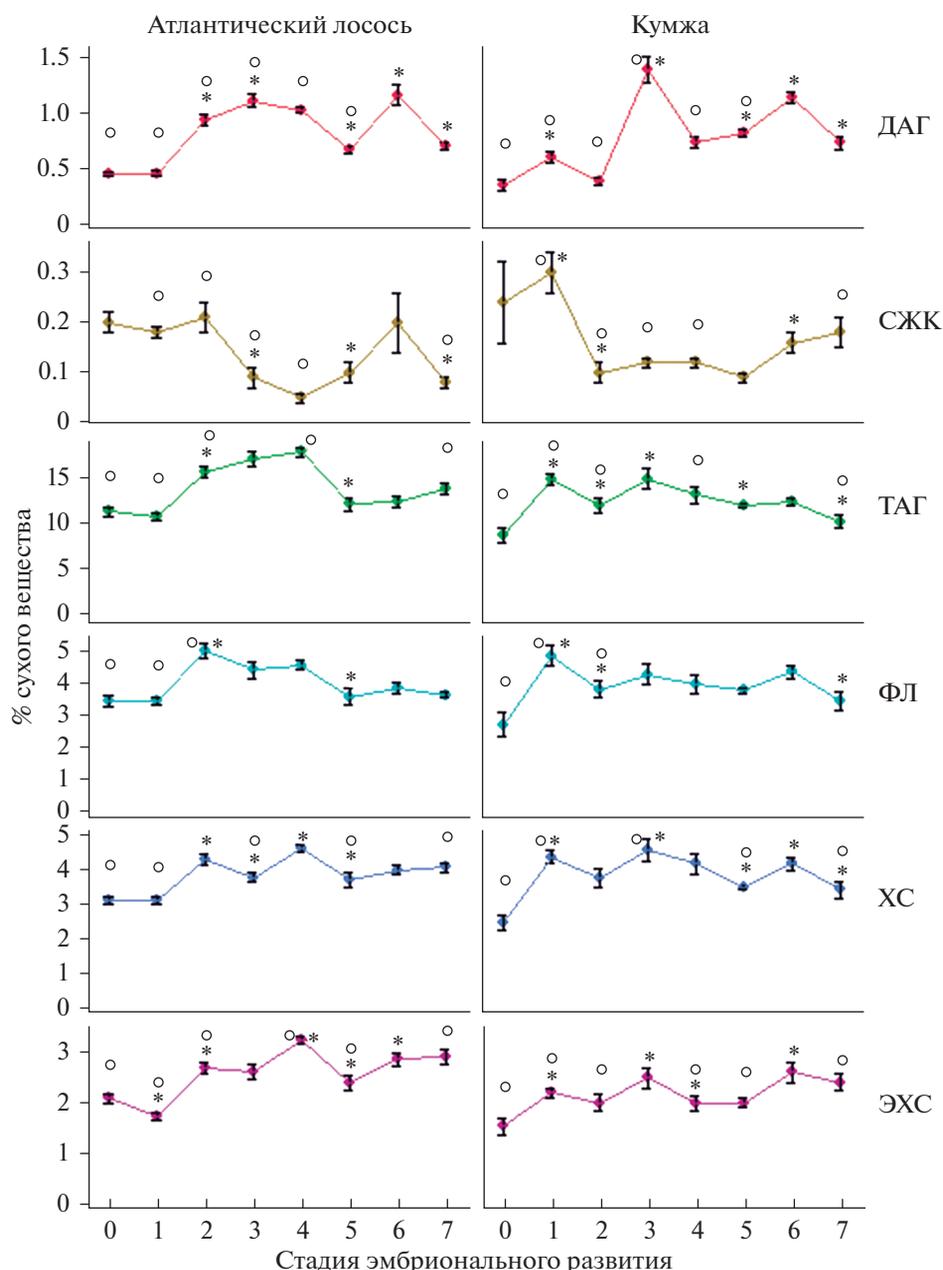


**Рис. 1.** Изменение содержания общих липидов (ОЛ) в неоплодотворенной икре, на отдельных стадиях эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.). Примечание к рис. 1: Динамика содержания ОЛ представлена в формате  $M \pm SE$ . \* – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от предыдущей стадии развития, о – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) между атлантическим лососем (*Salmo salar* L.) и кумжей (*Salmo trutta* L.) на соответствующей стадии развития.

ского лосося выявлено накопление запасных ТАГ на ранних стадиях эмбрионального развития (бластула, гастроула, органогенез) до 15.03 и 17.95% сухого вещества соответственно, коррелирующих с увеличением содержания ДАГ ( $r = 0.55$  и  $0.49$  соответственно) и уменьшением концентрации СЖК ( $r = 0.23$  и  $-0.28$  соответственно), относительно оплодотворенной икры. Однако стоит отметить разнонаправленность динамики СЖК (положительная корреляция у кумжи и отрицательная – у атлантического лосося) на данных стадиях развития у исследованных видов рыб. На этапах подготовки к выклеву и непосредственно в момент выклева личинки отмечено увеличение количества ТАГ у атлантического лосося (до 12.46 и 13.93% сухого вещества на стадиях предличинки и личинки соответственно). При этом у предличинок кумжи выявлено увеличение ТАГ до 12.45% сухого вещества, тогда как у личинок – снижение до 10.33% сухого вещества.

Отличительной особенностью кумжи является также достоверно более низкое содержание эфиров холестерина (ЭХС) по сравнению с атлантическим лососем (1.57–2.66 и 1.78–3.30% сухого вещества соответственно), на протяжении практически всего периода эмбрионального развития (рис. 2).

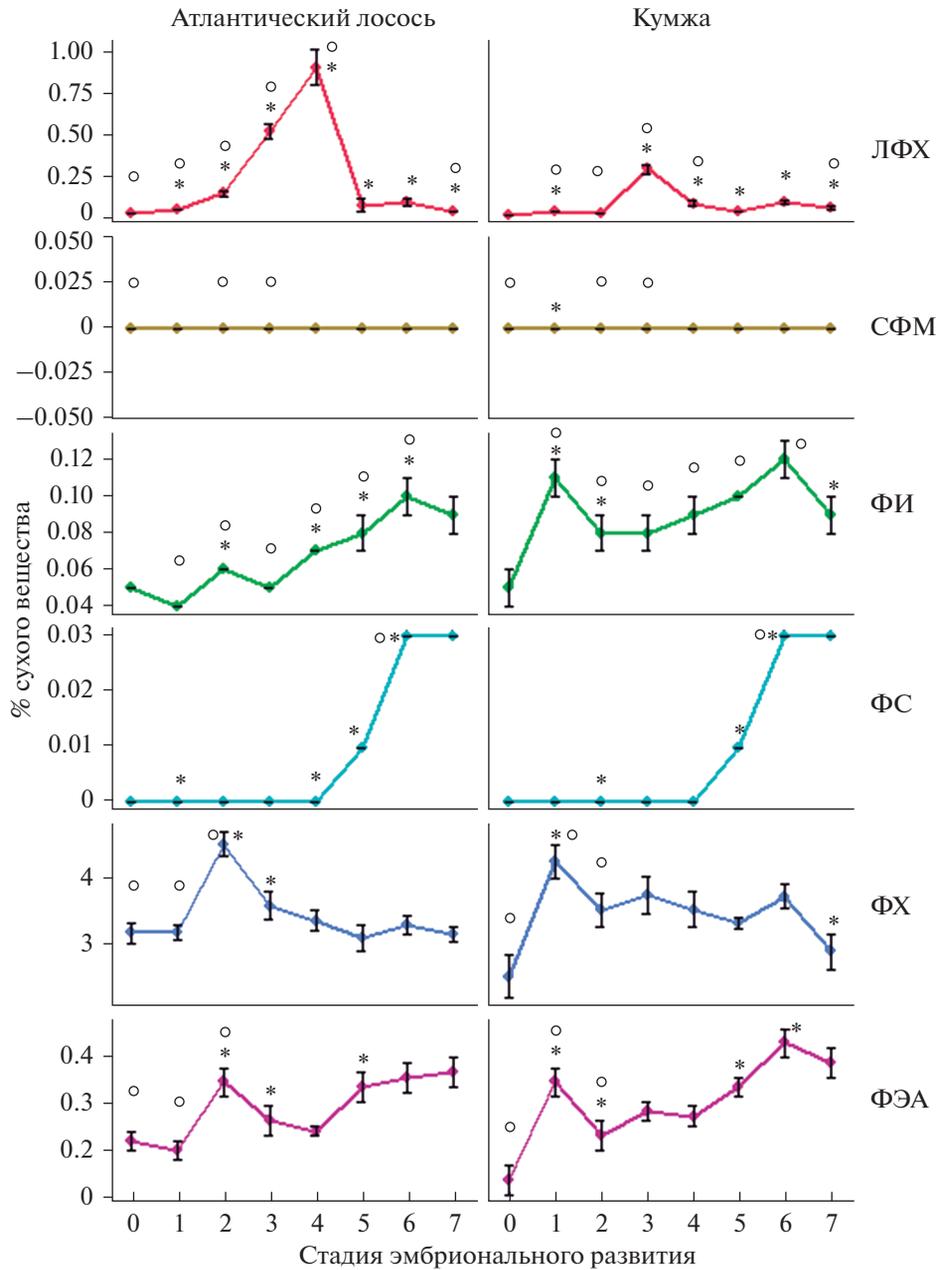
Результаты исследования содержания липидов в процессе развития лососевых рыб, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что по количественному содержанию на втором и третьем месте после ТАГ располагаются структурные фосфолипиды (ФЛ) и холестерин (ХС), содержание которых в неоплодотворенной икре атлантического лосося составило 3.49 и 3.10% сухого вещества, а для кумжи – 2.74 и 2.44% сухого вещества соответственно. На стадиях эмбрионального и раннего постэмбрионального развития отмечены вариации в содержании данных липидов для атлантического лосося в диапазоне 3.62–5.05 и 3.09–4.63% сухого вещества, а для



**Рис. 2.** Изменение содержания липидов отдельных классов (общих фосфолипидов, диацилглицеринов, триацилглицеринов, холестерина, эфиров холестерина, свободных жирных кислот) в неоплодотворенной икре, на разных стадиях эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.). Примечание к рис. 2: ФЛ – общие фосфолипиды, ДАГ – диацилглицерины, ТАГ – триацилглицерина, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, СЖК – свободные жирные кислоты; 0 – неоплодотворенная икра, 1 – оплодотворенная икра, 2 – бластула, 3 – гастрюла, 4 – органогенез, 5 – пигментация глаз, 6 – предличинка, 7 – личинка. Динамика липидных классов представлена в формате  $M \pm SE$ . \* – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от предыдущей стадии развития, o – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) между атлантическим лососем (*Salmo salar* L.) и кумжей (*Salmo trutta* L.) на соответствующей стадии развития.

кумжи – 3.46–4.88 и 3.40–4.53% сухого вещества. Динамика ФЛ и ХС в икре исследованных видов лососевых рыб сходна и коррелирует между собой ( $r = 0.86$  и  $0.78$  для кумжи и атлантического лосося соответственно). Основными классами фосфолипидов у обоих видов лососевых рыб являются

фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА) (рис. 3). Установлено, что у кумжи увеличение содержания ФХ происходит на стадии оплодотворения икры, тогда как у лосося – на стадии бластулы (Supplementary materials 2). Дальнейшее изменение содержания ФХ в эм-



**Рис. 3.** Изменение содержания фосфолипидов отдельных классов (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин) в неоплодотворенной икре, на разных стадиях эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.). Примечание к рис. 3: ФХ – фосфатидилхолин, ФЭА – фосфатидилэтанолламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозитол, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин; 0 – неоплодотворенная икра, 1 – оплодотворенная икра, 2 – бластула, 3 – гастрюла, 4 – органогенез, 5 – пигментация глаз, 6 – предличинка, 7 – личинка. Динамика фосфолипидных классов представлена в формате М ± SE. \* – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от предыдущей стадии развития, о – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) между атлантическим лососем (*Salmo salar* L.) и кумжей (*Salmo trutta* L.) на соответствующей стадии развития.

бриогенезе демонстрирует тенденцию к снижению общего количества данной фракции ФЛ до 3.16 и 2.90% сухого вещества у личинок лосося и кумжи соответственно. Для ФЭА в этот же период установлена тенденция к увеличению содержания от 0.23 и 0.15 до 0.37 и 0.39% сухого вещества у лосося и кумжи.

Также отмечено накопление фосфатидилсерина (ФС) в икре на ранних постэмбриональных стадиях развития (до 0.03% сухого вещества у кумжи и лосося), а также и увеличение минорного фосфатидилинозитола (ФИ) (до 0.12 и 0.10% сухого вещества у кумжи и лосося соответственно) в процессе развития эмбриона. На стадиях га-

струляции и органогенеза выявлено статистически значимое превалирование лизофосфатидилхолина (ЛФХ) у атлантического лосося по сравнению с кумжей – 0.52–0.91 и 0.29–0.08% сухого вещества соответственно. Наибольшая концентрация ЛФХ у лосося отмечена на стадии органогенеза с одновременным снижением метаболически связанного ФХ (до 3.36% сухого вещества), а у кумжи – на стадии гастрюляции, однако у последней отмечено сохранение уровня ФХ (в пределах 3.53–3.75% сухого вещества).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Высокое содержание ОЛ в икре является характерным признаком лососевых рыб, связанным с их образом жизни, спецификой питания, а также экологическими особенностями размножения (Atchison, 1975; Zengin, Akpinar, 2006; Павлов и др., 2007а, 2007б; Bell, Tocher, 2009; Jonsson, Jonsson, 2011). Обнаруженные количественные различия в содержании ОЛ у кумжи и лосося в неоплодотворенной икре, а также на некоторых стадиях эмбриогенеза и раннего постэмбрионального развития (личинка с желточным мешком) указывают на видоспецифичность липидного метаболизма раннего онтогенеза у исследованных видов, что, по-видимому, является одним из факторов, определяющих разновременность развития и различия сроков выклева личинок. Ранее (Нефедова и др., 2010; Murzina et al., 2014) была продемонстрирована разнокачественность липидного профиля текучей икры из разных частей яичника атлантического лосося и горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*), которая впоследствии может сказываться на способности к оплодотворению, росте и развитии зародыша и дальнейшей дифференциации молоди лососевых рыб.

Низкая температура и длительный инкубационный период развивающейся икры в зимнее время, а также выклев личинок весной в специфических трофических условиях (при недостатке кормовых объектов), по-видимому, определяют высокий уровень запасных ТАГ в икре лососевых рыб (MacFarlane, Norton, 1999; Halver, 2000). На начальных стадиях эмбрионального развития (бластула, гастрюла) ТАГ не используются в качестве источника энергии, поскольку на данных этапах преобладают реакции гликолиза (Мильман и др., 1977), а поглощение кислорода невелико (Рыжков, 1976; Озернюк, 1985; Юровицкий, 1999). Кроме того, согласно данным литературы (Tocher et al., 1985; Sejas et al., 2004), на ранних стадиях развития зародыша возможен синтез ТАГ *de novo*. Для обоих видов лососевых рыб отмечено накопление ТАГ на ранних стадиях эмбрионального развития, тогда как на поздних стадиях эмбрионального развития (органогенез, пигментация глаз, предличинка) и раннего постэмбрионального раз-

вития прослеживается общее снижение содержания ТАГ, что указывает на использование данного класса липидов в качестве энергетического источника. Установленные различия во времени использования ТАГ в качестве энергетических компонентов в процессе эмбриогенеза лосося и кумжи определяются, скорее всего, видовой спецификой развития эмбриона, а на уровне метаболизма липидов – регуляцией активности фермента липазы или активацией фермента липазы.

Отмеченное снижение содержания ТАГ у обоих видов рыб на стадии пигментации глаз связано, скорее всего, с усилением метаболических процессов – на данной стадии эмбрионального развития начинает функционировать печень, где протекают процессы липогенеза (Игнатьева, 1979; Озернюк, 1985; Рыжков, Крупень, 2004). Ранее было показано (Нефедова, 1989), что масса желтка эмбриона лосося от стадии дробления до пигментации глаз может снижаться до 24% за счет деградации липидных компонентов (в том числе энергетических ТАГ), что было также подтверждено в настоящей работе.

Известно, что до перехода на экзогенное питание личинки лососевых рыб в течение нескольких дней после выклева получают энергию преимущественно за счет собственных запасов (Эколого-биохимический статус..., 2016; Jin Y. et al., 2019). У личинок кумжи было отмечено снижение содержания ТАГ по сравнению с предыдущей стадией развития (предличинкой), что указывает на активную деградацию ТАГ, тогда как у атлантического лосося установлено повышение содержания ТАГ. Отсутствие у личинок лосося достоверных различий между данными стадиями развития в количественном содержании ТАГ, вероятно, связано с тем, что личинки лосося в качестве энергетических источников, предпочтительнее используют углеводы, а личинки кумжи – липиды. Похожие результаты были получены и в других работах (Лапин, Шатуновский, 1981; Нефедова, 1989; Немова и др., 2014; Мурзина и др., 2017).

Динамика использования ТАГ в качестве энергетических источников подтверждается ее корреляцией с динамикой его метаболического предшественника – ДАГ, а также продуктов гидролиза ТАГ – СЖК. Обнаружено (Supplementary materials 1), что коэффициенты корреляции СЖК у атлантического лосося и кумжи различаются, что указывает на различия в метаболизме липидов в эмбриогенезе этих видов рыб. Повышенное содержание СЖК отмечено на стадии оплодотворения у кумжи и на стадии бластулы у лосося, а также после пигментации глаз у обоих видов, что указывает на активные метаболические процессы (липолиз) на данных этапах развития. Эти данные согласуются с представлениями о том, что СЖК активно используется в качестве энергетиче-

ческого источника при усилении физиологических процессов (Coweу et al., 1985). Кроме того, увеличение содержания СЖК оказывает влияние на многие клеточные процессы, такие как регуляция деятельности некоторых ферментов, участие в передаче клеточного сигнала, модулирование связывания стероидных гормонов с рецепторами, транскрипция некоторых генов (Когтева, Безуглов, 1998).

Установленная пониженная концентрация ЭХС в икре кумжи определяется разной потребностью организма в липидах отдельных классов. Стоит отметить, что динамика изменения содержания ЭХС у кумжи и лосося в процессе эмбриогенеза в основном сходна, однако некоторые различия обнаружены на стадии оплодотворения икры – снижение содержания ЭХС у лосося (с 2.13 до 1.78% сухого вещества) и увеличение его содержания у кумжи (с 1.57 до 2.24% сухого вещества). Это может быть связано с более активным разрушением кортикальных альвеол на стадии оплодотворения у лосося с последующим высвобождением холестеринэстеразы по сравнению с кумжей (Ionescu et al., 1979; Gwatkin et al., 1980).

Развивающаяся в эмбриогенезе икра является “закрытой”, относительно гомогенной системой, находящейся на полном “самообеспечении” нормального развития эмбриона. Взаимосвязанное изменение общих ФЛ и ХС в процессе развития икры согласуется с необходимостью поддержания определенной структуры биомембраны клетки, в частности ее жидкости (Болдырев и др., 2006). На стадии оплодотворения происходит увеличение содержания ФЛ и ХС, что является основной характеристикой существующих различий между лососем и кумжей, поскольку именно эту стадию развития икры связывают (Finn et al., 1995) с началом процессов деления клеток и “ригидностью биомембраны” от воздействий внешней среды. При этом, данные об общем снижении содержания ФХ и увеличении ФЭА в процессе развития исследованных видов лососевых рыб указывают, по-видимому, на перестройку фосфолипидного каркаса мембраны при подготовке к выклеву личинки.

Отмеченное накопление ФС в икре на ранних постэмбриональных стадиях развития, указывает на процессы индигирования активности  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы – основного компонента осмотической регуляции (Болдырев и др., 2006). Увеличение минорного ФИ в процессе развития эмбриона определяется участием данного ФЛ в регуляции обмена кальция внутри клетки в качестве вторичного мессенджера (Радченко и др., 2005). В совокупности, увеличение синтеза ХС, снижение содержания ФХ и повышение концентрации ФЭА, ФС и ФИ указывает на активную клеточную перестройку организма, направлен-

ную на увеличение жидкости биомембран как для оптимальной работы мембраносвязанных ферментов, так и для передачи сигналов внутрь клетки. Оптимальное соотношение холестерина к фосфолипидам (ХС/ФЛ), коэффициента Дьерди, который описывает микровязкость биомембраны, свидетельствует о влиянии этого параметра на активность мембраносвязанных ферментов и обменные процессы в развивающемся организме (Crockett, 1998; Mitra et al., 2004). На протяжении всего эмбрионального и раннего постэмбрионального развития икры это соотношение сохранялось в пределах одинаковых значений у обоих видов лососевых рыб. Только у ранних личинок в период после выклева икры из оболочек была отмечена тенденция к увеличению ХС/ФЛ до 1.00 и 1.10% сухого вещества у кумжи и атлантического лосося соответственно.

У атлантического лосося отмечена высокая концентрация ЛФХ на стадии органогенеза с одновременным снижением метаболически связанного с ним ФХ, тогда как у кумжи – на этапе гастрюляции с сохранением уровня ФХ, что, вероятно всего, связано с реакцированием ЛФХ (Карагезян, 1972; Murzina, 2009). Известно, что накопление ЛФХ увеличивает проницаемость мембраны для ионов (Осадчая и др., 2004). Кроме того, ЛФХ под действием фосфолипазы D может превращаться в лизофосфатидную кислоту, которая, в свою очередь, тесно связана с процессами дифференциации клетки, ее ростом, подвижностью и выживанием (Бердичевец и др., 2010).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании липидного профиля и динамики содержания отдельных липидов в процессе эмбрионального и раннего постэмбрионального развития кумжи и атлантического лосося была показана биохимическая разнокачественность (количественная) липидов как по стадиям развития, так и между исследованными видами рыб. Высокое содержание общих липидов и их энергетических форм в икре исследованных лососевых рыб обусловлено необходимостью их использования в последующем эмбриональном и раннем личиночном развитии в экологических условиях, сложившихся в биотопах, в которых молодь развивается до наступления смолтификации и перехода из пресной среды в морскую. Несмотря на то, что эти процессы генетически детерминированы, они тесно связаны и регулируются эпигенетическими условиями, связанными с условиями среды обитания (температурой, уровнем растворенного кислорода, фотопериодом и др.). Так изменения содержания и соотношения индивидуальных ФЛ (ФХ, ФЭА, ФС) можно рассматривать как компенсаторную адаптацию эмбрионального и раннего постэмбрионального развития исследуемых рыб,

направленную на поддержание оптимальной микровязкости биомембран. Кроме того, данные об изменении таких физиологически активных веществ липидной природы как ФИ, ЛФХ и ДАГ в процессе эмбрионального развития лосося и кумжи можно рассматривать с точки зрения их значимости в регуляции биохимических и физиологических процессов в качестве вторичных мессенджеров.

На общий механизм адаптации к освоению новой среды обитания у обоих видов лососевых рыб после выклева личинки из оболочки свидетельствуют данные о повышении содержания ФС, минорного фосфолипида, участвующего в регуляции фермента осморегуляции, который активируется при переходе особей из пресной среды в морскую. Кроме того, известно, что ФС принимает активное участие в процессах нейrogenеза, что особенно важно для развивающейся молодежи. Обнаруженные различия между атлантическим лососем и кумжей (более высокое содержание ОЛ, запасных ТАГ и ЭХС, а также метаболические изменения некоторых структурных липидов и, особенно, фосфолипидов) на отдельных этапах эмбрионального и раннего постэмбрионального развития, отражают особенности жизненной стратегии исследованных видов рыб. Для икры атлантического лосося характерно накопление энергетически ценных липидных компонентов (в частности ТАГ и ЭХС) на этапе активного клеточного деления, тогда как в икре кумжи отмечено варьирование содержания данных липидных компонентов на протяжении эмбрионального развития. В период выклева личинок из оболочек отмечено общее снижение содержания данных компонентов.

