

СОДЕРЖАНИЕ

Том 48, номер 5, 2022

Обзор

Генезис рыб отряда Salmoniformes

В. Н. Долганов

291

Оригинальные статьи

Реакции антиоксидантной системы эмбрионов собачки желто-красной *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) (Blenniiformes: Blennidae) на загрязнение морской среды мазутом

И. И. Руднева

298

Оценка взаимного влияния микроводорослей *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) и *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyta)

Ж. В. Маркина

306

Идентификация трех видов дальневосточных красноперок рода *Pseudaspius* (Osteichthyes: Sургинidae) на основе многомерного анализа пластических признаков

А. О. Золотова, Ю. Ф. Картавцев

315

Изменчивость ядерных локусов у дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Holothuroidea) в выборках из залива Петра Великого Японского моря

В. Д. Ягодина, Н. М. Батищева, В. А. Брыков

328

Воздействие эндофита *Laminariocolax aecidioides* (Rosenvinge) A.F. Peters, 1998 (Phaeophyceae: Ectocarpales) на липидный состав бурой водоросли *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 (Phaeophyceae: Laminariales)

О. А. Чадова, П. В. Веланский

338

Краткие сообщения

Случаи поимок мальков рыб семейства долгохвостовые (Gadiformes: Macrouridae) в тихоокеанских водах Камчатки в 2006–2018 гг.

Д. Я. Саушкина

346

Особенности накопления каротиноидов в тканях двустворчатого моллюска-фильтратора *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) из Чёрного моря

А. В. Бородина, П. А. Задорожный

351

Contents

Volume 48, No 5, 2022

Review

- Genesis of Fishes from the Order Salmoniformes
V. N. Dolganov 291
-

Original papers

- Responses of the Antioxidant System of Embryos of the Rusty Blenny *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) (Blenniiformes: Blenniidae) to Pollution of the Marine Environment with Heavy Fuel Oil
I. I. Rudneva 298
- Analysis of the Mutual Influence of the Microalgae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyta)
Zh. V. Markina 306
- Identification of Three Far Eastern Redfin Species of the Genus *Pseudaspius* (Osteichthyes: Cyprinidae) Based on Multidimensional Analysis of Measurable Characters
A. O. Zolotova and Yu. Ph. Kartavtsev 315
- Variation at Nuclear Loci in the Japanese Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Holothuroidea) in Samples from Peter the Great Bay, Sea of Japan
V. D. Yagodina, N. M. Batishcheva, and V. A. Brykov 328
- Influence of Endophyte *Laminariocolax aecidioides* (Rosenvinge) A.F. Peters, 1998 (Phaeophyceae: Ectocarpales) on the Lipid Composition of the Brown Alga *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 (Phaeophyceae: Laminariales)
O. A. Chadova and P. V. Velansky 338
-

Short communications

- Records of Capture of Juveniles of Grenadiers (Gadiformes: Macrouridae) in Pacific Waters of Kamchatka in the years 2006–2018
D. Ya. Saushkina 346
- Distinctive Variations in Carotenoid Accumulation in Tissues of the Filter-Feeding Bivalve Mollusk *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) from the Black Sea
A. V. Borodina and P. A. Zadorozhny 351
-
-

УДК 597.552.5

ГЕНЕЗИС РЫБ ОТРЯДА SALMONIFORMES

© 2022 г. В. Н. Долганов*

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

*e-mail: vndolganov@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2021 г.

После доработки 14.05.2021 г.

Принята к публикации 24.06.2021 г.

Выяснение генезиса представителей отряда Salmoniformes необходимо для определения направлений морфоэкологической и генетической эволюции, а также для выяснения закономерностей формирования биологического разнообразия лососеобразных рыб. Сторонники морского генезиса считают Salmoniformes морскими рыбами, которые перенесли размножение в пресные воды; сторонники пресноводного происхождения полагают, что это пресноводные рыбы, освоившие нагул в морской среде. Анализ литературных данных показал несостоятельность предположения о переносе лососеобразными нагула в морскую среду, тогда как освоение нереста в пресных водах рыбами морского генезиса представляется вполне обычным и распространенным явлением. Согласно данным палеолетописи, центр происхождения лососеобразных рыб находится в северной части Тихого океана, где не позднее начала палеогена морской предок этой группы рыб стал анадромным. После открытия Берингова пролива на рубеже миоцена и плиоцена анадромные лососеобразные мигрировали в Полярный бассейн и Северную Атлантику, где возникли вторичные центры видообразования.

Ключевые слова: Salmoniformes, морской или пресноводный генезис, палеолетопись, центры происхождения, анадромность

DOI: 10.31857/S0134347522050047

Исключительный интерес исследователей к лососеобразным рыбам определяется их значимостью как объектов промысла, а также своеобразием биологии и жизненной стратегии. К настоящему времени опубликованы тысячи работ, в которых рассматриваются разные аспекты биологии Salmoniformes, а также вопросы их таксономической и генетической дифференциации. Однако, несмотря на огромный объем знаний об этой группе рыб, на некоторые основополагающие вопросы их происхождения и формирования биоразнообразия до сих пор нет однозначного ответа. Например, вопрос о генезисе лососеобразных, дискуссия по которому длится более 100 лет, актуален и сегодня. Сторонники морского генезиса считают, что это морские рыбы, которые перенесли размножение в пресные воды (Day, 1887; Smitt, 1895; Regan, 1911; Зенкевич, 1933; Шмидт, 1947, 1950, и др.), их оппоненты полагают, что лососеобразные — это пресноводные рыбы, освоившие нагул в морской среде (Чернавин, 1921; Владимиров, 1946; Neave, 1958; Norden, 1961; Rounsefell, 1962; Никольский, 1971, и др.). В то же время ни одна из сторон не приводит достаточно убедительного доказательства правильности своей точки зрения.

Проблема происхождения представителей отряда лососеобразных интересна и важна не только для выяснения закономерностей формирования биологического разнообразия этих рыб, но и для определения направлений морфоэкологической и генетической эволюции. Однако данную проблему невозможно решить, используя взаимоисключающие точки зрения на происхождение лососеобразных.

В работах ученых разных специальностей, посвященных Salmoniformes, преобладает точка зрения о пресноводном происхождении этой группы рыб (Яковлев, 1961, 1964; Шапошникова, 1976; Gross, 1987; Сычевская, 1989; Черешнев, 1996, 1998; Дорофеева, 1998; Dodson et al., 2009; Alexandrou et al., 2013; Животовский, 2015, и др.). В то же время анализ формирования биоразнообразия представителей отряда лососеобразных позволяет предположить, что мнение сторонников морского генезиса этой группы рыб всё же правильное.

Кроме размножения в пресных водах, основными положениями, выдвигаемыми в защиту пресноводного происхождения лососеобразных рыб, являются наличие у них пресноводной палеолетописи при отсутствии морской, а также су-

существование пресноводных таксонов при отсутствии морских. По мнению Г.В. Никольского (1971), от исходной группы древних тропических Clupeoidei в бореальную область Северного полушария "...ушли предки Salmonoidei, которые здесь вселились в пресную воду и дали ископаемых Thaumaturidae, хариусов и лососевых". Однако в этой работе не обсуждается, почему морские пелагические рыбы поменяли среду обитания. Большинство высказываний в пользу морского генезиса лососей также декларативны. Наиболее убедительные доводы в пользу данной точки зрения привёл П.Ю. Шмидт (1950, с. 245): "Если бы они возникли и распространились в качестве речных форм, трудно было бы представить себе, почему это произошло только в реках Азии и Америки, впадающих в Тихий океан, и почему в Атлантическом океане имеются лишь формы, производные от тихоокеанских". Существует и промежуточный вариант, предложенный Л.С. Бергом (1948), который показал, что все современные жилые формы родов *Salmo*, *Salvelinus* и *Oncorhynchus* произошли от проходных форм. Возможность вторичного перехода от проходного образа жизни к пресноводному разделял и Г.В. Никольский (1971). Однако при отсутствии известных палеонтологических данных оба исследователя были вынуждены предположить, что современные проходные формы лососей, в свою очередь, произошли от пресноводных представителей семейства Thaumaturidae эоцена—олигоцена Европы, которых в то время относили к лососевым рыбам. Впрочем, наряду с этим предположением существовало мнение, что обитающие в болотах и заморных озерах мелкие хищные рыбы данного семейства вряд ли могут быть предками лососей (Яковлев, 1961, 1964). Позже выяснилось, что Thaumaturidae палеогена Европы действительно не могли дать начало Salmonidae, так как в эоцене в северной части Тихого океана лососевые уже существовали (Wilson, 1977; Сычевская, 1986). В настоящее время семейство Thaumaturidae не рассматривается в составе отряда Salmoniformes, а относится к отряду Osteoglossiformes (Сычевская, 1986; Нельсон, 2009). Следовательно, довольно сложная концепция Л.С. Берга и Г.В. Никольского (морские сельдеобразные — пресноводные предки лососеобразных — проходные лососеобразные — жилые формы) упрощается до концепции морского генезиса Salmoniformes.

Отсутствие убедительной аргументации о происхождении лососеобразных привело к появлению "вероятностного" метода филогенетической реконструкции. В соответствии с этим методом вывод о пресноводном или морском происхождении рыб основывается на простом арифметическом большинстве морских, проходных или жилых таксонов в конкретной группе (Dodson et al., 2009; Alexandrou et al., 2013). Однако данный ме-

тод не учитывает геологическое время начала процесса перехода из одной среды в другую, климатические условия во время появления анадромности, пластичность рассматриваемой группы, начальное количество таксонов, участвовавших в процессе, а также наличие свободных экологических ниш (особенно в Южном полушарии) и другие обстоятельства, что делает применение этого метода неприемлемым для решения проблемы генезиса лососеобразных.

Палеолетопись и центры происхождения лососеобразных рыб

Подавляющее большинство ископаемых лососеобразных обнаружено в бассейне Тихого океана. Наиболее древние ископаемые остатки ныне вымершего рода *Eosalmo*, морфологически промежуточного между лососями и хариусами, известны из эоцена Британской Колумбии (Wilson, 1977), Вашингтона (Wilson, Williams, 1992) и западной Камчатки (Сычевская, 1986). Существует мнение, что представители камчатских *Eosalmo* наиболее близки к современному роду *Parasalmo* (Глубоковский, 1995). Из верхнего эоцена Калифорнии описаны чешуи сиговых рыб (David, 1946). Фрагменты ископаемого скелета лосося, отнесенного к роду *Brachymystax*, обнаружены в отложениях верхнего олигоцена Приморья (Сычевская, 1986). Из миоцена Приморья известны лососи рода *Oncorhynchus*, а также сиговые, имеющие общие черты строения для родов *Stenodus* и *Coregonus* (Сычевская, 1979); из миоцена-плейстоцена Японии известен *Oncorhynchus masou* (Ueno et al., 1975; Tomoda et al., 1977). Многочисленные миоценовые и плиоценовые ископаемые останки лососевых тихоокеанского побережья Северной Америки сближают с родами *Hucho*, *Salvelinus* и *Oncorhynchus* (Cavender, Miller, 1972; Smith et al., 1982; Smith, Cossel, 2002, и др.).

Единственной достоверной находкой лососеобразных в Европе является отпечаток головы *Salmo* из плиоцена Армении (Владимиров, 1946), другие определения из дочетвертичных отложений очень сомнительны или прямо ошибочны (Яковлев, 1961).

Все перечисленные ископаемые останки рыб считаются пресноводными. Высказано мнение, что отсутствие останков лососевых в несравненно более полных, чем пресноводные, морских третичных отложениях служит подтверждением гипотезы континентального происхождения Salmonoidei, а поразительная редкость находок лососевых свидетельствует о том, что они не были широко распространены в неогене, являясь, предположительно, представителями горной позднетретичной ихтиофауны (Яковлев, 1961). Основываясь на отсутствии лососеобразных в равнинных фаунистических комплексах неогена, такое же пред-

положение высказали и другие исследователи (Сычевская, 1986; Cavender, 1986; Дорофеева, 1989; Глубоковский, 1995, и др.), которые считали, что эти рыбы возникли в эоцене в горных областях северной части Тихого океана. Однако данные предположения не дают ответа на вопросы, кто же предок этой “горной” ихтиофауны, а также как и откуда эта фауна там появилась. Почему до плиоцена лососеобразные обитали только в горных водоемах, что заставило их в плиоцене спуститься на равнины и начать расселяться? И если формирование лососевых и хариусовых еще можно как-то связать с горными ихтиоценонами, то у сиговых рыб отсутствуют горные экотипы, а горные ихтиоцены не могут быть центром их происхождения. Поэтому, несмотря на отсутствие у сиговых рыб (как у лососевых и хариусовых) доплиоценовой палеолетописи в равнинных фаунистических комплексах, центром происхождения сиговых ихтиологи вынуждены считать северную часть Азии (Дрягин, 1933; Nimberg, 1970; Пирожников, 1973; Шапошникова, 1976, и др.). Исключение составляет род *Prosopium*, происхождение которого связывают с Северной Америкой (Norden, 1970; Шапошникова, 1976). При этом центры происхождения сиговых выделяются на основании обилия видов в их современном равнинном распространении, что, учитывая эоценовый возраст группы и отсутствие палеолетописи, по крайней мере, некорректно.

Предложенные центры происхождения лососевых и хариусовых в горных системах Амфицифики, а сиговых в северных районах Азии и Америки вынуждают обосновывать расселение этих групп по пресноводным водоёмам. Есть мнение, что современные атлантические *Salmo* расселились в олигоцене-миоцене на запад к южной Европе через Сибирь (Дорофеева, 1998). При этом их расселение на север Азии почему-то сдерживал экологически близкий ленок рода *Brachymystax*, хотя по палеонтологическим данным он обитал южнее. Согласно представлениям одних исследователей, разные роды и виды сиговых через Берингию расселялись из Азии в Америку, другие исследователи считают, что это происходило наоборот (Walters, 1955; Norden, 1970; Решетников и др., 1975; Шапошникова, 1976; Черешнев, 1996, 1998, и др.). Обращает на себя внимание то, что расположение предложенных центров происхождения и путей дальнейшего трансконтинентального расселения не подтверждено доплиоценовыми находками лососеобразных рыб на путях предполагаемых миграций, временем этих миграций и экологией видов, которые сначала расселились на ограниченные расстояния по материкам, а затем почему-то стали анадромными, не оставив в материковых водоемах ни жилых форм, ни палеолетописи. На суше в реках и озерах после нереста ежегодно погибали милли-

арды особей лососеобразных, однако количество палеонаходок, относящихся к этой группе рыб, крайне мало. В море гибло гораздо меньше лососей и условия их захоронения намного менее благоприятны, из чего следует, что обнаружить ископаемые останки лососеобразных в море статистически почти невозможно. Кажется очевидным, что до плиоцена в Европе, Сибири, арктической и восточной Америке морские и пресноводные лососеобразные отсутствовали. Вся доплиоценовая палеолетопись лососеобразных сосредоточена по берегам северной части Тихого океана. При этом наличие таких ископаемых форм, как *Eosalmo* (лососи и хариусы), *Hucho* (таймени и голецы) и сиговые Приморья (*Stenodus* и *Coregonus*), обладающих промежуточными межродовыми морфологическими признаками, указывает на родовую дифференциацию лососеобразных именно в данном регионе. Если предположить, что эти древние рыбы произошли из пресных водоемов, то они обитали бы не только в реках, текущих в Тихий океан, но и в реках, направленных в материковую сторону, а за десятки миллионов лет своего существования, несомненно, расселились бы по всей Голарктике. Однако этого не произошло, следовательно, по крайней мере, с эоцена это были нагуливающиеся в Тихом океане анадромные рыбы, потенциально способные создавать и жилые формы. Присутствие палеонаходок доплиоценового периода только в системе водотоков северной части Тихого океана подтверждает гипотезу, предложенную П.Ю. Шмидтом (1947, 1950), согласно которой центром происхождения лососеобразных рыб является Северная Пацифика, откуда после первого открытия Берингова пролива на рубеже миоцена и плиоцена (Marincovich, Gladenkov, 2001; Гладенков, Гладенков, 2004) амфидромные представители отряда Salmoniformes расселились в Полярном бассейне и Северной Атлантике, создав там вторичные центры формирования.

Из изложенного следует, что пресноводные ископаемые предки лососеобразных отсутствуют. Может быть, они имеются среди ныне живущих представителей отряда? Еще в середине прошлого века доказано, что современные жилые формы родов *Salmo*, *Salvelinus* и *Oncorhynchus* являются вторичноводными и произошли от проходных видов (Берг, 1948). Эти выводы логично применить и к “полупроходным” сиговым, а также к ныне утратившим связь с морской средой видам и популяциям сигов, тайменей, ленков и хариусов. В современной ихтиофауне на родовом уровне к полностью пресноводным рыбам относятся лишь ленки и хариусы. Однако ленки — это ближайшие родственники тайменей, имеющих проходной вид *Parahucho perryi*. Известно, что предки ленков и хариусов, как и всех других групп Salmoniformes, обнаружены только в палеолетописи по-

бережья Тихого океана. Это позволяет предположить, что изначально они также были проходными рыбами, которые, как и другие лососеобразные, потеряли связь с морской средой, что несложно при наличии пресноводного нереста (см. ниже). Следовательно, можно сделать вывод, что современные пресноводные формы, как и известные ископаемые, не могут быть предками лососеобразных рыб.

О переносе морского нереста в пресные воды

При рассмотрении любых систем рыб видно, что родственниками лососеобразных являются только морские рыбы (Берг, 1940; Greenwood et al., 1966; Никольский, 1971; Световидов и др., 1975; Rosen, 1982; Nelson, 1984; Johnson, Patterson, 1996; Нельсон, 2009, и др.). И из какой бы группы не выводили лососеобразных, их общими предками будут морские рыбы. В северной части Тихого океана лососеобразные наиболее близки к корюшкам семейства *Osmeridae* (Nelson, 1984; Wilson, Li, 1999), которые представлены как исключительно морскими видами (*Allosmerus elongatus*, *Spirinchus starksi*, *Hypomesus japonicus*, *H. pretiosus*), так и проходными (*Osmerus eperlanus*, *O. mordax*, *Thaleichthys pacificus*, *S. lanceolatus*, *S. thaleichthys*, *H. nipponensis*, *H. transpacificus*, *H. olidus*), к настоящему времени сформировавшими множество жилых форм и популяций (озерные формы *O. eperlanus* и *O. mordax*, а также *H. nipponensis* и *H. olidus*). Интересно, что морские, проходные и жилые формы имеются и у обитающих в Южном полушарии корюшкообразных рыб семейств *Retropinnidae* и *Galaxiidae* (Нельсон, 2009). На примере корюшкообразных, имеющих морское происхождение, хорошо прослеживается тенденция к освоению ими пресных вод. Маловероятно, что их ближайшие родственники лососеобразные эволюционировали в противоположном направлении.

Наиболее убедительным представляется предположение, что в отличие от многочисленных корюшкообразных, которые в настоящее время находятся в процессе освоения пресных вод, предок лососеобразных перенес нерест в пресные воды еще в палеогене. Пресноводные биоценозы того времени были намного беднее современных, что значительно облегчало их освоение. Следует заметить, что перенос нереста из более сложно устроенных морских сообществ (особенно прибрежных) в пресноводные является довольно распространенным и очень выгодным для размножения процессом. Известно, что все проходные группы рыб (миногообразные, сельдеобразные, осетрообразные, колюшкообразные и корюшкообразные) имеют морское происхождение. При этом миногообразные, осетрообразные и колюшкообразные, как и лососеобразные, полностью

перенесли размножение в пресные воды. Представители многих исходно морских групп рыб не ограничились нерестом в пресных водах, а стали полностью пресноводными формами. Так, в палеогене в исключительно благоприятных для адаптации к пресным водам условиях Паратетиса пресноводными стали такие представители отряда Perciformes, как ерши, окуни, судаки (частично) и размножающаяся в разных средах черноморская игла-рыба. Из огромного количества сельдевых в процессе эволюции к настоящему времени около 1/3 видов стали пресноводными или проходными (Световидов, 1952). Бычки из обширного морского семейства Cottidae в неогене освоили пресные воды, широко расселились в Голарктике, включая оз. Байкал, и дали около 100 видов; в плиоцене полностью пресноводным стал единственный представитель трескообразных налим *Lota lota*.

Таким образом, в третичном периоде исключительно пресноводными стали не только проходные, но и истинно морские рыбы, сформировавшиеся в пресных водах новые таксоны видового и родового уровня. Вполне логично, что проходным рыбам, которые уже перенесли в пресные воды нерест — наиболее консервативную часть жизненного цикла, перейти к пресноводному образу жизни было намного проще, чем морским. Для этого достаточно в условиях похолодания плиоплейстоцена лишиться прибрежной части амфидромных популяций, как это, скорее всего, произошло у хариусов и ленков. Данный переход хорошо прослеживается на примере формирования пресноводных популяций у проходных и амфидромных рыб р. Амур. Значительное похолодание климата во второй половине плиоцена (Цой и др., 2003; Плетнев, 2004) сделало невозможным их обитание и миграции в Охотском море. Единственным местом для нагула оставался обширный лиман р. Амур, который при продолжавшемся похолодании климата также постепенно охлаждался, вынуждая обитающих в нем рыб адаптироваться к пресноводному образу жизни. Дальнейшее похолодание и усиление ледовой обстановки на границе плиоцена и плейстоцена (Плетнев, 2004) привело к исчезновению прибрежных популяций рыб Амурского лимана и формированию в бассейне р. Амур пресноводных популяций калуги *Huso dauricus*, амурского осетра *Acipenser schrenckii*, девятииглой колюшки *Pungitius cf. sinensis*, бычка *Mesocottus haitej*, мальсы *Salvelinus curilus*, микижи *Parasalmo mykiss*, уссурийского сига *Coregonus ussuriensis*, нижеамурского хариуса *Thymallus tugarinae* и тупорылого ленка *Brachymystax tumensis*, а также, вероятно, сахалинского тайменя *Parahucho perryi*.

Следовательно, перенос морскими рыбами размножения в пресные воды, а также создание жилых популяций и таксонов — достаточно рас-

пространенные явления, однако этого нельзя сказать о переносе нагула пресноводных рыб в морскую среду.

Проблема освоения лососеобразными питания в море

Обоснование причины и времени появления у лососеобразных анадромности, или начала освоения морской кормовой базы, — самое слабое место в позиции сторонников пресноводного генезиса данной группы рыб. Так как рассуждения на эту тему основываются только на допущениях, не имеющих доказательств, то спектр мнений о времени возникновения анадромности очень широк — указываются периоды от эоцена (Глубоковский, 1995; Dodson et al., 2009; Alexandrou et al., 2013; Животовский, 2015, и др.) до четвертичного времени, когда переход лососей и сигов к проходному образу жизни был облегчен опреснением моря в результате таяния ледников (Никольский, 1971). При этом анадромность у лососей появилась конвергентно в северных частях Атлантического и Тихого океанов.

На фоне данных предположений следует заметить, что в современной ихтиофауне нет пресноводных рыб, которые полностью адаптировались к питанию в морской среде. В уникальных условиях Сарматского моря, которое со второй половины миоцена частично или полностью изолировалось от Средиземного моря (позже от Черного моря отделился Аралокаспийский бассейн), от пресноводных предков образовалось максимальное количество амфидромных видов, подвидов и форм мировой ихтиофауны (усачи, лещи, сазан, плотва, вырезуб, шемай, чехонь и др.). Однако эти рыбы смогли адаптироваться к нагулу в водах, соленость которых не превышает 10–14‰. В северной части Тихого океана эпиконтинентальные моря отсутствовали, поэтому освоение пресноводными лососеобразными нагула в морской воде сомнительно. Из всех пресноводных рыб Северной Пацифики нагул в более соленых водах освоил только предок дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*. В настоящее время 2 вида этого рода летом могут встречаться при солености, близкой к океанической (32–33‰), однако основной нагул у них проходит в менее соленых водах побережья, лагун и эстуариев рек. Таким образом, предположение о том, что *Salmoniformes* — это морские рыбы, для которых морская кормовая база была изначальной, представляется более убедительным. К тому же рыбы пресноводного происхождения, постоянно живущие в пресных водах, в солоноватых (не морских) водах нагуливаются только сезонно. А лососеобразные, как и другие рыбы морского генезиса, ставшие проходными (миноги, сельди, осетровые, колюшки, корюшки), до наступления половозрелости

живут и нагуливаются в море, что также служит подтверждением их морского происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ показал несостоятельность аргументации в пользу пресноводного генезиса лососеобразных, доплиоценовые пресноводные ископаемые остатки которых в Голарктике отсутствуют и встречаются лишь в бассейне Тихого океана. Предки этой группы рыб не обнаружены и среди ныне живущих в пресных водах лососеобразных. Однако все родственные *Salmoniformes* группы рыб являются морскими. Поскольку в современной ихтиофауне генеративно пресноводные, но освоившие нагул в морских водах рыбы отсутствуют, то и предположение о переносе лососеобразными нагула в морскую среду представляется сомнительным. Намного более естественно изначальное присутствие у них морской кормовой базы, что подтверждается также их обитанием и нагулом в море до наступления половозрелости (как и у других проходных рыб морского генезиса), в то время как рыбы пресноводного происхождения нагуливаются в солоноватых водах и только сезонно. А вот перенос нереста рыбами морского генезиса в пресные воды — вполне обычное и распространенное явление.

Из данных палеолетописи следует, что центром происхождения лососеобразных рыб является северная часть Тихого океана, где их морской предок не позднее начала палеогена стал анадромным. Позднее, после открытия Берингова пролива на рубеже миоцена и плиоцена анадромные лососеобразные мигрировали в Полярный бассейн и Северную Атлантику, где создали вторичные центры формирования.

Изложенное выше подтверждает точку зрения сторонников морского генезиса лососеобразных. Это позволяет скорректировать направление морфоэкологической и генетической эволюции рыб отряда *Salmoniformes* и усовершенствовать методы их изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берг Л.С. Система рыбообразных и рыб, ныне живущих и ископаемых // Тр. ЗИН АН СССР. 1940. Т. 5. № 2. С. 87–317.
- Берг Л.С. О происхождении форелей и других пресноводных лососевых // Памяти акад. С.А. Зернова. Л.: Изд-во АН СССР. 1948. С. 159–172.
- Владимиров В.И. Форель из диатомовых отложений плиоцена Армении // Докл. АН АрмССР. 1946. Т. 4. № 4. С. 123–128.
- Гладенков А.Ю., Гладенков Ю.Б. Начало формирования межконтинентальных связей Пацифики и Арктики через Берингов пролив в неогене // Стратиграфия. Геол. корреляция. 2004. Т. 12. № 2. С. 72–89.
- Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 1995. 343 с.
- Дорофеева Е.А. Основные принципы классификации и филогении лососевых рыб (Salmoniformes, Salmonoidei, Salmonidae) // Биология и филогения рыб. Л.: ЗИН АН СССР. 1989. С. 5–15.
- Дорофеева Е.А. Систематика и история расселения европейских лососей рода *Salmo* // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 4. С. 437–447.
- Дрягин П.А. Рыбные ресурсы Якутии // Труды совета по изучению производительных сил Якутской АССР. М.; Л. 1933. Вып. 5. С. 3–94.
- Животовский Л.А. Генетическая история лососевых рыб рода *Oncorhynchus* // Генетика. 2015. Т. 51. № 5. С. 584–599.
- Зенкевич Л.А. Некоторые моменты зоогеографии Северного полярного бассейна в связи с вопросом о его палеогеографическом прошлом // Зоол. журн. 1933. Т. 12. С. 17–34.
- Нельсон Д.С. Рыбы Мировой фауны. М.: Книжный дом “Либроком”. 2009. 880 с.
- Никольский Г.В. Частная ихтиология. М.: Высшая школа. 1971. 471 с.
- Плетнев С.П. Историко-геологическое развитие острова Сахалин // Растительный и животный мир острова Сахалин. Владивосток: Дальнаука. 2004. С. 11–22.
- Пирожников П.Л. О формообразовании у сиговых (Coregonidae, Pisces) в связи с особенностями их расселения // Проблемы эволюции. Т. 3. Новосибирск: Наука. 1973. С. 132–142.
- Решетников Ю.С., Новиков А.С., Слугин И.В. и др. Валёк *Prosopium cylindraceum* (Pallas et Pennant) Чукотки // Вопр. ихтиологии. 1975. Т. 15. № 5. С. 788–805.
- Световидов А.Н. Сельдевые (Clupeidae). Фауна СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 1952. Т. 2. Вып. 1. № 48. 331 с.
- Световидов А.Н., Дорофеева Е.А., Клюканов В.А., Шапошникова Г.Х. Морфологические основы классификации лососевидных рыб // Зоол. журн. 1975. Т. 54. № 4. С. 559–574.
- Сычевская Е.К. Пресноводные рыбы из неогеновых отложений Приморья // 14-й Тихоокеан. науч. конгр. Комитет В. 1979. Т. 2. С. 113.
- Сычевская Е.К. Пресноводная палеогеновая ихтиофауна СССР и Монголии. М.: Наука. 1986. 157 с.
- Сычевская Е.К. Пресноводная ихтиофауна неогена Монголии. М.: Наука. 1989. 144 с.
- Цой И.Б., Терехов Е.П., Горювая М.Т. и др. Кайнозойское осадконакопление на западном склоне южно-охотской котловины Охотского моря // Тихоокеан. геология. 2003. Т. 22. № 4. С. 19–34.
- Черешнев И.А. Биологическое разнообразие пресноводной ихтиофауны северо-востока России. Владивосток: Дальнаука. 1996. 197 с.
- Черешнев И.А. Биогеография пресноводных рыб Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука. 1998. 130 с.
- Чернавин В.В. Происхождение брачного наряда у лососей // Журн. Петроград. агроном. ин-та. 1921. № 3–4. 171 с.
- Шапошникова Г.Х. История расселения сигов рода *Coregonus* // Зоогеография и систематика рыб. Л.: Изд-во ЗИН АН СССР. 1976. С. 54–67.
- Шмидт П.Ю. Миграции рыб. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 1947. 362 с.
- Шмидт П.Ю. Рыбы Охотского моря. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 1950. 370 с.
- Яковлев В.Н. Распространение пресноводных рыб неогена Голарктики и зоогеографическое районирование // Вопр. ихтиологии. 1961. Т. 1. № 2. С. 209–220.
- Яковлев В.Н. История формирования фаунистических комплексов пресноводных рыб // Вопр. ихтиологии. 1964. Т. 4. № 1. С. 10–22.
- Alexandrou M.A., Swartz B.A., Matzke N.J., Oakley T.H. Genome duplication and multiple evolutionary origins of complex migratory behavior in Salmonidae // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. P. 514–523.
- Cavender T.M. Review of the fossil history of North American freshwater fishes // The zoogeography of North American freshwater fishes. New York: Wiley. 1986. P. 699–724.
- Cavender T.M., Miller R.R. *Smilodonichthys rastronus*: a new Pliocene Salmonid fish from Western United States // Bull. Mus. Nat. Hist. Univ. Oregon. 1972. № 18. P. 1–44.
- Day F. British and Irish Salmonidae. London: Williams and Norgate. 1887. 298 p.
- David L.R. Some typical upper Eocene fish scales from California // Fossil Vertebrates from Western North America and Mexico / Contributions to Paleontology. Carnegie Institution of Washington publication № 551. Washington, DC: Carnegie Institution, 1946. P. 45–79.
- Dodson J.J., Laroche J., Lecomte F. Contrasting evolutionary pathways of anadromy in euteleostean fishes // Am. Fish. Soc. Symp. 2009. V. 69. P. 63–77.
- Greenwood P.H., Rosen D.E., Weitzman S.H., Myers G.S. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms // Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 1966. V. 131. № 4. P. 339–456.
- Gross M.R. Evolution of diadromy in fishes // Am. Fish. Soc. Symp. 1987. V. 1. P. 14–25.
- Himberg K.J.M. A systematic and zoogeographic study of some North European Coregonid fishes // Biology of Coregonid Fishes. Winnipeg, Manitoba, Canada: Univ. of Manitoba Press. 1970. P. 219–250.

- Johnson G.D., Patterson C.* Relationships of lower euteleostean fishes // Interrelationships of fishes. San Diego: Academic Press. 1996. P. 251–332.
- Marincovich L. Jr., Gladenkov A.Y.* New evidence for the age of Bering Strait // Quat. Sci. Rev. 2001. № 20. P. 329–335.
- Nelson J.S.* Fishes of the World. New York: Wiley. 1984. 523 p.
- Neave F.* The origin and speciation of *Oncorhynchus* // Trans. R. Soc. Can., Ser. 3, Sect. 5. 1958. V. 52. P. 25–40.
- Norden C.R.* Comparative osteology of representative salmonid fishes, with particular reference to the grayling (*Thymallus arcticus*) and its phylogeny // J. Fish. Res. Board Can. 1961. V. 18. № 5. P. 679–791.
- Norden C.R.* Evolution and distribution of the genus *Prosoptium* // Biology of Coregonid fishes. Winnipeg, Manitoba, Canada: Univ. of Manitoba Press. 1970. P. 67–80.
- Regan C.T.* The freshwater fishes of the British Isles. London: Methuen & Co. Ltd. 1911. 287 p.
- Rosen D.E.* Teleostean interrelationships, morphological function and evolutionary inference // Am. Zool. 1982. V. 22. P. 261–273.
- Rounsefell G.A.* Relationships among North American Salmonidae // Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. V. 62. Fishery Bulletin 209. Washington, DC: U.S. Gov. Print. Off. 1962. P. 235–269.
- Smith G.R., Swirydchuk K., Kimmel P.G., Wilkinson B.H.* Fish biostratigraphy of Late Miocene to Pleistocene sediments of the Western Snake river plain, Idaho // Cenozoic geology of Idaho / Idaho Bureau of Mines and Geology Bulletin 26. Moscow. Idaho: Bureau Mines Geol. 1982. P. 519–541.
- Smith G., Cossel J. Jr.* Fishes from the Late Miocene Poison Creek and Chalk Hills formations, Owyhee County, Idaho // And Whereas ... Papers on the Vertebrate Paleontology of Idaho Honoring John A. White, V. 2 / Idaho Museum of Natural History Occasional Paper 37. Pocatello, Idaho: Idaho Mus. Nat. Hist. 2002. P. 23–35.
- Smitt F.A.* A history of Scandinavian fishes. P. II. Stockholm: P.A. Norstedt & söner. 1895. P. 567–1240.
- Tomoda Y., Kodera H., Nakajima T., Yasuno T.* Fossil freshwater fishes from Japan // Mem. Geol. Soc. Jpn. 1977. № 14. P. 221–243.
- Ueno T., Kimura S., Hasegawa Y.* Freshwater fishes from the Late Cenozoic deposits in Kusu Basin, Oita Prefecture, Japan // Mem. Nat. Sci. Mus. 1975. № 8. P. 57–70.
- Walters V.* Fishes of western arctic America and eastern arctic Siberia // Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 1955. V. 106. Art. 5. P. 255–368.
- Wilson M.V.H.* Middle Eocene freshwater fishes from British Columbia // Life Sciences Contributions. Royal Ontario Museum N. 113. Toronto: R. Ontario Mus. 1977. P. 1–61.
- Wilson M.V.H., Li G.-Q.* Osteology and systematic position on the Eocene salmonid *Eosalmo driftwoodensis* Wilson from western North America // Zool. J. Linn. Soc. 1999. V. 125. P. 279–311.
- Wilson M.V.H., Williams R.R.G.* Phylogenetic, biogeographic and ecological significance of early fossil records of North American freshwater teleostean fishes // Systematics, historical ecology, and North American freshwater fishes. Stanford, Calif.: Stanford Univ. Press. 1992. P. 224–244.

Genesis of Fishes from the Order Salmoniformes

V. N. Dolganov

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The genesis of members of the order Salmoniformes needs elucidation in order to identify the trend of morpho-ecological and genetic evolution of these fishes and also clarify the patterns of their biological diversification. Adherents of the marine genesis hypothesis consider Salmoniformes as marine fishes that have transferred their reproduction to fresh waters, while those advocating the freshwater origin hypothesis suggest these are freshwater fishes that have occupied feeding grounds in the marine environment. An analysis of literature data has shown the assumption about the transfer of feeding grounds to the marine environment by salmonids as untenable, whereas development of spawning in fresh waters by fish of marine genesis is a quite common and widespread phenomenon. According to results of fossil record examinations, the center of origin of salmoniform fishes is the northern Pacific Ocean, where their marine ancestor became anadromous no later than in the early Paleogene. Subsequently, after the opening of the Bering Strait at the Miocene–Pliocene boundary, anadromous salmoniforms migrated to the Polar Basin and North Atlantic where the secondary centers of speciation emerged.

Keywords: Salmoniformes, marine or freshwater genesis, fossil records, centers of origin, anadromy

УДК 597.593.4:24

РЕАКЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЭМБРИОНОВ СОБАЧКИ ЖЕЛТО-КРАСНОЙ *PARABLENNIUS SANGUINOLENTUS* (PALLAS, 1814) (BLENNIIFORMES: BLENNIDAE) НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ МОРСКОЙ СРЕДЫ МАЗУТОМ

© 2022 г. И. И. Руднева*

Морской гидрофизический институт РАН, Севастополь 299011, Россия

*e-mail: svg-41@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Нефтяное загрязнение остается серьезной проблемой для морских экосистем, особенно для характеризующихся высоким биоразнообразием и продуктивностью прибрежных акваторий, где происходит размножение многих видов рыб и беспозвоночных, в том числе промысловых. Ранние онтогенетические стадии гидробионтов очень чувствительны к действию загрязнителей, инициирующих развитие различных токсических эффектов, включая окислительный стресс. Исследовано влияние мазута в концентрациях 0.00001 и 0.02 мл/л на активность антиоксидантных ферментов эмбрионов собачки желто-красной *Parablennius sanguinolentus* на V и VI стадиях развития. Отмечены неоднозначные ответные реакции ферментов, которые зависели от стадии развития эмбрионов и концентрации токсиканта. Обсуждаются возможные пути реорганизации ферментной антиоксидантной системы для обеспечения защиты эмбрионов от окислительного стресса, вызванного как подготовкой к выходу из яйцевых оболочек, так и действием токсиканта.

Ключевые слова: Черное море, мазут, загрязнение, икра рыб, биомаркеры, антиоксидантные ферменты

DOI: 10.31857/S0134347522050072

Нефтяное загрязнение является доминирующим видом загрязнения Мирового океана, создающим серьезные проблемы биоте и экосистеме в целом (Kyrusamy et al., 2020). Если в прошлом веке основными причинами поступления нефтяных углеводородов в морскую среду были аварии судов и танкеров, сбросы балластных и технических вод, речные стоки и атмосферные осадки, то в настоящее время загрязнение морей и океанов нефтяными углеводородами связано преимущественно с бурным развитием нефтегазового комплекса на шельфе (Martinez-Gomez et al., 2006; Патин, 2015; Veyer et al., 2016). При этом постоянно происходят небольшие утечки, которые быстро ликвидируются, однако они создают повышенный фон углеводородов в воде и донных отложениях. В состав нефти входят разные компоненты, токсичность которых для морских обитателей может существенно различаться. Помимо прямого действия нефть и нефтепродукты могут оказывать косвенные эффекты, образуя пленку на поверхности воды, нарушая газообмен поверхностных и глубинных вод, тем самым создавая аноксические и гипоксические зоны (Samuelsen et al.,

2019). Тяжелые нефтяные фракции оседают на дно и наносят непоправимый вред не только в результате поглощения токсиканта бентосными организмами, но и ухудшая условия обитания гидробионтов. Особенно страдают ранние онтогенетические стадии развития рыб и беспозвоночных, которые чувствительны к действию загрязнителей и любым изменениям внешних условий (Beirão et al., 2019; Jin et al., 2020; Phan et al., 2020; Bender et al., 2021). Например, в Мексиканском заливе около 10% мест нереста рыб и около 12% акваторий, в которых происходит развитие личинок, загрязнены нефтью (Muhling et al., 2012; Rooker et al., 2013). Однако исследователи не могут однозначно утверждать, что снижение численности и распределения рыб вызвано нефтяным загрязнением, поэтому требуется дальнейшее тщательное изучение влияния нефтяного загрязнения на ранние онтогенетические стадии гидробионтов в природных и экспериментальных условиях.