Таким образом, результаты изучения липидного профиля в икре в эмбриогенезе и у ранней личинки атлантического лосося и кумжи свидетельствуют как об общих механизмах, так и о специфических различиях, определяющих биохимическую разнокачественность организмов, отражающую, в свою очередь фенотипическую разнокачественность, которая в последующем определяет внутривидовое разнообразие вида, специфику жизненной стратегии, сроки развития и готовности молодежи к смолтификации.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося проведены при финансировании в рамках проекта Российского научного фонда № 19-14-00081 “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молодежи атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”.

#### 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

В.П. Воронин – проведение липидного анализа икры исследованных видов рыб, статистический анализ, обсуждение результатов исследования, написание и подготовка публикации; С.А. Мурзина – обсуждение результатов исследования, написание и подготовка публикации; З.А. Нефедова – обсуждение результатов исследования, подготовка отдельных разделов публикации; С.Н. Пеккоева, Т.Р. Руоколайнен – проведение липидного анализа икры исследованных видов рыб; М.А. Ручьев – сбор биоматериала и его фиксация, наблюдение и уход за икрой в процессе развития; Н.Н. Немова – обсуждение результатов исследований, подготовка публикации, руководитель проекта РФФ № 19-14-00081.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблицы и рисунки доступны на сайте <https://link.springer.com/journal/11174/volumes-and-issues>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бредичевец И.Н., Тяжелова Т.В., Шимшилашвили Х.Р. и др.* Лизофосфатидная кислота – липидный медиатор с множеством биологических функций. Пути биосинтеза и механизм действия. Обзор // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1213–1223.
- Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А.* Биомембранология: Учебное пособие. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2006. 226 с.
- Веселов А.Е., Калюжин С.М.* Экология, поведение и распределение молодежи атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В.* Введение в количественную биологию. Петрозаводск: Изд-во Петрозаводск. ун-та, 2003. 304 с.
- Игнатьева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий (сравнительный анализ временных закономерностей развития). М.: Наука, 1979. 304 с.
- Кабаков Р.И.* R в действии. Анализ и визуализация данных в программе R / Пер. с англ. Полины А. Волковой. М.: ДМК Пресс, 2014. 588 с.
- Карагезян К.* Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван, 1972. 29 с.

- Когтева Г.С., Безуглов В.В. Ненасыщенные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы // Биохимия. 1998. Т. 63. № 1. С. 6–15.
- Кузицин К.В. Особенности формирования внутривидовой разнокачественности у кумжи *Salmo trutta* L. Белого моря: автореферат дис...канд. биол. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1997. 17 с.
- Ланин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Успехи современной биологии. 1981. Т. 92. Вып. 3(6). С. 380–394.
- Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. Контроль углеводного обмена на различных стадиях оогенеза // Соврем. проблемы оогенеза. М.: Наука, 1977. С. 249–264.
- Мурзина С.А., Нефедова З.А., Пеккоева С.Н. и др. Содержание липидных компонентов у молоди кумжи *Salmo trutta* L. из реки Орзга (бассейн Онежского озера): II. Динамика уровня липидов в мальковом периоде развития // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2017. Т. 6. № 167. С. 7–11.
- Немова Н.Н., Нефедова З.А., Мурзина З.А. Особенности динамики липидов в раннем развитии атлантического лосося *Salmo salar* L. // Труды Карельского научного центра РАН. 2014. № 5. С. 44–52.
- Нефедова З.А. Липидный статус лосося на ранних этапах онтогенеза: дис. ... канд. биол. наук. Харьков: Харьковский Государственный университет им. А.М. Горького, 1989. 225 с.
- Нефедова З.А., Мурзина С.А., Веселов А.Е. и др. Разнокачественность липидных и жирнокислотных спектров у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* L., различающихся размерно-весовыми характеристиками // Сибирский экологический журн. 2014. Т. 21. № 4. С. 639–645.
- Нефедова З.А., Мурзина С.А., Пеккоева С.Н. и др. Сравнительная характеристика жирнокислотного профиля смолтов кумжи (*Salmo trutta* L.) и атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в период смолтификации (река Индера, Бассейн Белого моря) // Известия РАН. Сер. биол. 2018. Т. 2. С. 144–149.
- Нефедова З.А., Мурзина С.А., Руоколайнен Т.Р. и др. Липидный состав разных порций текучей икры атлантического лосося *Salmo salar* L. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. 2010. Т. 1. С. 215–218.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.
- Осадчая Л.М., Галкина О.В., Ещенко Н.Д. Влияние коразола на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и интенсивность ПОЛ в нейронах и нейроглии // Биохимические и молекулярно – биологические основы физиологических функций. 2004. № 37. С. 220–226.
- Павлов Д.С., Лунандин А.И., Костин В.В. Механизмы покатной миграции молоди речных рыб. М.: Наука, 2007а. 211 с.
- Павлов Д.С., Мещерякова О.В., Веселов А.Е. и др. Показатели энергетического обмена у молоди атлантического лосося *Salmo salar* L., обитающей в главном русле и притоке реки Варзуга (Кольский полуостров) // Вопр. ихтиол. 2007б. Т. 47. № 6. С. 819–826.
- Павлов Д.С., Нефедова З.А., Веселов А.Е. и др. Липидный статус сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* из разных микробиотов реки Варзуга // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48. № 5. С. 679–685.
- Павлов Д.С., Савваитова К.А. К проблеме соотношения анадромии и резидентности у лососевых рыб (Salmonidae) // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48. № 6. С. 810–824.
- Радченко В.В., Меркулова М.И., Шуваева Т.М. и др. Функциональная экспрессия и свойства Sec 14 р-подобного белка с молекулярной массой 45 кДа из обонятельного эпителия крысы // Биохимия. 2005. Т. 70. № 12. С. 1631–1638.
- Рыжков Л.П. Морфофизиологические закономерности и трансформация вещества и энергии в раннем онтогенезе пресноводных рыб. Петрозаводск: ПетрГУ, 1976. 288 с.
- Рыжков Л.П., Крупень И.М. Пресноводный лосось Онежского озера: Монография. Петрозаводск: Изд-во Петрозаводск. ун-та, 2004. 152 с.
- 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: Карельский филиал АН СССР. 1972. № 1. С. 152–163.
- Тагизадэ В. Особенности морфогенетической изменчивости молоди кумжи из рек Ирана: дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2007. 148 с.
- Уикем Х, Гроулмунд Г. Язык R в задачах науки о данных: импорт, подготовка, обработка, визуализация и моделирование данных. Пер. с англ. СПб.: Изд-во "Альфа-книга". 2019. 592 с.
- Шустов Ю.А., Веселов А.Е. Современное состояние и пути сохранения озерной кумжи *Salmo trutta* m. Lacustris L. в водоемах Карелии // Лососевидные рыбы Восточной Фенноскандии. Петрозаводск, 2006. С. 198–210.
- Эколого-биохимический статус молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. из некоторых рек бассейна Белого моря / Под общ. ред. Немовой Н.Н. Петрозаводск: РИО КарНЦ РАН, 2016. 205 с.
- Юровицкий Ю.Г. Отношения зародыша и желтка в развитии костистых рыб // Онтогенез. 1999. Т. 30. № 3. С. 205–209.
- Arduini A., Peschechera A., Dottori S. et al. High-performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. Lipid Res. 1996. V. 37. P. 684–689.
- Arsilan M., Alaybasi S., Altun E. et al. Changes in lipids, fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant defence system during the early development of wild brown trout (*Salmo trutta*) // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2016. V. 16. № 3. P. 703–714.
- Atchison G.J. Fatty acid levels in developing brook trout (*Salvelinus fontinalis*) eggs and fry // J. Fisheries Board of Canada. 1975. V. 32. № 12. P. 2513–2515.
- Bell M.V., Tocher D.R. Biosynthesis of fatty acids; general principles and new directions // Lipids in Aquatic Eco-

- systems / Eds. Arts M.T., Brett M., Kainz M. NY: Springer, 2009. P. 211–236.
- Cejas J.R., Almansa E., Jerez S. *et al.* Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae // *Compar. Biochem. Physiol. B.* 2004. V. 139. № 2. P. 209–216.
- Cowey C.B., Bell J.G., Knox D. *et al.* Lipids and lipid antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*) // *Lipids.* 1985. V. 20. № 9. P. 567–572.
- Crockett E.L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature // *Integrative and Comparative Biology.* 1998. V. 38. № 2. P. 291–304.
- Finn R.N., Henderson J.R., Fyhn H.J. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). II. Lipid metabolism and enthalpy balance // *Marine Biology.* 1995. V. 124. № 3. P. 371–379.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. № 5. P. 497–509.
- Gwatkin R.B.L., Williams D.T., Hartmann J.F. *et al.* The zona reaction of Hamster and Mouse egg: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules // *Reprod. Fert.* 1980. V. 32. P. 259–265.
- Ionescu V.M., Mester R., Scripcarin D. *et al.* Cytochemical localization and electrophoretic characterization of acid phosphatase in fish ovary // *Rev. Roum. Biol.* 1979. V. 24. № 2. P. 117–123.
- Jin Y., Olsen R.E., Ostensen M.A. *et al.* Transcriptional regulation of lipid metabolism when salmon fry switches from endogenous to exogenous feeding // *Aquaculture.* 2019. V. 503. P. 422–429.
- Johnson R.B. Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth // *Reviews in Fisheries Science.* 2009. V. 17. № 1. P. 78–89.
- Jonsson B., Jonsson N. Habitats as template for life histories / *Ecology of Atlantic Salmon and Brown Trout.* Springer, Dordrecht, 2011. 720 p.
- Halver J.E. *Lipids and Fatty Acids.* Washington, 2000. 246 p.
- Hellwig J. Defining parameters for a reproducible TLC – separation of phospholipids using ADC 2. Diploma thesis, University of Applied Sciences Northwestern Switzerland (FHNW), 2008.
- MacFarlane R.B., Norton E.C. Nutritional dynamic during embryonic development in the viviparous genus *Sebastes* their application to the assessment of reproductive success // *Fish Biol.* 1999. V. 97. P. 273–281.
- Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T. *et al.* Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 12. P. 4083–4088.
- Mueller C.A., Doyle L., Eme J. *et al.* Lipid content and fatty acid profile during lake whitefish embryonic development at different incubation temperatures // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 2017. V. 203. P. 201–209.
- Murzina S.A., Nefedova Z.A., Veselov A.E. *et al.* Changes in fatty acid composition during embryogenesis and in young age groups (0+) of Atlantic salmon *Salmo salar* L. The role of rheotactic behavior and lipid composition of fry in the formation of phenotypic groups of salmon in large Arctic rivers // *Salmon: Biology, Ecological Impacts and Economic Importance* / P.T.K. Woo, D.J. Noakes. Eds. N.Y.: Nova Science Publishers, 2014. P. 47–67.
- Murzina S.A., Nefedova Z.A., Ruokolainen T.R. *et al.* Dynamics of lipid content during early development of freshwater salmon *Salmo salar* L. // *Russ. J. Dev. Biol.* 2009. V. 40. P. 165–170.  
<https://doi.org/10.1134/S1062360409030059>
- Olsen R.E., Henderson R.J. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1989. V. 129. P. 189–197.
- Tocher D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // *Reviews in Fisheries Science.* 2003. V. 11. № 2. P. 107–184.
- Tocher D.R., Fraser A.J., Sargent J.R. *et al.* Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) // *Lipids.* 1985. V. 20. P. 69–74.
- Zengin H., Akpinar M.A. Fatty acid composition of *Oncorhynchus mykiss* during embryogenesis and other developmental stages // *Biologia.* 2006. V. 61. № 3. P. 305–311.

## Comparative Species-Specific Characteristics of Lipids and Their Dynamics During Embryogenesis and Early Postembryonal Development of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and Brown Trout (*Salmo trutta* L.)

V. P. Voronin<sup>1,\*</sup>, S. A. Murzina<sup>1,\*\*</sup>, Z. A. Nefedova<sup>1</sup>, S. N. Pekkoeva<sup>1</sup>,  
T. R. Ruokolainen<sup>1</sup>, M. A. Ruch'ev<sup>1</sup>, and N. N. Nemova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Pushkinskaya, 11,  
Republic of Karelia, Petrozavodsk, 185910 Russia*

\*e-mail: voronen-viktor@mail.ru

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

A comparative species-species study of the content of total lipids and their individual classes (total phospholipids and their fractions, triacylglycerols, diacylglycerols, cholesterol esters, cholesterol, non-esterified fatty acids) in unfertilized eggs, during embryogenesis (fertilized eggs, blastula, gastrula, organogenesis, eye pig-

mentation, pre-hatching larvae) and early postembryonic development (alevin) of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Brown trout (*Salmo trutta* L.). The relatively high content of total lipids (due to the fraction of storage triacylglycerols) in unfertilized eggs, especially in Atlantic salmon, is a necessary prerequisite for their further embryonic and postembryonic development. The dynamics of the lipid composition in the studied species during embryogenesis also differed, which may indicate the feature of lipid metabolism in these species. At the stages of active cell division (blastula, gastrula, organogenesis) during embryogenesis of Atlantic salmon and Brown trout, the content of lysophosphatidylcholine increased. At the later stages of embryogenesis (eye pigmentation, pre-hatching larvae) and early postembryonic development (alevin), the amount of phosphatidylserine increased. The biochemical heterogeneity due to the quantitative content of individual lipid classes at the studied stages of development, is apparently associated with the feature of embryogenesis of the studied species, in particular, the differences in time-scale of these processes.

*Keywords:* salmonids, Atlantic salmon, Brown trout, embryogenesis, early postembryonic development, lipids, fatty acids

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 577.25,591.465.1

ОПОСРЕДОВАННОЕ ООЦИТОМ ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА  
НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ

© 2021 г. Д. А. Никишин<sup>а</sup>, \*, Ю. В. Храмова<sup>б</sup>, Н. М. Алешина<sup>а</sup>,  
Л. А. Мальченко<sup>а</sup>, Ю. Б. Шмуклер<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: d.nikishin@idbras.ru

Поступила в редакцию 07.05.2020 г.

После доработки 02.09.2020 г.

Принята к публикации 09.09.2020 г.

В яичнике млекопитающих серотонин имеет все компоненты, необходимые для осуществления его сигнальной функции, и влияет на функциональную активность клеток гранулы. В то же время накопление серотонина с помощью специфического транспортера SERT происходит преимущественно в ооцитах растущих овариальных фолликулов, и практически отсутствует в клетках гранулы. На экспериментальной модели культуры овариальных фолликулов проведен количественный анализ экспрессии мРНК маркеров пролиферации, апоптоза и функционального состояния фолликулярных клеток, а также ооцитарных факторов роста. Серотонин (1 мкМ) не проявляет выраженных митогенных, про- и антиапоптотических свойств и не влияет на экспрессию маркеров стероидогенеза. При этом серотонин стимулирует в клетках гранулы экспрессию генов циклинов *Cend1*, *Cend2*, *Ccne1*, а также *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgsfr*, *Igfbr* и *Ihh*. Кроме того, добавление серотонина приводит к увеличению экспрессии *Gdf9* в ооцитах. Наблюдается более выраженный по сравнению с первичной культурой клеток гранулы эффект серотонина, который во всех случаях, за исключением циклинов, отменяется флуоксетином (10 мкМ). Полученные результаты свидетельствуют о том, что функциональная активность клеток гранулы регулируется серотонином через его воздействие на ооцит и опосредовано активностью SERT.

**Ключевые слова:** мышь, яичник, овариальный фолликул, гранула, ооцит, серотонин, СИОЗС, флуоксетин, SERT, экспрессия генов

**DOI:** 10.31857/S0475145021020063

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что серотонин проявляет физиологическую активность на самых ранних стадиях индивидуального развития (Vuznikov, 2007) и продолжает играть важную роль плейотропного гормона вне нервной системы у взрослых животных (Amigault et al., 2013). Большая часть серотонина у позвоночных синтезируется энтерохромаффинными клетками желудочно-кишечного тракта, где он играет роль важного регулятора гладкомышечной моторики и секреторной активности (Mawe, Hoffman, 2013). Здесь же он попадает в кровяное русло и накапливается в тромбоцитах, играя важную роль в процессах вазоконстрикции и свертывания крови (Mercado, Kilic, 2010). Гуморальное воздействие циркулирующего серотонина на клетки может быть опосредовано активацией мембранных рецепторов, влекущей запуск соответствующих сигнальных каскадов, и/или захватом его

внутри клеток с помощью мембранного транспортера SERT, после чего он может участвовать в посттрансляционной модификации белков посредством серотонилирования (Paulmann et al., 2009). Изменения концентрации циркулирующего серотонина ассоциировано с рядом патологических состояний, как центральной нервной системы, так и периферических органов (Mercado, Kilic, 2010).

Одной из мишеней периферического серотонина является яичник, где он детектируется в физиологически активных концентрациях (Bodis et al., 1992) и имеет все компоненты, необходимые для осуществления его сигнальной функции (Dubé, Amigault, 2007). Несмотря на наличие экспрессии ферментов синтеза серотонина, основным механизмом, обеспечивающим накопление серотонина в яичнике, является его захват с помощью специфического транспортера SERT,

который происходит преимущественно в ооцитах растущих овариальных фолликулов, и практически отсутствует в клетках гранулезы (Nikishin et al., 2019). Наиболее выраженным физиологическим эффектом серотонина на функцию яичника, проявляющимся у разных видов млекопитающих, является активация секреции стероидных гормонов клетками гранулезы, которая опосредуется рецепторными механизмами (Korran et al., 2004). Нами ранее показано влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы, которое, ввиду отсутствия активности SERT, скорее всего, опосредовано активацией рецепторов (Никишин и др., 2018а). Однако, системное подавление механизма захвата серотонина путем нокаута гена *Sert* или применения селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), негативно влияет на функциональную активность клеток гранулезы, в том числе угнетает секрецию эстрадиола (Zha et al., 2017). По всей вероятности, накопление серотонина в ооцитах растущих фолликулов опосредованно влияет на функциональную активность клеток гранулезы.

Данная работа посвящена исследованию влияния серотонина на функциональный статус фолликулярных клеток в культуре изолированных овариальных фолликулов и выявлению роли механизма обратного захвата серотонина в этом процессе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные многослойные овариальные фолликулы в стерильных условиях выделяли из яичников мышей линии C57BL/6 (Питомник лабораторных животных “Столбовая”) в возрасте 14 дней. Яичники выделяли, разделяли на 8 частей, переносили в среду Лейбовица L15 (Biosera, Франция) с добавлением 50 мкг/мл Liberase DH (Roche, Швейцария) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. В процессе инкубации ткань яичника время от времени разрывали двумя инсулиновыми иглами. Изолированные фолликулы отмывали от ферментов и оценивали под контролем стереомикроскопа по следующим критериям: 1) диаметр 100–130 мкм; 2) поверхность гладкая и не повреждена; 3) один-два слоя клеток гранулезы (возможно наличие нескольких распластанных клеток теки); 4) наличие центрально расположенного округлого ооцита (см. рис. 3г). Овариальные фолликулы, отвечающие этим критериям, случайно переносили в лунки 6-луночного культурального планшета (Corning, США), содержащие 3 мл культуральной среды DMEM/F-12 (Панэко, Россия), с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 3 мМ аланил-глутамин (Панэко, Россия), 0.1 МЕ/мл ФСГ (Merck

Serono S.A., Швейцария), 0.1 мкМ андростендиона (Sigma-Aldrich, США), 100 ЕА/мл пенициллина (Панэко, Россия) и 0.1 мг/мл стрептомицина (Панэко, Россия) и культивировали в течение 6 суток в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C и ежедневной смене среды. Далее фолликулы, которые прикрепилась и активно росли (см. рис. 3д), отмывали от сыворотки и культивировали в среде DMEM/F-12 с добавлением 3 мМ аланил-глутамин, инсулин-трансферрин-селеновой добавки (Панэко, Россия), 0.1 МЕ/мл ФСГ, 0.1 мкМ андростендиона, 100 ЕА/мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина. В экспериментальных группах клеткам гранулезы добавляли 1 мкМ серотонина (5НТ); или 1 мкМ серотонина и 10 мкМ флуоксетина (5НТ + FLU). Смену культуральной среды проводили каждые 12 ч. Через 48 ч среду заменяли на DMEM/F-12 с добавлением 1 мг/мл коллагеназы I (Панэко, Россия) и 100 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 30 мин при 37°C и периодическом аккуратном пипетировании. Ооциты из диссоциированных фолликулов собирали стриппером под контролем стереомикроскопа и использовали для исследования экспрессии генов *Bmp6*, *Bmp15*, *Gdf9* и *Igf1*. Клетки гранулезы пропускали через 40 мкм сито (SPL Lifesciences, Корея) и осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 g, после чего использовали для исследования экспрессии генов *Bad*, *Bax*, *Bcl2*, *Casp3*, *Ccna1*, *Ccnb1*, *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Foxo3*, *Fshr*, *Has2*, *Igfbp4*, *Ihh*, *Lhcgr*, *Mki67*, *Trp53*, *Pena*, *Ptgr*, *Ptgs2* и *Star*.

Тотальную РНК из полученных проб выделяли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия), используя 3 мкг гликогена в качестве коосадителя, и обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Библиотеки кДНК синтезировали с помощью набора реактивов Maxima H Minus с применением рандомных гексаолигонуклеотидов (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческой смеси qPCRMix-HS SYBR+HighROX (Евроген, Россия). Относительную экспрессию генов (NRQ) рассчитывали методом ddCt с нормировкой на ген *Rps18* и контрольную пробу. Последовательности специфических олигонуклеотидов для проведения ПЦР приведены в табл. S1. Эксперимент проведен в четырех повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США) с применением *t*-критерия Вилкоксона.