Как отмечено ранее, изменение условий существования на фоне климатических аномалий и действия загрязнителей, а также сами поллютан-

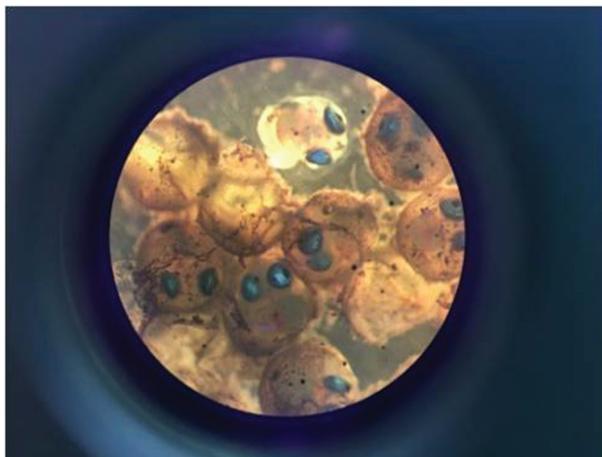


Рис. 1. Икра *Parablennius sanguinolentus*. Икринки сферические, сплюснутые на полюсах. Диаметр 1.20–1.25 мм, высота 0.8–0.9 мм, толщина оболочки 5 мкм (Дехник, 1973). У эмбрионов видны пигментированные глаза, желток светло-желтого цвета с мелкими многочисленными каплями жира и мелкие сиреневые включения. Фотография сделана на бинокулярном микроскопе МБС-9 при увеличении 8 × 4.

ты могут вызывать состояние окислительного стресса у морских организмов (Rudneva, 2014). Ферменты антиоксидантной системы являются удобными и эффективными биомаркерами этого процесса в организме при воздействии неблагоприятных факторов (Domingues et al., 2010; Geгаудие et al., 2016; Jiang et al., 2017). Однако проявление токсического эффекта и отклики защитной антиоксидантной системы неоднозначны, зависят от дозы токсиканта, его вида и от стадии развития гидробионтов. Это необходимо учитывать при разработке тест-систем, использующих в качестве тест-объектов икру и личинок рыб.

Ранее нами было показано различное, а в ряде случаев противоположное влияние нефти на икру и личинок некоторых видов черноморских рыб, которое выражалось в усилении или подавлении активности ферментов, отражая как адаптивный ответ организма на действие стрессора, так и токсический (Rudneva, 2014, 2019). С одной стороны, стадия развития икры может существенным образом модифицировать отклик организма на токсическое воздействие, что обусловлено процессами формирования защитных систем в раннем онтогенезе и необходимостью обеспечения таких основных жизненных функций, как рост и развитие, образование систем органов и, наконец, процесс вылупления. С другой стороны, разные концентрации токсикантов также могут вызывать неоднозначные эффекты у живых организмов (Hansen et al., 2018).

Цель настоящей работы – проведение сравнительного анализа откликов четырех антиокси-

дантных ферментов икры собачки желто-красной *Parablennius sanguinolentus* на последних (V и VI) стадиях развития на действие мазута в существенно различающихся концентрациях 0.00001 и 0.02 мл/л.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Собачка желто-красная *Parablennius sanguinolentus* – типичная донная рыба Черного моря, обитающая на мелководье. Ее икру на последних (V и VI) стадиях развития (рис. 1) собирали в прибрежных водах акватории г. Севастополь. Предпоследняя V стадия развития характеризуется ростом хвостового отдела, отделением хвоста от желтка, образованием сердца, зачатков кишечника и печени, а также появлением плавниковой каймы (эта стадия продолжается до начала пульсации сердца); VI стадия – это “подвижный эмбрион”, когда одновременно с пульсацией сердца зародыш начинает двигаться внутри яйцевых оболочек (Дехник, 1973). Икра донная, в природных условиях ее развитие проходит в прибрежной зоне, в наибольшей степени подверженной воздействию различных загрязняющих веществ, в том числе нефтепродуктов.

Концентрация токсиканта 0.00001 мл/л выбрана для моделирования ситуации, когда происходит хроническая утечка нефтепродуктов в очень малой концентрации. Вторая концентрация (0.02 мл/л) соответствует половине ПДК нефти для морских акваторий (0.05 мл/л). Мазут вносили в профильтрованную морскую воду и 20–30 мин перемешивали до получения стойкой эмульсии. После отстаивания в течение 0.5 ч воду с мазутом заливали в аэрируемые аквариумы, температура воды в которых соответствовала таковой в море (Чесалина и др., 2000). В каждый аквариум помещали по 50 икринок. В аналогичных условиях содержали контрольную икру без токсиканта. В конце каждого этапа икру отбирали для биохимических исследований, которые проводили в трех аналитических повторностях.

Активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПЕР) и глутатионредуктазы (ГР) анализировали на спектрофотометре Specol-211 (фирма Carl Zeiss, Jena, Германия) в соответствии с методами, описанными нами ранее (Rudneva, 2019). Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, вычисляли среднее арифметическое и ошибку средней. Для графического представления результатов значения активности ферментов, полученные для опытных групп, выражали в процентах к контролю, взятому за 100%. Анализировали соотношение активности ферментов в контрольной и экспериментальных группах. Достоверность различий определяли по критерию

Таблица 1. Активность антиоксидантных ферментов, мг белка/мин ($M \pm m$), в эмбрионах *Parablennius sanguinolentus*, подвергшихся воздействию мазута разной концентрации

Фермент	Стадия V			Стадия VI		
	контроль	концентрация мазута, мл/л		контроль	концентрация мазута, мл/л	
		0.00001	0.02		0.00001	0.02
СОД, условные единицы	119.9 ± 15.8	233.8* ± 20.1	194.17* ± 16.3	214.6 ± 42.4	79.1* ± 12.3	136.9* ± 24.9
КАТ, мг H ₂ O ₂	0.04 ± 0.002	0.05 ± 0.01	0.09* ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.02
ПЕР, оптические единицы	0.04 ± 0.003	0.01* ± 0.002	0.05 ± 0.005	0.048 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02* ± 0.003
ГР, нмоль НАДФН	1.74 ± 0.38	0.13* ± 0.03	0.66* ± 0.13	1.35 ± 0.38	0.27* ± 0.03	1.89 ± 0.40

Примечание. СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ПЕР – пероксидаза, ГР – глутатионредуктаза; * различия между значениями активности ферментов по отношению к контролю достоверны при $p < 0.05$.

Манна–Уитни, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В подвергшейся воздействию мазута икре активность ферментов изменялась (табл. 1). При инкубации икры в воде, содержащей мазут, в зависимости от его концентрации (0.00001 или 0.02 мл/л) у эмбрионов на V стадии развития активность СОД по сравнению с таковой в контрольной группе увеличилась на 95 и 68%, а на стадии VI снизилась на 63 и 36% соответственно (рис. 2).

Активность КАТ в икре на стадии V при концентрации мазута 0.00001 мл/л увеличилась до 25%, а при концентрации мазута 0.02 мл/л – до

125%, однако на стадии VI незначительно снизилась соответственно до 38 и 18%. При обеих концентрациях токсиканта активность ПЕР в икре на стадии V изменялась неоднозначно: при содержании мазута 0.00001 мл/л она снизилась на 74%, но при повышении его концентрации в среде до 0.02 мл/л увеличилась на 28% по отношению к контролю. Активность ПЕР в икре на стадии VI при низкой концентрации мазута почти не изменилась (+4%), но при его содержании 0.02 мл/л снизилась на 58%. Активность ГР в икре на стадии V снизилась при обеих концентрациях мазута соответственно на 93 и 62%; на стадии VI такая же тенденция отмечена при концентрации мазута 0.00001 мл/л (–78%), однако при

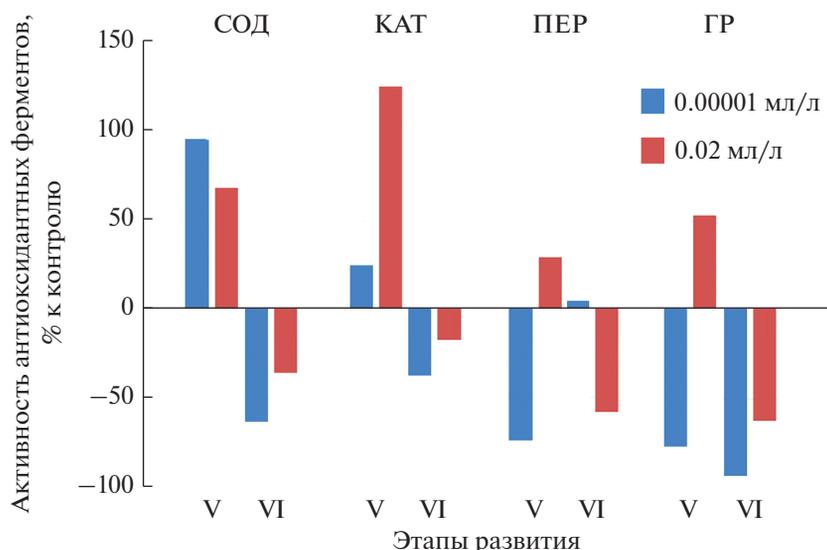


Рис. 2. Изменение активности антиоксидантных ферментов эмбрионов *Parablennius sanguinolentus* V и VI стадий развития, подвергшихся воздействию мазута разной концентрации. Данные представлены в процентах к контролю, взятому за 100%.

Таблица 2. Соотношение активности антиоксидантных ферментов в эмбрионах *Parablennius sanguinolentus*, подвергшихся воздействию мазута разной концентрации

Фермент	Стадия V			Стадия VI		
	контроль	концентрация мазута, мл/л		контроль	концентрация мазута, мл/л	
		0.00001	0.02		0.00001	0.02
СОД/КАТ	2997.5	4676.2	2157.4	2715.4	1317.2	1711.3
СОД/ПЕР	3074.3	2338.2	3885.4	4470.8	1585.8	6845.3
СОД/ГР	68.9	1798.5	294.2	171.7	283.3	72.4
КАТ/ПЕР	1.0	5.0	1.8	2.0	1.2	4.0
КАТ/ГР	0.02	0.38	0.14	0.08	0.22	0.04
ПЕР/ГР	0.02	0.08	0.08	0.04	0.18	0.01

повышении содержания мазута активность ГР увеличилась на 51%.

Анализ соотношения активности ферментов у эмбрионов рыб на поздних стадиях развития в контрольной группе и в двух экспериментальных группах, подвергшихся воздействию мазута (табл. 2), показал, что под влиянием разных концентраций токсиканта в процессе развития эмбрионов соотношения активности антиоксидантных ферментов существенно перераспределялись. Если на стадии V у эмбрионов контрольной группы отношения активности СОД/КАТ и СОД/ПЕР были примерно одинаковыми, то при добавлении нефтепродукта в концентрации 0.00001 мл/л доля КАТ снизилась, а доля ПЕР относительно СОД повысилась. При концентрации токсиканта 0.02 мл/л эти различия уменьшились, а их значения были близки к контрольным. При концентрации мазута 0.00001 мл/л соотношение СОД/ГР резко увеличилось по сравнению с таковым в контроле, однако снизилось при концентрации мазута 0.02 мл/л. Соотношения активности КАТ/ПЕР и КАТ/ГР характеризовались одинаковой динамикой: увеличением при концентрации мазута 0.00001 мл/л и снижением при его содержании 0.02 мл/л. При обеих тестируемых концентрациях соотношение ПЕР/ГР незначительно возросло по отношению к контролю.

Соотношение активностей ферментов на стадии VI показало иные закономерности. Отношения СОД/КАТ и СОД/ПЕР снизились по сравнению с таковыми в контроле при концентрации токсиканта 0.00001 мл/л; при увеличении его содержания они увеличились, причем показатель СОД/ПЕР увеличился в большей степени. Соотношение СОД/ГР проявило противоположную тенденцию, а отношения КАТ/ГР и ПЕР/ГР повысились при концентрации мазута 0.00001 мл/л, но снизились при его концентрации 0.02 мл/л.

ОБСУЖДЕНИЕ

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами у обитателей водной среды вызывает стресс, который проявляется на разных уровнях биологической организации. Ранние стадии развития рыб подвержены влиянию нефтяного загрязнения в большей степени, так как в отличие от взрослых особей они не могут быстро покинуть неблагоприятную среду обитания. Анализ эмбриотоксичности нефти на разных видах рыб – удобный информативный тест, используемый в экотоксикологических исследованиях. На многих видах рыб и беспозвоночных в экспериментальных и природных условиях показано, что под действием нефтяного загрязнения у гидробионтов развивается окислительный стресс, приводящий к нарушению окислительно-антиоксидантного баланса (Mu et al., 2013, 2018). При содержании золотой рыбки *Carassius auratus* в среде с концентрацией водорастворимой фракции дизельного топлива 0.05 и 0.1 мг/л в течение 40 сут в ее тканях происходила активация антиоксидантной защиты и отмечено снижение реакций иммунитета (Zhang et al., 2004). Индукция активности антиоксидантных ферментов СОД, КАТ и глутатионтрансферазы (ГТ) под действием водорастворимой фракции дизельного топлива выявлена у моллюсков при их содержании в среде с концентрацией токсиканта 4 мг/л (Jiang et al., 2017). У эмбрионов рыб также отмечено развитие окислительного стресса под действием разных токсикантов (Sehonova et al., 2017; Stancova et al., 2017; Velisek, Stara, 2018). Увеличение активности ферментов свидетельствует о развитии адаптивного ответа АОС эмбрионов, направленного на нейтрализацию продуктов свободнорадикальных реакций, в избытке образующихся в процессе окислительного стресса, который может развиваться по нескольким механизмам. В результате гидроксилирования нефтяных углеводородов системой цитохрома P450 происходит синтез компонентов, вовлекаемых в окислительно-восстановительные реакции (ме-

таболизм) организма. Эти компоненты могут конъюгировать с глутатионтрансферазой, снижая уровень глутатиона GSH и общую антиоксидантную активность. Одновременно образуются соединения, которые включаются в редокс-цикл и изменяют его, так как являются донорами или акцепторами электронов. Другие компоненты конъюгируют с глутатионом, сокращают его запас и, следовательно, уменьшают общую антиоксидантную активность (АОА). Другая группа соединений способна инактивировать антиоксидантные ферменты и также уменьшать АОА. Во всех случаях происходит отток энергии на АО защиту, при этом у развивающегося эмбриона снижается уровень метаболизма, что влияет на нормальное обеспечение процессов его роста, развития и вылупления (Dubansky et al., 2014; Geraudie et al., 2016). Следовательно, параметры АОА информативны при оценке токсических эффектов у гидробионтов, испытывающих влияние нефтяного загрязнения, и могут быть использованы в качестве биомаркеров для оценки эмбриотоксичности мазута.

Наши исследования показали, что реорганизация ферментной антиоксидантной системы развивающихся эмбрионов *Parablennius sanguinolentus* зависит от этапа эмбриогенеза и от действия разных концентраций токсиканта. Известно, что перед выклевом личинки из яичевых оболочек, которые предохраняют эмбрион от неблагоприятного воздействия внешней среды, повышается активность антиоксидантных ферментов; это необходимо для обеспечения защиты организма от предстоящего окислительного стресса (Domigues et al., 2010; Rudneva, 2014; Jin et al., 2020).

Анализ полученных данных (табл. 1) показал, что в контроле у эмбрионов *P. sanguinolentus* активность всех тестируемых ферментов на стадии VI была выше, чем на стадии V. Это свидетельствует о подготовке эмбриона к окислительному стрессу, который неизбежен у личинки, выходящей из оболочки в окружающую среду. Ранее у *P. sanguinolentus* и у других видов черноморских рыб мы отмечали увеличение активности антиоксидантных ферментов к концу эмбриогенеза (Rudneva, 1999). Однако под воздействием токсиканта активность ферментов изменялась, причем неоднозначно на разных этапах эмбриогенеза (табл. 1, рис. 2). На стадии V активность КАТ и СОД возрастала по отношению к контролю, что позволяет говорить о выраженном защитном эффекте. Активность ПЕР и ГР при малой концентрации мазута была низкой; при его концентрации 0.02 мл/л она была выше, хотя активность ГР была меньше, чем в контроле. Таким образом, в этом случае также проявлялся определенный адаптационный эффект, направленный на мобилизацию защитной системы по предотвращению негативных последствий окислительного стресса.

На стадии VI наблюдалась иная картина, активность ключевых антиоксидантных ферментов СОД, КАТ и ПЕР уменьшалась по сравнению с их активностью в контроле; защитные ресурсы эмбриона в результате продолжающейся интоксикации мазутом истощались, что привело к негативным эффектам.

Под действием тестируемых концентраций мазута у развивающейся икры собачки желто-красной происходила модификация ответных реакций АОС. На стадии V отмечено двукратное увеличение активности СОД при низкой концентрации мазута, при этом активность КАТ не изменилась, а активность ПЕР снизилась в 4 раза. В данном случае доля СОД по отношению к КАТ увеличилась по сравнению с таковой в контроле, а соотношение СОД/ПЕР, наоборот, снизилось, указывая на активное производство супероксидрадикала, который подвергается дисмутации посредством СОД. Однако активность КАТ, разлагающей образующуюся в результате данной реакции перекись водорода, не изменилась, а доля ПЕР по отношению к СОД увеличилась. Очевидно, ПЕР вовлекается в редукцию H_2O_2 и происходит снижение активности ГР, восстанавливающей дисульфидную связь окисленного глутатиона GSSG до его сульфгидрильной формы GSH. При увеличении концентрации мазута до 0.02 мг/л активность СОД оставалась повышенной по сравнению с таковой в контроле, что также свидетельствует об интенсивной генерации активных форм кислорода (АФК). Увеличение активности КАТ и ПЕР может говорить об активации этих ферментов для деградации перекиси водорода. В обоих случаях доля ГР по отношению к КАТ и ПЕР оставалась выше, чем в контроле, это подтверждает направленность реакций детоксикации в эмбрионе на стадии V. Следует отметить, что стадия V характеризуется интенсивным морфогенезом: наблюдается рост хвостового отдела, появляется сердце, образуются зачатки кишечника и печени, а также плавниковой каймы. Это требует значительных энергетических затрат и приводит к дополнительной продукции АФК. Однако тот факт, что в некоторых случаях активность ферментов КАТ и ПЕР по отношению к контролю не изменилась, свидетельствует об успешности стратегии эмбриона для противодействия окислительному стрессу, вызванному активацией метаболических реакций в связи с ростом, развитием и подготовкой к выклеву, а также действием токсиканта.

На стадии VI при низкой концентрации токсиканта активность СОД уменьшилась почти в 3 раза, однако активность КАТ и ПЕР не изменилась, что говорит о способности обоих ферментов успешно разлагать образующуюся в данных условиях H_2O_2 . В этом случае доля активности СОД по

отношению к активностям этих ферментов снизилась. Активность СОД при большей концентрации мазута оставалась ниже контроля, но выше значения, наблюдавшегося при низкой концентрации токсиканта. Это вызвало снижение активности ПЕР, компенсирующей разложение перекиси водорода, при неизменной активности КАТ. Активность ГР была близка к контролю и существенно выше, чем активность фермента при низкой концентрации токсиканта. Таким образом, на стадии VI работают иные, чем на стадии V, компенсаторные механизмы, что обусловлено прежде всего особенностями морфофизиологических процессов, происходящих в организме эмбриона. В этот период начинает функционировать сердце, зародыш интенсивно двигается перед вылуплением, что сопровождается значительными энергетическими тратами и активацией образования АФК. При наличии токсиканта необходимы дополнительные затраты на процессы его детоксикации, что требует соответствующей реорганизации метаболизма. Ранее было показано, что под влиянием разных видов нефти меняется число сердечных сокращений у эмбрионов *Danio rerio* (Hamilton, 1822) – тест-объекта, широко используемого в токсикологических работах. В этом же исследовании установлена индукция цитохрома P4501A (CYP1A), индикатора накопления нефтяных углеводородов в организме (Incardona et al., 2011). Изменение кардиоритма у эмбрионов рыб обусловлено изменением проводимости в результате нарушения передачи импульса на мембране кардиоцита, а также механизма транспорта ионов кальция и калия через ионные каналы (Brette et al., 2014). При этом нефтяные фракции, содержавшие ароматические углеводороды, были в 3–5 раз более токсичны, чем нециклические компоненты. Нарушение сердечного ритма приводило к снижению двигательной активности эмбрионов, требующей больших энергетических трат, и, следовательно, активного поглощения кислорода, что в условиях нефтяного загрязнения затруднено. Нарушение кардиоритма создает определенный риск для процесса вылупления и дальнейшего выживания личинок рыб (Klinger et al., 2015).