Для оценки жизнеспособности фолликулов в ходе длительного культивирования, было проведено окрашивание фолликулов, претерпевших все экспериментальные манипуляции, реагентом

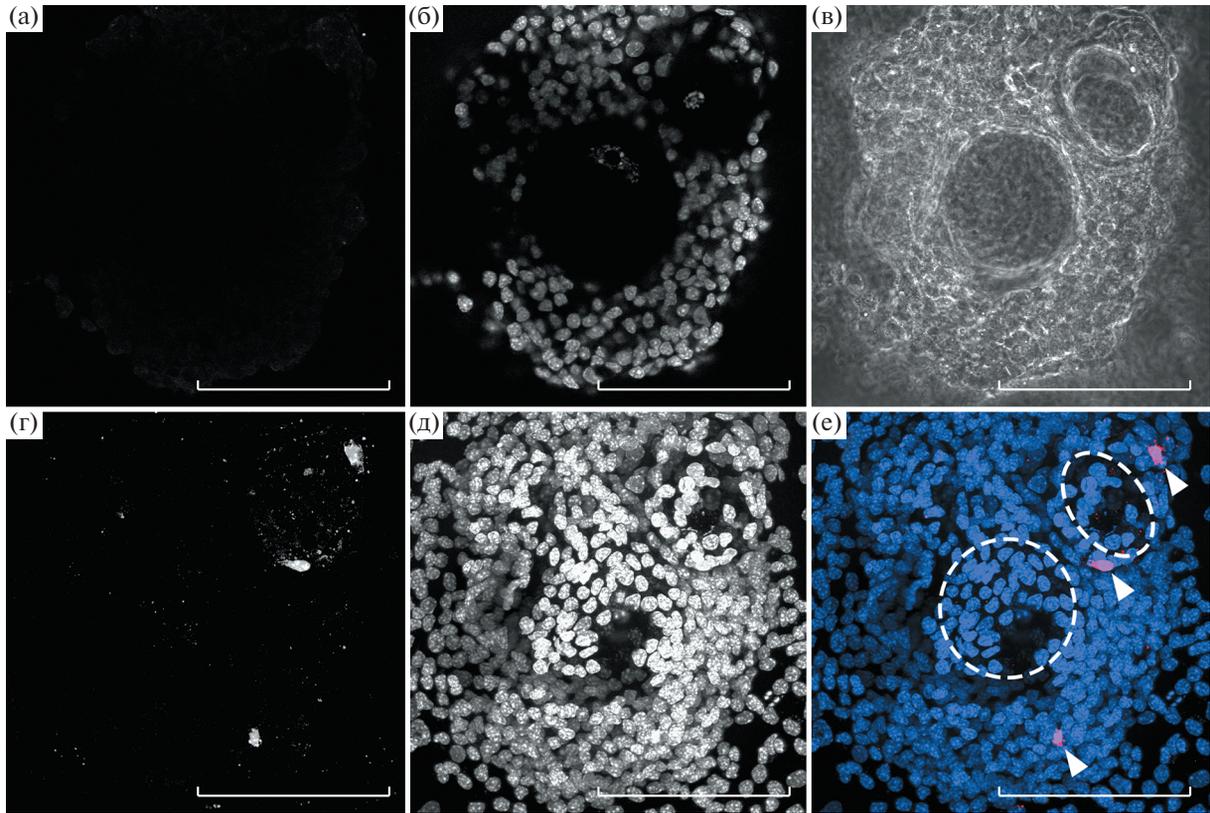
ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Red (Thermo Fisher Scientific, США) и последующее выявление живых и мертвых клеток на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV10i (Лаборатория конфокальной микроскопии ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова). Для оценки активности захвата серотонина компонентами овариального фолликула в условиях 2D-культуры, были проведены инкубации культивируемых фолликулов с 1 мкМ серотонина в течение 2 ч. Фолликулы фиксировали в 4%-м параформальдегиде (рН 7.5) и окрашивали кроличьими антителами против серотонина (S5545 Sigma-Aldrich, США, разведение 1 : 1000) и козьими антителами против Ig кролика, конъюгированными с флуорофором CF™568 (SAB4600085 Sigma-Aldrich, США). Специфичность иммуногистохимической реакции оценивали по отсутствию флуоресценции при окрашивании только вторичными антителами. Препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Zeiss LSM 880 (Группа оптических методов ЦКП ИБР РАН) и регистрировали иммунофлуоресценцию на среднем оптическом срезе при постоянных параметрах интенсивности лазера и чувствительности детектора. Уровень иммунофлуоресценции на полученных изображениях определяли с помощью программы ImageJ. Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа была выполнена на изолированных преантральных овариальных фолликулах, культивируемых на поверхности пластика (2D-культура) в течение 6 сут и 48 ч эксперимента. В ходе культивирования фолликулы прикреплялись к поверхности, распластывались и росли, оставаясь при этом морфологически целостными (см. рис. 1в). Проведенное в конце эксперимента выявление живых и мертвых клеток (рис. 1) показало, что в ходе культивирования как клетки гранулезы, так и ооциты остаются живыми (рис. 1б, 1д, 1е). Незначительное количество мертвых фолликулярных клеток выявлялось на поверхности некоторых фолликулов (рис. 1г, 1е). Иммуногистохимическое исследование активности захвата серотонина в овариальных фолликулах в условиях 2D-культуры показало, что при добавлении серотонина в среду происходит его накопление в ооцитах, тогда как в клетках гранулезы его количество не изменяется (рис. 2). Данные результаты полностью согласуются с данными, полученными ранее на изолированных овариальных фолликулах (Никишин и др., 2018б) и фрагментах овариальной ткани (Nikishin et al., 2019), что подтверждает адекватность используемой экспериментальной модели.

Функциональный статус овариального фолликула в период активного роста выражается, прежде всего, показателями функционального состояния клеток гранулезы – важнейшими из которых являются пролиферативная активность, отсутствие апоптоза, стероидогенная активность и маркеры степени дифференцировки (Kraus et al., 2017). Для оценки этих показателей в работе использовали количественный анализ экспрессии мРНК генов, являющихся маркерами функционального состояния клеток гранулезы (рис. 3а, 3б). Снижение пролиферативной активности, в сочетании с активацией механизмов клеточной гибели, является маркером атретических процессов (Zhen et al., 2014). При добавлении серотонина к культуре изолированных овариальных фолликулов гены-маркеры пролиферации *Mki67* и *Pena* (а также циклинов *Ccna1* и *Ccnb1*) не изменили уровень экспрессии относительно контроля. Это говорит об отсутствии выраженного митогенного эффекта серотонина на клетки гранулезы. В то же время, количественный анализ выявил достоверное увеличение уровня экспрессии циклина *Ccnd1* в 1.58 раз ( $p = 0.0294$ ), *Ccnd2* в 1.63 раз ( $p = 0.0409$ ) и *Ccne1* в 1.49 раз ( $p = 0.044$ ). Циклины D и E являются ключевыми регуляторными белками, которые способствуют переходу клеток к фазе S через фазу G1 (Bertoli et al., 2015). Селективный ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин не отменяет эффект серотонина на экспрессию циклинов, что говорит о том, что в данном эффекте не участвует SERT, и он, скорее всего, опосредован воздействием на рецепторы серотонина. Таким образом, эффект серотонина на пролиферативные свойства клеток гранулезы ограничивается влиянием на уровень экспрессии регуляторов клеточного цикла, но не приводит к увеличению пролиферации. Уровень апоптоза, особенно в условиях культуры, является очень важным показателем функционального статуса овариального фолликула. Серотонин, в зависимости от типа активируемого рецептора, способен выступать как про- так и антиапоптотическим агентом (Azmitia, 2001). В нашем эксперименте не выявлено статистически значимых изменений уровня экспрессии как генов-маркеров апоптоза *Bax*, *Bad*, *Bcl2*, *Casp3*, *Trp53*, так и *Foxo3*, который является инициатором апоптоза в клетках гранулезы, что указывает на отсутствие выраженного про- и антиапоптотического эффекта серотонина.

Важнейшими показателями функциональной активности соматических компонентов овариального фолликула является экспрессия ключевых стероидогенных ферментов, а также гена *Star*, кодирующего эффектор скорость-лимитирующей стадии стероидогенеза (Bao et al., 1997; Zhen et al., 2014). Несмотря на литературные данные о влиянии серотонина на стероидогенную актив-

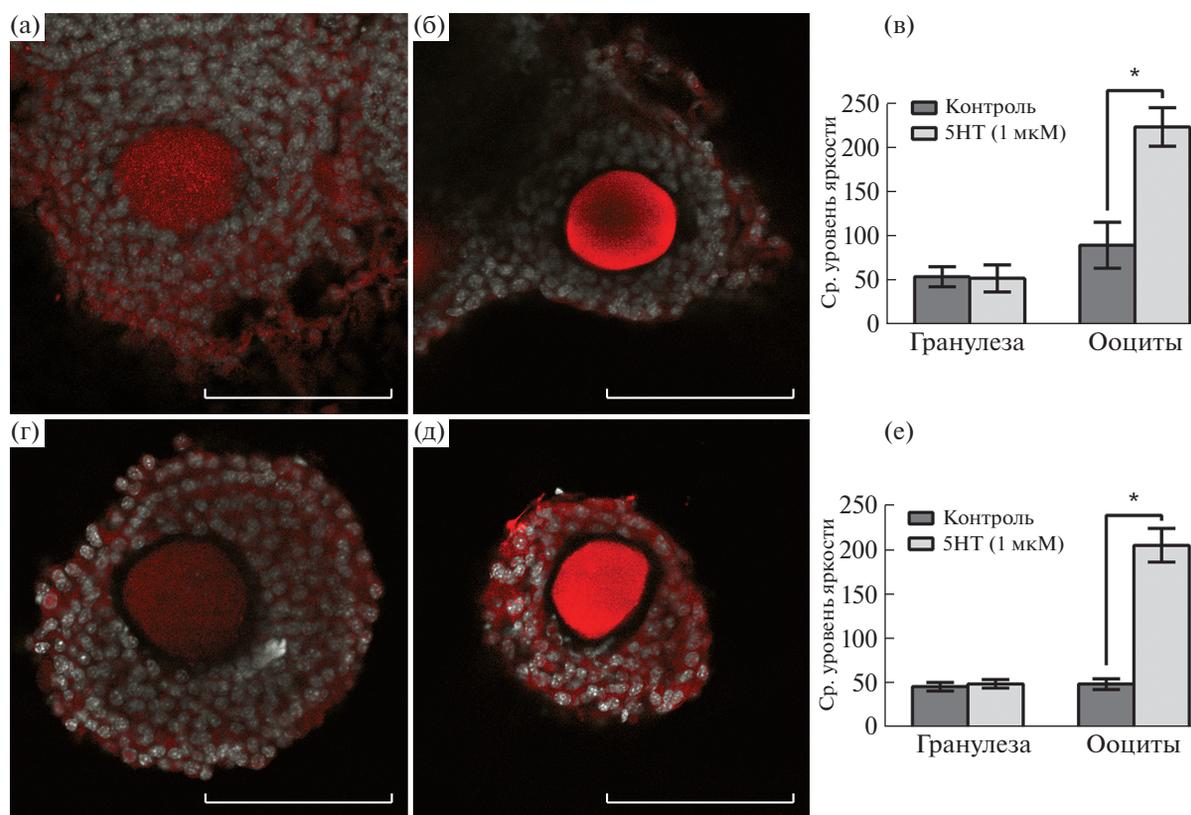


**Рис. 1.** Выявление живых и мертвых клеток в овариальных фолликулах после 6 сут предварительного культивирования и 48 ч культивирования в бессывороточной среде. (а, б) – срединный конфокальный оптический срез, проходящий через ядра ооцитов; (в) – микрофотография в фазовом контрасте; (г–е) – максимальная проекция стопки конфокальных микрофотографий. (а, г) – мертвые клетки, окрашенные йодидом пропидия; (б, в) – ядра живых клеток, окрашенные красителем Hoechst 33342; (е) – совмещенное изображение мертвых клеток (красный) и ядер живых клеток (синий), пунктиром обозначены границы ооцитов. Масштабный отрезок 100 мкм.

ность, при анализе экспрессии генов *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1* и *Star* достоверных различий между группами не выявлено. По всей видимости, описанные в литературе эффекты связаны с регуляцией активности компонентов системы синтеза стероидных гормонов на посттранскрипционных стадиях. Количественными маркерами степени дифференцировки клеток гранулы являются гены рецептора фолликулостимулирующего гормона *Fshr* и рецептора лютеинизирующего гормона *Lhcgr* (Bao et al., 1997), а также гиалуронансинтазы *Has2*, связывающего инсулиноподобный фактор роста белка *Igfbp4*, рецептора простагландина F2-альфа *Ptgfr*, циклооксигеназы *Ptgs2* и лиганда Hedgehog-сигнального пути *Ihh* (Zhen et al., 2014). При анализе экспрессии генов *Fshr* и *Lhcgr* достоверных различий между группами не выявлено. В то же время, уровень экспрессии гена *Ptgs2* при добавлении серотонина увеличивается в 4.59 раз ( $p = 0.0425$ ), *Has2* – в 2.26 раз ( $p = 0.0492$ ), *Igfbp4* – в 1.56 раз ( $p = 0.0373$ ), *Ihh* – 1.5 раз ( $p = 0.0045$ ), *Ptgfr* – в 1.4 раз ( $p = 0.0172$ ). При этом добавление флуоксетина снижает уровень экс-

прессии генов до уровня, статистически не отличающегося от контроля, что говорит о наличии вклада захвата серотонина в реализацию этого эффекта. Экспрессия данных генов характерна для зрелых клеток кумулюса, в которых они обеспечивают синтез межклеточного матрикса, необходимого для экспансии кумулюса, и функционирование ключевых механизмов межклеточной сигнализации (Diaz et al., 2007). Таким образом, серотонин проявляет признаки фактора, способствующего созреванию клеток гранулы и их дифференцировке в направлении кумулюса.

Одной из целей данной работы было сопоставление полученных результатов с эффектами серотонина, наблюдаемыми в экспериментах на первичной культуре клеток гранулы, в отсутствие возможного влияния ооцитов (см. рис. 4). При прямом воздействии серотонина на клетки гранулы наблюдался сходный эффект на экспрессию генов-показателей их функциональной активности, однако статистически значимый эффект наблюдался только для генов *Ccnd1*, *Has2* и *Ihh* (Нишкин и др., 2018а). В культуре изолированных

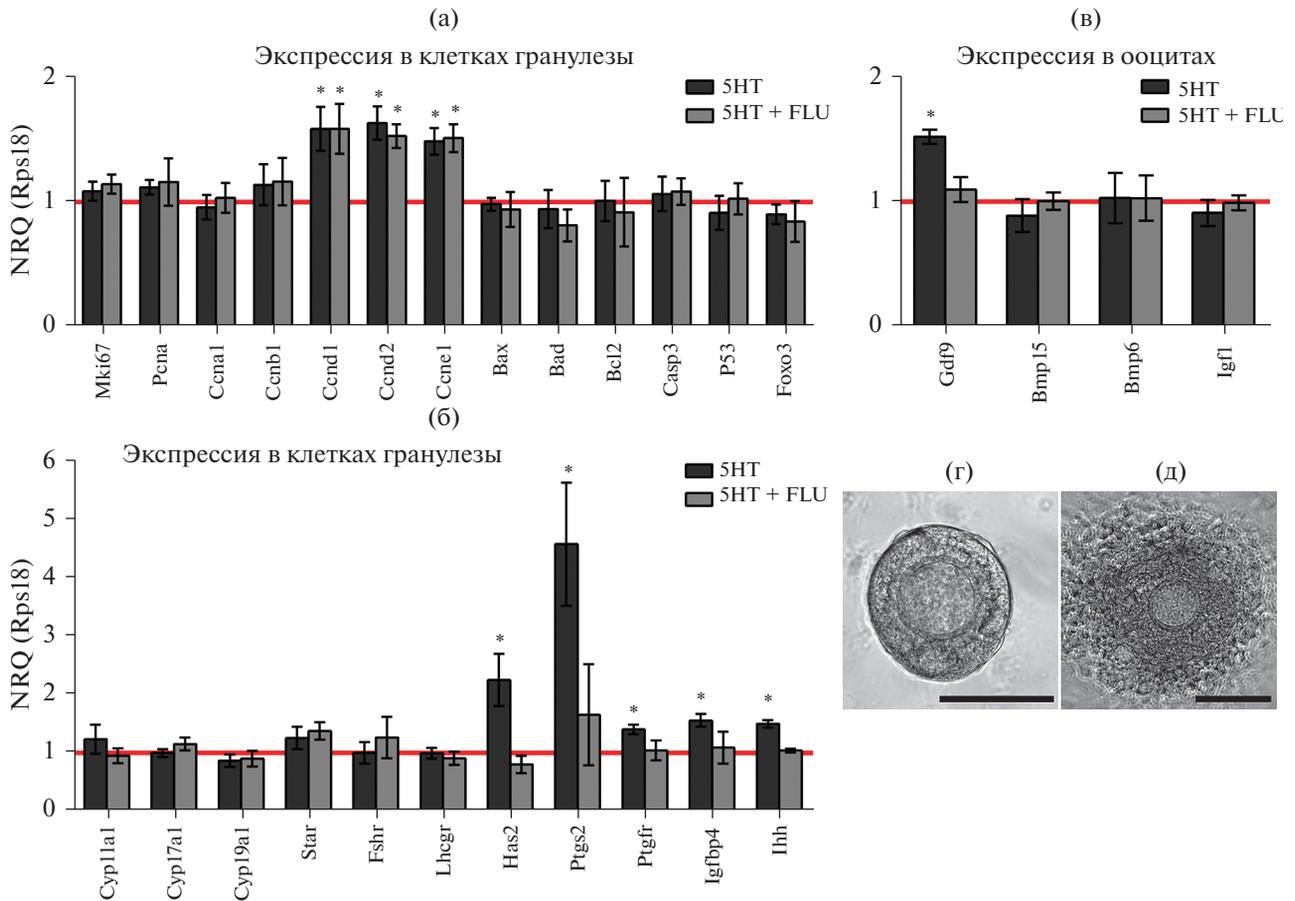


**Рис. 2.** Иммуногистохимическое выявление активности захвата серотонина в культуре овариальных фолликулов. (а, б, г, д) – совмещенные конфокальные срединные оптические срезы овариальных фолликулов, культивируемых в течение 6 сут (а, б), и дополнительно культивируемых в бессывороточной среде в течение 48 ч (г, д), окрашенных анти-телами против серотонина (красный) и красителем Hoechst 33342 (белый). (а, г) – контроль; (б, д) – инкубация с 1 мкМ серотонина в течение 2 ч. Масштабный отрезок 100 мкм. (в, е) – измерение уровня иммунофлуоресценции серотонина в клетках гранулезы и ооцитах овариальных фолликулов, культивируемых в течение 6 сут (в), и дополнительно культивируемых в бессывороточной среде в течение 48 ч (е).  $M \pm SD$ , \* –  $p < 0.0001$  по  $t$ -критерию Стьюдента.

овариальных фолликулов наблюдается более выраженный эффект серотонина, что, по всей вероятности, объясняется большей восприимчивостью клеток гранулезы к воздействию серотонина в этих условиях, более приближенных к нативному состоянию. Известно, что ооциты теснейшим образом связаны с фолликулярными клетками и взаиморегулируют их функциональное состояние (Kidder, Vanderhyden, 2010). Логично предполагать, что усиление влияния серотонина на функциональную активность клеток гранулезы связано с дополнительным воздействием ооцитов. В пользу этого предположения говорит отмена наблюдаемых эффектов при ингибировании обратного захвата серотонина, который активен в ооцитах, но не в клетках гранулезы. Учитывая, что, помимо мембранного транспортера серотонина, в ооцитах экспрессируется везикулярный транспортер моноаминов (Никишин и др., 2018в), есть вероятность, что ооцит экскретирует накопленный серотонин и создает вокруг себя локальную область его повышенной концентрации, усиливая таким образом его воздействие на клетки грану-

лезы. С другой стороны, серотонин во многих типах клеток играет роль регулятора секреторной активности (Paulmann et al., 2009). Серотонин, накопленный в ооците, вероятно, может влиять на секрецию белковых факторов роста, играющих важную роль в поддержании полноценной жизнедеятельности фолликулярных клеток (Kidder, Vanderhyden, 2010).

Для проверки этого предположения, исследованы эффекты серотонина и флуоксетина на экспрессию в ооцитах ключевых факторов роста, регулирующих функциональный статус фолликулярных клеток (рис. 3в). В культуре изолированных фолликулов при воздействии серотонина уровень экспрессии *Bmp15*, *Bmp6*, *Igf1* в ооцитах не изменяется, при этом *Gdf9* – увеличивается в 1.52 раз ( $p = 0.0116$ ), причем в присутствии флуоксетина данный эффект снижается, что говорит о вовлеченности механизмов транспорта серотонина в этот эффект. Известно, что GDF9 является одним из ключевых факторов, регулирующих процесс фолликулогенеза на стадии фолликуляр-



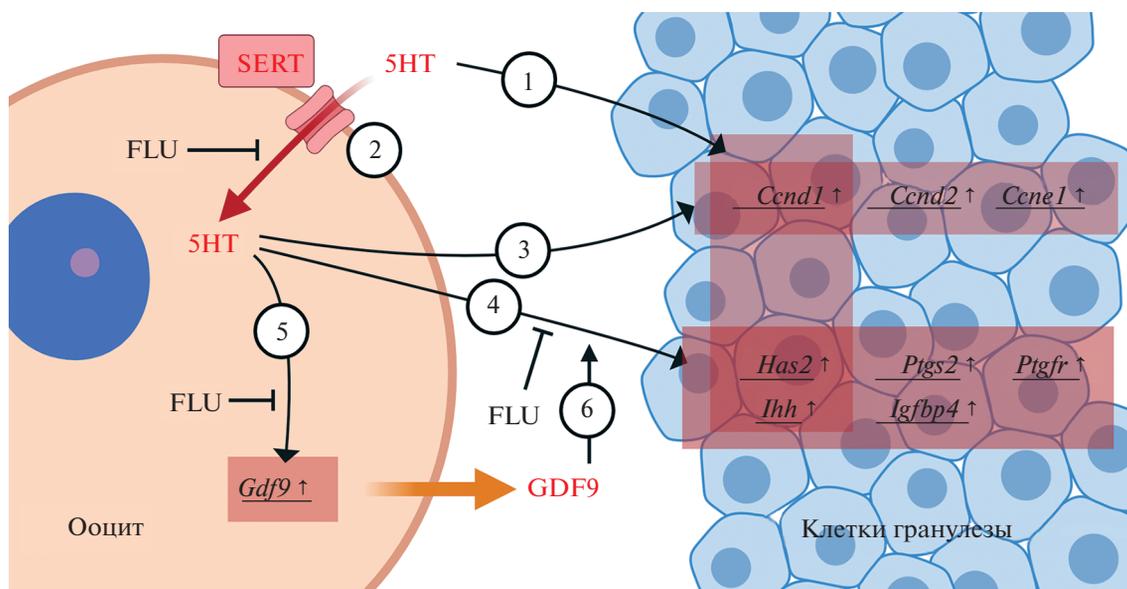
**Рис. 3.** Эффект серотонина и флуоксетина на функциональный статус овариальных фолликулов в культуре *in vitro*. (а–в) – изменение уровня экспрессии в клетках гранулезы маркеров их функциональной активности (а, б) и уровня экспрессии в ооцитах факторов роста (в) в культуре изолированных овариальных фолликулов при добавлении 1 мкМ серотонина (5HT) и 1 мкМ серотонина с 10 мкМ флуоксетина (5HT + FLU). NRQ – нормированная на контрольную пробу относительная экспрессия гена, в качестве референсного гена использовали *Rps18*. Красной линией обозначена экспрессия генов в контрольной пробе, принятая за 1. \* –  $p < 0.05$  по *t*-критерию Вилкоксона. (г–д) – первичный многослойный овариальный фолликул сразу после изоляции (г) и через 6 дней культуры *in vitro* (д). Масштабный отрезок 100 мкм.

ного роста и овуляции. Так, например, под действием GDF9 в клетках кумулюса возрастает экспрессия генов *Has2* и *Ptgs2* (Gui, Joyce, 2005). По всей видимости, захват серотонина ооцитами в растущих овариальных фолликулах, действительно, способствует синтезу и секреции факторов, которые влияют на функциональную активность клеток гранулезы.

Механизм влияния захвата серотонина ооцитом на экспрессию генов и секрецию факторов роста пока остается неясным. Возможность внутриклеточной сигнальной активности серотонина является предметом многолетних дискуссий – именно на ооцитах и ранних эмбрионах были получены фармакологические свидетельства внутриклеточной активности серотониновых рецепторов, которая остается неисследованной (Шмуклер, Никишин, 2018). С другой стороны, внутри клетки серотонин способен принимать участие в регуляции

активности белков путем их серотонилирования (Bader, 2019). Этот механизм задействован в регуляции секреторной активности в тромбоцитах (Walther et al., 2003) и  $\beta$ -клетках поджелудочной железы (Paulmann et al., 2009), может влиять на экспрессию генов путем модификации гистонов (Farrelly et al., 2019) и, вполне вероятно, также активен в ооцитах.