Таким образом, при разработке биотестов на икре рыб с использованием в качестве биомаркеров параметров антиоксидантной системы необходимо учитывать этап эмбриогенеза. На последних стадиях эмбрионального развития активность антиоксидантных ферментов возрастает в связи с подготовкой к процессу вылупления и неизбежному окислительному стрессу при выходе личинки из оболочки в окружающую среду. Наличие токсиканта в среде – это дополнительная нагрузка на антиоксидантную систему, обусловленная необходимостью детоксифицировать продукты свободнорадикального окисления. Различия, которые установлены в откликах

АОС на разных стадиях эмбриогенеза исследованного вида рыб, отражают данные процессы и особенности их протекания на последних стадиях развития икры. Активность компонентов защитной антиоксидантной системы существенно изменяется по отношению к контролю; результаты нашего исследования демонстрируют эффективность их применения в качестве молекулярных биомаркеров для разработки методов выделения и выяснения механизмов адаптаций ранних онтогенетических стадий развития морских рыб к неблагоприятным условиям среды обитания.

Подобные исследования необходимы также для мониторинга загрязнения морепродуктов нефтью, которая передается по пищевым цепям и, накапливаясь в рыбе, представляет опасность для человека (Xia et al., 2012). К тому же, нефтяное загрязнение значительно ослабляет иммунитет рыб, делая их уязвимыми для различных патогенов, в том числе болезнетворных вирусов и бактерий, таких как *Photobacterium damsela* и *Vibrio vulnificus*; в акваториях, где происходили разливы нефти, неоднократно регистрировали эпизоотию среди рыб. При развитии эмбрионов рыб в среде, загрязненной нефтью, отмечали нарушение экспрессии генов, ответственных за половую дифференциацию и рост. У икры, содержащейся в среде с разной концентрацией нефти, наблюдали задержку развития, запоздалое вылупление личинок и снижение их выживаемости (Dubansky et al., 2013), а также индукцию окислительного стресса (Crowe et al., 2014; Pereira et al., 2018), что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании. При перераспределении энергии на детоксикацию модифицируются генетические процессы, в том числе экспрессия генов, транскрипция и трансляция, повышается уровень СРО. В результате у развивающегося эмбриона происходит реорганизация метаболизма путем оптимизации соотношений активности антиоксидантных ферментов, которые должны обеспечить не только эффективный процесс вылупления личинки, но и детоксикацию при наличии токсиканта в среде.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-44-92007 “Роль глобальных и локальных факторов в формировании ихтиопланктонных сообществ Черного моря”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность к. б. н. Т.Л. Чесалиной за разработку дизайна эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дехник Т.В.* Ихтиопланктон Черного моря. Киев: Наукова думка. 1973. 235 с.
- Патин С.А.* Морской нефтегазовый комплекс: факторы экологического риска // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2015. № 4. С. 5–12.
- Чесалина Т.Л., Руднева И.И., Кузьмина Н.С.* Токсическое действие соляра на молодь черноморской кефали-остроноса *Liza saliens* // Вопр. ихтиологии. 2000. Т. 40. № 3. С. 429–432.
- Beirão J., Baillonc L., Litta M.A. et al.* Impact of crude oil and the dispersant Corexit™ EC9500A on capelin (*Mallotus villosus*) embryo development // Mar. Environ. Res. 2019. V. 147. P. 90–100.
- Bender M.L., Giebichenstein J., Teisrud R.N. et al.* Combined effects of crude oil exposure and warming on eggs and larvae of an arctic forage fish // Sci. Rep. 2021. V. 11. Art. № 8410.
- Beyer J., Trannum H.C., Bakke T. et al.* Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review // Mar. Pollut. Bull. 2016. V. 110. № 1. P. 28–51.
- Brette F., Machado B., Cros C. et al.* Crude oil impairs cardiac excitation–contraction coupling in fish // Science. 2014. V. 343. P. 772–776.
- Crowe K.M., Newton J.C., Kaltenboeck B. et al.* Oxidative stress responses of gulf killifish exposed to hydrocarbons from the Deepwater Horizon oil spill: potential implications for aquatic food resources // Environ. Toxicol. Chem. 2014. V. 33. P. 370–374.
- Domingues I., Oliveira J., Lourenco J. et al.* Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults // Comp. Biochem. Physiol. 2010. Part C. V. 152. P. 338–345.
- Dubansky B., Whitehead A., Miller J.T.* Multitissue molecular, genomic, and developmental effects of the Deepwater Horizon oil spill on resident gulf killifish (*Fundulus grandis*) // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. № 10. P. 5074–5082.
- Dubansky B., Whitehead A., Rice C.D. et al.* Response to comment on “Multitissue molecular, genomic, and developmental effects of the Deepwater Horizon oil spill on resident gulf killifish (*Fundulus grandis*)” // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. P. 7679–7680.
- Geraudie P., Bakkemo R., Milinkovitch T. et al.* First evidence of marine diesel effects on biomarker responses in the Icelandic scallops, *Chlamys islandica* // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016. V. 23. № 16. P. 16504–16512.
- Hansen B.H., Farkas J., Nordtug T. et al.* Does microbial biodegradation of water-soluble components of oil reduce the toxicity to early stages of fish? // Environ. Sci. Technol. 2018. V. 162. P. 59–62.
- Incardona J.P., Linbo T.L., Scholz N.L.* Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2011. V. 257. P. 242–249.
- Jiang M., Li L., Shen G., Shen X.* Oxidative stress in shellfish *Sinonovacula constricta* exposed to the water accommodated fraction of zero sulfur diesel oil and pinghu crude oil // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2017. V. 73. № 2. P. 294–300.
- Jin J., Kurobe T., Hammock B.G. et al.* Toxic effects of fluridone on early developmental stages of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) // Sci. Total Environ. 2020. V. 700. Art. № 134495.
- Klinger D.H., Dale J.J., Machado B.E. et al.* Exposure to Deepwater Horizon weathered crude oil increases routine metabolic demand in Chub mackerel, *Scomber japonicus* // Mar. Pollut. Bull. 2015. V. 98. P. 259–266.
- Kuppusamy S., Maddela N.R., Megharaj M. et al.* Ecological impacts of total petroleum hydrocarbons // Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation. Cham, Switzerland: Springer. 2020. P. 95–138.
- Martinez-Gomez C., Campillo J.A., Benedicto J. et al.* Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boschii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill // Mar. Pollut. Bull. 2006. V. 53. P. 305–314.
- Mu X., Pang S., Sun J. et al.* Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays // Environ. Pollut. 2013. V. 175. P. 147–157.
- Mu X., Liu J., Yang K. et al.* Diesel water-accommodated fraction induced lipid homeostasis alteration in zebrafish embryos // Environ. Pollut. 2018. V. 242. Part 4. P. 952–961.
- Muhling B.A., Roffer M.A., Lamkin J.T. et al.* Overlap between Atlantic bluefin tuna spawning grounds and observed Deepwater Horizon surface oil in the northern Gulf of Mexico // Mar. Pollut. Bull. 2012. V. 64. P. 679–687.
- Pereira T.M., Merçon J., Passos L. S. et al.* Effects of the water-soluble fraction of diesel oil (WSD) on the fertilization and development of a sea urchin (*Echinometra lucunter*) // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2018. V. 162. P. 59–62.
- Phan T.C.T., Manuel A.V., Tsutsui N. et al.* Impacts of short-term salinity and turbidity stress on the embryonic stage of red sea bream *Pagrus major* // Fisheries Sci. 2020. V. 86. P. 119–125.
- Rooker J.R., Kitchens L.L., Dance M.A. et al.* Spatial, temporal, and habitat-related variation in abundance of pelagic fishes in the Gulf of Mexico: Potential implications of the Deepwater Horizon oil spill // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. e76080.
- Rudneva I.I.* Antioxidant system of Black Sea animals in early development // Comp. Biochem. Physiol. C

- Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1999. V. 122. № 2. P. 265–271.
- Rudneva I.I. Biomarkers for stress in fish embryos and larvae. CRC Press. Taylor & Francis Group. 2014. 206 p.
- Rudneva I.I. Use of fish embryo biomarkers for the evaluation of mazut toxicity in marine environment // Int. Aquat. Res. 2019. V. 11. P. 147–157.
- Samuelson A., Daewe U., Wettre C. Risk of oil contamination of fish eggs and larvae under different oceanic and weather conditions ICES // J. Mar. Sci. 2019. V. 76. № 6. P. 1902–1916.
- Sehonova P., Plhalova L., Blahova J. et al. Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages // Chemosphere. 2017. V. 188. P. 414–423.
- Stancova V., Plhalova L., Blahova J. et al. Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*) // Veterinarni Medicina. 2017. V. 62. № 2. P. 90–96.
- Velisek J., Stara A. Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*) // Chemosphere. 2018. V. 194. P. 481–487.
- Xia K., Hagood G., Childers C. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Mississippi seafood from areas affected by the Deepwater Horizon oil spill // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. P. 5310–5318.
- Zhang J.F., Wang X.R., Guo H.Y. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2004. V. 58. P. 110–116.

Responses of the Antioxidant System of Embryos of the Rusty Blenny *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) (Blenniiformes: Blenniidae) to Pollution of the Marine Environment with Heavy Fuel Oil

I. I. Rudneva

Marine Hydrophysical Institute, Russian Academy of Science, Sevastopol 299011, Russia

Oil pollution remains a serious problem for marine ecosystems, especially for coastal waters that are known as spawning areas of many fish and invertebrates, including commercial species, and are characterized by high biodiversity and productivity. The early ontogenetic stages of aquatic organisms are very sensitive to action of pollutants, which generate various toxic effects, including oxidative stress. The effect of heavy fuel oil (mazut) at concentrations of 0.00001 and 0.02 ml/l on the activity of antioxidant enzymes in the embryos of the rusty blenny *Parablennius sanguinolentus* was assessed in embryonic stages V and VI. The recorded ambiguous responses of enzymes depended on the stage of embryo development and the concentration of the toxicant. This study investigates possible pathways of reorganization of the enzyme antioxidant system to protect embryos from oxidative stress caused both by preparation to the hatching process by the action of the toxicant effect of mazut.

Keywords: Black Sea, heavy fuel oil (mazut), pollution, fish eggs, biomarkers, antioxidant enzymes

УДК 581.1:582.26

ОЦЕНКА ВЗАИМНОГО ВЛИЯНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *HETEROSIGMA AKASHIWO* (RAPHIDOPHYCEAE) И *THALASSIOSIRA PSEUDONANA* (BACILLARIOPHYTA)

© 2022 г. Ж. В. Маркина*

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2021 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 24.03.2022 г.

В экспериментальных условиях исследовано взаимное влияние рафидофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo*, вызывающей “цветения” в морских акваториях, и диатомеи *Thalassiosira pseudonana*, регулярно регистрируемой в водах морей. Эксперименты проводили с монокультурами, их фильтраатами и со смешанными культурами при разных исходных концентрациях. Рост и физиологическое состояние микроводорослей оценивали методом проточной цитометрии. Показано, что в совместной культуре и при выращивании на фильтраатах ингибировался рост обеих водорослей, но у *T. pseudonana* рост подавлялся в большей степени. У *H. akashiwo*, выращенной на фильтраате *T. pseudonana*, снижались флуоресценция хлорофилла *a*, содержание активных форм кислорода и нейтральных липидов. Подобные изменения отмечены и у *T. pseudonana*, выращенной на фильтраате *H. akashiwo*. На основе этого сделан вывод, что изученные водоросли проявляют аллелопатическую активность в отношении друг друга.

Ключевые слова: *Heterosigma akashiwo*, *Thalassiosira pseudonana*, аллелопатия, взаимодействие водорослей, флуоресценция хлорофилла *a*, активные формы кислорода, нейтральные липиды

DOI: 10.31857/S0134347522050060

В разных районах Мирового океана рафидофитовая водоросль *Heterosigma akashiwo* вызывает “цветения” (Shikata et al., 2008; Dursun et al., 2016), приводящие к массовой гибели рыб (Taylor, 1993; Fuica et al., 2007) в результате выделения водорослью активных форм кислорода (Marshall et al., 2005). Концентрация ее клеток при “цветении” может достигать 400 тыс. кл/мл (Branco et al., 2014). В связи с этим важно исследовать экологию вида, воздействие на него как биотических, так и абиотических факторов. Работ по изучению влияния биотических факторов на *H. akashiwo*, в том числе о её взаимодействии с диатомовыми водорослями, в настоящее время немного (Yamasaki et al., 2007, 2009; Wang et al., 2017; Long et al., 2018).

Непосредственное взаимное влияние конкретных видов микроводорослей можно оценить в контролируемых условиях в лабораторном эксперименте. Одним из способов исследования биотических взаимодействий являются эксперименты с фильтраатами монокультур, позволяющие исследовать отношения “среда—популяция”. Смешанные культуры позволяют оценить отношения

“популяция—популяция”, а также изучить условия доминирования и элиминации видов (Михеев и др., 2018). Смешанные культуры — это не просто смесь монокультур, так как их рост, биохимический состав и другие показатели у конкретного вида могут значительно отличаться от показателей этого же вида, регистрируемых в монокультуре (Huang et al., 2011).

Для оценки аллелопатического взаимного влияния на физиологическое состояние водорослей предлагается использовать следующие показатели: флуоресценция хлорофилла *a* как индикатор состояния фотосинтетического аппарата (Jamers et al., 2009; Нука et al., 2013); содержание активных форм кислорода (АФК), возрастающее при неблагоприятном воздействии на живой организм (Gomes et al., 2005), а также содержание нейтральных липидов для оценки стрессового воздействия неблагоприятных условий на водоросль (Felpeto et al., 2019).

Диатомовая водоросль *Thalassiosira pseudonana* участвует в сукцессионном цикле фитопланктона и имеет важное экологическое значение как вид, влияющий на формирование “цветений” (Ianora

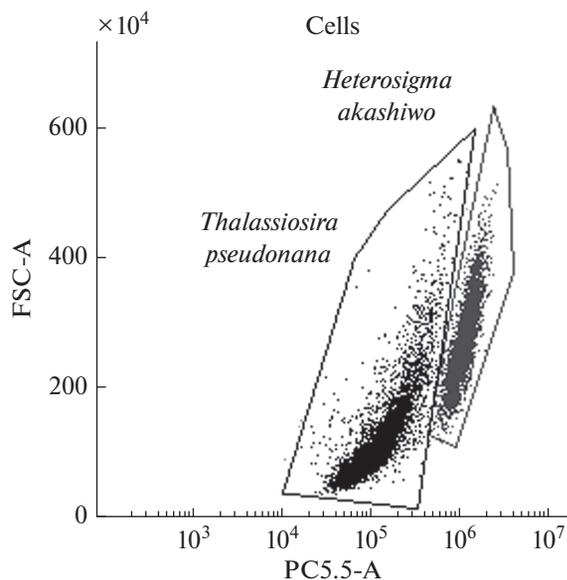


Рис. 1. Диаграмма разделения клеток популяций *Heterosigma akashiwo* и *Thalassiosira pseudonana* на проточном цитометре согласно размеру и флуоресценции хлорофилла *a*. По оси абсцисс – флуоресценция хлорофилла *a* клеток в канале PC5.5; по оси ординат – прямое светорассеяние, параметр FSC, который косвенно отображает размер клеток.

et al., 2011), в том числе в умеренных и полярных водах (Harris et al., 1995). В дальневосточных морях в осенний сезон эта водоросль может встречаться одновременно с *H. akashiwo* (Орлова и др., 2009; Стоник, 2018; Шевченко и др., 2022). Представители данных родов в виде цист обнаружены совместно в донных отложениях (Орлова, Морозова, 2009).

Цель настоящей работы – исследование взаимного влияния микроводорослей *H. akashiwo* (Raphidophyceae) и *T. pseudonana* (Bacillariophyceae).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили культуры одноклеточных водорослей *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara, M. Chihara (Raphidophyceae) и *Thalassiosira pseudonana* MBRU_TSP-02 Hasle & Heimdal (Bacillariophyta). Водоросли выращивали на среде *f* (Guillard, Ryther, 1962), приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰, в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл при температуре 18°C, интенсивности освещения 70 мкмоль/м²/с в области видимого света и свето-темным периодом 14 ч свет : 10 ч темнота. В качестве инокулята использовали культуры на экспоненциальной стадии роста. Начальные концентрации клеток (НКК) составляли

1.5×10^4 и 3.0×10^4 кл/мл для *H. akashiwo*, а также 10×10^4 и 30×10^4 кл/мл для *T. pseudonana*.

Экспериментальную работу проводили в три этапа. На первом этапе изучали динамику численности микроводорослей и их физиологические показатели (флуоресценция хлорофилла *a*, содержание АФК и нейтральных липидов) в монокультурах при разной начальной концентрации. На втором этапе исследовали рост и физиологические показатели в культуре *H. akashiwo*, выращенной на фильтрах *T. pseudonana*, а также в культуре *T. pseudonana*, выращенной на фильтрах *H. akashiwo*. На третьем этапе изучали рост микроводорослей в смешанных культурах *H. akashiwo* и *T. pseudonana* без оценки физиологических показателей.

Фильтраты микроводорослей *H. akashiwo* и *T. pseudonana* получали фильтрованием культур через мембраны МФАС-ОС-2 (“Владипор”, Россия); культуру второго вида предварительно центрифугировали в течение 10 мин при 7000 оборотов/мин. Для получения фильтратов культуры обеих водорослей отбирали на 10-е сут; в это время они находятся на одной и той же фазе роста, а культура *H. akashiwo* обладает наибольшей токсичностью (Yamasaki et al., 2007). Фильтраты проверяли под микроскопом, чтобы исключить присутствие в них клеток водорослей.

Продолжительность экспериментов составила 14 сут. Пробы для подсчета клеток отбирали через 3, 7, 10 и 14 сут. Для оценки флуоресценции хлорофилла *a*, определения содержания АФК и нейтральных липидов пробы отбирали через 7 и 14 сут опыта. Показатели измеряли на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа в течение каждого измерения записали 10000 событий (частиц, регистрируемых в пробе). Выбор клеток водорослей из общего числа событий, детектируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* (Нука et al., 2013; Маркина, 2019). Размер клеток косвенно определяют на цитометре по показателю прямого светорассеяния (forward scattering – FSC): чем меньше данный показатель, тем меньше клетка. Клетки *H. akashiwo* обладают более интенсивной флуоресценцией хлорофилла *a*, чем клетки *T. pseudonana*. Благодаря этим особенностям детектируемые клетки можно отнести к конкретному виду исследуемых водорослей при их совместном культивировании (рис. 1).

Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм; длина волны возбуждения составляла 488 нм – канал PC 5.5 (Нука et al., 2013). Продукцию АФК оценивали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата, окрашивание проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Показатель флуоресценции его окисленного и

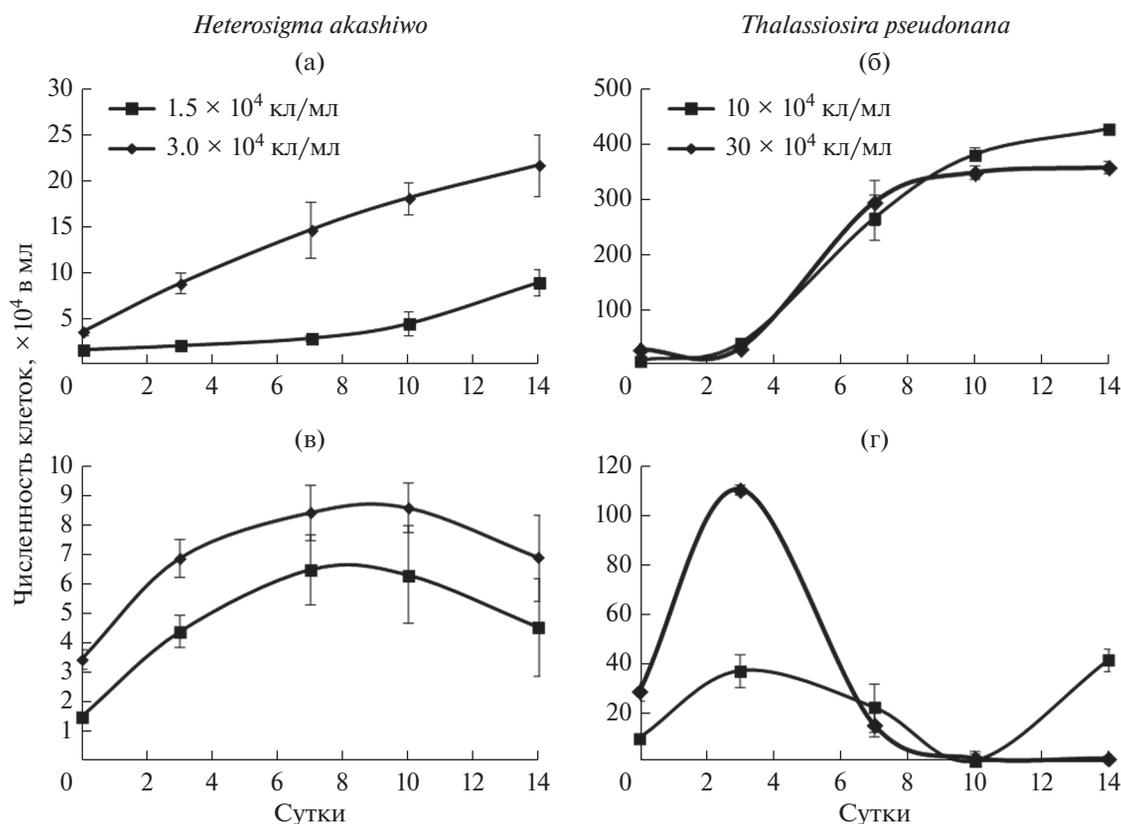


Рис. 2. Динамика численности клеток водорослей с разной исходной концентрацией в монокультурах (а – *Heterosigma akashiwo*, б – *Thalassiosira pseudonana*) и культурах, выращенных на фильтратах друг друга (в – *H. akashiwo*, культивируемая на фильтрате *T. pseudonana*; г – *T. pseudonana*, культивируемая на фильтрате *H. akashiwo*).