Таким образом, в экспериментах на культуре изолированных овариальных фолликулов выявлены эффекты серотонина на экспрессию нескольких генов-показателей функциональной активности клеток гранулезы (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Igfbp* и *Ihh*), а также важнейшего ооцитарного фактора роста *Gdf9*. Большая часть наблюдаемых эффектов отменяется флуоксетином, следовательно, опосредована активностью специфического транспортера серотонина SERT. Полученный результат является очень важным свидетельством того, что овариальный серотонин



**Рис. 4.** Схема прямого и опосредованного ооцитом влияния серотонина (5HT) на функциональную активность клеток гранулезы. В культуре клеток гранулезы (1) серотонин стимулирует экспрессию циклина D1 *Ccnd1*, гиалуронансинтазы *Has2* и сигнальной молекулы *Ihh* (по: Никишин и др., 2018). В культуре растущих овариальных фолликулов (2–5) происходит (2) накопление серотонина в ооцитах за счет активности мембранного транспортера SERT, которая ингибируется флуоксетином (FLU). (3) Серотонин стимулирует в клетках гранулезы экспрессию циклинов *Ccnd1*, *Ccnd2* и *Ccne1*, ответственных за переход к синтетической фазе клеточного цикла. Эффект не отменяется флуоксетином. (4) Серотонин стимулирует экспрессию в клетках гранулезы маркеров зрелости *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Ihh* и *Igfbp4*. Эффект отменяется флуоксетином. (5) Серотонин стимулирует экспрессию в ооцитах фактора роста *Gdf9*. Эффект отменяется флуоксетином. (6) GDF9 является регулятором функционального состояния фолликулярных клеток (Gui, Joусе, 2005).

воздействует на функциональную активность клеток гранулезы опосредованно через влияние на ооцит, и требует дальнейшего более внимательного исследования.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН и ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0003. Исследование эффектов флуоксетина выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00143).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.А. Никишин придумал и разработал эксперименты, провел анализ данных и написал статью. Ю.В. Храмова и Л.А. Мальченко выполнили культуральную работу и поставили эксперименты. Н.М. Алешина выполнила молекулярно-генетический анализ. Ю.Б. Шмуклер курировал исследование и участвовал в подготовке текста.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблица S1 доступна на сайте <https://link.springer.com/journal/11174/volumes-and-issues>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л. и др. Влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы в культуре *in vitro* // *Фундаментальные аспекты психического здоровья*. 2018а. № 4. С. 12–17.
- Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развиваю-

- щется овариальном фолликуле мыши // ДАН. 2018б. Т. 478. № 1. С. 103–106.
- Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С. и др. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши // Онтогенез. 2018в. Т. 49. № 3. С. 208–216.
- Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. О внутриклеточной рецепции медиаторов // Нейрохимия. 2018. Т. 35. № 4. С. 289–293.
- Amireault P., Sibon D., Côté F. Life without peripheral serotonin: Insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks // ACS Chem. Neurosci. 2013. V. 4. № 1. P. 64–71.
- Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // Brain Res. Bull. 2001. V. 56. № 5. P. 413–424.
- Bader M. Serotonylation: Serotonin signaling and epigenetics // Front. Mol. Neurosci. 2019. V. 12. P. 288.
- Bao B., Garverick H.A., Smith G.W. et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles // Biol. Reprod. 1997. V. 56. № 5. P. 1158–1168.
- Bertoli C., Skotheim J.M., Bruin R.A.M.De. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2015. V. 14. № 8. P. 518–528.
- Bòdis J., Bognàr Z., Hartmann G. et al. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment // Gynecol. Obstet. Invest. 1992. V. 33. № 3. P. 165–167.
- Buznikov G.A. Preneuronal transmitters as regulators of embryogenesis. Current state of problem // Russ. J. Dev. Biol. 2007. V. 38. № 4. P. 213–220.
- Diaz F.J., Wigglesworth K., Eppig J.J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles // J. Cell Sci. 2007. V. 120. № 8. P. 1330–1340.
- Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // Life Sci. 2007. V. 81. № 25–26. P. 1627–1637.
- Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S. et al. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3 // Nature. 2019. V. 567. № 7749. P. 535–539.
- Gui L.-M., Joyce I.M. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice // Biol. Reprod. 2005. V. 72. № 1. P. 195–199.
- Kidder G.M., Vanderhyden B.C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: Ensuring oocyte developmental competence // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2010. V. 88. № 4. P. 399–413.
- Koppa M., Bodis J., Verzar Z. et al. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system // Endocrine. 2004. V. 24. № 2. P. 155–159.
- Kranc W., Budna J., Kahan R. et al. Molecular basis of growth, proliferation, and differentiation of mammalian follicular granulosa cells // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2017. V. 31. № 1. P. 1–8.
- Mawe G.M., Hoffman J.M. Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013. V. 10. № 8. P. 473–486.
- Mercado C.P., Kilic F. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels // Mol. Interv. 2010. V. 10. № 4. P. 231–241.
- Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L. et al. Analysis of expression and functional activity of aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) and serotonin transporter (SERT) as potential sources of serotonin in mouse ovary // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 12. P. 3070.
- Paulmann N., Grohmann M., Voigt J.-P. et al. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation // PLoS Biol. 2009. V. 7. № 10. P. e1000229.
- Walther D.J., Peter J.-U., Winter S. et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release // Cell. 2003. V. 115. № 7. P. 851–862.
- Zha W., Ho H.T.B., Hu T. et al. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1137.
- Zhen Y.-H., Wang L., Riaz H. et al. Knockdown of CEBPβ by RNAi in porcine granulosa cells resulted in S phase cell cycle arrest and decreased progesterone and estradiol synthesis // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2014. V. 143. P. 90–98.

## Oocyte-Mediated Effect of Serotonin on the Functional Status of Granulosa Cells

D. A. Nikishin<sup>1, \*</sup>, Y. V. Khramova<sup>2</sup>, N. M. Alyoshina<sup>1</sup>, L. A. Malchenko<sup>1</sup>, and Y. B. Shmukler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: d.nikishin@idbras.ru

In the mammalian ovary, serotonin has all the components necessary for the implementation of its signaling function and affects the functional activity of granulosa cells. At the same time, the accumulation of serotonin by the specific transporter SERT occurs mainly in oocytes of growing ovarian follicles and is practically absent in granulosa cells. A quantitative analysis of the expression of mRNA markers of proliferation, apoptosis, and the functional state of follicular cells, as well as oocyte-derived growth factors, was carried out on an experimental model of the ovarian follicles culture. Serotonin (1 μM) does not show pronounced mitogenic,

pro- and anti-apoptotic properties and does not affect the expression of markers of steroidogenesis. At the same time, serotonin stimulates the expression of genes of cyclins *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccne1*, as well as *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgfr*, *Igfbp*, and *Ihh* in granulosa cells. Also, the addition of serotonin leads to an increase in *Gdf9* expression in oocytes. A more pronounced effect of serotonin in comparison with the primary culture of granulosa cells is observed, which in all cases, except for cyclins, is canceled by fluoxetine (10  $\mu$ M). The results obtained indicate that the functional activity of granulosa cells is regulated by serotonin through its effect on the oocyte and is mediated by the SERT activity.

*Keywords:* mouse, ovary, ovarian follicle, granulosa, oocyte, serotonin, SSRIs, fluoxetine, SERT, gene expression

**БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)**

УДК 597.552.511:577.115:591.543.1

**ВЛИЯНИЕ ФОТОПЕРИОДА НА ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ СЕГОЛЕТОК (0+)  
АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L.  
ПРИ ЗАВОДСКИХ УСЛОВИЯХ ВЫРАЩИВАНИЯ**

© 2021 г. Н. Н. Немова<sup>а</sup>, \*, З. А. Нефедова<sup>а</sup>, С. А. Мурзина<sup>а</sup>,  
С. Н. Пеккоева<sup>а</sup>, В. П. Воронин<sup>а</sup>, Т. Р. Руоколайнен<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

\*e-mail: [nnpnetova@gmail.com](mailto:nnpnetova@gmail.com)

Поступила в редакцию 25.06.2020 г.

После доработки 04.10.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Получены новые данные о влиянии дополнительного освещения на липидный профиль сеголеток 0+ атлантического лосося в процессе роста и развития при искусственном выращивании в заводских условиях. Изучено влияние разных световых режимов: заводское освещение (контроль), экспериментальные режимы – 16 ч освещения и 8 ч затемнения (16:8), постоянное освещение (24:0). У сеголеток, развитие которых проходило в условиях экспериментальных режимов фотопериода, обнаружены специфические модификации липидного профиля, главным образом – в содержании структурных липидов (фосфолипидов), а также индексов соотношений структурных и запасных липидов: холестерин/фосфолипиды (ХЛ/ФЛ) и триацилглицерины/фосфолипиды (ТАГ/ФЛ). Эти изменения в большей степени проявились у молоди лосося, выращиваемой при круглосуточном освещении (24:0).

*Ключевые слова:* липиды, фотопериод, атлантический лосось, искусственное выращивание

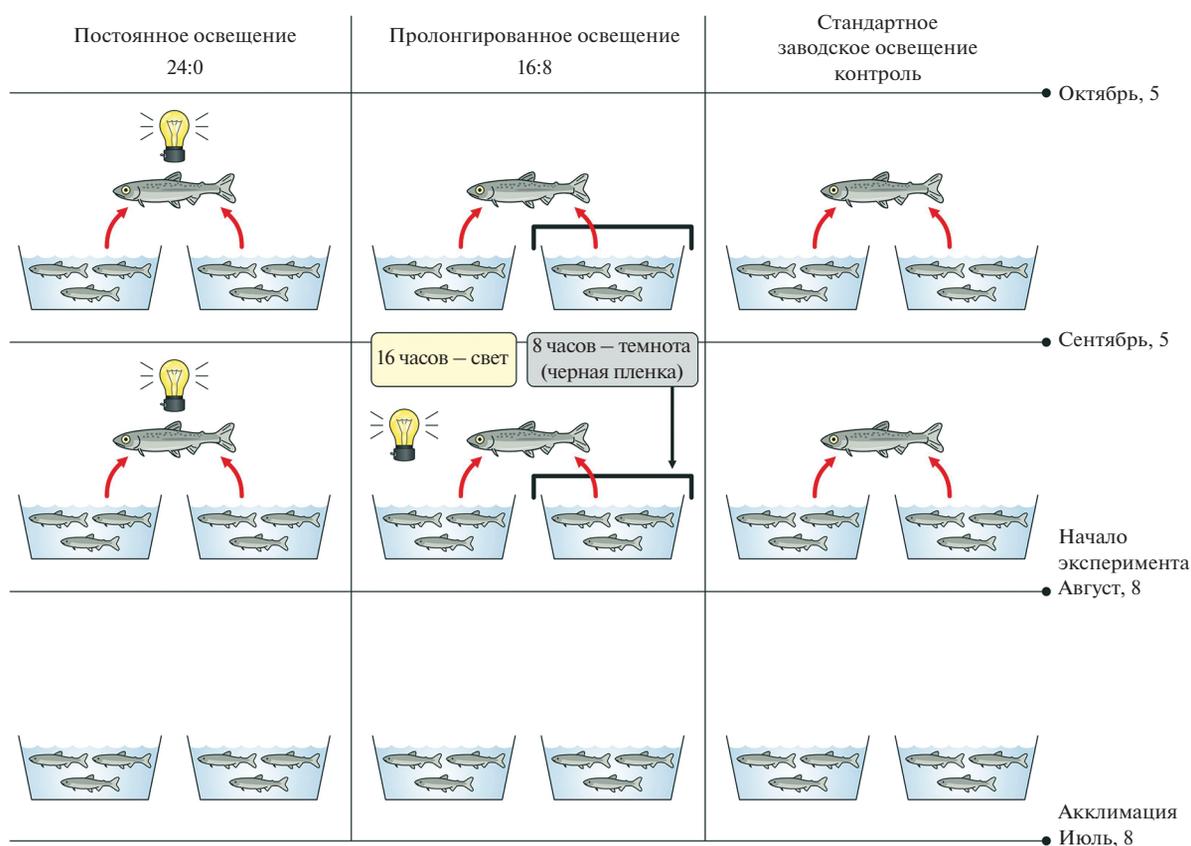
DOI: 10.31857/S0475145021020051

## ВВЕДЕНИЕ

Свет, как абиотический фактор, воздействует на разные аспекты жизнедеятельности рыб. Для каждого вида рыб характерен определенный оптимальный диапазон освещенности, при котором улучшается физиологическое состояние организма, происходит накопление массы. Поэтому при искусственном выращивании молоди лососевых и других видов рыб нередко используются регулируемые световые режимы, которые влияют на рост и развитие молоди (Villargreal et al., 1988; Mäkinen, Ruohonen, 1992; Voef, Le Bail, 1999; Taylor et al., 2006; Björnsson et al., 2011). В исследованиях на молоди рыб (форель, белый толстолобик, карп, щука), подращиваемой при переменном световом режиме (искусственном и естественном освещении), показано отличие более высокой скорости роста и максимальной выживаемости (Власов и др., 2013). Например, у карповых рыб при круглосуточном освещении возрастает эффективность конвертирования пищи (Ручин, 2012), в мышцах осетра при переменных режимах (12-часовой смене освещенности) повышается содержание липидов и белков на фоне

снижения их оводненности (Ручин, 2007). Показано, что увеличение светового режима с 8 до 16 ч стимулирует рост и развитие молоди лососевых рыб, повышается эффективность потребления корма и его конвертация (Clarke, 1981; Бретт, 1983). Предшествующие условия жизни молоди лосося (сеголеток 0+), связанные с изменением температуры и продолжительностью светового периода, могут в дальнейшем повлиять на сроки смолтификации двухлеток лосося (1+) (Metcalf, Thorpe, 1990), что важно при их заводском выращивании, поскольку в этом возрасте происходит выпуск молоди в природную среду для поддержания численности природной популяции атлантического лосося.

Известно, что липиды в значительной степени обеспечивают адаптационные способности организма в ответ на специфические условия искусственной среды, включая фотопериод, температуру, аэрацию среды и др. (Murzina et al., 2009; Nemova et al., 2020) и тем самым могут считаться индикаторами роста и развития жизнеспособной молоди лосося. В настоящей работе оценили влияние разных световых режимов (заводское осве-



**Рис. 1.** Схема эксперимента по оценке влияния различных режимов фотопериода на липидный профиль сеголеток атлантического лосося, выращиваемых в условиях Выгского рыбзавода.

щение – контроль, экспериментальные режимы – пролонгированное освещение – 16 ч света и 8 ч затемнения, постоянное освещение – 24 ч) на липидный профиль и рост сеголеток 0+ атлантического лосося в условиях искусственного выращивания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В июле сеголетки (0+) атлантического лосося были перенесены из инкубационного центра в выростные бассейны Выгского рыбноводного завода (Республика Карелия) при достижении соответствующей массы (0.96–1.00 г). После недельной адаптации, в начале августа, был поставлен эксперимент по влиянию разных режимов фотопериода (контроль–заводские условия, режимы 16:8 и 24:0) на липидный профиль сеголеток лосося. В дальнейшем пробы молоди лосося отбирали для биохимического анализа липидов дважды – в сентябре и октябре. Молодь лосося содержалась в бассейнах размером 2 × 2 м. Для каждого из исследуемых экспериментальных режимов освещения, а также для заводского режима (контроль) были определены по два бассейна. Из каждого бассейна с соответствующим режимом освеще-

ния забирали равное количество рыб, для формирования смешанной выборки ( $n = 20$ ). Тем самым, исследовали три группы рыб: контрольная – заводское освещение, экспериментальные – 16:8 (16 ч света и 8 ч затемнения) и круглосуточное/постоянное освещение, 24:0. Описание режимов освещения было ранее представлено в работе Н.Н. Немовой с соавторами (Nemova et al., 2020), в которой обсуждались данные по жирным кислотам и массе у молоди лосося в эксперименте с фотопериодом. Схема эксперимента дана на рис. 1.

Экспериментальные бассейны были оборудованы двумя светодиодными светильниками (AquaLED smart led sunny, 6 W, 6500 K), а для создания затемнения бассейны накрывали черной, непроницающей свет пленкой. Переключение режимов происходило автоматически с помощью розеток-таймеров (Feron TM-50). Все остальные условия содержания для всех бассейнов были одинаковыми: плотность посадки, режим кормления и корм (согласно потребностям возрастной группы), профилактические меры и уход за бассейнами. Для молоди лосося, выращиваемой в условиях завода, использовали коммерческий корм марки BioMar Inicio plus G (Biomar, Danmark) (стартовый корм для сеголеток 0+).

Количество сеголеток, содержащихся в бассейнах составило: 7541 шт. (контроль), 7361 шт. (режим 16:8) и 7400 (режим 24:0). Вода в бассейны поступала с Маткожненского водохранилища (р. Нижний Выг). Температурный режим был естественный. Значения температуры за период исследования составили в августе 18.2–13.8°C, сентябре 13.8–9.8°C, октябре 9.8–2.4°C. Эксперимент проводился до конца октября. Пробы рыб (тушки рыб) на липидный анализ брали в конце каждого месяца.

Взвешивание рыб проводили каждый месяц (по 3–5 раз в месяц) на заводе. Чипирование сеголеток не проводилось вследствие их маленьких размеров, поэтому данные по массе рыб получали по результатам повторных взвешиваний по 70–100 особей вместе. Средняя масса молоди лосося 0+ в начале исследования в разных бассейнах составляла:  $0.96 \pm 0.07$  (контроль),  $1.00 \pm 0.04$  (режим 16:8),  $0.96 \pm 0.03$  (режим 24:0). За весь период эксперимента было собрано 465 проб сеголеток. Кроме того, следует отметить, что “отход” в бассейнах с экспериментальным освещением был ниже по сравнению с контрольным (139 шт., 1.84%) и составил 45 особей (0.61% – режим 16:8), 72 (0.97% – режим 24:0).

Экстракцию липидов из отобранных образцов (тушка) молоди лосося проводили по методу Фолча (Folch et al., 1957) и Кейтс (Кейтс, 1975). Затем липиды концентрировали с помощью роторно-вакуумной установки Heidolph Hei-Vap (Heidolph, Германия). Выделенные суммарные липиды и обезжиренный остаток (включающий белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и микроэлементы) сушили до постоянной массы.

Качественное и количественное определение отдельных липидных классов осуществляли при помощи метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Фракционирование общих липидов проводили на пластинках на стеклянной основе – HPTLC Silicagel 60 F<sub>254</sub> Premium Purity (Merck, Германия). Нанесение экстракта липидов осуществлялось при помощи полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцария) микрошприцом на 100 мкл штриховым методом. В качестве элюента, а также раствора для насыщения хроматографической камеры ADC2 (CAMAG, Швейцария), использовалась система растворителей гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (32 : 8 : 0.8 по объему) (Olsen, Henderson, 1989). Насыщение хроматографической камеры проводили в течение 20 мин с одновременным контролем влажности (10 мин), после чего проводилось насыщение пластины (20 минут). Дистанция подвижной фазы составляла 80 мм ( $R_f$  конечная = 80 мм), сушка пластины осуществлялась в течение 5 мин. Проявление липидных пятен проводили в растворе медного купороса

(CuSO<sub>4</sub>) с ортофосфорной кислотой (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) и нагреванием пластины до 160°C в течение 15 мин (Hellwig, 2008). Качественное и количественное определение липидных компонентов было выполнено в камере денситометра TLC Scanner 4 (CAMAG, Швейцария) на дейтериевой лампе при длине волны 350 нм в режиме адсорбции (Hellwig, 2008). Идентификация липидных классов проводилась по референтным стандартам соответствующих компонентов (Sigma-Aldrich, США) с учетом соответствия значений  $R_f$ . В составе общих липидов анализировали: общие фосфолипиды (ФЛ), триацилглицерин (ТАГ), диацилглицерин (ДАГ), холестерин (ХС), эфиры холестерина (ЭХС), свободные жирные кислоты (СЖК).

Состав индивидуальных фосфолипидов – фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ), сфингомиелина (СФМ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ) анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на стальной колонке Nucleosil 100-7 (“Элсико”, Москва), используя элюент ацетонитрил–гексан–метанол–ортофосфорная кислота (918 : 30 : 30 : 17.5). Детектирование проводили по степени поглощения света при 206 нм (Arduini et al., 1996). Соотношение между компонентами оценивали по величинам площадей пиков на хроматограммах.

Данные в табл. 1 и 2 представлены в виде  $M \pm SE$  (ошибка среднего арифметического). Обработка результатов проводилась при помощи непараметрического метода теста ранговых сумм Вилкоксона–Манна–Уитни в открытой среде программирования R (Коросов, Горбач, 2007). Различия считаются достоверными при  $p \leq 0.05$ .

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований по влиянию разных режимов фотопериода на липидный профиль сеголеток лосося при его искусственном выращивании представлены в табл. 1 и 2.

У сеголеток из трех бассейнов с разным режимом освещения, включая контрольный, отобранных в сентябре, липидный профиль достоверно не отличался по содержанию ОЛ (в пределах 26.59–27.13% сухой массы), в том числе суммарных ФЛ (3.69–4.02%) и ДАГ (1.22–1.24%). При режимах 16:8 и 24:0 у сеголеток отмечено достоверно значимое снижение количества ХС, минорных ФИ и ФС, а также снижение ЛФХ и ЭХС – при режиме 24:0, индекса ХС/ФЛ – при 16:8.