диацетилированного продукта определяли на длине волны 525 нм; длина волны возбуждения 488 нм – канал FITC (Gomes et al., 2005). Содержание нейтральных липидов определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red в концентрации 1 мкг/мл; окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте; длина волны возбуждения 488 нм, испускания 580 нм – канал PE (Alemán-Nava et al., 2016).

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel. На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост и физиологические показатели *Heterosigma akashiwo* и *Thalassiosira pseudonana* в монокультуре

В популяции *Heterosigma akashiwo* с НКК 1.5×10^4 кл/мл отмечена выраженная лаг-фаза (рис. 2а); в 2 раза число клеток увеличилось только на 7-е сут опыта, затем их численность возрастала более интенсивно. Рост популяции микроводоросли с НКК 3×10^4 кл/мл был отмечен уже в начале опыта, численность клеток монотонно увели-

чивалась и к концу эксперимента составляла 21.6×10^4 кл/мл. Флуоресценция хлорофилла *a* у *H. akashiwo* в монокультурах с разной НКК на 7-е и 14-е сут экспозиции достоверно не различалась (рис. 3а), но к завершению эксперимента несколько снизилась. Содержание АФК у водоросли на 14-е сут было выше, чем на 7-е (рис. 4а). В целом более высокое содержание АФК отмечено у культуры с НКК 1.5×10^4 кл/мл. Независимо от начальной концентрации водоросли содержание нейтральных липидов у *H. akashiwo* на 14-е сут было выше, чем на 7-е (рис. 5а).

В монокультуре у *Thalassiosira pseudonana* при обеих начальных концентрациях лаг-фаза продолжалась до трех суток, с 3-х по 7-е сут наблюдалась экспоненциальная фаза, а с 7-х по 14-е – стационарная (рис. 2б). При НКК 10×10^4 и 30×10^4 кл/мл максимальная численность составляла 430×10^4 и 356×10^4 кл/мл соответственно. Флуоресценция хлорофилла *a* при НКК 10×10^4 кл/мл к концу эксперимента увеличилась, а при более высокой НКК, напротив, снизилась (рис. 3б). Содержание АФК у *T. pseudonana* в начале стационарной фазы возрастало при обеих начальных концентрациях клеток (рис. 4б). Содержание нейтральных липи-

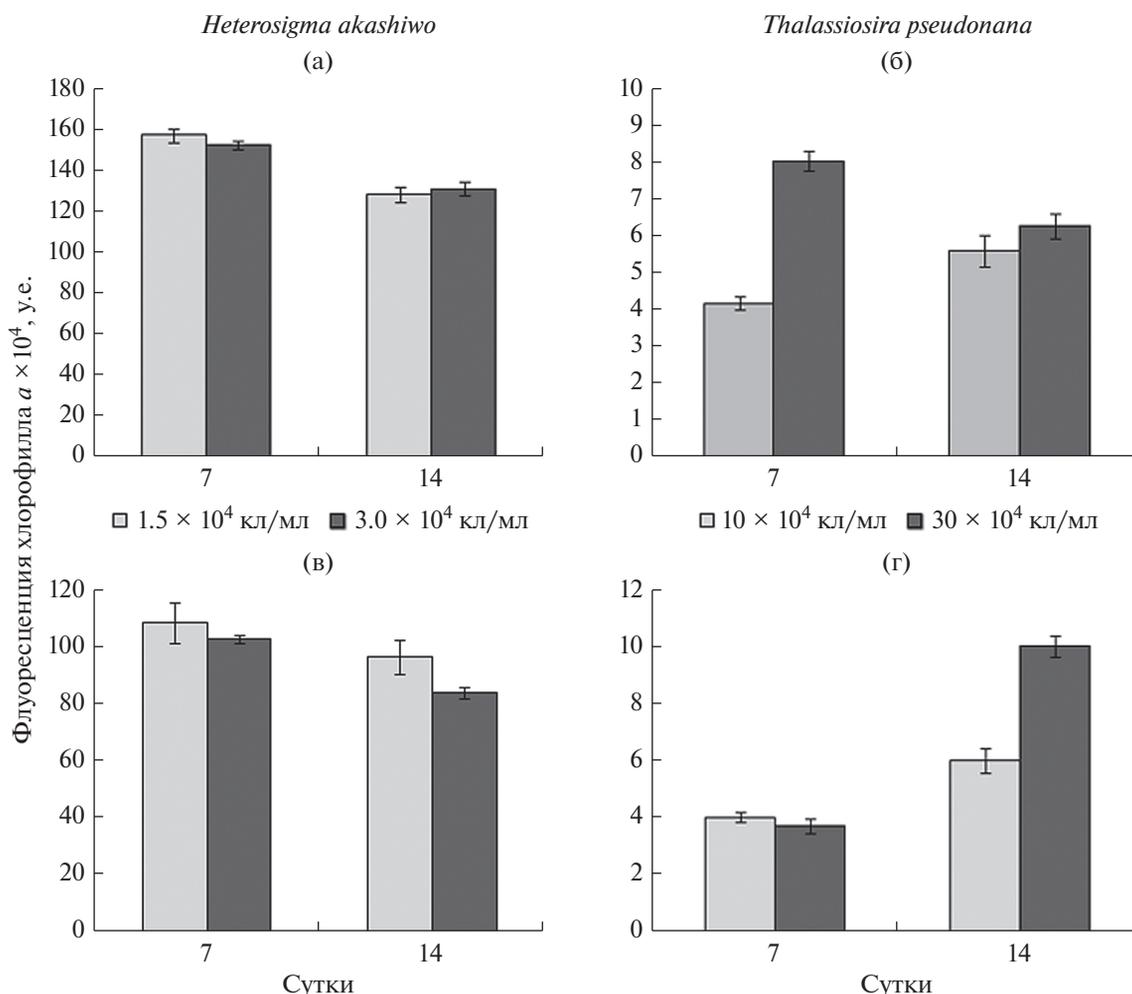


Рис. 3. Детектированная на канале РС 5.5 флуоресценция хлорофилла *a* у водорослей с разной исходной концентрацией в монокультурах (а – *Heterosigma akashiwo*, б – *Thalassiosira pseudonana*) и в культурах, выращенных на фильтратах друг друга (в – *H. akashiwo*, культивируемая на фильтрате *T. pseudonana*; г – *T. pseudonana*, культивируемая на фильтрате *H. akashiwo*).

дов в культуре с НКК 10×10^4 кл/мл на протяжении всего опыта было ниже, чем в культуре с более высокой начальной концентрацией (рис. 5б)

Рост и физиологические показатели культур *Heterosigma akashiwo* и *Thalassiosira pseudonana* на фильтратах

При культивировании *H. akashiwo* на фильтратах *T. pseudonana* увеличение числа клеток отмечено в первые трое суток (рис. 2в); при НКК 1.5×10^4 кл/мл рост *H. akashiwo* был более интенсивным, чем в монокультуре. Однако при более высокой НКК количество клеток на протяжении всего опыта было ниже, чем в монокультуре. После 10 сут численность клеток в обоих случаях снижалась. Независимо от начальной концентрации флуоресценция хлорофилла *a* у *H. akashiwo* в течение всего опыта была ниже, чем в культуре, выращенной

на чистой среде (рис. 3в). Содержание АФК было выше у культуры с НКК 3×10^4 кл/мл (рис. 4в); этот показатель оставался на одном уровне на 7-е и 14-е сут эксперимента. У культуры, выращенной на фильтратах *T. pseudonana*, содержание нейтральных липидов было более низким, чем у монокультуры, однако оно также увеличилось к завершению эксперимента (рис. 5в)

На фильтратах *H. akashiwo* численность клеток *T. pseudonana* при отсутствии лаг-фазы на 3-и сут увеличилась до 370×10^4 и 111×10^4 кл/мл при НКК 10×10^4 и 30×10^4 кл/мл соответственно (рис. 2г). К концу экспоненциальной фазы роста культуры численность клеток падала и продолжала снижаться до 10-х сут. На 14-е сут в культуре с низкой НКК численность клеток увеличилась до 41.5×10^4 кл/мл, а в культуре с НКК 30×10^4 кл/мл осталась на уровне 10-х сут – 1.5×10^4 кл/мл. Флуоресценция хлорофилла *a* в культуре с НКК 10×10^4 кл/мл

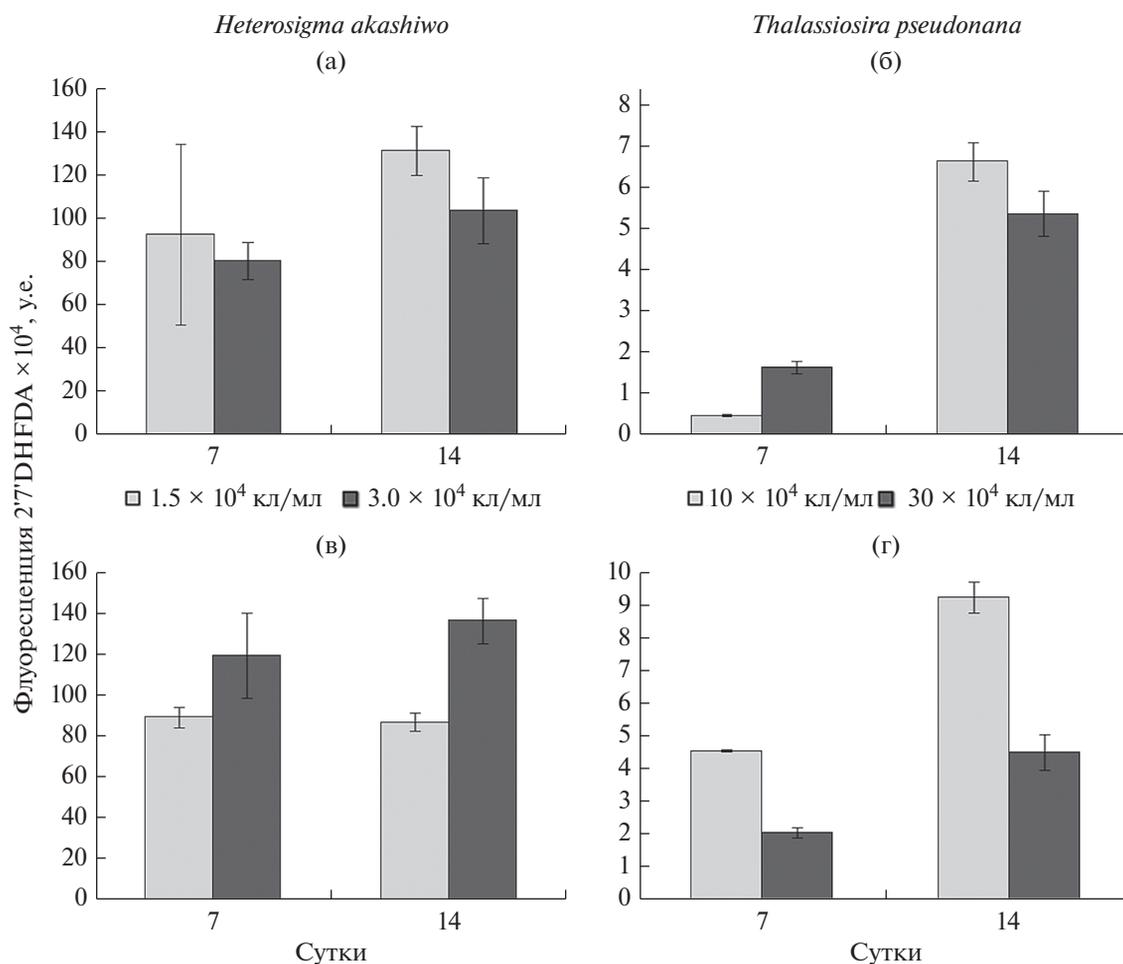


Рис. 4. Флуоресценция клеток, окрашенных индикатором содержания активных форм кислорода 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетатом, у водорослей с разной исходной концентрацией в монокультурах (а – *Heterosigma akashiwo*, б – *Thalassiosira pseudonana*) и в культурах, выращенных на фильтратах друг друга (в – *H. akashiwo*, культивируемая на фильтрате *T. pseudonana*; г – *T. pseudonana*, культивируемая на фильтрате *H. akashiwo*).

не отличалась от этого показателя у водоросли в монокультуре (рис. 3г). В культуре с более высокой НКК флуоресценция изначально была ниже, чем в монокультуре, однако к концу экспозиции была выше, чем в монокультуре. Содержание АФК возрастало к концу экспозиции и в культуре с НКК 30 × 10⁴ кл/мл было выше, чем в культуре с НКК 10 × 10⁴ кл/мл (рис. 4г). Содержание нейтральных липидов при выращивании *T. pseudonana* на фильтратах *H. akashiwo* существенно снижалось к концу опыта (рис. 5г).

Рост *Heterosigma akashiwo* и *Thalassiosira pseudonana* при совместном культивировании

При совместном культивировании *H. akashiwo* и *T. pseudonana* с НКК 15 × 10⁴ кл/мл численность *H. akashiwo* увеличивалась в начале эксперимента и в течение 10 сут не отличалась от этого показателя в монокультуре (рис. 6а). К концу экспозиции рост водоросли замедлился, и ее численность была ниже, чем в монокультуре. У культуры с

НКК 3 × 10⁴ кл/мл зарегистрированы 3-суточная лаг-фаза, а затем интенсивный рост, однако количество клеток в культуре было меньше, чем в контроле. Как и в монокультуре, число клеток интенсивнее увеличивалось при более высокой НКК. Рост *H. akashiwo* при совместном культивировании с *T. pseudonana* не зависел от концентрации *T. pseudonana*.

Рост *T. pseudonana* с НКК 10 × 10⁴ кл/мл в смешанной культуре ингибировался в течение всего эксперимента и оставался на одном уровне (рис. 6б). В культуре с НКК 30 × 10⁴ кл/мл количество клеток незначительно снижалось в течение семи суток и только к 10-м сут увеличилось до 60 × 10⁴ кл/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что при совместном культивировании и выращивании на фильтратах культура *Heterosigma akashiwo* оказы-

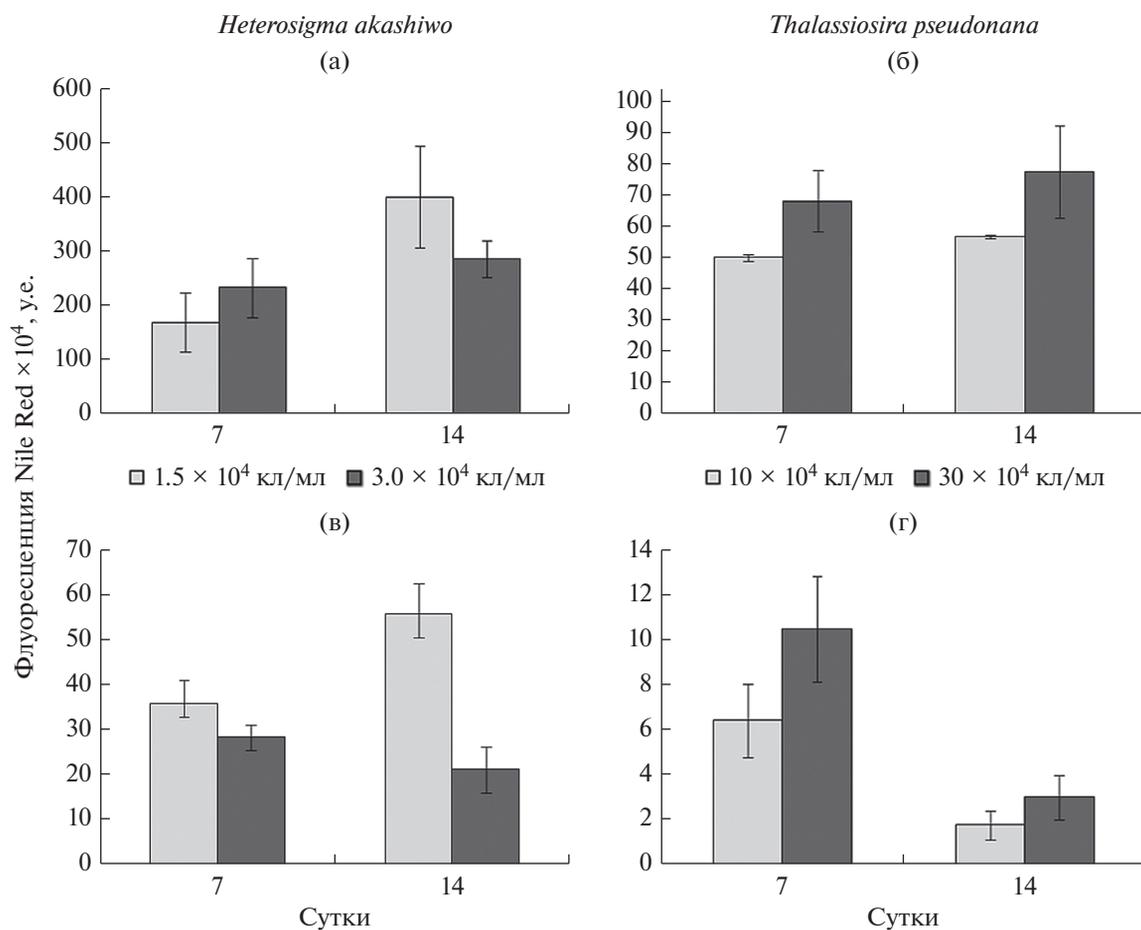


Рис. 5. Флуоресценция клеток, окрашенных индикатором содержания нейтральных липидов Nile Red, у водорослей с разной исходной концентрацией в монокультурах (а – *Heterosigma akashiwo*, б – *Thalassiosira pseudonana*) и в культурах, выращенных на фильтратах друг друга (в – *H. akashiwo*, культивируемая на фильтрате *T. pseudonana*; г – *T. pseudonana*, культивируемая на фильтрате *H. akashiwo*).

вала на *Thalassiosira pseudonana* большее влияние, чем культура *T. pseudonana* на *H. akashiwo*. Ранее было установлено, что при совместном культивировании *H. akashiwo* и *Skeletonema costatum* изменялся рост только *S. costatum*, который снижался на 13% по сравнению с таковым в монокультуре (Yamasaki et al., 2007). В тоже время при выращивании *H. akashiwo* на экстрактах *Phaeodactylum tri-cornutum* отмечена гибель большинства клеток *H. akashiwo* в результате лизиса. У выживших клеток наблюдали повреждение мембран, а также снижение эстеразной активности и флуоресценции хлорофилла *a* (Wang et al., 2017).

Культура водоросли *T. pseudonana* с НКК 30×10^4 кл/мл при совместном культивировании с *H. akashiwo* росла более интенсивно, чем с НКК 10×10^4 кл/мл, однако при выращивании на фильтратах отмечен обратный эффект. Ранее было показано, что при экспонировании *S. costatum* на фильтратах *H. akashiwo* при низкой НКК *S. costatum* наблюдалось ингибирование ее роста,

однако этого не происходило в культуре с высокой НКК (Yamasaki et al., 2007, 2009). Возможно, ингибирование роста *T. pseudonana*, отмеченное в экспериментах, связано в том числе и с более мелкими, чем у *H. akashiwo*, размерами. Небольшие виды с быстрым метаболизмом более чувствительны к веществам с аллелопатической активностью (Felpeto et al., 2019). Отметим, что при выращивании *T. pseudonana* на фильтратах численность клеток сначала увеличивалась, а затем выражено снижалась. Такую же тенденцию наблюдали при выращивании пресноводной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* на фильтратах разных цианобактерий (Leão et al., 2009).

Несмотря на то, что рост популяций *T. pseudonana* и *H. akashiwo* подавлялся, к концу эксперимента они не погибали, хотя известно, что вещества, выделяемые микроводорослями, например, представителями рода *Alexandrium*, способны вызвать иммобилизацию и лизис клеток в течение нескольких часов (Hatlenarth-Lehmann,

Gobler, 2011; Fernández-Herrera et al., 2016; Zheng et al., 2016; Long et al., 2018).

При совместном культивировании высокий конкурентный эффект может достигаться не только за счет подавления одной культуры другой токсичными экзометаболитами, но и из-за изъятия питательных веществ при более быстром росте одной из культур или из-за большей потребности в биогенах у одного вида, чем у другого. У мелких диатомовых часто наблюдается высокая скорость роста популяции, которая может приводить к более быстрому изъятию питательных веществ из среды по сравнению с таковым у конкурентных видов (Михеев и др., 2018). Возможно, по этой причине у *H. akashiwo* отмечено ингибирование роста при совместном культивировании с *T. pseudonana*, хотя и более слабое, чем при выращивании на фильтрах *T. pseudonana*. Ранее было показано, что фильтраты диатомовых *Skeletonema marinoi* и *Thalassiosira* sp. ингибировали рост *Ostreopsis* cf. *ovata* соответственно до 56 и 78% от роста в монокультуре (Pichierri et al., 2017). Авторы связали это с высоким производством диатомовыми полиненасыщенных альдегидов и жирных кислот, которые оказывают влияние на другие виды водорослей. Альдегиды диатомовых действуют как сигнальные молекулы, вызывая в клетке каскад реакций таргетного вида, что приводит к ее гибели. Виды рода *Thalassiosira* негативно воздействуют на клеточный цикл и вызывают апоптоз у других видов микроводорослей (Ianora et al., 2011; Felpeto, Vasconcelos, 2016).

В настоящем исследовании отмечено, что рост культуры *T. pseudonana* при НКК *H. akashiwo* 3×10^4 кл/мл подавлялся в большей степени, чем при НКК 1.5×10^4 кл/мл. Вероятно, важна концентрация обоих видов, а не только более аллелопатически агрессивного вида, так как при НКК *T. pseudonana* 30×10^4 кл/мл, несмотря на 7-суточную лаг-фазу, наблюдали выраженное увеличение числа клеток, не отмеченное при НКК 10×10^4 кл/мл. В эксперименте по совместному культивированию *Trichormus doliolum* и *Anabaena variabilis* установлено, что аллелопатически активный вид должен достигнуть определенной концентрации, прежде чем начнет доминировать (Hulot, Huisman, 2004).

В проведенном нами исследовании зарегистрировано снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* у *H. akashiwo*, выращенной на фильтрате *T. pseudonana*. Ранее Лонг с соавторами (Long et al., 2018) обнаружили, что фильтрат *Alexandrium tamarense* приводит к такому же эффекту с одновременным изменением липидного состава у *Chaetoceros muelleri*. На основе оценки эстеразной активности *C. muelleri* авторы пришли к выводу, что данные нарушения являются результатом повреждения наружных мембран, в том

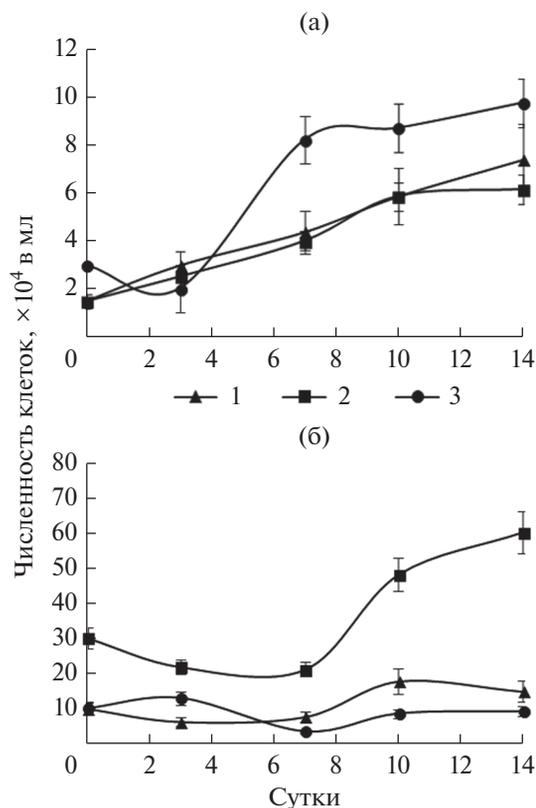


Рис. 6. Динамика численности клеток водорослей *Heterosigma akashiwo* (а) и *Thalassiosira pseudonana* (б) в смешанной культуре. Условные обозначения: 1 – культуры *H. akashiwo* с начальной концентрацией клеток (НКК) 1.5×10^4 кл/мл и *T. pseudonana* с НКК 10×10^4 кл/мл; 2 – культуры *H. akashiwo* с НКК 1.5×10^4 кл/мл и *T. pseudonana* с НКК 30×10^4 кл/мл; 3 – культуры *H. akashiwo* с НКК 3×10^4 кл/мл и *T. pseudonana* с НКК 10×10^4 кл/мл.

числе за счет продуцирования водорослью АФК. Одной из причин снижения флуоресценции хлорофилла *a* может быть разрушение мембран хлоропластов, которое наблюдали у *P. tricornutum* при совместном культивировании с *A. tamarense* (Zheng et al., 2016). Такой же эффект отмечен у водорослей разных отделов во время совместного культивирования с *Synechocystis* sp. (Śliwińska-Wilczewska et al., 2018; Felpeto et al., 2019), а также у *Ostreopsis* cf. *ovata* при совместном культивировании с диатомовой водорослью *Licmophora paradoxa* (Ternon et al., 2018).

У *T. pseudonana*, выращенной на фильтрате *H. akashiwo*, отмечено небольшое увеличение АФК в течение эксперимента. Ранее такое явление наблюдали у *C. muelleri* при совместном культивировании с *A. tamarense* (Long et al., 2018). АФК могут выступать в роли сигнальных молекул, влияя на генетические процессы в клетках, что приводит как к появлению нежизнеспособных клеток, так и к возникновению организмов,

более адаптированных к негативному воздействию (Felpeto, Vasconcelos, 2016).

В нашем эксперименте при культивировании на фильтрах в культурах обеих водорослей содержание нейтральных липидов снижалось. Ранее Пуулин с соавторами (Poulin et al., 2018) отметили, что метаболиты *Karenia brevis* одновременно с ингибированием роста разрушают липиды мембран у *T. pseudonana* и *Asterionellopsis gracialis*.

Таким образом, согласно полученным результатам, микроводоросли *H. akashiwo* и *T. pseudonana* не только влияют на рост, но и меняют физиологическое состояние друг друга. У обеих водорослей отмечено снижение флуоресценции хлорофилла *a* и содержания нейтральных липидов. Содержание АФК у *H. akashiwo* в монокультуре было выше, чем у водоросли, выращенной на фильтрате. Это позволяет предположить, что при моновидовом “цветении” *H. akashiwo* более токсична, чем в смешанных фитопланктонных сообществах. Так как рост и физиологическое состояние водорослей подавлялись при их выращивании на фильтрах, можно сделать вывод, что изученные микроводоросли оказывают друг на друга больше аллелопатическое, чем конкурентное, влияние. При более высокой НКК численность клеток в культурах *H. akashiwo* и *T. pseudonana* достигает более высоких значений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

БЛАГОДАРНОСТИ

Культуры микроводоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 и *Thalassiosira pseudonana* MBRU_TSP-02 Hasle & Heimdal (Bacillariophyta) предоставлены ресурсным центром “Морской био-банк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Маркина Ж.В. Проточная цитометрия как метод исследования морских одноклеточных водорослей: развитие, проблемы, перспективы // Биол. моря. 2019. Т. 45. № 5. С. 291–298.

Мухеев М.А., Инатова В.И., Спиркина Н.Е. Биотические взаимоотношения двух видов микроводорослей в смешанной культуре // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2018. Т. 73. № 2. С. 78–84.

Орлова Т.Ю., Морозова Т.В. Покоящиеся стадии микроводорослей в поверхностных осадках залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2009. Т. 35. № 4. С. 256–265.

Орлова Т.Ю., Стоник И.В., Шевченко О.Г. Флора микроводорослей планктона Амурского залива Японского моря // Биол. моря. 2009. Т. 35. № 4. С. 48–61.

Стоник И.В. Качественный и количественный состав фитопланктона бухты Золотой Рог Японского моря // Изв. ТИНРО. 2018. Т. 194. С. 167–174.

Шевченко О.Г., Тевс К.О., Шулькин В.М., Шульгина М.А. Мониторинг фитопланктона и гидрохимических параметров прибрежных вод острова Русский (залив Петра Великого, Японское море) // Биол. моря. 2022. Т. 48. № 1. С. 44–53.

Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 128. P. 74–79.

Branco S., Menezes M., Alves-de-Souza C. et al. Recurrent blooms of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in the Piraquê Channel, Rodrigo de Freitas Lagoon, southeast Brazil // Braz. J. Biol. 2014. V. 74. P. 529–537.

Dursun F., Taş S., Koray T. Spring bloom of the raphidophycean *Heterosigma akashiwo* in the Golden Horn Estuary at the northeast of Sea of Marmara // Ege J. Fish. Aquat. Sci. V. 2016. 33. P. 201–207.

Felpeto A.B., Śliwińska-Wilczewska S., Klin M. et al. Temperature-dependent impacts of allelopathy on growth, pigment, and lipid content between a subpolar strain of *Synechocystis* sp. CCBA MA-01 and coexisting microalgae // Hydrobiologia. 2019. V. 835. P. 117–128.

Felpeto A.B., Vasconcelos V.M. Allelopathic interactions in phytoplankton population ecology // JAI. 2016. V. 2. № 2. P. 25–34.

Fernández-Herrera L.J., Band-Schmidt C.J., López-Cortés D.J. et al. Allelopathic effect of *Chattonella marina* var. *marina* (Raphidophyceae) on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) // Harmful Algae. 2016. V. 51. P. 1–9.

Fuica N., Rojas X., Clément A. et al. Ocurrencia e impacto de las FANs en la salmonicultura en el sur de Chile: análisis del programa de monitoreo de INTESAL de Salmón Chile // Salmociencia. 2007. V. 2. P. 61–71.

Gomes F., Ferdandes E., Lima J.F.L.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // J. Biochem. Methods. 2005. V. 65. P. 45–80.

Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // Can. J. Microbiol. 1962. V. 8. P. 229–239.

Harris A.S.D., Medlin L.K., Lewis J., Jones K.J. *Thalassiosira* species (Bacillariophyceae) from a Scottish sea-loch // Eur. J. Phycol. 1995. V. 30. 117–131.

Hatlenarth-Lehmann T.H., Gobler C.J. Allelopathic inhibition of competing phytoplankton by North American strains of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*: Evidence from field experiments, laboratory ex-

- periments, and bloom events 2011 // *Harmful Algae*. 2011. V. 11. P. 106–116.
- Huang W.-W., Dong B.-Zh., Cai Zh.-P., Duan Sh.-Sh. Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. V. 10. P. 13164–13174.
- Hulot F., Huisman J. Allelopathic interactions between phytoplankton species: The roles of heterotrophic bacteria and mixing intensity // *Limnol. Oceanogr.* 2004. V. 49. P. 1424–1434.
- Hyka P., Lickova S., Přibyl P. et al. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 2–16.
- Jamers A., Lenjou M., Deraedt P. et al. Flow cytometric analysis of the cadmium exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) // *Eur. J. Phycol.* 2009. V. 44. P. 541–550.
- Ianora A., Matthew G. B., Caldwell G.S. et al. The Relevance of Marine Chemical Ecology to Plankton and Ecosystem Function: An Emerging Field // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9. P. 1625–1648.
- Leão P.N., Teresa M., Vasconcelos S.D., Vítor M. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities // *Eur. J. Phycol.* 2009. V. 44. P. 347–355.
- Long M., Taliec K., Soudant P. et al. Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri* // *Algal Res.* 2018. V. 35. P. 508–518.
- Marshall J.-A., de Salas M., Oda Tatsuya, Hallegraef G. Superoxide production by marine microalgae // *Mar. Biol.* 2005. V. 147. P. 533–540.
- Pichierri S., Accoroni S., Pezzolesi L. et al. Allelopathic effects of diatom filtrates on the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. Ovata* // *Mar. Environ. Res.* 2017. V. 131. P. 116–122.
- Poulin R.X., Poulson-Ellestad K.L., Roy J.S., Kubanek J. Variable allelopathy among phytoplankton reflected in red tide metabolome // *Harmful Algae*. 2018. V. 71. P. 50–56.
- Shikata T., Yoshikawa S., Matsubara T. et al. Growth dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Hakata Bay, Japan // *Eur. J. Phycol.* 2008. V. 43. № 4. P. 395–411.
- Śliwińska-Wilczewska S., Felpeto A.B., Maculewicz J. et al. Allelopathic activity of the picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on unicellular eukaryote planktonic microalgae // *Mar. Freshwater Res.* 2018. <https://doi.org/10.1071/MF18024>
- Taylor F.J.R. Current problems with harmful phytoplankton blooms in British Columbia waters // *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Amsterdam: Elsevier. 1993. P. 699–704.
- Ternon E., Pavaux A.-S., Marro S. et al. Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and a co-occurring diatom 2018 // *Harmful Algae*. 2018. V. 75. P. 35–44.
- Wang R., Xue Q., Wang J. et al. Effects of an allelochemical in *Phaeodactylum tricornutum* filtrate on *Heterosigma akashiwo*: morphological, physiological and growth effects // *Chemosphere*. 2017. V. 186. P. 527–534.
- Yamasaki Y., Nagasoe S., Matsubara T. et al. Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2007. V. 339. P. 83–92.
- Yamasaki Ya., Shikata T., Nukata A. et al. Extracellular polysaccharide-protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community 2009 // *ISME J.* 2009. V. 3. P. 808–817.
- Zheng J.-W., Li D.-W., Yang L. et al. Molecular exploration of algal interaction between the diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* // *Algal Res.* 2016. V. 17. P. 132–141.

Analysis of the Mutual Influence of the Microalgae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyta)

Zh. V. Markina

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The mutual influence of the raphidophyte microalgae *Heterosigma akashiwo*, which causes algal blooms, and the diatom *Thalassiosira pseudonana*, which is regularly present in sea waters, was studied under experimental conditions. Experiments were carried out with monocultures, monocultural filtrates, and with co-cultures of different initial concentrations. The growth and physiological state of the microalgae were assessed by flow cytometry. Both algae showed inhibited growth in co-culture and at growth on filtrates, but growth was suppressed to a greater extent in *T. pseudonana*. The fluorescence of chlorophyll *a*, the content of reactive oxygen species and neutral lipids decreased in *H. akashiwo* cultures grown on *T. pseudonana* filtrate. Similar changes were noted in *T. pseudonana* culture grown on *H. akashiwo* filtrate. It is concluded that these algae exhibit allelopathic activity in relation to each other.

Keywords: *Heterosigma akashiwo*, *Thalassiosira pseudonana*, allelopathy, algal interaction, chlorophyll *a* fluorescence, reactive oxygen species, neutral lipids

УДК 57.015 + 575.17

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТРЕХ ВИДОВ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ КРАСНОПЕРОК РОДА *PSEUDASPIUS* (OSTEICHTHYES: CYPRINIDAE) НА ОСНОВЕ МНОГОМЕРНОГО АНАЛИЗА ПЛАСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

© 2022 г. А. О. Золотова¹, *, Ю. Ф. Картавец¹¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: anna.o.zolotova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.21 г.

После доработки 09.03.22 г.

Принята к публикации 24.03.22 г.

На основании дисперсионного, канонического и дискриминантного анализов по комплексу пластических признаков выявлены значимые различия между обитающими в Приморье и на о-ве Сахалин дальневосточными красноперками *Pseudaspius* (*Tribolodon*) *hakonensis*, *P. brandtii* и *P. sachalinensis* (Osteichthyes, Cyprinidae), а также между выборками *P. hakonensis* из разных районов обитания. Показано, что относительные размеры головы, рыла, глаза, верхней и нижней челюстей, а также хвостового стебля — это основные признаки, по которым различаются виды и локальные группировки дальневосточных красноперок.

Ключевые слова: дальневосточные красноперки, *Pseudaspius* (*Tribolodon*), морфология, систематика, популяционная структура, морфометрия, дисперсионный анализ, канонический анализ, ANOVA, дискриминантный анализ

DOI: 10.31857/S0134347522050114

Дальневосточные красноперки — уникальные представители карповых рыб, распространенные в реках, эстуариях и морских бухтах от о-ва Тайвань на юге (Берг, 1949) до Шантарских и Курильских островов на севере (Большаков, 2013). Они могут вести анадромный образ жизни, а также образовывать жилые и проходные формы; в ходе миграций способны приспосабливаться к воде разной степени солености — от пресной до океанической (Гриценко, 2002). В свое время признак анадромности был использован для выделения дальневосточных красноперок в отдельный род *Tribolodon* (Okado, 1960; Nakamura, 1963, 1969; Sakai, 1995; Гриценко, 1974, 1982). Обосновывая выделение дальневосточных красноперок в отдельный род, Гриценко (1974) придерживался концепции о необходимости отнесения к самостоятельному роду видов, имеющих общие морфологические родовые признаки и общее филогенетическое происхождение, а также занимающих сходные экологические ниши (Майр и др., 1956).

В зависимости от методов исследования и концепций вида в систематике дальневосточных красноперок поочередно преобладали разные тенденции: выделение внутри рода от шести (Шмидт, 1904) до 18 (по: Гриценко, 1974) видов или объединение видов под единым названием

(Берг, 1916; Дружинин, 1970, и др.). Таксономические изменения затрагивали не только видовой уровень, но и родовой. В настоящее время по итогам ревизии рода *Tribolodon*, проведенной на основании молекулярно-генетических данных (Tan, Armbruster, 2018; Sakai et al., 2020), предложено объединить этот род с родом *Pseudaspius* (Dyldin, Orlov, 2021). Ранее единственным представителем рода считался вид *Pseudaspius leptocephalus*, ведущий пресноводный и полупроходной образ жизни (Dyldin, Orlov, 2016), лишь единичные особи этого вида отмечены в эстуариях (Bogutskaya et al., 2008; Парин и др., 2014). Согласно данным каталога рыб Эшмайера (Eschmeyer's catalog of Fishes), в настоящее время род *Pseudaspius* представлен видами *P. leptocephalus* (Pallas, 1776), *P. brandtii* (Dybowski, 1872), *P. sachalinensis* (Nikolskii, 1889), *P. hakonensis* (Günther, 1877) и *P. nakamurai* (Doi & Shinzawa, 2000). Четыре последних вида ранее относили к роду *Tribolodon* (Парин и др., 2014).

Во многих работах результаты систематизации таксонов отряда Сургиниформес по морфологическим признакам отличаются от данных, полученных с помощью молекулярно-генетических маркеров (Stout et al., 2016), однако эти два метода могут дополнять друг друга (Kartavtsev et al., 2017).