**Таблица 1.** Содержание общих липидов и липидных классов (фосфолипиды, триацилглицерины, диацилглицерины, эфиры холестерина, холестерин, свободные жирные кислоты) (% сухой массы) у сеголеток атлантического лосося (*Salmo salar* L.), выращиваемых на Выгском рыбноводном заводе при разных световых режимах. Обозначения: *n* – число проб, 16:8 – 16 ч освещения и 8 ч затемнения, 24:0 – постоянное освещение, ОЛ – общие липиды, ФЛ – фосфолипиды, ТАГ – триацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины, ЭХС – эфиры холестерина, ХС – холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты

Месяц	Сентябрь			Октябрь		
	Контроль	16:8	24:0	Контроль	16:8	24:0
Режим освещения						
<i>n</i>	20	20	20	20	20	20
Масса*, г	2.47 ± 0.09	2.51 ± 0.08	2.62 ± 0.19	3.68 ± 0.13 <sup>A</sup>	3.50 ± 0.15 <sup>A</sup>	3.74 ± 0.24 <sup>A</sup>
Масса*, г min–max	1.88–3.09	1.90–3.01	1.55–4.30	3.04–4.7	2.58–4.94	2.49–5.45
Длина (TL)*, см	6.12 ± 0.05	6.09 ± 0.07	6.18 ± 0.14	7.16 ± 0.08 <sup>A</sup>	7.04 ± 0.10 <sup>A</sup>	7.12 ± 0.14 <sup>A</sup>
Длина (TL)*, см min–max	5.8–6.5	5.5–6.4	5.4–7.3	6.72–7.73	6.44–7.92	6.22–8.15
ОЛ	27.13 ± 0.34	26.80 ± 0.91	26.59 ± 0.39	32.81 ± 0.87 <sup>A</sup>	34.23 ± 0.78 <sup>A</sup>	32.72 ± 0.94 <sup>A</sup>
ФЛ	4.02 ± 0.08	3.69 ± 0.13	3.84 ± 0.07	5.66 ± 0.36 <sup>A</sup>	5.67 ± 0.13 <sup>A</sup>	4.68 ± 0.11 <sup>A1, 2</sup>
ДАГ	1.22 ± 0.03	1.22 ± 0.06	1.24 ± 0.03	1.37 ± 0.10	1.26 ± 0.04	1.15 ± 0.03 <sup>1, 2</sup>
ХС	3.64 ± 0.04	3.19 ± 0.11 <sup>1</sup>	3.45 ± 0.06 <sup>1, 2</sup>	4.35 ± 0.12 <sup>A</sup>	4.80 ± 0.09 <sup>A1</sup>	4.55 ± 0.11 <sup>A2</sup>
СЖК	1.48 ± 0.06	1.49 ± 0.07	1.80 ± 0.07 <sup>1, 2</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>A1</sup>	0.95 ± 0.04 <sup>A1</sup>
ТАГ	15.00 ± 0.22	15.34 ± 0.52 <sup>1</sup>	14.85 ± 0.23 <sup>2</sup>	18.26 ± 0.73 <sup>A</sup>	19.39 ± 0.56 <sup>A</sup>	19.77 ± 0.69 <sup>A</sup>
ЭХС	1.77 ± 0.05	1.86 ± 0.08	1.41 ± 0.05 <sup>1, 2</sup>	2.45 ± 0.15 <sup>A</sup>	2.20 ± 0.13	1.63 ± 0.06 <sup>A1, 2</sup>
ХС/ФЛ	0.91 ± 0.02	0.87 ± 0.01 <sup>1</sup>	0.90 ± 0.02	0.79 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.85 ± 0.01	0.97 ± 0.01 <sup>A1, 2</sup>
ТАГ/ФЛ	3.75 ± 0.06	4.17 ± 0.07 <sup>1</sup>	3.87 ± 0.03 <sup>2</sup>	3.4 ± 0.21	3.43 ± 0.09 <sup>A</sup>	4.22 ± 0.08 <sup>A1, 2</sup>

Примечание. \* – размерно-весовые характеристики сеголеток взятых для биохимического анализа, <sup>A</sup> – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от таковых у рыб в сентябре; <sup>1</sup> – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от таковых у рыб, выращиваемых при заводском освещении (контроль); <sup>2</sup> – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от таковых у рыб, выращиваемых в условиях режима 16:8.

Причем содержание ТАГ и индекс ТАГ/ФЛ повысились у сеголеток при режиме освещения 16:8, а СФМ и СЖК – при режиме 24:0 по сравнению с контролем. Наибольшие изменения липидного профиля у сеголеток в сентябре установлены при режиме 24:0. Снижение при режиме 24:0 у молоди в разной степени отдельных классов липидов (ФИ, ФС, ЛФХ, ЭХС) положительно коррелировало с повышением СЖК. При этом у сеголеток лосося в сентябре при режиме 24:0, наблюдалось повышение размерно-весовых характеристик – 2.62 г и 6.18 см против 2.51 г и 6.09 см; 2.47 г и 6.12 см при режиме 16:8 и контроле соответственно.

У сеголеток, отобранных в октябре, в целом (при всех режимах, включая контроль) отмечено повышение содержания ОЛ (в пределах 32.72–34.23% сухой массы), в том числе доминирующих запасных ТАГ (18.26–19.77%), а также ФЛ и ХС в октябре по сравнению с сентябрем. Основные из-

менения липидного спектра при влиянии двух режимов фотопериода отмечены у сеголеток, адаптированных к режиму 24:0 (относительно контроля) и связаны со снижением содержания структурных ФЛ (в том числе ФХ, ЛФХ), ДАГ, ЭХС и повышением СЖК, индексов ХС/ФЛ и ТАГ/ФЛ. При этом у рыб при режиме 16:8, относительно контроля, установлено достоверное повышение содержания ХС, СЖК и снижение ЭХС. У сеголеток, рост и развитие которых проходило при режиме фотопериода 24:0, отмечена тенденция к повышению веса – 3.74 г против 3.50 г и 3.68 г – (соответственно, при режиме 24:0, 16:8 и контроле).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Липиды, как известно, являются не только структурными компонентами живых систем и источником энергии, но и выполняют сигнальные функции, модулируя активность клеточных фер-

**Таблица 2.** Содержание индивидуальных фосфолипидов (% сухой массы) у сеголеток атлантического лосося (*Salmo salar* L.), выращиваемых на Выгском рыбзаводе при разных световых режимах. Обозначения: *n* – число проб, ФИ – фосфатидилинозитол, ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ФХ – фосфатидилхоллин, ЛФХ – лизофосфатидилхоллин, СФМ – сфингомиелин

Месяц	Сентябрь			Октябрь		
	Контроль	16:8	24:0	Контроль	16:8	24:0
<i>n</i>	20	20	20	20	20	20
Масса*, г	2.47 ± 0.09	2.51 ± 0.08	2.62 ± 0.19	3.68 ± 0.13 <sup>A</sup>	3.50 ± 0.15 <sup>A</sup>	3.74 ± 0.24 <sup>A</sup>
Масса*, г min–max	1.88–3.09	1.90–3.01	1.55–4.30	3.04–4.7	2.58–4.94	2.49–5.45
Длина (TL)*, см	6.12 ± 0.05	6.09 ± 0.07	6.18 ± 0.14	7.16 ± 0.08 <sup>A</sup>	7.04 ± 0.10 <sup>A</sup>	7.12 ± 0.14 <sup>A</sup>
Длина (TL)*, см min–max	5.8–6.5	5.5–6.4	5.4–7.3	6.72–7.73	6.44–7.92	6.22–8.15
ФЛ	4.02 ± 0.08	3.69 ± 0.13	3.84 ± 0.07	5.66 ± 0.36 <sup>A</sup>	5.67 ± 0.13 <sup>A</sup>	4.68 ± 0.11 <sup>A1, 2</sup>
ФИ	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01 <sup>1</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>1</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>A</sup>
ФС	0.04 ± 0.004	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.004 <sup>1</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>A</sup>
ФЭА	0.56 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.96 ± 0.05 <sup>A</sup>	1.07 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.91 ± 0.02 <sup>A2</sup>
ФХ	2.97 ± 0.06	2.79 ± 0.11	2.99 ± 0.05 <sup>A</sup>	4.19 ± 0.33 <sup>A</sup>	4.12 ± 0.09 <sup>A</sup>	3.39 ± 0.09 <sup>A1, 2</sup>
ЛФХ	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.01 <sup>1</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>A1, 2</sup>
СФМ	0.005 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.01 ± 0.001 <sup>2</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>A</sup>
Неизвестные	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.001	0.25 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>A2</sup>

Примечание. \* – размерно-весовые характеристики сеголеток взятых для биохимического анализа, <sup>A</sup> – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от таковых у рыб в сентябре; <sup>1</sup> – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от таковых у рыб, выращиваемых при заводском освещении (контроль); <sup>2</sup> – отличия достоверны ( $p \leq 0.05$ ) от таковых у рыб, выращиваемых в условиях режима 16:8.

ментов. Поэтому модификации липидного окружения организмов, вызванные воздействием различных факторов, оказывают влияние на целый ряд физиологических процессов, включая рост и развитие (Hochachka, Somero, 2002; Arts, Kohler, 2009). Результаты исследований влияния световых режимов на липидный статус сеголеток атлантического лосося свидетельствуют о том, что у сеголеток в сентябре, на фоне отсутствия изменений в содержании ОЛ, суммарных ФЛ и ДАГ отмечено снижение ХС и его запасной формы ЭХС, а также минорных ФЛ (ФИ, ФС, ЛФХ), что положительно коррелирует с повышением СЖК (в 1.2 раза). Эти изменения в большей степени отмечены у сеголеток, содержащихся в бассейнах при фотопериоде 24:0. Установленные модификации указывают на более активные метаболические процессы у рыб в условиях круглосуточного освещения. Известно, что у рыб при активации физиологических процессов из липи-

дов быстро мобилизуются жирные кислоты, образуя пул СЖК, обеспечивая им приток энергии (Саутин, 1989). Усиление окислительных реакций в отдельных липидах вполне могло привести к повышению СФМ (в 2 раза), что способствует ригидности биомембран и может рассматриваться как компенсаторная реакция на продолжительное освещение.

Совокупность изменений отдельных классов ФЛ, особенно минорных, которые, как известно, являются посредниками многих сигнальных механизмов регуляции важнейших метаболических процессов, направлена, по-видимому, на обеспечение адаптации сеголеток лосося в ответ на воздействие такого мощного физического фактора как непрерывное освещение. При увеличении суточного периода освещения молодь рыб наиболее эффективно усваивает корм, отличается более высокой жизнеспособностью и скоростью роста (Власов и др., 2013). В нашем эксперименте в сен-

тябре сеголетки лосося при режиме 24:0 имели сравнительно лучший вес и рост – 2.62 г и 6.18 см против 2.51 г и 6.09 см – при режиме 16:8; 2.47 г и 6.12 см – в контроле.

Следует отметить, что у сеголеток в октябре, во всех исследуемых вариантах фотопериода, включая контроль по сравнению с сентябрем, отмечено повышение ОЛ за счет запасных ТАГ и структурных липидов – ХС и ФЛ (в том числе ФС, ФЭА, ФХ, СФМ), что свидетельствует не только о влиянии разного режима фотопериода, но, возможно, и температурного фактора. В октябре температура снизилась на 4°C (до 9.8–2.4°C) по сравнению с сентябрем (13.8–9.8°C). Адаптация сеголеток к экспериментальным световым режимам на уровне липидов может реализоваться разными биохимическими механизмами. С одной стороны, при экспериментальных световых режимах у сеголеток повышается интенсивность липолиза, связанная с мобилизацией энергетических компонентов липидов, на что указывает снижение содержания ЭХС, ДАГ и ФЛ, включая ФХ и ЛФХ, и повышение СЖК, а также индексов ХС/ФЛ, ТАГ/ФЛ (при режиме 24:0). Следует отметить, что снижение ДАГ в октябре у сеголеток 0+ при режиме 24:0, возможно, связано с комплексным действием продолжительности освещения и снижением температуры. Диацилглицерин является мультифункциональными веществами, предшественниками не только ТАГ, но и многих ФЛ, а направление их метаболических путей регулируется как внутренними, так и внешними факторами среды (Саутин, 1989). При этом следует учитывать не только содержание ХС и ФЛ, но и их соотношение ХС/ФЛ. Так, в октябре при исследуемых световых режимах у сеголеток установлено повышение индекса соотношения мембранных липидов ХС/ФЛ (до 0.97 при режиме 24:0 и до 0.85 при режиме 16:8 против 0.79 в контроле) за счет снижения содержания ФЛ (главным образом ФХ, а также ЛФХ). Изменение соотношения ХС/ФЛ является одним из ключевых механизмов регуляции физико-химического состояния биомембран и их ионной проницаемости, что влияет на различные обменные процессы, такие как (скорость транспорта ионов, метаболитов и воды (Нетюхайло, Тарасенко, 2001; Perevozchikov, 2008). Результатом может быть ингибирование окисления как ХС, так и отдельных минорных классов ФЛ (ФИ, ФС, ФЭА, СФМ). Все отмеченные изменения липидного профиля сеголеток лосося в процессе развития в условиях эксперимента в большей степени проявились в октябре при круглосуточном режиме освещения 24:0. Кроме того, к этому периоду как в контроле, так и при обоих световых режимах у сеголеток возрастает содержание запасных ТАГ и повышается индекс ТАГ/ФЛ (при 24:0), что свидетельствует о повышении у рыб энергетического по-

тenciала, который поддерживается за счет более эффективного конвертирования корма в условиях дополнительного освещения, а также может быть связан и с температурным фактором. Возможно, снижение температуры воды в октябре повлияло на повышение активности липазы в желудочно-кишечном тракте рыб, что способствовало наилучшему конвертированию пищи. Так результаты работы китайских ученых показали, что молодь амурского осетра хорошо переваривает липиды при пониженной температуре (14°C), а протеины – при 21 и 28°C (Hong-jie et al., 2007).

Отмеченные изменения в содержании основных липидных классов положительно коррелируют с тенденцией повышения темпов роста сеголеток при световом режиме 24:0. Следует отметить, что данные согласуются с опубликованными ранее (Nemova et al., 2020) результатами изучения жирнокислотного состава молоди лосося при варьировании световых режимов в аналогичном эксперименте.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение дополнительного освещения при заводском выращивании молоди атлантического лосося на этапе сеголеток приводит к количественным и качественным модификациям структурных и запасных липидов и их соотношений (индексов), направленных на регуляцию жизненных функций сеголеток лосося путем таких компенсаторных изменений липидов, которые обеспечивают оптимальные адаптационные возможности их выживания. Варьирование световых режимов при выращивании молоди лосося в условиях северных рыбопроизводных заводов может влиять на получение более жизнестойкой, готовой к выпуску в естественную среду молоди за счет ускорения процессов ее роста. Дополнительное освещение может применяться с целью ускорения роста молоди лосося, наступления периода смолтификации, отсрочки полового созревания. Кроме того, полученные результаты о модификации липидного состава сеголеток при использовании дополнительного освещения в процессе развития могут использоваться в практике выращивания молоди лосося в заводских условиях при расчетах кормовых коэффициентов, объемов используемого корма, а также для характеристики ее физиологического состояния.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 19-14-00081.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТНИЧЕСКИХ 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

Н.Н. Немова, З.А. Нefeldова, С.А. Мурзина – об-суждение результатов исследования, подготовка публикации. С.Н. Пеккоева – проведение анализа липидов и жирных кислот в тканях исследованной молодежи рыб, участие в подготовке публикации. В.П. Воронин – сбор материала в ходе экспедиции, проведение анализа липидов и жирных кислот в тканях исследованной молодежи рыб, статистический анализ. Т.Р. Руоколайнен – проведение анализа индивидуальных классов фосфолипидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brett D.* Факторы среды и рост рыб // Биоэнергетика и рост рыб / Под ред. Хоара У., Рендолла Д., Бретта Дж. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. С. 275–345.
- Власов В.А., Маслова Н.И., Пономарев С.В., Боканева Ю.М.* Влияние света на рост и развитие рыб // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. 2013. № 2. С. 24–34.
- Кейтс М.* Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.
- Коросов А.В., Горбач В.В.* Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2007. 76 с.
- Нетюхайло Л.Г., Тарасенко Л.М.* Особенности липидного состава плазматических мембран тканей легких при остром эмоционально-болевым стрессе у крыс // Украинский биохимический журн. 2001. Т. 73. № 1. С. 115–117.
- Ручин Б.А.* Влияние фотопериода на рост, физиологические и гематологические показатели молодежи сибирского осетра *Acipenser baerii* // Известия РАН. Серия биологическая. 2007. № 6. С. 698–704.
- Ручин Б.А.* Влияние фотопериода на энергетические показатели карповых рыб // Астраханский вестник экологического образования. 2012. № 4(22). С. 144–150.
- Саутин Ю.Ю.* Проблема регуляции адаптационных изменений липогенеза, липолиза и транспорта липидов у рыб // Успехи современной биологии. 1989. Т. 107. Вып. 1. С. 131–147.
- Arduini A., Pescechera A., Dottori S. et al.* High-performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. Lipid Res. 1996. V. 37(2). P. 684–689.
- Arts M.T., Kohler C.C.* Health and conditions in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response // Lipids in Aquatic Ecosystems. Dordrecht; Heidelberg; London; N.Y.: Springer, 2009. P. 237–257.
- Björnsson B.T., Stefansson S.O., McCormick S.D.* Environmental endocrinology of salmon smoltification // General and Comparative Endocrinology. 2011. V. 170. P. 290–298.
- Boeuf G., Le Bail P.-Y.* Does light have an influence on fish growth? // Aquaculture. 1999. V. 177(3). P. 129–152.
- Clarke W.C., Sheinbourn J.E., Brett J.N.* Effect of artificial photoperiod cycles, temperature and salinity on growth and smolting in underyearlings coho. Chinook // Aquaculture. 1981. P. 105–116.
- 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.
- Hellwig J.* Defining parameters for a reproducible TLC-separation of phospholipids using ADC 2. Diploma thesis, University of Applied Sciences Northwestern Switzerland (FHNW), 2005.
- Hochachka P.W., Somero G.N.* Biochemical Adaptation: Mechanism and Process Physiological Evolution. N.Y.: Oxford University press, 2002. 466 p.
- Mäkinen T., Ruohonen K.* Effect of delayed photoperiod on the growth of a Finnish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) stock // J. Appl. Ichthyol. 1992. V. 8. P. 40–50.
- Murzina S.A., Nefedova Z.A., Ruokolainen T.R. et al.* Dynamics of lipid content during early development of freshwater salmon *Salmo salar* L. // Russ. J. Dev. Biol. 2009. V. 40. P. 165–170. <https://doi.org/10.1134/S1062360409030059>
- Hong-jie T., Ping Z., Long-zhen Z. et al.* The influence of water temperature on the activity of digestive enzymes of juvenile Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* // J. Fish. Sei. China. 2007. V. 14. № 1. P. 126–131.
- Metcalfe N.B., Thorpe J.E.* Determinants of geographical variation in the age of seaward-migrating salmon, *Salmo salar* // J. Animal Ecology. 1990. V. 59. P. 135–145.
- Nemova N.N., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N. et al.* The effect of the photoperiod on the fatty acid profile and weight in hatchery-reared underyearlings and yearlings of atlantic salmon *Salmo salar* L. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 6. P. 845. <https://doi.org/10.3390/biom10060845>
- Olsen R.E., Henderson R.J.* The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1989. V. 129. P. 189–197.
- Perevozchikov A.P.* Sterols and their transport in animal development // Russ. J. Dev. Biol. 2008. V. 39. P. 131–150. <https://doi.org/10.1134/S1062360408030016>
- Taylor J.F., North B.P., Porter M.J.R. et al.* Photoperiod can be used to enhance growth and improve feeding efficiency in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // Aquaculture. 2006. V. 256. P. 216–234.
- Villarreal C.A., Thorpe J.E., Miles M.S.* Influence of photoperiod on growth changes in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. // J. Fish Biol. 1988. V. 33. P. 15–30.

## The Effect of the Photoperiod on the Lipid Profile in Hatchery-reared Underyearlings (0+) of Atlantic Salmon *Salmo salar* L.

N. N. Nemova<sup>1,\*</sup>, Z. A. Nefedova<sup>1</sup>, S. A. Murzina<sup>1</sup>, S. N. Pekkoeva<sup>1</sup>,  
V. P. Voronin<sup>1</sup>, and T. R. Ruokolainen<sup>1</sup>

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

*\*e-mail: nnnemova@gmail.com*

New data on the effect of prolonged light on the lipid profile in the hatchery-reared underyearlings (at 0+ age) of Atlantic salmon were obtained. The effect of different light regimes (usual hatchery lighting – control, experimental lighting – 16:8 h light/dark (LD 16:8) and 24:0 h light/dark (LD 24:0)) was studied during growth and development of fish. It was found specific alterations in the lipid profile, mainly in the content of structural lipids (total phospholipids), also in the ratios of structural to storage lipids: cholesterol/phospholipids (CHOL/PL) and triacylglycerols/phospholipids (TAG/PL) in the fish under experimental light regimes. These changes were most pronounced in the underyearlings under continuous light (LD 24:0).

*Keywords:* lipids, photoperiod, Atlantic salmon, hatchery-reared fish

БИОЛОГИЯ  
РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 631.524.825:582.717.4

НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ОНТОГЕНЕЗА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА  
*HYDRANGEA* L. В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ

© 2021 г. Ф. К. Мурзабулатова<sup>а</sup>, \*, З. Х. Шигапов<sup>а</sup>, Н. В. Полякова<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, ул. Менделеева, 195, корп. 3, Уфа, 450080 Республика Башкортостан, Россия

\*e-mail: murzabulatova@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.04.2020 г.

После доработки 14.09.2020 г.

Принята к публикации 21.09.2020 г.

Описаны начальные этапы онтогенеза видов рода *Hydrangea* L. Исследования проводились на протяжении 2007–2015 гг. Цель данной работы – изучить и описать начальные этапы онтогенеза представителей рода *Hydrangea* в условиях культуры в Башкирском Предуралье. В ходе исследований были решены следующие задачи: определены этапы виргинильного возрастного состояния изучаемых видов гортензии; описаны признаки, характерные для каждого этапа; охарактеризованы морфологические параметры растений на каждом этапе развития; выявлены особенности развития изученных видов на начальных этапах онтогенеза. Описаны 4 этапа виргинильного возрастного состояния: проростки, ювенильные, имматурные и взрослые вегетативные растения. Этап ювенильных растений у гортензий наступает в среднем через 25 дней после прорастания семян с появлением 2-й пары настоящих листьев; имматурных – в основном на 3 году, после начала ветвления осевого побега; виргинильных – на 4–5 году жизни с началом кушения и приобретением жизненной формы взрослого растения.

**Ключевые слова:** *Hydrangea*, начальные этапы онтогенеза, возрастное состояние, проростки, ювенильные растения, имматурные растения, взрослые вегетативные растения

**DOI:** 10.31857/S047514502102004X

ВВЕДЕНИЕ

Род Гортензия (*Hydrangea* L., Hydrangeaceae Dumort.) включает в себя красивоцветущие кустарники, естественный ареал распространения которых – Китай, Гималаи, Япония, Северная и Южная Америка, единично – Филиппины и о. Ява. В настоящее время род включает около 200 видов и более 350 сортов (van Gelderen, 2004). В последние годы гортензии стали чрезвычайно популярны в декоративном садоводстве и ландшафтном дизайне, и, следовательно, возникла необходимость в изучении их роста и развития в условиях конкретного региона и климатической зоны.

В настоящее время подробное анатомическое и морфологическое описание семян гортензий дано в работах L. Hufford (1995), А.Л. Тахтаджяна (2000), Т.А. Лобовой (2000), М. Mrogozowska, А. Woznicka, М. Kujawa (2012). Семена гортензий многочисленны, мелкие, 0.4–1.5 мм длины, 0.5–2 мм ширины, 0.3–1 мм толщины. Цвет семян от золотисто-желтого до темно-коричневого. Форма семян разнообразна: основная часть видов имеет веретеновидные, обратнойцевидные, широкояйцевидные и овальные семена. Н.А. Коляда

(2007) в своих опытах с 5 видами гортензий описала морфологию семян, количественные параметры, имеющие важное значение для познания их биологии. В частности, максимальный вес 1000 шт. семян отмечен ею у *H. paniculata* – 0.091 г, *H. bretschneideri* – 0.075 г, *H. paniculata* f. *grandiflora* – 0.060 г. В природе, по данным М. Нара и др. (1999), а также Н. Kanno и К. Seiwa (2004) у *H. paniculata* средний вес семян составляет 1.01 г. Вероятно, такая разница в весе семян в природных условиях и при интродукции может свидетельствовать о кардинальной разнице в комплексе климатических условий, в которых происходит завязывание и созревание семян. О прорастании семян видов гортензий имеются данные в работах Н.А. Коляды (2007). По ее сведениям, в дендрарии Горно-таежной станции ДВО РАН лабораторная всхожесть семян гортензии достаточно высокая и в среднем составляет 79%, а у *H. bretschneideri* она достигает 90%. По данным Л.А. Семкиной и Ю.В. Цыкарева (1994), в условиях культуры на Среднем Урале *H. bretschneideri* обильно цветет, но всхожесть ее семян в лабораторных условиях составляет всего 37%. В условиях Ботанического сада г. Киева (Коркуленко, 2013) семе-

на интродуцированных гортензий имеют высокую всхожесть и не нуждаются в предпосевной подготовке, лабораторная всхожесть их достигает 99.3%.

Данных по особенностям роста и морфологии проростков и ювенильных растений гортензий при интродукции в литературе нет. Имеются некоторые данные по изучению морфологии и онтогенеза цветков гортензий (Roels et al., 1997; Huford, 2001).

М.Т. Мазуренко и А.П. Хохрякова (1977) изучали особенности прорастания семян и развития сеянцев гортензии крупнолистной (*H. opuloides*) в естественных местообитаниях в окрестностях г. Батуми (Грузия); в их описаниях отсутствует информация о характере роста проростков. Данными авторами установлено, что в системе побегов формирования может развиваться до 6 порядков побегов, при этом основной цикл проходит всего за 3, реже 4 года. Его периоды:

1. Рост побега формирования и побегов ветвления первого порядка (первый год жизни, реже — начало второго года).

2. Развитие побегов ветвления первого-второго, реже третьего порядков (второй год жизни).

3. Отмирание верхушки системы побегов формирования, развитие и отмирание побегов ветвления третьего-шестого порядков (третий-четвертый год жизни).

Таким образом, число порядков побегов здесь больше, чем число лет основного цикла. Это связано, очевидно, с более длительным периодом вегетации в условиях теплого климата и, как следствие, закладкой и ростом большего количества почек и побегов (Мазуренко, Хохряков, 1977).

Анализ литературы по теме данной работы показывает, что биологические особенности интродуцированных видов гортензий изучались на базе коллекций крупных ботанических садов в России (г. Москва) и Украине (г. Киев). Сведения о биологии видов гортензий в других регионах носят не полный и отрывочный характер. Информации по культуре гортензий на Урале (в т.ч. на Южном Урале) и в Приуралье практически нет. Аспекты онтогенеза видов гортензий в культуре как в зарубежной, так и в отечественной литературе не освещены, а именно: отсутствует полное описание онтогенетического развития гортензий, нет данных по морфометрическим параметрам растений в каждом возрастном состоянии, не выявлены особенности индивидуального развития на каждом этапе онтогенеза. Это обуславливает необходимость обобщения существующих данных, а также их уточнения и детализации. Таким образом, актуальность и новизна представленных результатов очевидна. Цель данной работы — изучить и описать начальные этапы онтогенеза представителей рода *Hydrangea* в условиях культуры в Башкирском

Предуралье. В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

— определить этапы виргинильного возрастного состояния изучаемых видов гортензии;

— описать признаки, характерные для каждого этапа;

— охарактеризовать морфологические параметры растений на каждом этапе развития;

— выявить особенности развития изученных видов на начальных этапах онтогенеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе коллекции гортензий Южно-Уральского ботанического сада-института Уфимского федерального исследовательского центра РАН (ЮУБСИ УФИЦ РАН) в период с 2007 по 2015 годы (Мурзабулатова, Полякова, 2016). Объектами исследования являлись 6 видов и 1 подвид рода *Hydrangea*, произрастающие на коллекционном участке декоративных кустарников (Фрутицетуме):

### Подсекция *Americanae*

**Виды:** гортензия древовидная (*H. arborescens* L.); гортензия лучистая (*H. arborescens* subsp. *radiata* (Walter) McClintock);

гортензия пепельная (*H. cinerea* Small).

### Подсекция *Heteromallae*

**Виды:** гортензия метельчатая (*H. paniculata* Siebold);

гортензия почвопокровная (*H. heteromalla* D. Don);

гортензия Бретшнейдера (*H. bretschneideri* Dippel);

гортензия золотистожилковая (*H. xanthoneura* Diels).

Климатические условия района исследований имеют свои особенности и отличия от условий естественного произрастания гортензий. Климат Башкирского Предуралья континентальный и характеризуется холодной зимой и теплым летом, большой амплитудой колебаний температуры в течение года, ранними осенними и поздними весенними заморозками. В г. Уфа среднемесячная температура воздуха составляет +3.4°C, средняя температура января —13.5°C, абсолютный минимум достигает —48.5°C, зимой нередко оттепели, безморозный период длится в среднем 144 дня. Средняя температура июля +19.5°C, абсолютный максимум зафиксирован на уровне +40°C. Климат достаточно влажный: среднегодовое количество осадков составляет 500–590 мм, в т.ч. около 350 мм в теплый период (максимум приходится на июнь–июль). Снежный покров устанавливается в ноябре и держится в среднем 155 сут (Путенихин и др., 2017).

Как известно, в онтогенезе растений выделяют 4 периода (Серебряков, 1952, 1964; Уранов, 1967; Borchert, 1975; Hackett, 1985; Рекомендации по изучению онтогенеза., 1990; Donovan, Ehleringer, 1991; Paiva, Machado, 2006; Wang et al., 2011; Albert et al., 2012):

- латентный (состояние семени);
- виргинильный (включающий этапы проростков, ювенильных, имматурных и взрослых вегетативных растений);
- генеративный (этапы молодых, средневозрастных и старых генеративных растений);
- сенильный (субсенильный и сенильный этапы).

Поскольку гортензии являются древесными долгоживущими растениями, мы в наших исследованиях ограничились описанием этапов виргинильного периода.

В исследованиях были задействованы по 30 экземпляров каждого изучаемого таксона. Все они были этикетированы, каждые 7 дней фиксировались изменения их частей и органов в процессе развития, отмечались признаки перехода одного этапа возрастного состояния в другой. Для проведения замеров морфологических параметров и изучения строения корневой системы растений на каждом этапе выкапывались модельные растения, которые фотографировались или зарисовывались.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета анализа Microsoft Excel и статистических программ Statistica 6.0; Statistica 10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ роста и развития гортензий при грунтовом посеве позволил описать 4 этапа виргинильного возрастного состояния: проростки, ювенильные, имматурные и взрослые вегетативные растения.

**Проросток** (plantules (Горышина и др., 1988)). Состояние проростков определяется с момента появления семядолей до их отмирания или же до момента появления первой пары настоящих листьев. У проростков изученных нами видов гортензий наблюдалась следующая очередность развития: рост первичного корешка > рост гипокотилия > вынос семядолей > разворачивание семядолей > рост семядолей > начало роста почечки > разворачивание и рост первой пары настоящих листьев (рис. 1, 2).

На этом этапе у некоторых представителей подсемейства *Heteromallae* наблюдались отклонения в сторону увеличения количества семядолей (поликотилия) обычно до 3-х (рис. 3).

Начало роста корней 1-го порядка происходит на стадии роста семядолей. В период формирования почечки проростки имеют главный корень и



Рис. 1. Всходы *H. arborescens*.



Рис. 2. Всходы *H. xanthoneura*.



Рис. 3. Поликотилия у проростков гортензий подсемейства *Heteromallae*.

**Таблица 1.** Основные фазы роста и развития проростков гортензий (в днях от начала прорастания)

Вид	Начало роста			Окончание роста сеянца	Усыхание семядолей
	1-й пары листьев	2-й пары листьев	3-й пары листьев		
Подсекция <i>Americanae</i>					
<i>H. arborescens</i>	13 ± 0.17	24 ± 0.42	40 ± 1.32	—*	70 ± 1.16
<i>H. cinerea</i>	14 ± 0.56	31 ± 1.64	40 ± 1.59	—*	70 ± 0.69
<i>H. arborescens</i> subsp. <i>radiata</i>	19 ± 0.47	35 ± 0.40	43 ± 0.32	—*	75 ± 1.91
Подсекция <i>Heteromallae</i>					
<i>H. paniculata</i>	22 ± 0.48	27 ± 0.29	35 ± 0.35	92 ± 0.23	77 ± 0.39
<i>H. bretschnideri</i>	12 ± 0.16	18 ± 0.42	32 ± 0.29	108 ± 1.32	57 ± 0.96
<i>H. heteromalla</i>	12 ± 0.13	17 ± 0.58	32 ± 0.25	107 ± 1.26	56 ± 0.88
<i>H. xanthoneura</i>	12 ± 0.15	25 ± 0.87	39 ± 0.97	97 ± 0.86	71 ± 0.93

Примечание. \* — у данных видов естественный рост в конце вегетационного периода не завершен, сеянцы ушли под зиму к несформированной почкой.

**Таблица 2.** Высота однолетних сеянцев и длина центрального корня

Название вида	Среднее количество междоузлий, шт.	Средняя высота, см	Средняя длина центрального корня, см
Подсекция <i>Americanae</i>			
<i>H. arborescens</i>	3.7 ± 0.18	3.9 ± 0.34	3.2 ± 0.15
<i>H. arborescens</i> subsp. <i>radiata</i>	1.7 ± 0.21	2.1 ± 0.07	9.5 ± 1.2
<i>H. cinerea</i>	1.7 ± 0.13	2.0 ± 0.16	4.8 ± 0.38
Подсекция <i>Heteromallae</i>			
<i>H. paniculata</i>	2.3 ± 0.10	1.7 ± 0.09	4.7 ± 0.32
<i>H. bretschnideri</i>	2.0 ± 0.14	1.2 ± 0.12	9.7 ± 0.60
<i>H. heteromalla</i>	1.6 ± 0.13	0.8 ± 0.04	12.6 ± 0.37
<i>H. xanthoneura</i>	1.6 ± 0.15	0.6 ± 0.12	6.8 ± 0.21

несколько боковых корешков. Гипокотиль голый, вначале беловатый, затем постепенно приобретает зеленую окраску. Длина гипокотиля представителей подсекции *Americanae* до 0.4 см, а у проростков из подсекции *Heteromallae* — до 0.2 см. Семядольные листья светло-зеленые, голые, с еле заметной центральной жилкой. Верхушка семядольных листьев сеянцев у представителей подсекции *Americanae* округлая, а в подсекции *Heteromallae* слегка заостренная. У представителей подсекции *Heteromallae* междоузлия укорочены, расстояние между ними составляет до 1.5 мм. Продолжительность жизни семядольных листьев составляет в среднем от 56 дней (*H. heteromalla*) до 77 дней (*H. paniculata*) (табл. 1). Окончание вегетации сеянцев на первом году жизни знаменует закладкой апикальной почки и завершением роста побега. Сеянцы видов из подсекции *Americanae* (*H. arborescens*, *H. cinerea*, *H. arborescens* subsp. *radiata*) не успевают закончить вегетацию и сформировать апикальную почку, но семядольные листья у них

усыхают и опадают так же, как у видов из другой подсекции.

Минимальной высотой осевого побега отличаются сеянцы *H. xanthoneura* (табл. 2), а максимальной — *H. arborescens*, у которой отмечено наибольшее количество метамеров. К концу сезона осевая часть побега одревесневает. В пазухах семядольных листьев и нижней пары листьев закладываются почки возобновления. Главный корень имеет наименьший размер у *H. arborescens* (в среднем 3.2 см), а самый длинный у *H. heteromalla* (в среднем 12.6 см), с развитием надземной части проростков увеличиваются боковые корни. Первые настоящие листья сеянцев имеют эллиптическую и яйцевидно-продолговатую форму листовой пластинки. Окраска листьев сверху ярко-зеленая, снизу — светло-зеленая.

Первая пара листьев с максимальным размером зафиксирована нами у *H. bretschnideri*, а самая мелкая — у *H. paniculata*. Наиболее крупная вторая пара листьев отмечена у *H. heteromalla*, а

**Таблица 3.** Средние значения морфометрических параметров и их изменчивость у 2-летних сеянцев (ювенильный период) гортензий

Название вида	Средняя высота растения		Средняя длина осевого корня		Средняя величина диаметра корневой шейки		Среднее количество боковых побегов, шт.
	высота, см	CV, %	длина, см	CV, %	диаметр, мм	CV, %	
Подсекция <i>Americanae</i>							
<i>H. arborescens</i>	13.0 ± 0.63	16.8	15.8 ± 0.6	11.7	3.5 ± 0.16	20.9	0.4 ± 0.2
<i>H. cinerea</i>	10.8 ± 0.83	22.4	17.6 ± 0.9	17.2	3.5 ± 0.21	32.4	0
<i>H. arborescens</i> subsp. <i>radiata</i>	13.9 ± 0.99	28.1	15.4 ± 0.7	15.1	3.7 ± 0.20	14.1	0.5 ± 0.2
Подсекция <i>Heteromallae</i>							
<i>H. paniculata</i>	12.8 ± 1.35	23.0	9.8 ± 0.3	10.6	2.5 ± 0.28	39.5	0
<i>H. bretschnideri</i>	10.0 ± 0.79	34.2	12.5 ± 0.6	16.7	3.9 ± 0.19	22.4	0
<i>H. heteromalla</i>	10.6 ± 0.7	7.0	15.7 ± 0.3	12.4	3.7 ± 0.21	19.4	0
<i>H. xanthoneura</i>	12.8 ± 1.78	61.0	14.8 ± 1.10	24.9	3.8 ± 0.24	17.6	0

минимальный размер листовой пластинки второй пары также у *H. paniculata*. Корневая система однолетних сеянцев характеризуется удлинением главного корня и увеличением количества боковых корешков. Наибольшей высотой в первый год жизни характеризовались *H. arborescens* (3.9 см в среднем) и *H. paniculata* (2.3 см), наименьшей – *H. heteromalla* (0.8 см в среднем) и *H. xanthoneura* (0.6 см). Максимальный диаметр стволика у корневой шейки отмечен у *H. xanthoneura*, *H. heteromalla* и *H. bretschnideri* (от 2.2 до 2.6 мм), минимальный – у *H. cinerea* (1.6 мм). Связь между высотой растений и диаметром ствола умеренная отрицательная, коэффициент корреляции  $r = -0.52$  ( $p < 0.05$ ). Дисперсионный анализ показал, что виды гортензии различаются уже на начальных этапах онтогенеза как по высоте однолетних сеянцев ( $F = 81.900$ ;  $p < 0.001$ ), так по длине центрального корня ( $F = 45.91$ ;  $p < 0.001$ ).

**Ювенильные растения** (juvenile plants (Hackett, 1985; Popov et al., 2004)). Данный этап длится с момента разворачивания второй пары настоящих листьев до начала ветвления (Серебряков, 1952; Рекомендации по изучению онтогенеза..., 1990). У представителей обеих подсекций первые настоящие листочки похожи на листья взрослых растений, но меньшего размера и имеют более редкое опушение; размер листовых пластинок увеличивается пропорционально высоте сеянцев. В этом возрастном состоянии наблюдается рост эпикотилия сеянцев подсекции *Americanae*, последовательное разворачивание и рост 3-го, 4-го и последующих настоящих листьев, прекращение роста семядольных листьев, прекращение апикального роста и формирование терминальной почки (только у видов подсекции *Heteromallae*, в подсекции *Americanae* терминальная почка не закладывается), изменение окраски семядолей, отмирание и опадение

их, прекращение радиального роста сеянцев. Ювенильные растения имеют моноподиально (одноосно) растущий побег, корневая система состоит из главного и боковых корней.

В ювенильном возрасте (второй год жизни) самые высокие сеянцы зафиксированы у *H. arborescens* и *H. arborescens* subsp. *radiata* (13.0 и 13.9 см), Наименьший показатель зафиксирован у *H. bretschnideri* и *H. heteromalla* (10.0 и 10.6 см) (табл. 3), коэффициент вариации высоты видов колеблется от 7 до 61%. Наибольший диаметр стволика зафиксирован у *H. bretschnideri* (3.9 мм), а наименьший показатель – у *H. paniculata* (2.5 мм). Связь между высотой растений и диаметром ствола умеренно положительная и коэффициент корреляции  $r = 0.35$  ( $p < 0.05$ ). Сохраняется и развивается осевой корень, также наблюдается увеличение количества боковых корней до 4–5-го порядка (рис. 4). Виды, входящие в подсекцию *Americanae*, в условиях ботанического сада не успевают формировать верхушечные почки (без кроющих чешуй) и кончики побегов засыхают или обмерзают и у некоторых сеянцев на втором году начинается ветвление. Дисперсионный анализ подтверждает, что на стадии ювенильных растений сеянцы гортензий также имеют различия по высоте ( $F = 2.59$ ;  $p < 0.001$ ) и длине центрального корня ( $F = 17.256$ ;  $p < 0.001$ ).

**Имматурные растения** (immature plants). Этот этап начинается с ветвления сеянцев (Серебряков, 1952; Рекомендации по изучению онтогенеза..., 1990) и является переходным от ювенильных растений к взрослым вегетативным. У некоторых сеянцев гортензий ветвление начинается во втором вегетационном сезоне; по нашим наблюдениям, количество боковых ветвей сеянцев различно в зависимости от принадлежности к подсекциям (табл. 4). У видов гортензий имматурный

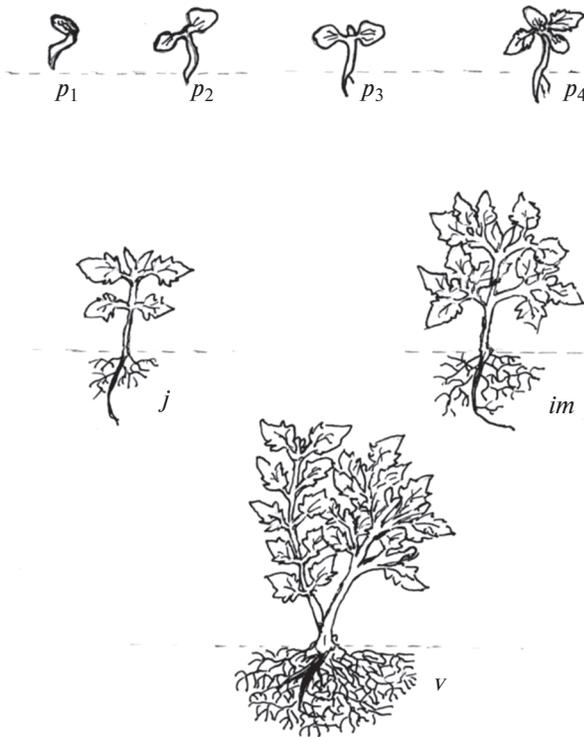


Рис. 4. Этапы виргинильного возрастного состояния видов гортензий: проростки ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ,  $p_4$ ), ювенильные ( $j$ ), имматурные ( $im$ ) и взрослые вегетативные ( $v$ ) растения.

возрастной период в основном начинается на третьем году жизни. У представителей обеих подсекций наблюдается формирование и рост боковых побегов (рис. 4) наибольшее количество которых наблюдается у *H. arborescens* subsp. *radiata* (табл. 4), небольшое количество их у видов *H. bretschnideri* и *H. heteromalla*. Корневая шейка у

всех сеянцев утолщается, максимальный прирост отмечен у *H. bretschnideri* (6.8 мм), минимальный – у *H. cinerea* (5.1 мм). В этом возрасте рост центрального корня у всех видов замедляется, наблюдается утолщение центрального и боковых корней и увеличение количества боковых корней. На третьем году жизни рост осевого побега продолжается, и трехлетние сеянцы гортензий достигают высоты 17.2–61.6 см и 5.3–6.8 мм в диаметре у корневой шейки (табл. 4). Максимальной высоты в этом возрасте достигли *H. arborescens* (65.8 см у отдельных особей) и *H. bretschnideri* (61.6 см), наименьший показатель зафиксирован у *H. paniculata* (17.2 см) и *H. xanthoneura* (24.5 см). Длительность имматурного возрастного состояния у видов гортензий составляет обычно один год.

У единичных сеянцев, особенно в подсекции *Heteromallae*, наблюдался ускоренный темп развития, который приводил к переходу сеянцев в генеративное состояние и к появлению зацветающих ювенильных (*H. paniculata*) и имматурных (*H. xanthoneura*) растений.

Дисперсионный анализ показал, что на стадии имматурных растений виды гортензий имеют различия по высоте ( $F = 18.143$ ;  $p < 0.001$ ), в то время как различий по длине центрального корня уже не отмечается ( $F = 1.500$ ;  $p = 0.186$ ).

**Взрослые вегетативные растения** (adult phases of vegetative development in plants (Wang et al., 2011)). В этот этап развития сеянцы видов гортензий переходят на 4–5 год жизни. На первичном кусте развиваются первые ростовые побеги высотой от 13.5 до 37.9 см (табл. 5), они являются побегами формирования (Мазуренко, Хохряков, 1977; Чубарь, 2013); при этом наблюдается кущение растений. У представителей обеих подсекций в основании главного побега над почвой (аэроксильно) из

Таблица 4. Средние значения морфометрических параметров и их изменчивость у сеянцев в имматурном возрастном состоянии

Вид	Средняя высота растения		Средняя длина осевого корня		Средняя величина диаметра корневой шейки		Количество боковых побегов, шт.
	высота, см	CV, %	длина, см	CV, %	диаметр, мм	CV, %	
Подсекция <i>Americanae</i>							
<i>H. arborescens</i>	65.8 ± 2.39	19.0	15.8 ± 3.1	16.8	5.9 ± 0.31	17.9	1.9 ± 0.3
<i>H. cinerea</i>	53.9 ± 3.60	19.9	14.3 ± 5.2	34.3	5.1 ± 0.21	10.4	1.7 ± 0.4
<i>H. arborescens</i> subsp. <i>radiata</i>	40.2 ± 6.64	42.0	16.1 ± 4.1	26.4	6.2 ± 0.42	27.8	2.0 ± 0.4
Подсекция <i>Heteromallae</i>							
<i>H. paniculata</i>	17.2 ± 1.80	11.7	12.4 ± 4.2	31.8	5.4 ± 0.38	24.3	1.7 ± 0.3
<i>H. bretschnideri</i>	61.6 ± 5.59	56.9	13.4 ± 3.2	23.7	6.8 ± 0.30	28.0	0.9 ± 0.2
<i>H. heteromalla</i>	52.7 ± 6.39	30.9	15.5 ± 4.5	29.3	6.2 ± 0.47	14.9	0.9 ± 0.2
<i>H. xanthoneura</i>	24.5 ± 3.70	44.4	13.6 ± 5.4	39.6	5.3 ± 0.48	31.2	1.7 ± 0.1

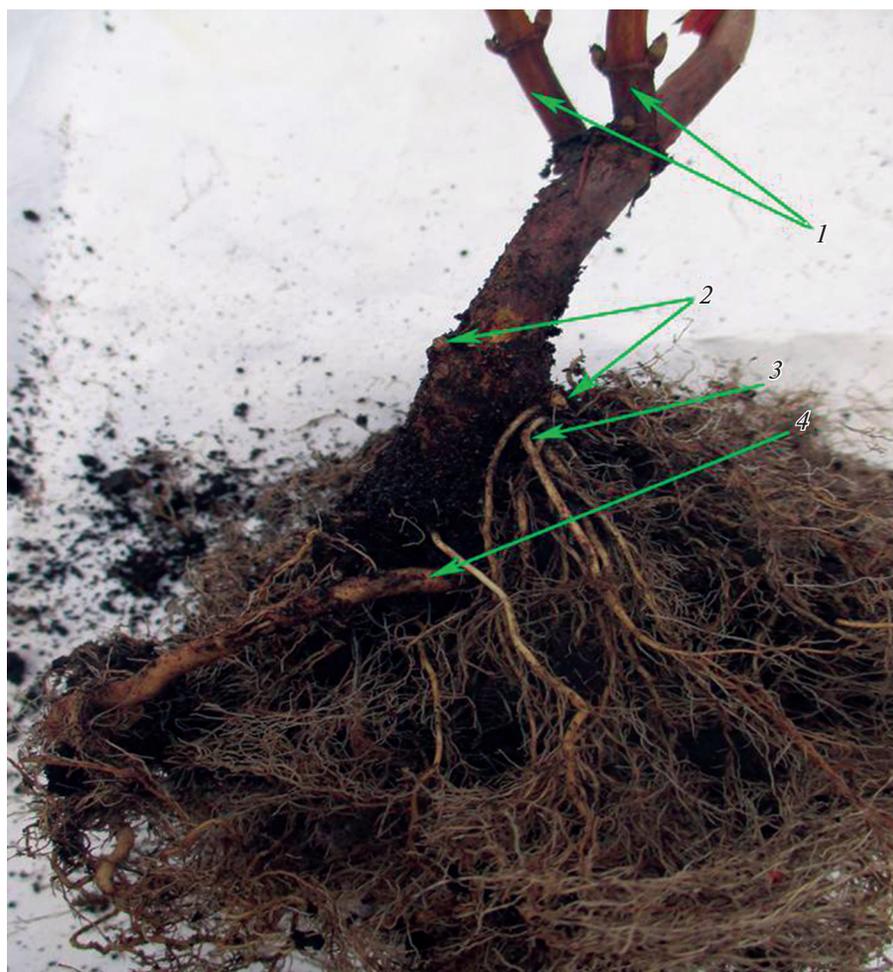
**Таблица 5.** Количество и высота побегов у взрослых вегетативных растений гортензий

Название вида	Высота побегов, см			Количество побегов, шт.
	среднее	min	max	
Подсекция <i>Americanae</i>				
<i>H. arborescens</i>	36.0 ± 5.61	10.3	59.5	2
<i>H. cinerea</i>	37.9 ± 3.76	15.0	53.6	2
<i>H. arborescens</i> subsp. <i>radiata</i>	27.9 ± 4.01	10.5	60.2	2
Подсекция <i>Heteromallae</i>				
<i>H. paniculata</i>	13.5 ± 2.77	5.6	23.0	2
<i>H. bretschnideri</i>	14.7 ± 1.15	9.0	23.7	2
<i>H. heteromalla</i>	16.3 ± 10.5	9.0	23.0	2
<i>H. xanthoneura</i>	18.5 ± 1.88	10.5	35.6	2

спящих почек (почки возобновления) (рис. 5) начинают расти побеги; в дальнейшем появляются и побеги из подземных почек (аэроксильно-

геоксильные) (Капранова, 1980; Тищенко, 2004) (рис. 5).