Для дальневосточных красноперок вопросы происхождения (Kartavtsev et al., 2002; Брыков и др., 2011, 2013; Полякова и др., 2015) и фенотипической изменчивости, связанной с экологической пластичностью (Иванков и др., 2016), до сих пор не решены, поэтому независимо от того, принадлежат эти виды к роду *Tribolodon* или к роду *Pseudaspius*, необходимо продолжить их изучение. Наряду с генетическими методами важно использовать морфологические признаки, которые не теряют своей значимости при работе в полевых условиях и при быстрой сортировке большого объема материала. Ранее по *t*-критерию Стьюдента и расстоянию Махаланобиса у видов *P. brandtii* и *P. hakonensis* с юга Приморского края были выявлены значимые различия между самками и самцами (Гавренков, Свиридов, 2001; Свиридов, Иванков, 2003). На основе анализа уровня флуктуирующей асимметрии признаков оценена стабильность развития этих видов (Романов, Ковалев, 2005; Романов, 2019). На примере *P. brandtii* и *P. hakonensis* из бухт и заливов Японского моря рассмотрены проблемы внутривидовой организации (Иванков и др., 2016). Для *P. hakonensis* сопоставлены данные по морфометрии особей с юга Приморского края с опубликованными данными для этого вида рыб с о-ва Сахалин (Гудков и др., 2010).

Комплексное исследование морфологических признаков с привязкой к молекулярно-генетическим данным актуально для карповых рыб (Zolotova et al., 2019). В настоящей работе представлены собственные материалы по внутри- и межвидовой морфологической изменчивости дальневосточных красноперок *P. hakonensis*, *P. brandtii* и *P. sachalinensis* с юга Приморского края и с о-ва Сахалин, для видовой идентификации которых ранее были использованы молекулярно-генетические маркеры (Zolotova, Kartavtsev, 2018; Zolotova et al., 2019).

При проведении работы рассматривали две гипотезы. Согласно основной гипотезе различия значений пластических признаков у разных видов рыб рода *Pseudaspius* превышают различия признаков у одного и того же вида из разных мест обитания. Альтернативная гипотеза состоит в том, что исследованные виды рода *Pseudaspius* характеризуются достаточно широкой экологической пластичностью и вариабельность пластических признаков зависит от места обитания, а не от видовой принадлежности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Отлов рыб проводили жаберными сетями и с помощью удильной снасти в б. Киевка (42°50' N, 133°40' E) Приморского края и в пяти районах о-ва Сахалин: в зал. Анива (46°59' N, 142°58' E), р. Лютога (47°14' N, 142°45' E), р. Найба (47°34' N,

142°22' E), р. Тымь (51°15' N, 143°10' E) и р. Пиленга (51°14' N, 143°26' E). Исследовано 82 экз. *Pseudaspius hakonensis* из пяти локальностей: б. Киевка (19 экз.), зал. Анива (21 экз.), р. Лютога (27 экз.), р. Найба (10 экз.) и р. Тымь (5 экз.); 26 экз. *P. brandtii* из трех локальностей: б. Киевка (22 экз.), р. Лютога (3 экз.) и р. Найба (1 экз.), а также 9 экз. *P. sachalinensis* из двух локальностей: р. Найба (4 экз.) и р. Пиленга (5 экз.). Для снижения погрешностей анализа измерения были выполнены одним оператором. Морфометрия и меристические подсчеты проведены в соответствии с существующей методикой измерения карповых рыб (Armbruster, 2012) (рис. 1).

На первом этапе морфологического анализа была оценена нормальность распределения вариационных рядов выбранных признаков после их перевода в индексы (Armbruster, 2012; Золотова, 2019) (табл. 1, 2). Для минимизации влияния размера на изменчивость пластических признаков (линейных промеров) в дальнейшем анализировали проиндексированные значения, выраженные в процентах. Перед проведением статистического анализа все переменные (признаки) были стандартизованы с приведением всех вариационных рядов к виду со средней, равной 0, и стандартным отклонением, равным 1.

Для проверки возможности идентификации трех видов рыб рода *Pseudaspius* и выборки *P. hakonensis* из пяти мест обитания применяли многомерный дисперсионный, канонический и дискриминантный анализы (Афифи, Эйзен, 1982). Для расчетов использовали случайные выборки особей из разных популяций и признаки, имеющие нормальное или близкое к нормальному распределение. Нормально распределенными считали признаки, у которых значение асимметрии распределения по модулю не превышало стандартной ошибки асимметрии, а значение эксцесса — трех стандартных ошибок. Для каждого анализируемого признака во всех тестах принимались минимальные вероятности ошибки (уровни значимости) $p \leq 0.05$, включая тест на нормальность Колмогорова—Смирнова и статистику Шапиро—Уилкса, а также простой дисперсионный анализ отдельных признаков (ANOVA), многомерный анализ комплекса признаков (MANOVA), канонический и дискриминантный анализы. Поскольку канонический корреляционный и канонический дискриминантный анализы дополняют друг друга, сначала проводили анализ канонических корреляционных связей и статистической значимости всего комплекса переменных. Затем полученные статистические характеристики использовали в каноническом дискриминантном анализе. В каждом анализе выявляли признаки, по которым различия между сформированными группами были наибольшими. Статистическую значимость различий для сравниваемых групп

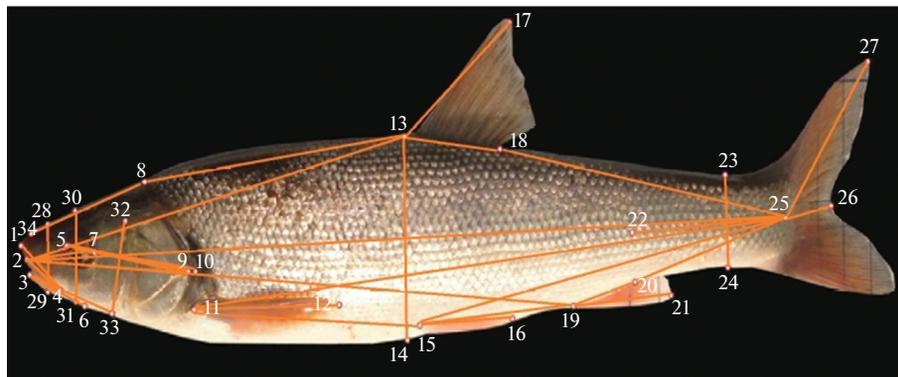


Рис. 1. Схема промеров дальневосточных красноперок. Цифрами обозначены точки, по которым проводили измерения. 2–25 – стандартная длина рыбы (SL); 1–4 – длина рыла; 5–7 – горизонтальный диаметр глаза; 7–9 – посторбитальное расстояние до кости жаберной крышки; 7–10 – посторбитальное расстояние до конца кожной складки на жаберной крышке; 2–9 – длина головы; 28–29 – высота головы (сквозь ноздри); 30–31 – высота головы (сквозь глаз); 2–4 – длина верхней челюсти; 3–6 – длина нижней челюсти; 32–33 – высота operculum; 13–14 – наибольшая высота тела (у основания спинного плавника); 23–24 – наименьшая высота тела (высота хвостового стебля); 2–13 – преддорсальное расстояние; 13–25 – постдорсальное расстояние; 2–11 – расстояние до грудного плавника; 2–15 – расстояние до брюшного плавника; 2–19 – расстояние до анального плавника; 20–25 – длина хвостового стебля (по: Armbruster, 2012); 22–25 – длина хвостового стебля (по: Правдин, 1966); 13–18 – длина основания спинного плавника (D); 13–17 – высота спинного плавника (D) (по второму лучу); 19–20 – длина основания анального плавника (A); 19–21 – высота анального плавника (A) (по второму лучу); 11–12 – длина грудного плавника (P) (по третьему лучу); 15–16 – длина брюшного плавника (V) (по третьему лучу); 11–15 – расстояние между основаниями грудного и брюшного плавников; 15–19 – расстояние между основаниями брюшного и анального плавников; 25–27 – длина верхней лопасти хвостового плавника; 25–26 – длина выемки хвостового плавника; 18–25 – постдорсальное расстояние; 3–33 – расстояние от начала нижней челюсти до края operculum, 2–7 – от начала рыла до заднего конца горизонтального диаметра глаза, 5–9 – от начала горизонтального диаметра глаза до края жаберной крышки, 11–19 – от основания грудного плавника до основания анального, 15–25 – от основания брюшного плавника до основания хвостового, 11–25 – от основания грудного плавника до основания хвостового, 8–13 – от заднего края черепной коробки до основания спинного плавника, 34–8 – от переднего конца nasale до заднего края черепной коробки; 35–36 – межглазничное расстояние, 37–38 – расстояние между внешними краями sphenotica, 39–40 – расстояние между внешними краями pterotica, 41–42 – ширина головы, 43–44 – расстояние между внешними краями supraethmoidea, 47–48 – ширина тела в районе основания дорсального плавника, 49–50 – ширина хвостового стебля.

(видов и популяций) оценивали на основе комплексов переменных в описанных многомерных подходах. При этом минимизируется проблема множественности сравнений по отдельным признакам.

Всего в работе исследовали 54 признака (индекса). В ходе анализа индексы, вариационные ряды которых отклонялись от нормального распределения, были исключены; основу исследования составили 39 индексов. При выполнении дискриминантного анализа для различения видов и популяций используются разные значения признаков, что отражается на их подборе в дискриминирующую функцию и приводит к разному набору и разному числу признаков при требовании максимизации различий; в результате этого число признаков уменьшилось до 21–25. Статистический анализ проводили на основе пакета программ Statistica 6 (StatSoft, 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе вариационных рядов 54 индексов пластических признаков для трех видов красноперок рода *Pseudaspius* установлено, что боль-

шинство признаков имело нормальное или близкое к нормальному распределение (табл. 1). Основные результаты дискриминантного анализа изменчивости пластических признаков представлены в табл. 2 и 3. Данные многомерного дисперсионного анализа показали наличие значимых различий между изученными видами красноперок по комплексу из 39 нормально распределенных индексов пластических признаков ($F = 5.9$; $d.f. = 102$; 80 ; $p < 0.0001$). Для крупночешуйной красноперки *P. hakonensis* оценена внутривидовая изменчивость пластических признаков. При проведении многомерного дисперсионного анализа обнаружено, что выборки, соответствовавшие разным локальным группировкам *P. hakonensis*, различались ($F = 2.9$; $d.f. = 188$, 50 ; $p < 0.0001$).

Межвидовая изменчивость дальневосточных красноперок

Для изученных видов дальневосточных красноперок выявлены характерные различия по четырем индексам пластических признаков: пропорции рыла и верхней челюсти, диаметр глаза, а

Таблица 1. Характеристики вариационных рядов основных стандартизованных индексов пластических признаков, проанализированных в выборках трех видов дальневосточных краснопёрок рода *Pseudaspis*

№	Индекс, %	Доверительный интервал 95%		Минимум	Максимум	SE	Асимметрия (As)	SE As	Экцесс (Ex)	SE Ex
		-95	+95							
1	Высота тела у основания дорсального плавника/SL	-0.192	0.192	-2.395	2.899	0.097	-0.004	0.234	-0.018	0.463
2	Высота хвостового стебля/SL	-0.192	0.192	-2.248	2.635	0.097	0.434	0.234	0.193	0.463
3	Высота хвостового стебля/длина хвостового стебля	-0.192	0.192	-2.074	2.369	0.097	0.093	0.234	-0.432	0.463
4	Ширина тела у основания дорсального плавника/SL	-0.192	0.192	-1.705	2.327	0.097	0.212	0.234	-0.675	0.463
5	Ширина хвостового стебля/SL	-0.192	0.192	-2.009	3.133	0.097	0.604	0.234	0.395	0.463
6	Преддорсальное расстояние/SL	-0.192	0.192	-2.441	3.993	0.097	0.815	0.234	2.564	0.463
7	Постдорсальное расстояние/SL	-0.192	0.192	-4.881	2.607	0.097	-1.021	0.234	4.722	0.463
8	Расстояние от начала верхней челюсти до брюшного плавника/SL	-0.192	0.192	-8.371	2.304	0.097	-5.782	0.234	47.390	0.463
9	Преанальное расстояние/SL	-0.192	0.192	-7.900	3.384	0.097	-4.191	0.234	37.739	0.463
10	Расстояние от основания грудного до основания брюшного плавника/SL	-0.192	0.192	-2.427	2.947	0.097	0.330	0.234	0.114	0.463
11	Расстояние от основания брюшного до основания анального плавника/SL	-0.192	0.192	-2.353	2.410	0.097	-0.335	0.234	-0.027	0.463
12	Длина хвостового стебля/SL	-0.193	0.193	-2.577	2.470	0.097	-0.259	0.235	-0.330	0.465
13	Длина основания дорсального плавника/SL	-0.192	0.192	-2.127	2.920	0.097	0.210	0.234	-0.141	0.463
14	Высота дорсального плавника/SL	-0.192	0.192	-4.073	1.978	0.097	-0.828	0.234	2.030	0.463
15	Длина основания анального плавника/SL	-0.192	0.192	-2.413	2.642	0.097	0.106	0.234	-0.385	0.463
16	Высота анального плавника/SL	-0.192	0.192	-3.134	2.132	0.097	-0.030	0.234	0.075	0.463
17	Длина грудного плавника/SL	-0.192	0.192	-2.320	2.366	0.097	0.195	0.234	-0.359	0.463
18	Длина брюшного плавника/SL	-0.192	0.192	-3.277	2.347	0.097	-0.140	0.234	0.421	0.463
19	Длина головы/SL	-0.192	0.192	-2.639	3.423	0.097	0.657	0.234	1.092	0.463
20	Длина головы/высота тела	-0.192	0.192	-2.033	3.560	0.097	0.540	0.234	0.527	0.463
21	Высота головы в районе ноздрей/SL	-0.192	0.192	-1.962	2.311	0.097	0.063	0.234	-0.472	0.463
22	Высота головы в районе ноздрей/длина головы	-0.192	0.192	-2.211	2.190	0.097	0.081	0.234	-0.510	0.463
23	Высота головы через диагональ глаза/длина головы	-0.192	0.192	-2.615	2.721	0.097	0.052	0.234	-0.297	0.463
24	Ширина головы/SL	-0.192	0.192	-1.938	2.972	0.097	0.392	0.234	0.395	0.463
25	Высота головы/длина головы	-0.192	0.192	-1.781	3.732	0.097	0.584	0.234	0.881	0.463
26	Длина рыла/SL	-0.192	0.192	-2.040	3.612	0.097	1.164	0.234	2.221	0.463
27	Длина рыла/длина головы	-0.192	0.192	-2.411	3.627	0.097	0.946	0.234	2.807	0.463
28	Горизонтальный диаметр глаза/SL	-0.193	0.193	-2.041	2.739	0.097	0.270	0.235	-0.314	0.465
29	Горизонтальный диаметр глаза/длина головы	-0.192	0.192	-2.447	2.569	0.097	0.392	0.234	0.119	0.463

Таблица 1. Окончание

№	Индекс, %	Доверительный интервал 95%		Минимум	Максимум	SE	Асимметрия (As)	SE As	Экцесс (Ex)	SE Ex
		-95	+95							
30	Горизонтальный диаметр глаза/ширина межглазничного расстояния	-0.192	0.192	-2.081	3.011	0.097	0.512	0.234	0.461	0.463
31	Посторбитальное расстояние/длина головы	-0.192	0.192	-2.335	6.114	0.097	3.910	0.234	20.716	0.463
32	Межглазничное расстояние/SL	-0.192	0.192	-2.164	3.775	0.097	0.415	0.234	1.308	0.463
33	Межглазничное расстояние/длина головы	-0.192	0.192	-2.245	3.060	0.097	0.153	0.234	-0.103	0.463
34	Длина верхней челюсти/длина головы	-0.193	0.193	-2.377	3.778	0.097	0.264	0.235	2.080	0.465
35	Длина верхней челюсти /SL	-0.193	0.193	-1.724	3.601	0.097	0.875	0.235	1.663	0.465
36	Длина нижней челюсти/SL	-0.192	0.192	-2.041	3.832	0.097	0.689	0.234	1.582	0.463
37	Длина нижней челюсти/длина головы	-0.192	0.192	-1.998	5.069	0.097	0.993	0.234	5.030	0.463
38	Длина нижней челюсти/межглазничное расстояние	-0.192	0.192	-1.838	3.212	0.097	0.700	0.234	0.372	0.463
39	Длина нижней челюсти/высота operculum	-0.192	0.192	-2.721	3.621	0.097	0.355	0.234	1.165	0.463
40	Расстояние между краями pterogica/длина черепной коробки	-0.192	0.192	-2.308	2.009	0.097	-0.338	0.234	-0.520	0.463
41	Ширины между краями rhenotica/длина черепной коробки	-0.193	0.193	-3.507	2.457	0.097	-0.603	0.235	1.014	0.465
42	Расстояние между краями supraethmoidea/длина черепной коробки	-0.192	0.192	-2.796	2.217	0.097	-0.541	0.234	-0.044	0.463
43	Расстояние между краями supraethmoidea/расстояние между краями pterogica	-0.192	0.192	-3.153	2.457	0.097	0.207	0.234	0.285	0.463
44	Длина нижней челюсти/расстояние между краями pterogica	-0.192	0.192	-2.686	2.531	0.097	-0.025	0.234	-0.155	0.463
45	Длина operculum/длина головы	-0.192	0.192	-1.964	6.113	0.097	2.558	0.234	13.299	0.463
46	Межглазничное расстояние/горизонтальный диаметр глаза	-0.192	0.192	-2.497	2.494	0.097	0.027	0.234	0.048	0.463
47	Длина рыла/горизонтальный диаметр глаза	-0.192	0.192	-2.235	3.620	0.097	1.081	0.234	2.563	0.463
48	Высота головы/горизонтальный диаметр глаза	-0.192	0.192	-2.424	2.235	0.097	-0.130	0.234	-0.057	0.463
49	Длина головы/высота хвостового стебля	-0.192	0.192	-2.117	2.599	0.097	-0.008	0.234	-0.189	0.463
50	Длина хвостового стебля/высота хвостового стебля	-0.192	0.192	-2.063	2.354	0.097	0.252	0.234	-0.386	0.463
51	Длина нижней челюсти/высота хвостового стебля	-0.192	0.192	-2.192	2.052	0.097	-0.020	0.234	-0.827	0.463
52	Длина грудного плавника/расстояние между основаниями грудного и брюшного плавников	-0.192	0.192	-2.057	2.491	0.097	0.286	0.234	-0.119	0.463
53	Предорсальное расстояние/длина головы	-0.192	0.192	-2.307	5.001	0.097	0.964	0.234	4.631	0.463
54	Высота тела в районе дорсального плавника/длина головы	-0.204	0.204	-2.855	2.391	0.103	-0.032	0.247	-0.154	0.490

Примечание. Перед проведением статистического анализа стандартизованы с приведением всех вариационных рядов к виду со средней, равной 0, и стандартным отклонением, равным 1; SE — стандартная ошибка средней; SL — стандартная длина тела рыбы.

Таблица 2. Дискриминантный анализ изменчивости индексированных пластических признаков пяти популяций крупночешуйной красноперки *Pseudaspius hakonensis* и трех видов дальневосточных красноперок рода *Pseudaspius* с оценкой вклада отдельных переменных (индексов) в канонические переменные (КП)

№	Индекс, %	Структура факторных нагрузок КП для пяти популяций (коэффициенты корреляции КП с признаками)			Структура факторных нагрузок КП для трех видов (коэффициенты корреляции КП с признаками)	
		КП1	КП2	КП3	КП1	КП2
1	Высота хвостового стебля/SL	0.199	0.113	-0.082	-0.186	0.298
2	Ширина тела в районе основания дорсального плавника/SL	0.246	-0.099	-0.112	0.108	0.150
3	Расстояние от основания грудного до основания брюшного плавника/SL	0.048	0.096	-0.277	0.067	0.207
4	Расстояние от основания брюшного до основания анального плавника/SL	-0.001	-0.009	0.060	0.099	-0.232
5	Длина хвостового стебля/SL	0.104	-0.031	-0.026	0.003	0.241
6	Длина основания анального плавника/SL	0.122	0.080	-0.051	-0.022	0.212
7	Длина головы/высота тела	-0.031	-0.113	-0.102	-0.317	-0.063
8	Высота головы в районе ноздрей/SL	-0.149	-0.104	-0.090	-0.269	-0.194
9	Высота головы в районе ноздрей/длина головы	0.190	-0.215	-0.152	-0.043	0.049
10	Высота головы через вертикальную диагональ глаза/длина головы	0.267	-0.182	-0.122	0.086	0.080
11	Высота головы/длина головы	0.133	-0.223	-0.130	-0.114	0.127
12	Длина рыла/SL	0.214	-0.183	-0.068	0.062	0.177
13	Длина горизонтального диаметра глаза/SL	0.040	-0.061	-0.102	0.018	0.236
14	Длина горизонтального диаметра глаза/ширина межглазничного расстояния	0.050	0.023	0.065	0.284	0.048
15	Длина верхней челюсти/длина головы	0.210	-0.129	0.136	0.041	0.135
16	Длина верхней челюсти/SL	0.138	-0.066	-0.025	0.171	0.324
17	Длина нижней челюсти/SL	0.091	-0.158	-0.111	-0.071	0.210
18	Ширина sphenoticum/длина черепной коробки	0.239	-0.066	-0.058	0.240	0.303
19	Ширина между ethmoidale (между краями supraethmoid)/длина черепной коробки	0.075	-0.277	-0.073	0.277	0.048
20	Длина между ethmoidale/ширина между prooticum (между краями pterotica)	0.292	-0.116	-0.109	0.247	0.304

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения переменных, для которых коэффициенты факторных нагрузок приняли величины ≥ 0.2 или ≤ -0.2 . Эти значения выбраны произвольно как точки отсечения для более значимых статистически признаков.