Самая большая высота побегов формирования (будущие скелетные оси) на этапе взрослых веге-



**Рис. 5.** *H. arborescens* subsp. *radiata*. 1 – надземные побеги или побеги формирования; 2 – подземные почки; 3 – придаточные корни; 4 – главный корень.

тативных растений отмечена у *H. cinerea* (среднее значение 37.9 см), самые низкие побеги формирования на этом этапе зафиксированы у *H. paniculata* (среднее значение 13.5 см) (табл. 5). Количество этих побегов в подсекции *Americanae* насчитывается от 1 до 2 на одном растении, в подсекции *Heteromallae* у отдельных растений побеги формирования не появились и эти экземпляры остались в имматурном состоянии. У взрослых вегетативных растений образуется масса придаточных корней, главный корень со временем перестает среди них выделяться и теряется в общей массе корней (рис. 5).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении начальных этапов онтогенеза видов гортензий коллекции ЮУБСИ УФИЦ РАН выявлены особенности 4 этапов виргинильного возрастного состояния: проростки, ювенильные, имматурные и взрослые вегетативные растения. В связи с отсутствием литературных данных по изучению онтогенеза гортензий в других регионах и, следовательно, сравнений, приводятся результаты собственных наблюдений.

Максимальной высотой в первый год жизни характеризуются сеянцы *H. arborescens* (3.9 см) и *H. paniculata* (2.3 см), минимальной — *H. heteromalla* (0.8 см) и *H. xanthoneura* (0.6 см). Среди трехлетних сеянцев наименьшая изменчивость по высоте наблюдалась у *H. paniculata* (17.2%); наибольший показатель коэффициента вариативности по высоте отмечен у *H. bretschnideri* (56.9%), а по диаметру корневой шейки наименьший показатель зафиксирован у *H. cinerea* (10.4%), максимальный — у *H. xanthoneura* (31.2%). Максимальной скоростью роста обладают сеянцы *H. arborescens*, медленнее всех растут сеянцы *H. paniculata*.

Переход проростков в ювенильные растения происходит после появления второй пары настоящих листьев, в среднем через 25 дней после прорастания. Моментом перехода от ювенильных к имматурным растениям можно считать начало ветвления в средней и верхней части первичного побега, т.е. рост побегов II порядка, который происходит в основном на 3 году жизни сеянцев. Переход к взрослым вегетативным растениям связан с началом отрастания побегов формирования из спящих почек (почки возобновления) в основании первичного побега (Мазуренко, Хохряков, 1977; Чубарь, 2013). При дальнейшем росте увеличивается размер растений за счет кущения. Главный корень в начале роста сеянцев хорошо выражен, по мере роста начинает сильно ветвиться, и теряется в общей массе корней.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность коллегам — сотрудникам Южно-Уральского ботанического сада-института за помощь и поддержку при проведении исследований и оформлении электронного варианта статьи.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН “Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России” и в рамках государственного задания ЮУБСИ УФИЦ РАН по теме АААА-А18-118011990151-7.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горышина Т.Г., Гребенщиков О.С., Ниценко А.А. Терминологический словарь по экологии, геоботанике и почвоведению: Русско-англо-немецко-французский. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1988. 250 с.
- Капранова Н.Н. Сравнительное морфологическое исследование некоторых видов чубушника в онтогенезе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1980. 26 с.
- Коляда Н.А. Качество семян некоторых видов семейства Гортензиевые в дендрарии Горно-таежной станции ДВО РАН // Мат-лы Междунар. науч. конф., посвященной 75-летию со дня образования Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Минск. 2007. Т. 1. С. 176–178.
- Коркуленко О.М. Особливості плодоношення інтродукованих видів та культиварів роду *Hydrangea* L. // Науковий вісник НУБіП України. Серія: Лісівництво та декоративне садівництво. Київ. 2013. № 187–1. С. 75–80.
- Лобова Т.А. Анатомио-морфологическая характеристика семян группы семейств порядка *Hydrangeales*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб, 2000. 23 с.
- Мазуренко М.Т., Хохряков А.П. Структура и морфогенез кустарников. М.: Наука, 1977. 159 с.
- Мурзабулатова Ф.К., Полякова Н.В. Коллекционный фонд рода Гортензия (*Hydrangea* L.) в ботаническом саду-институте Уфимского научного центра РАН // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 4. С. 69–76.
- Путенихин В.П., Путенихина К.В., Шигапов З.Х. Кедр сибирский в Башкирском Предуралье и на Южном Урале: биологические и лесоводственные особенности при интродукции. Уфа: Башкирская Энциклопедия, 2017. 248 с.
- Рекомендации по изучению онтогенеза в ботанических садах СССР. Киев, 1990. 378 с.
- Семкина А.А., Цыкарев Ю.В. Особенности прорастания семян гортензии Бретшнейдера // Тезисы докладов совещания по семеноведению интродуцентов. Москва, 1994. С. 35–36.

- Серебряков И.Г. Морфология вегетативных органов высших растений. М.: Советская наука, 1952. 391 с.
- Серебряков И.Г. Жизненные формы высших растений и их изучение. // Полевая геоботаника. М.-Л.: Наука, 1964. Т. 3. С. 146–205.
- Тахтаджян А.Л. Сравнительная анатомия семян. Том 6. Двудольные. *Rosidae* II. СПб.: Наука, 2000. 455 с.
- Тищенко М.П. Онтогенез смородины темно-пурпуровой (*Ribes atropurpureum* С.А. Мей) // Онтогенетический атлас лекарственных растений: Научное издание. Т. IV. Йошкар-Ола: МарГУ, 2004. С. 43–48.
- Уранов А.А. Онтогенез и возрастной состав популяций // Онтогенез и возрастной состав популяций цветковых растений. М.: Наука, 1967. С. 3–8.
- Чубарь Е.А. Онтогенез Дальневосточных видов рода *Deutzia* (Hydrangeaceae) // Ботанический журн. 2013. Т. 98. № 12. С. 1524–1541.
- Albert V.A., Gustafsson M.H.G., Laurenzio L. Ontogenetic systematics, molecular developmental genetics // Molecular Systematics of Plants. 2012. P. 349–370.
- Borchert R. The concept of juvenility in woody plants // Symposium on Juvenility in Woody Perennials. 1975. V. 56. P. 21–36.
- Donovan L.A., Ehleringer J.R. Ecophysiological differences among juvenile and reproductive plants of several woody species // Oecologia. 1991. V. 86. № 4. P. 594–597.
- Hackett W.P. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants // Horticultural Reviews. 1985. P. 109–569.
- Hara M., Kimura M., Hirabuki Y., Kanno H. Temporal and spatial patterns of seed production of four shrub species in a climax beech forest // Japanese J. Ecology. 1999. № 49. P. 91–104.
- Hufford L. Seed morphology of Hydrangeaceae and its phylogenetic implication // Intern. J. Plant Sci. 1995. V. 156. № 4. P. 555–580.
- Hufford L. Ontogeny and morphology of the fertile flowers of Hydrangea and allied genera of tribe Hydrangeae (Hydrangeaceae) // Botanical J. Linnean Society. 2001. V. 137. № 2. P. 139–187.
- Kanno H., Seiwa K. Sexual vs. vegetative reproduction in relation to forest dynamics in the understorey shrub, *Hydrangea paniculata* (Saxifragaceae) // Plant Ecology. 2004. V. 170. № 1. P. 43–53.
- Morozowska M., Woznicka A., Kujawa M. Microstructure of fruits and seeds of selected species of Hydrangeaceae (Cornales) and systematic importance // Acta Scientiarum Poloniarum. Hortum Cultus. 2012. V. 11. № 4. P. 17–38.
- Paiva E.A.S., Machado S.R. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion // Brazilian J. Biology. 2006. V. 66. № 1b.
- Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation // Cryoletters. 2004. V. 25. № 3. P. 205–212.
- Roels P., Decraene L.P.R., Smets E.F. A floral ontogenetic investigation of the Hydrangeaceae // Nordic J. Botany. 1997. V. 17. № 3. P. 235–254.
- Van Gelderen C.J., van Gelderen D.M. Encyclopedia of *Hydrangeas*. Timber Press, Portland – Cambridge, 2004. 279 p.
- Wang J.-W., Park M.Y., Wang L.-J., Koo Y., Chen X.-Y., Detlef W. MiRNA control of vegetative phase change in trees // PLoS Genetics. 2011. V. 7. № 2.

## Early Ontogenetic Stages of the *Hydrangea* Species in Floriculture Conditions

F. K. Murzabulatova<sup>1,\*</sup>, Z. Kh. Shigapov<sup>1</sup>, and N. V. Polyakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South-Ural Botanical Garden-Institute – A Separate Structural Unit of the Federal State Budget Scientific Institution Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Mendeleeva 195, building 3, Ufa, 450080 Russian, Republic of Bashkortostan

\*e-mail: murzabulatova@yandex.ru

The initial stages of ontogenesis of species of the genus *Hydrangea* L. were described. The studies were carried out during 2007–2015. The purpose of this work was to describe the initial stages of ontogenesis of representatives of the genus *Hydrangea* under the culture conditions in the Bashkir Cis-Urals. In the course of research work, the following tasks were resolved: the stages of the virginil age state were determined for hydrangea species under investigation; the features characteristic for each stage were described; the morphological parameters of plants at each stage of development were characterized; the characteristic features of the species early ontogenesis were revealed. Four stages of the virginil age state were described: plantules, juvenile, immature and adult vegetative plants. The stage of juvenile plant in hydrangeas begins on average on the 25th day after the seed germination with the appearance of the second pair of true leaves. The stage of immature plant begins mainly at the age of 3 months, after the beginning of branching of the dominating shoot. The stage of adult vegetative plant begins at the 4th–5th year with the onset of tillering and acquisition of the life form of an adult plant.

**Keywords:** *Hydrangea*, initial stages of development, age state, plantules, juvenile plants, immature plants, adult phases of vegetative development in plants

## ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА ПЕРВОГО ТИПА НА РАЗВИТИЕ *IN VITRO* ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2021 г. Е. Ю. Брусенцев<sup>а</sup>, Е. А. Кизилова<sup>а</sup>, Т. Н. Игонина<sup>а</sup>,  
С. В. Раннева<sup>а</sup>, С. Я. Амстиславский<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”,  
пр. ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

\*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 03.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Криоконсервацию гамет и эмбрионов широко применяют для сохранения генетических ресурсов животных. В работе исследовано развитие дробящихся эмбрионов мышей линий CD1 в культуре *in vitro* при воздействии инсулиноподобного фактора роста первого типа (IGF-1) после процедур криоконсервации. Зародыши мышей, полученные *in vivo* на стадии 4–6 клеток вначале замораживали, согласно стандартному протоколу программного замораживания с использованием 10%-го раствора пропиленгликоля в качестве криопротектора, а после оттаивания культивировали *in vitro* до стадии бластоцисты в среде KSOM в течение 48 ч. Добавление в среду для культивирования IGF-1 в концентрации 40 нг/мл приводило к повышению доли развивающихся до стадии бластоцисты эмбрионов по сравнению с контролем (78.9 и 47.4% соответственно,  $p < 0.01$ ). Кроме того, заморожено-оттаянные эмбрионы после культивирования с IGF-1 имели большее число клеток по сравнению с контролем ( $79.8 \pm 3.9$  и  $58.6 \pm 3.6$  клеток соответственно,  $p < 0.001$ ). Между тем, уровень фрагментации ядер не различался между этими группами бластоцист. Результаты представленных экспериментов свидетельствуют о стимулирующем воздействии фактора роста IGF-1 на развитие дробящихся эмбрионов мышей в преимплантационный период после их криоконсервации.

**Ключевые слова:** мыши, преимплантационные эмбрионы, криоконсервация, культивирование *in vitro*, IGF-1

DOI: 10.31857/S0475145021020026

### ВВЕДЕНИЕ

Криоконсервацию биологических объектов и создание криобанков генетических ресурсов успешно используют для сохранения биоразнообразия животных; в таких криобанках хранят сперматозоиды, ооциты и преимплантационные эмбрионы (Agca, 2012). Однако в процессе охлаждения и последующего оттаивания эмбрионов нередко возникают криповреждения (Игонина и др., 2015). Культивирование эмбрионов *in vitro* после процедур криоконсервации позволяет оценить степень их жизнеспособности (Brusentsev et al., 2014; Игонина и др., 2015).

Современные питательные среды для культивирования *in vitro* репродуктивных клеток могут сильно варьировать по своему химическому составу, оставаясь при этом субоптимальными по сравнению с условиями *in vivo* (Aguilar, Reyley, 2005), что негативно влияет на качество эмбрио-

нов млекопитающих (Khatir et al., 2005; Brusentsev et al., 2014). Известно, что включение отдельных ростовых факторов в состав культуральной среды может минимизировать негативные эффекты культивирования эмбрионов *in vitro* (Amstislavsky et al., 2015; Брусенцев и др., 2015).

Одним из важнейших ростовых факторов, участвующих в росте и развитии фолликулов и эмбрионов, является инсулиноподобный фактор роста 1-го типа (IGF-1), который в перспективе может быть использован в клинической практике. Рецепторы к IGF-1 детектируются, начиная с ранних стадий дробления зародышей мышей (Heuener et al., 1989). В настоящее время имеются данные о стимулирующем воздействии IGF-1 на эмбрионы этих животных (Lin et al., 2003). Однако, изучение воздействия фактора IGF-1 на эмбрионы мышей после процедур замораживания-оттаивания проводили лишь в двух исследо-

ваниях (Desai et al., 2000, 2007). В первом из них изучали развитие *in vitro* преимплантационных эмбрионов после их криоконсервации на стадии морулы (Desai et al., 2000). В другой работе этого же коллектива авторов изучали влияние IGF-1 на развитие *in vitro* преимплантационных эмбрионов после их криоконсервации на стадии зиготы (Desai et al., 2007). Целью настоящего исследования было изучение влияния IGF-1 на развитие *in vitro* эмбрионов мышей после их криоконсервации на стадии дробления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте было использовано 10 половозрелых самок и пять самцов мышей линии CD1 в возрасте от двух до трех месяцев. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия).

Самок мышей линии CD1 на стадии проэструс-эструс ссаживали на ночь с фертильными самцами этой же линии. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности. Таких самок подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков на второй день беременности, в 16 ч. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой Flushing Solution (FertiPro, Belgium), как описано ранее (Igonina et al., 2019).

Для криоконсервации дробящихся зародышей мышей применяли программное замораживание. Все полученные эмбрионы были на стадии 4–6 клеток. В качестве криопротектора использовали 10% (v/v) пропиленгликоль (ХимМед, Россия) в среде Flushing Solution (FertiPro, Belgium). Эмбрионы помещали в центральную часть (второй сектор) 0.25 мл пластиковой соломины (Cryo Bio System, Франция) и криоконсервировали с использованием программного замораживателя CL 8800 (CryoLogic, Australia) как описано ранее (Игонина и др., 2015; Amstislavsky et al., 2015).

Для оттаивания соломины с эмбрионами доставали из резервуара с жидким азотом, выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30.0°C как описано ранее (Игонина и др., 2015; Amstislavsky et al., 2015). Содержимое выдавливали на чашку Петри (Corning, USA) и освобождали от криопротектора путем переноса оттаянных эмбрионов через три капли (50 мкл) среды Flushing Solution (FertiPro, Бельгия). После удаления криопротектора, эмбрионы оценивали визуально. Зародыши, у которых было разрушено более 25% бластомеров, либо были серьезные нарушения прозрачной оболочки (или ее полное отсутствие) были отбракованы согласно критериям, принятым для оценки эффективности процедуры криоконсервации эмбрионов мышей (Игонина и др.,

2015); остальные – переносили в индивидуальную каплю среды KSOM (Merck, Германия) и культивировали *in vitro* как описано ниже.

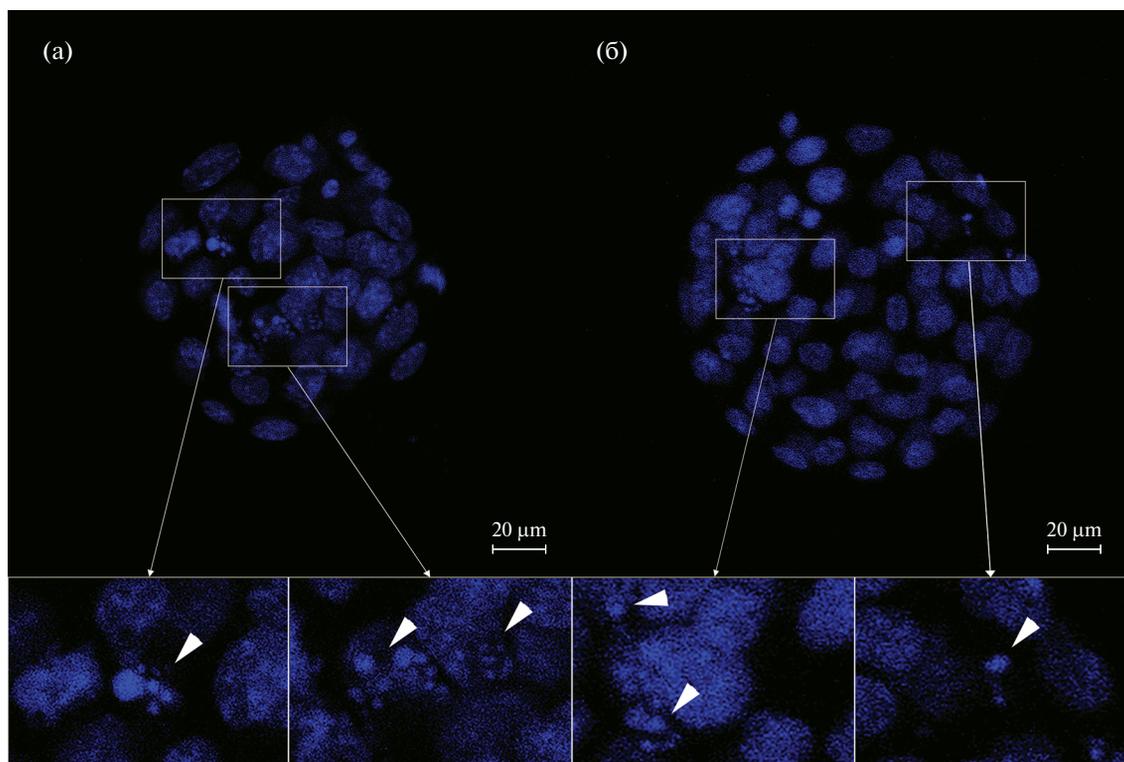
Были сформированы две группы: 1) без добавления факторов роста (контроль); 2) с добавлением 40 нг/мл IGF-1 (Merck, Германия). Данная дозировка выбрана нами исходя из литературных данных (Desai et al., 2000, 2007) и наших предварительных исследований. Согласно нашей предыдущей работы, эта дозировка была оптимальной для развития эмбрионов мышей без криоконсервации. Чистота препарата IGF-1 составляла  $\geq 98\%$ . Культивирование производили под минеральным маслом (Merck, Germany) в течение 48 ч при 37.0°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 90% в CO<sub>2</sub>-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия).

Оценку преимплантационных эмбрионов проводили микроскопически, определяя стадию их развития при помощи стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия). В бластоцистах определяли наличие хэтчинга, подсчитывали число клеток, индекс фрагментации, а также митотический индекс после окрашивания DAPI (2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола), как описано нами ранее (Amstislavsky et al., 2015). Подсчет числа интерфазных ядер, их фрагментов и метафазных пластинок в развивающихся бластоцистах производили путем визуальной оценки препаратов с применением флуоресцентного микроскопа AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия), имеющегося в распоряжении ЦКП МАБО СО РАН, с соответствующим кубическим фильтром для окрашивания DAPI. Индекс фрагментации рассчитывали, как число фрагментов  $\times 100$  деленое на общее число ядер. Митотический индекс рассчитывали, как число митозов  $\times 100$  деленое на общее число ядер.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc). Доли зародышей, развивающихся до стадии бластоцисты сравнивали с помощью теста хи-квадрат. Для сравнения данных по числу клеток в бластоцистах и индексу фрагментации использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

После процедур замораживания-оттаивания 76 из 89 зародышей, визуально были оценены как морфологически нормальные (т.о. всего было отбраковано ~15%). Все морфологически нормальные эмбрионы были использованы в дальнейших экспериментах: 38 из них культивировали в среде KSOM с добавлением IGF-1 в концентрации 40 нг/мл и 38 – культивировали в той же среде без добавления этого фактора роста. Добавление в



**Рис. 1.** Бластоцисты после культивирования *in vitro* заморожено-оттаянных эмбрионов мышей. Видны ядра клеток (окраска DAPI). Стрелки указывают на фрагментации ядер. (а) без фактора роста (контроль). (б) с IGF-1 (40 нг/мл).

культуральную среду IGF-1 приводило к улучшению показателей развития эмбрионов по сравнению с контролем (рис. 1а, 1б), таких как доля зародышей, развивающихся до стадии бластоцисты (78.9 и 47.4% соответственно,  $p < 0.01$ ) и число клеток в них ( $79.8 \pm 3.9$  и  $58.6 \pm 3.6$  соответственно,  $p < 0.001$ ). Однако не было обнаружено достоверных различий по доле бластоцист достигших стадии хэтчинга между экспериментальной группой и контролем (13.1 и 7.9% соответственно). При этом митотический индекс был существенно ниже при использовании IGF-1 по сравнению с контрольной группой ( $5.0 \pm 0.7$  и  $14.1 \pm 3.0$  соответственно,  $p < 0.01$ ). Между тем, не было обнаружено достоверных различий по индексу фрагментации между экспериментальной группой и контролем ( $9.2 \pm 1.5$  и  $9.8 \pm 1.7$  соответственно).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Давно установленный факт замедленного развития зародышей, полученных *in vitro*, по сравнению с эмбрионами, находящимися в условиях *in vivo* (Bowman, McLaren, 1970), указывает на важную роль паракринных факторов, секретируемых репродуктивным трактом, в ускорении их развития. Естественная среда репродуктивных путей млекопитающих содержит множество разнообразных компонентов, в том числе различные факторы

роста (Aguilar, Reyley, 2005). Так, например, в эндометрии человека показана экспрессия большого числа цитокинов и факторов роста, поддерживающих эмбриональное развитие (Kawamura et al., 2012).

Исследования на животных моделях подтверждают важную роль аутокринных/паракринных факторов, секретируемых преимплантационными эмбрионами и репродуктивным трактом для эмбрионального развития и имплантации (Neira et al., 2010). Перспективным подходом к оптимизации культуральных систем является включение отдельных факторов роста, присутствующих во внутриматочной среде *in vivo*, или их комбинаций в питательные среды, что способствует улучшению раннего эмбрионального развития и увеличению доли имплантирующихся зародышей (Kawamura et al., 2012; Брусенцев и др., 2015; Amstislavsky et al., 2015).

В нашей работе было показано, что при культивировании с IGF-1 заморожено-оттаянных эмбрионов на стадии дробления повышается доля развивающихся бластоцист и число клеток в них. Наши данные согласуются с результатами более ранних исследований, в которых было показано, что добавление IGF-1 к средам для культивирования *in vitro* повышало долю развивающихся до стадии бластоцисты эмбрионов у мышей (Desai et al.,

2000), и у других видов млекопитающих (Sirisathien, Brackett, 2003; Chen et al., 2017). В частности, в концентрации 30 нг/мл этот фактор повышал долю образования бластоцист и число клеток в них при культивировании зародышей мышей *in vitro* (Desai et al., 2000). Показано, что IGF-1 стимулирует эмбриональный рост и развитие, действуя в качестве митогенного фактора, индуцирующего пролиферацию клеток через митоген-активированную протеинкиназу (Velazquez et al., 2009). Кроме того, IGF-1 участвует в регулировании связанных с апоптозом генов Bcl-2/Bax (Chen et al., 2017). Это подтверждается результатами других исследований, которые указывают на то, что культивирование с IGF-1 способствует снижению уровня апоптоза в бластоцистах, которое происходит через активацию PI3K/Akt пути (Velazquez et al., 2009).

Согласно нашим данным, митотический индекс в бластоцистах при культивировании с IGF-1 был ниже, чем в контроле. Действительно, наши результаты, в своей совокупности, свидетельствуют о том, что при воздействии данного фактора роста бластоцисты более продвинуты в своем развитии (имеют больше число клеток). Между тем, известно, что в более поздних преимплантационных эмбрионах мышей скорость деления клеток снижается (Copp, 1978; Handyside, Hunter, 1986).

Ранее уже исследовали влияние фактора IGF-1 на процессы восстановления преимплантационных эмбрионов мышей, подвергавшихся криоконсервации на стадии морулы (Desai et al., 2000) и зиготы (Desai et al., 2007). Было показано, что морулы мышей после криоконсервации и последующего оттаивания быстрее достигают стадии бластоцисты и имеют больше клеток, если культивировать их с IGF-1 в концентрации 30 нг/мл (Desai et al., 2000). Однако, если эмбрионы мышей были заморожены на стадии зиготы этот эффект нивелировался (Desai et al., 2007). В данной работе мы восполнили пробел, связанный с тем, что не было изучено влияние этого фактора на развитие зародышей мышей после их криоконсервации на стадии дробления и продемонстрировали способность IGF-1 в концентрации 40 нг/мл стимулировать развитие дробящихся зародышей в преимплантационный период после процедур замораживания-оттаивания.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП “Генетических ресурсов лабораторных животных” (<http://spf.bionet.nsc.ru>) и ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy>).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-016-00025, бюджетного проекта № 0324-2019-0041-С-01 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский придумали и разработали дизайн эксперимента. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.В. Раннева получали преимплантационные эмбрионы, проводили их замораживание-оттаивание, а также их культивирование *in vitro*. Автор Е.А. Кизилова проводила окрашивание DAPI, подсчет числа интерфазных ядер, их фрагментов и метафазных пластинок в развивающихся бластоцистах. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, С.В. Раннева и С.Я. Амстиславский участвовали в обработке данных. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Амстиславский С.Я. Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 372–377.
- Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Наприменов В.А., Амстиславский С.Я. Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 77–81.
- Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals // Theriogenology. 2012. V. 78. P. 1653–1665.
- Aguiar J.J., Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects // Anim. Reprod. 2005. V. 2. № 2. P. 91–105.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation

- embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) // *Theriogenology*. 2015. V. 83. P. 1056–1063.
- Brusentsev E.Y., Igonina T.N., Amstislavsky S.Y. Traditional and modern approaches to culture of preimplantation mammalian embryos *in vitro* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2014. V. 45. P. 53–65.  
https://doi.org/10.1134/S1062360414020039
- Bowman P., McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 24. № 1. P. 203–207.
- Chen P., Pan Y., Cui Y. et al. Insulin-like growth factor I enhances the developmental competence of yak embryos by modulating aquaporin 3 // *Reprod. Domest. Anim.* 2017. V. 52. № 5. P. 825–835.
- Copp A.J. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the polar trophectoderm // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1979. V. 51. P. 109–120.
- Desai N., Kattal N., Abdel Hafez F.F., Szeptycki-Lawson J., Goldfarb J. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and co-culture can affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007. V. 24. № 6. P. 215–222.
- Desai N., Lawson J., Goldfarb J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 2. P. 410–418.
- Handyside A.H., Susan H. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation // *Roux. Arch. Dev. Biol.* 1986. V. 195. № 8. P. 519–526.
- Heyner S., Smith R.M., Schultz G.A. Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development // *Bioessays*. 1989. V. 11. № 6. P. 171–176.
- Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M. et al. Effects of *in vitro* culture at the preimplantation embryo stage on early development and hypertension in ISIAH rats // *Hypertens. Pregnancy*. 2019. P. 1–9.
- Kawamura K., Chen Y., Shu Y. et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth *in vitro* using autocrine/paracrine growth factors // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. e49328.
- Khatir H., Anouassi A., Tibary A. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced *in vitro* using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cells) // *Reprod. Domest. Anim.* 2005. V. 40. № 3. P. 245–249.
- Lin T.-C., Yen J.-M., Gong K.-B., Hsu T.-T., Chen L.-R. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line // *BMC Cell Biology*. 2003. V. 4. P. 14.
- Neira J.A., Tainturier D., Pena M.A., Martal J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro* // *Theriogenology*. 2010. V. 73. № 5. P. 595–604.
- Sirisathien S., Brackett B.G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I // *Mol. Reprod. Dev.* 2003. V. 65. № 1. P. 51–56.
- Velazquez M.A., Zaraza J., Oropeza A., Webb R., Niemann H. The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors // *Reproduction*. 2009. V. 137. № 2. P. 161–180.

## Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the *in vitro* Development of Mouse Embryos after Cryopreservation

E. Yu. Brusentsev<sup>1</sup>, E. A. Kizilova<sup>1</sup>, T. N. Igonina<sup>1</sup>, S. V. Ranneva<sup>1</sup>, and S. Ya. Amstislavsky<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

\*e-mail: amstis@yandex.ru

Cryopreservation of gametes and embryos is widely used for mammalian Genome Resource Banking. Effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the *in vitro* development of cleavage stage CD1 mouse embryos after their cryopreservation were studied. The mouse embryos developed *in vivo* up to the 4–6 cell stage were frozen in a programmable freezer according to a standard protocol with a 10% propylene glycol as a cryoprotectant, thereafter were thawed and cultured *in vitro* in KSOM for 48 hours. The percentage of embryos developed up to blastocyst stage in culture medium supplemented with IGF-1 (40 ng/mL) was higher as compared to controls (78.9 and 47.4%, respectively,  $p < 0.01$ ). Moreover, blastocysts developed in the presence of IGF-1 contained more cells as compared to controls ( $79.8 \pm 3.9$  and  $58.6 \pm 3.6$  cells, respectively,  $p < 0.001$ ). However, index of nuclear fragmentation did not differ between these groups. Experimental results presented herein revealed the stimulating effects of IGF-1 on the mouse preimplantation embryos after their cryopreservation.

**Keywords:** mice, preimplantation embryos, cryopreservation, *in vitro* culture, IGF-1

## МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ТЕМПЕ РАЗВИТИЯ И ПОТРЕБЛЕНИИ КИСЛОРОДА ГОЛОВАСТИКАМИ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ (*RANA ARVALIS* NILSSON, 1842, ANURA: AMPHIBIA)

© 2021 г. С. М. Ляпков<sup>а, \*</sup>, С. Ю. Клеймёнов<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биологической эволюции, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

<sup>б</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: lyarkov@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2020 г.

После доработки 22.11.2020 г.

Принята к публикации 26.11.2020 г.

Проведено сравнение темпа развития и скорости потребления кислорода у головастика остромордой лягушки из разных популяций (Брянская и Московская области) при выращивании в лабораторных условиях при температуре 20°C. Темп развития, скорость потребления кислорода на особь и на грамм веса, а также скорость прироста массы тела у особей из более северной популяции оказались достоверно выше. Полученные данные соответствуют выявленной нами ранее закономерности: более высокая скорость роста головастика характерна для популяций со сравнительно коротким сезоном активности, что указывает на наличие наследственной основы особенностей их метаболизма.

**Ключевые слова:** темп развития, потребление кислорода, головастики, остромордая лягушка, межпопуляционные различия

**DOI:** 10.31857/S0475145021020038

### ВВЕДЕНИЕ

Изменчивость количественных признаков, направленная против градиента условий среды, — это выявляемые в естественных условиях межпопуляционные фенотипические различия, направленность которых прямо противоположна адаптивным генетическим изменениям, формирующимся как ответ на данный градиент внешних условий. Даже если такие изменения уже сформированы, их можно выявить только в экспериментах, обычно в одинаковых условиях лабораторных опытов, существенно реже с помощью межпопуляционных переносов особей в естественных условиях (Berven, 1982). Так, например, на представителях двух широкоареальных видов бурых лягушек — остромордой (*Rana arvalis* Nilss.) и травяной (*Rana temporaria* L.), показано, что в естественной среде обитания в южных популяциях обоих видов темп развития головастика выше, чем в северных, что обусловлено разной температурой мест обитания. Но в лабораторных условиях при одинаковой температуре содержания, особи из северных популяций развивались быстрее, чем из южных (Ляпков и др., 2009; Ляпков, 2016). Преимущество сравнительно быстрого роста и развития особей из более северных популяций очевидно,

поскольку в условиях ограниченной длительности сезона активности это позволяет им быстрее достичь необходимого размера для успешной зимовки.

Похожую закономерность выявили наблюдения зависимости энергетического метаболизма от температуры у пойкилотермных животных. Интенсивность метаболизма у представителей северных популяций, рассчитанная по уравнению зависимости от температуры, заметно выше аналогичной величины у обитателей низких широт при той же температуре. В биоэнергетике это явление носит название температурной компенсации метаболизма (Озернюк, 2006).

Вместе с тем, известны факты модификации зависимости энергетического метаболизма от температуры при акклимации пойкилотермных животных к разным температурам содержания вследствие изменения экспрессии изоферментов. Показано, что смещение минимума константы Михаэлиса лактатдегидрогеназы рыб при переносе особей в среду с более высокой или низкой температурой соответствует новым условиям обитания и происходит за счет изменения ее изоферментного состава (Klyachko, Ozernyuk, 1998). Однако выращенные в одинаковых лабораторных условиях головастики

**Таблица 1.** Масса тела, средний прирост массы и скорость потребления кислорода головастиками остромордой лягушки

Популяция	Группа		n	Вес головастика (мг)	Потребление кислорода		Средний прирост массы тела (мг сутки <sup>-1</sup> )
					на особь (мл мин <sup>-1</sup> )	на грамм веса (мл г <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup> )	
	♀	♂		$x \pm \text{st.er.}$	$x \pm \text{st.er.}$	$x \pm \text{st.er.}$	$x \pm \text{st.er.}$
Брянская обл.	1	1	20	698.8 ± 27.2	0.886 ± 0.062	1.280 ± 0.082	16.05 ± 0.61
		2	20	710.0 ± 30.9	0.942 ± 0.053	1.352 ± 0.077	16.32 ± 0.71
	2	1	20	687.5 ± 12.0	0.875 ± 0.032	1.291 ± 0.054	15.80 ± 0.27
		2	20	695.0 ± 19.2	0.986 ± 0.029	1.426 ± 0.037	15.98 ± 0.45
	Все вместе		80	697.8 ± 11.5	<b>0.922 ± 0.023</b>	<b>1.337 ± 0.033</b>	<b>16.04 ± 0.26</b>
Московская обл.	3	3	20	654.0 ± 14.0	1.085 ± 0.039	1.667 ± 0.060	17.68 ± 0.38
		4	20	677.5 ± 13.5	1.025 ± 0.028	1.516 ± 0.035	18.31 ± 0.36
	4	3	20	670.5 ± 16.3	1.012 ± 0.036	1.514 ± 0.049	18.63 ± 0.45
		4	20	<b>735.0 ± 17.3*</b>	1.101 ± 0.027	1.506 ± 0.038	<b>20.42 ± 0.48*</b>
	Все вместе		80	684.2 ± 8.3	<b>1.056 ± 0.017</b>	<b>1.551 ± 0.024</b>	<b>18.76 ± 0.24</b>

Примечание. Выделены жирным шрифтом пары средних для популяций значений, достоверно различающиеся между собой, n – объем выборки;  $x \pm \text{st.er.}$  – среднее ± стандартная ошибка. \* – Достоверно отличаются от аналогичных величин у остальных групп данной популяции.

травяной лягушки из нескольких географически удаленных друг от друга популяций устойчиво различались по интенсивности потребления кислорода, что свидетельствует об отсутствии полной акклимации в период предметаморфозного роста (Lindgren, Laurila, 2009).

Вопрос о том, в какой мере такие важные свойства организма как темп развития и интенсивность метаболизма закреплены генетически, а в какой представлены нормой реакции в пределах диапазона толерантности вида, до сих пор открыт.

Задачей нашей работы было изучение интенсивности метаболизма головастика остромордой лягушки, происходящих из двух популяций, обитающих на разной широте (условно – более южной и более северной), при их выращивании в стандартных лабораторных условиях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала были использованы по 4 группы полных sibсов, полученные в результате экспериментальных скрещиваний половозрелых особей остромордой лягушки, отловленных в каждой из двух исследованных популяций в нерестовых водоемах в период размножения. Место отлова особей из первой популяции находилось в Брянской обл. (52°27' N; 33°53' E), длительность сезона активности – 7 мес. Местообитание второй популяции – Московская обл. (55°44' N, 36°51' E), длительность сезона активности – 6 мес., начало размножения – в среднем на

2 недели позднее (Ляпков и др., 2009). В каждой популяции были отловлены по 2 самки и по 2 самца. В результате контролируемых перекрестных скрещиваний, от родителей каждой из двух исследованных популяций было получено по 4 различные группы потомков – полных sibсов (см. табл. 1). Оплодотворенные яйца содержали в емкостях с уровнем воды 5 см, при температуре около 15°C до достижения 39-й стадии (начало активного питания по таблицам нормального развития травяной лягушки по Дабагян и Слепцовой, 1975). Затем головастика рассаживали по 20 экз. от каждой группы sibсов в 2 аквариума емкостью 20 л каждый. Дальнейшее выращивание головастика во всех аквариумах проводили при постоянной температуре 20°C и при одинаковом режиме кормления кормом для декоративных рыб фирмы TetraMin, а также сушеным гаммарусом и вареной крапивой. Для определения интенсивности потребления кислорода использовали по 20 экз. от каждой из 4 групп sibсов, происходящих из двух популяций, всего 160 экз.

Определение интенсивности потребления кислорода головастиками проводили на стадиях 46–47 (по: Дабагян, Слепцова, 1975). Измерения производили с помощью оксиметра Orion Star A323 RDO/DO meter (Thermo Fisher Scientific Inc.). Головастика по одному экземпляру помещали в герметичную стеклянную камеру, из которой сразу отбирали 1 мл воды для измерения начальной концентрации кислорода. Отбор пробы производили таким образом, чтобы в камере осталось

ровно 20 мл воды и отсутствовали пузырьки воздуха. Через 20 мин из камеры отбирали вторую пробу воды для измерения концентрации кислорода. Для заполнения камер использовали воду из аквариума, в котором содержался данный экземпляр. Контролем служили 2–3 камеры объемом 20 мл без объектов, заполненные водой из того же аквариума. Интервал времени между отборами проб измеряли с точностью до 1 мин. Скорость потребления кислорода вычисляли для камеры индивидуально, затем вносили поправку на потребление кислорода микробиотой, вычитая среднее значение скорости потребления кислорода в камерах без объекта. По окончании измерения потребления кислорода каждого головастика взвешивали с точностью до 10 мг и затем возвращали в аквариум.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Достоверность различий между средними для популяций значениями оценивали с помощью двухфакторного иерархического дисперсионного анализа, в котором первым фактором (включающим в себя градации второго фактора) были “популяции”, вторым фактором – группы полных sibсов. Достоверность различий между средними значениями потомства разных самцов и разных самок в пределах каждой из двух популяций оценивали с помощью трехфакторного дисперсионного анализа, с факторами “самки”, “самцы” и “повторности” (схема с полной классификацией).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Различия между двумя популяциями*

Продолжительность развития от оплодотворения до стадии 47 составила в потомстве популяции из Брянской обл. 43.5 сут, из Московской обл. – 36.5 сут. Различия средних составляют 19.2% и достоверны ( $p < 0.001$ ). Не обнаружено достоверных межпопуляционных различий по среднему значению массы тела головастика на стадии 46–47 (табл. 1).

Результаты измерения интенсивности потребления кислорода оказались сходными по величине с известными из научной литературы данными для близкого вида – травяной лягушки (Lindgren, Laurila, 2009). Обнаружены достоверные различия средних значений потребления кислорода головастиками из разных популяций в расчете на особь и на единицу массы тела. Оба показателя были достоверно выше (при  $p < 0.0001$ ) у потомства родителей, взятых из Московской обл., на 13.5 и 14.8% соответственно (табл. 1). Скорость прироста массы тела также была выше у головастика популяции Московской обл. на 15.6% ( $p < 0.0001$ ).

### *Внутрипопуляционная изменчивость исследованных характеристик*

В пределах популяции из Брянской обл. не было выявлено различий между потомством двух самок и между потомством двух самцов по средним значениям всех четырех изучаемых характеристик (табл. 1). В пределах популяции из Московской обл. средние значения массы тела и скорости ее прироста у потомков самки 2 и самца 2 было достоверно больше, чем у трех других групп потомков (табл. 1). Не выявлено различий между потомством двух самок и между потомством двух самцов по средним значениям потребления кислорода на особь и по средним значениям потребления кислорода на грамм массы тела, что указывает на отсутствие влияния на них материнского эффекта. Отсутствие влияния самцов на эти характеристики метаболизма в обеих популяциях означает низкую аддитивную изменчивость, что принято интерпретировать как достаточно жесткий контроль отбором по данным признакам (Falconer, Mackay, 1996).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Достоверные различия по продолжительности развития до 47 стадии при одинаковой температуре содержания указывают на устойчивые межпопуляционные различия темпов развития остромордой лягушки из Брянской и Московской областей. Результаты проведенных ранее исследований темпов развития и роста головастика в лаборатории при таких же условиях (20°C и начальная плотность 1 особь на 1 л) из тех же популяций показали, что головастики из Брянской обл. развивались достоверно медленнее, но были несколько крупнее более северных конспецификов из Московской обл. Продолжительность развития от оплодотворения до завершения метаморфоза составляла 53.6 и 49.7 суток соответственно, а длина тела после завершения метаморфоза равнялась 14.52 и 13.88 мм соответственно (Ляпков и др., 2009). В нашем эксперименте соотношение массы тела головастика сохраняло данную тенденцию, хотя различия не были достоверны.

Полученные нами результаты показали четкую направленность различий в потреблении кислорода: у особей из популяции с более длительным сезоном активности этот показатель достоверно ниже в сравнении с особями из более северной популяции. Такой результат вполне ожидаем, исходя из установленного ранее факта более высокой скорости роста головастика из популяций со сравнительно коротким сезоном активности (Ляпков и др., 2009). Сохранение этого соотношения при развитии головастика в лабораторных условиях при одинаковой температуре указывает на то, что особенности их физиологии, задающие разный

темпов развития в популяциях, вероятно, закреплены генетически.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа по постановке скрещиваний и выращиванию головастиков в лабораторных условиях выполнялась в рамках госзадания (Ч. 2 № ЦИТИС 04-1-21). Измерение потребления кислорода проводилось в рамках госзадания 0088-2021-0009.

#### 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, что конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в проведение исследований и написание статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дабазян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. 1975. С. 442–462.
- Ляпков С.М. Географическая изменчивость характеристик метаморфов травяных лягушек // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2016. Вып. 3. С. 86–91.
- Ляпков С.М., Корнилова М.Б., Сербинова И.А., Корзун Е.В., Новицкий Р.В. Формирование направленной географической изменчивости особенностей жизненного цикла бурых лягушек // Современная герпетология. 2009. Т. 9. № 3/4. С. 103–121.
- Озернюк Н.Д. Экологическая энергетика животных. М.: Т-во научных изданий КМК, 2006. 168 с.
- Berven K.A. The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica*. II. An experimental analysis of larval development // Oecologia, Berlin. 1982. V. 52. № 3. P. 360–369.
- Falconer D. S., Mackay T. F. C. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Essex, Longman, Harlow, 1996. 464 p.
- Klyachko O. S., Ozernyuk N. D. Functional and structural properties of lactate dehydrogenase from embryos of different fishes // Comp. Biochem. Physiol. 1998. V. 119B. P. 77–80.
- Lindgren B., Laurila A. Physiological variation along a geographical gradient: is growth rate correlated with routine metabolic rate in *Rana temporaria* tadpoles? // Biological J. Linnean Society. 2009. V. 98. P. 217–224.

## Interpopulation Differences in the Developmental Rate and Oxygen Consumption in Tadpoles of Moor Frog (*Rana arvalis* Nilsson, 1842, Anura: Amphibia)

S. M. Lyapkov<sup>1,\*</sup> and S. Yu. Kleymenov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Evolutionary Biology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: lyapkov@mail.ru

A comparative study of the developmental rate and oxygen consumption in *Rana arvalis* tadpoles from the population of the Bryansk region (Southern) and Moscow region (Northern) in laboratory conditions at a temperature of 20°C was carried out. The rates of growth and development, the rate of oxygen consumption as well as the specific rate of oxygen consumption in individuals from a Northern population were significantly higher. This result corresponds to the previously detected higher growth rate of tadpoles from populations with a relatively short season of activity (Northern) and indicates that these tadpole metabolism features are probably genetically determined.

**Keywords:** developmental rate, oxygen consumption, tadpoles, *Rana arvalis*, interpopulation differences