также отношение длины головы к высоте хвостового стебля (табл. 2).

На основе дискриминантного анализа оценены межвидовые и внутривидовые различия дальневосточных красноперок (табл. 2, 3). При исследовании межвидовых и внутривидовых различий оценивали интегральную картину дифференциации при помощи значений координат канонических переменных (КП) для всей совокупности особей и отдельно для *P. hakonensis*. На первом этапе провели канонический анализ степени сопряженности изучаемых переменных (признаков). Были сформированы два набора данных. Левый набор включал две группирующие переменные (виды – 3 группы и популяции – 5 групп).

Правый набор включал 39 индексированных пластических признаков (табл. 2). Переменные двух наборов хорошо коррелируют между собой: $R = 0.9196$, $\chi^2 = 222.2499$, d.f. = 80, $p < 0.00001$). В левом наборе смысловую нагрузку несли 100% признаков. В правом наборе из 39 переменных смысловую нагрузку несли 19.34% переменных. Для представленного набора индексов при оценке дискриминации видов извлечены два статистически значимых корня (КП1 и КП2). Вклад каждой КП, оцененный по величине R, составил для КП1 92.22, $\chi^2 = 273.1668$, λ' Уилкса = 0.0335, $p < 0.00001$, d.f. = 80; для КП2 эта величина составила 88.05, $\chi^2 = 120.1699$, $\lambda' = 0.2247$, $p < 0.00001$, d.f. = 39. Исследованные особи разных видов в значениях ко-

Таблица 3. Результирующие статистики дискриминантного анализа трех исследованных видов красноперок по комплексу из 39 индексов пластических признаков

№	Индекс, %	Лямбда Уилкса	Частная Лямбда	F-критерий	Значимость, <i>p</i>	Толерантность
1	Высота тела в районе основания дорсального плавника/SL	0.006	0.849	2.311	0.091	0.005
2	Высота хвостового стебля/SL	0.006	0.903	1.403	0.256	0.005
3	Высота хвостового стебля к длине хвостового стебля (%)	0.006	0.924	1.067	0.374	0.002
4	Ширина тела в районе основания дорсального плавника/SL	0.006	0.919	1.151	0.341	0.309
5	Ширина хвостового стебля/SL	0.006	0.904	1.375	0.265	0.276
6	Преддорсальное расстояние/SL	0.006	0.897	1.492	0.232	0.194
7	Расстояние от основания грудного до основания брюшного плавника/SL	0.008	0.631	7.591	0.001	0.283
8	Расстояние от основания брюшного до основания анального плавника/SL	0.005	0.980	0.264	0.851	0.326
9	Длина хвостового стебля/SL	0.006	0.932	0.946	0.428	0.003
10	Длина основания дорсального плавника/SL	0.006	0.848	2.335	0.089	0.297
11	Высота дорсального плавника/SL	0.005	0.956	0.598	0.620	0.222
12	Длина основания анального плавника/SL	0.005	0.948	0.707	0.554	0.355
13	Высота анального плавника/SL	0.007	0.790	3.457	0.025	0.226
14	Длина грудного плавника/SL	0.005	0.938	0.853	0.474	0.283
15	Длина брюшного плавника/SL	0.005	0.950	0.683	0.568	0.000
16	Длина головы/SL	0.006	0.870	1.934	0.140	0.003
17	Длина головы/высота тела	0.005	0.968	0.430	0.733	0.001
18	Высота головы в районе ноздрей/SL	0.005	0.968	0.432	0.731	0.001
19	Высота головы в районе ноздрей/длина головы	0.007	0.780	3.661	0.020	0.210
20	Высота головы через вертикальную диагональ глаза/длина головы	0.005	0.949	0.700	0.558	0.001
21	Высота головы/длина головы	0.005	0.954	0.626	0.602	0.001
22	Длина рыла/SL	0.005	0.970	0.408	0.748	0.000
23	Длина рыла/длина головы	0.005	0.967	0.449	0.720	0.000
24	Длина горизонтального диаметра глаза/SL	0.005	0.955	0.618	0.607	0.001
25	Длина горизонтального диаметра глаза/длина головы	0.005	0.965	0.470	0.705	0.001
26	Длина горизонтального диаметра глаза/ширина межглазничного расстояния	0.005	0.996	0.049	0.985	0.001
27	Длина посторбитального расстояния/длина головы	0.005	0.982	0.235	0.871	0.519
28	Ширина межглазничного расстояния/SL	0.006	0.863	2.061	0.121	0.000
29	Ширина межглазничного расстояния /длина головы	0.006	0.842	2.443	0.079	0.001
30	Длина верхней челюсти/длина головы	0.006	0.924	1.063	0.376	0.000
31	Длина верхней челюсти/SL	0.006	0.929	0.996	0.405	0.000
32	Длина нижней челюсти/SL	0.006	0.838	2.514	0.072	0.000
33	Длина нижней челюсти /длина головы	0.006	0.868	1.982	0.133	0.000
34	Длина нижней челюсти/ширина межглазничного расстояния	0.005	0.967	0.445	0.722	0.001
35	Длина нижней челюсти/высота operculum	0.005	0.940	0.834	0.484	0.400
36	Длина между prooticum (между краями pterotica)/длина черепной коробки	0.005	0.966	0.456	0.715	0.001
37	Ширина sphenoticum/длина черепной коробки	0.008	0.656	6.829	0.001	0.300
38	Ширина между ethmoidale (между краями supraethmoid)/длина черепной коробки	0.005	0.950	0.688	0.565	0.002
39	Длина между ethmoidale/ширина между prooticum (между краями pterotica)	0.005	0.960	0.543	0.656	0.003

Примечание. Жирным шрифтом выделены переменные, для которых значения F-критерия принимали значимые величины: ≤ 0.05 .

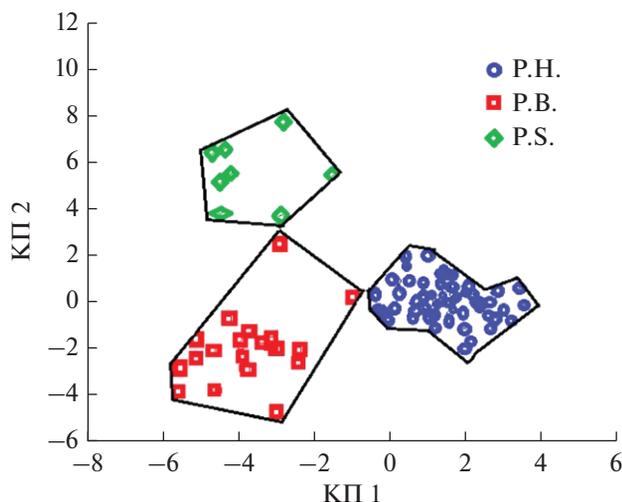


Рис. 2. Распределение координат значений канонических переменных (КП 1 и КП 2), полученных посредством дискриминантного анализа трех видов рода *Pseudaspius* по комплексу 39 индексов (табл. 2, 3). Значимые переменные для КП1 – 20, 21, 30, 41, 42, 43; для КП2 – 2, 10, 11, 12, 15, 28, 35, 36, 41 и 43 (номера пластических признаков соответствуют номерам в табл. 1).

ординат КП1 и КП2 сформировали кластеры, области которых не перекрывались. Каждая область соответствовала одному из трех видов: *P. hakonensis*, *P. brandtii* или *P. sachalinensis* (рис. 2).

По результатам дискриминантного анализа выявлено, что наибольший статистический вклад в диагностику видов вносили четыре индекса: отношение расстояния от основания грудного до основания брюшного плавника к стандартной длине тела (SL); отношение высоты анального плавника к SL; отношение высоты головы в районе ноздрей к длине головы и отношение расстояния между внешними краями sphenotica к длине черепной коробки от переднего конца nasale (табл. 3).

Матрица классификации векторов значений комплексных переменных (табл. 4) иллюстрирует

вероятность или точность идентификации видов. Точность идентификации особей *P. hakonensis* и *P. sachalinensis* составила 100%. Лишь 2 особи *P. brandtii* были ложно идентифицированы, вероятность правильной видовой идентификации в этом случае составила 90.9%. Точность дискриминации трех видов красноперок в среднем составила 95.9% (табл. 4).

Внутривидовая изменчивость *Pseudaspius hakonensis*

Области значений переменных для внутривидовых различий *P. hakonensis* менялись в зависимости от ординации по трем выделенным статистически значимым КП по пластическим признакам: КП1 с КП2 либо КП1 с КП3 (рис. 3, табл. 2). Наборы индексов, вносящих вклад в диагностику локальных группировок, отличались от таковых при видовой диагностике (табл. 5). В целом результаты кластеризации по КП1 и КП2 согласуются с результатами дисперсионного анализа. Выявлены кластеры, соответствующие географически близким локальностям (рис. 3). При оценке внутривидовой подразделенности *P. hakonensis* отмечено наложение значений координат для выборок из р. Лютога и зал. Анива (рис. 3, табл. 5). Отдельно на графике распределения координат КП1 и КП2 располагается группа из б. Киевка (рис. 3). По сравнению с КП1 и КП2 наложение областей значений координат КП1 и КП3 было меньше, черты морфологического сходства проявились для выборок из б. Киевка (юг Приморского края) и р. Найба (о-в Сахалин), некоторые области их кластеров пересекались. Признаки, оказывавшие наибольшее влияние на КП и влиявшие на диагностику групп *P. hakonensis*, в основном были связаны с пропорциями черепа, глаза и хвостового стебля: 4, 21, 23, 25, 26, 34, 41, 42, 43 (табл. 1, 2, 3).

Анализ внутривидовой изменчивости *P. hakonensis* показал, что выборки этого вида можно разделить на три группы: первая группа – особи

Таблица 4. Матрица классификации многомерных векторов значений особей трех видов дальневосточных красноперок рода *Pseudaspius* при использовании комплекса 39 индексов

Вид	Точность идентификации, %	<i>P. hakonensis</i> $p = 0.70874$	<i>P. brandtii</i> $p = 0.21359$	<i>P. sachalinensis</i> $p = 0.07767$
<i>P. hakonensis</i>	100	73	0	0
<i>P. brandtii</i>	90.9	1	20	1
<i>P. sachalinensis</i>	100	0	0	8
Суммарно	95.9	74	20	9

Примечание. p – доля классифицируемых особей в суммарной выборке.

из зал. Анива и р. Лютога; вторая группа – из рек Найба и Тымь, выборки из которых отличаются от всех локальностей по признакам 15, 16, 18, 44 (здесь и далее нумерация, как в табл. 1), и третья группа – выборка из б. Киевка, которая отличается от всех остальных по признакам 1, 2, 3, 4, 5, 21, 22, 23, 32, 33, 38, 44. Кроме того, отмечены индивидуальные отличия индексов для рыб из рек Найба (14), Тымь (53, 54) и Лютога (19, 35).

Таким образом, использование индексов пластических признаков для дисперсионного, канонического и дискриминантного анализов позволяет выявить как межвидовые, так и внутривидовые различия. Этот вывод подтверждается расстояниями Махаланобиса (D^2), межвидовые и внутривидовые значения которых составили соответственно 50.85 и 34.85 ($F = 3.4967$; $d.f. = 1; 51$; $P = 0.0672$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые проведенные для дальневосточных красноперок дисперсионный, канонический и дискриминантный анализы комплексов пластических признаков для видов *Pseudaspius hakonensis*, *P. brandtii* и *P. sachalinensis* в выборках с юга Приморского края и с о-ва Сахалин подтвердили значимость морфологических признаков для выявления межвидовых различий дальневосточных красноперок и внутривидовой неоднородности *P. hakonensis*. При анализе распределения координат КП особей *P. hakonensis* отмечена подразделенность, соответствующая разным районам обитания этого вида. Различия между локальностями *P. hakonensis* статистически значимы по F-критерию в дисперсионном комплексе и в метриках дискриминантного анализа (табл. 2, 5). Однако ни расстояния Махаланобиса D^2 , ни λ -статистика Уилкса не выявили значимых внутри- и межвидовых различий по комплексам морфологических признаков. Представленные данные по морфологической дифференциации видов красноперок согласуются с дифференциацией, выявленной при помощи молекулярно-генетического анализа (Семина и др., 2007; Брыков и др., 2013; Полякова и др., 2015; Zolotova, Kartavtsev, 2018; Zolotova et al., 2019). Молекулярно-генетические данные позволили идентифицировать в российских водах три вида красноперок, а также подразделить выборки крупночешуйной красноперки на три географических кластера: юг о-ва Сахалин (зал. Анива и р. Лютога), восток о-ва Сахалин (реки Найба и Тымь) и юг Приморского края (б. Киевка). Сходная кластеризация отмечена ранее при использовании митохондриальных маркеров в результате ПДРФ-анализа (Брыков и др., 2013).

При помощи пошагового дискриминантного анализа выявлен набор морфологических при-

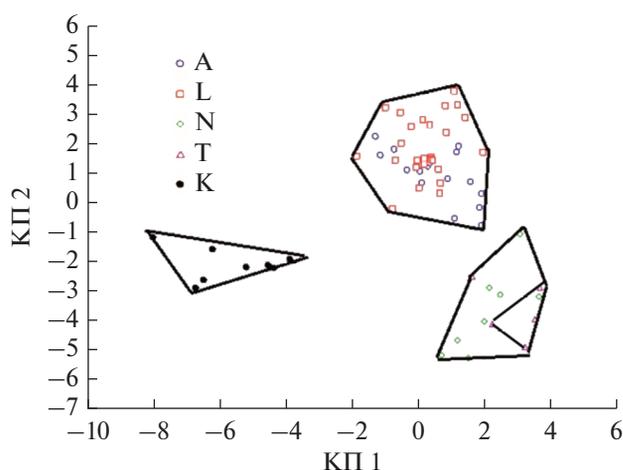


Рис. 3. Распределение координат значений канонических переменных КП1 и КП2, полученных посредством дискриминантного анализа пяти локальностей крупночешуйной красноперки *Pseudaspius hakonensis* по комплексу 25 индексов (табл. 5). Значимые переменные для КП1 – 4, 23, 26, 34, 41, 43; для КП2 – 21, 25, 42; для КП3 – 10 (номера пластических признаков соответствуют номерам в табл. 1).

знаков, диагностирующих исследованные виды рода *Pseudaspius* (табл. 5). В варианте пошагового дискриминантного анализа особей крупночешуйной красноперки *P. hakonensis* получен набор морфологических признаков, диагностирующих внутривидовые различия. Значение морфологической и молекулярной изменчивости в формировании видов и популяций различно. Изменчивость морфологических признаков в основном адаптивна, тогда как изменчивость большинства молекулярных маркеров генов селективно нейтральна или близка к нейтральности (Кимура, 1985; Nei, 1987). Локальные популяции находятся в изоляции меньше времени, чем виды. В результате более длительной изоляции репродуктивные барьеры между видами становятся заметнее в связи с большим числом мутаций, накапливающихся в геноме. Поэтому нуклеотидное разнообразие и генетические различия видового уровня выше, чем у популяций внутри вида, и нарастают с увеличением ранга таксонов (Kartavtsev, 2011, 2021; Hedges et al., 2015).

Наши данные не подтвердили выводы о преобладании межпопуляционных морфологических различий дальневосточных красноперок внутри каждого вида над различиями между видами (Иванков и др., 2016). Возможно, это связано с тем, что выбранные нами признаки, соответствующие им индексы и их функциональные значения отличаются от признаков в цитированных исследованиях (Гудков и др., 2010; Иванков и др., 2016). Возможны и другие причины. Например, численность выборок особей и представитель-

Таблица 5. Результирующие статистики дискриминантного анализа пяти выборок крупночешуйной красноперки *Pseudaspius hakonensis* по комплексу из 25 индексов

№	Индекс, %	Лямбда Уилкса	Частная лямбда	F-критерий	Значимость, <i>p</i>	Толерантность
1	Длина нижней челюсти/высота хвостового стебля	0.002690	0.689626	3.600494	0.015613	0.157122
2	Ширина межглазничного расстояния/SL	0.002809	0.660529	4.111497	0.008445	0.368756
3	Ширина хвостового стебля/SL	0.002379	0.779780	2.259300	0.084534	0.290191
4	Ширина sphenoticum/длина черепной коробки	0.002993	0.619785	4.907710	0.003358	0.395699
5	Высота головы/горизонтальный диаметр глаза	0.002275	0.815289	1.812475	0.150720	0.461177
6	Длина основания дорсального плавника/SL	0.002874	0.645491	4.393669	0.006060	0.507804
7	Длина нижней челюсти/длина головы	0.002330	0.796246	2.047143	0.111218	0.153765
8	Высота тела/длина головы	0.002874	0.645392	4.395560	0.006047	0.382067
9	Высота головы через вертикальную диагональ глаза/длина головы	0.002321	0.799226	2.009690	0.116745	0.484738
10	Длина между ethmoidale/ширина между prooticum (между краями pterotica)	0.002164	0.857409	1.330441	0.279945	0.263963
11	Высота головы/длина головы	0.002230	0.831730	1.618504	0.193651	0.431569
12	Длина основания анального плавника/SL	0.002226	0.833383	1.599427	0.198469	0.006606
13	Расстояние от основания грудного до основания брюшного плавника/SL	0.002445	0.758718	2.544102	0.058610	0.406808
14	Высота анального плавника/SL	0.002170	0.854946	1.357315	0.270564	0.452633
15	Расстояние от основания брюшного до основания анального плавника/SL	0.002081	0.891401	0.974637	0.435048	0.004372
16	Длина хвостового стебля/высота хвостового стебля	0.002140	0.866875	1.228549	0.318309	0.003160
17	Длина грудного плавника/расстояние между основаниями грудного и брюшного плавников	0.002249	0.824966	1.697375	0.174912	0.002772
18	Длина головы/высота тела	0.002240	0.828244	1.658989	0.183799	0.002738
19	Длина верхней челюсти/длина головы	0.002625	0.706707	3.320115	0.022037	0.248216
20	Длина рыла/SL	0.002454	0.755860	2.583974	0.055694	0.212147
21	Длина хвостового стебля/SL	0.002087	0.888835	1.000548	0.421667	0.007557
22	Высота хвостового стебля к длине хвостового стебля	0.002072	0.895310	0.935453	0.455937	0.004424
23	Ширина тела в районе основания дорсального плавника/SL	0.002349	0.789742	2.129895	0.099921	0.213752
24	Ширина между ethmoidale (между краями supraethmoid)/длина черепной коробки	0.002200	0.843229	1.487338	0.229209	0.439126
25	Преддорсальное расстояние/длина головы	0.002131	0.870653	1.188507	0.334654	0.274371

Примечание. Жирным шрифтом выделены переменные, для которых значения F-критерия принимали значимые величины: ≤ 0.05 .

ство разных популяций видов могли повлиять на оценки соотношения внутри- и межвидовой морфологической дифференциации в разных работах. Тем не менее, результаты нашего исследования показали, что при анализе пластических признаков всех особей в первую очередь выявлялись видовые кластеры. Значимые внутривидовые группы обнаружены только при отдельном анализе крупночешуйной красноперки *P. hakonensis*. Это может быть связано с разным адаптивным потенциалом видов и внутривидовых группировок. Сходство морфологического строения пластических признаков у отдельных особей из выбо-

рок *P. hakonensis* из р. Лютога и зал. Анива можно объяснить сходством средовых условий формирования признаков в онтогенезе и/или большим влиянием иммиграции. Река Лютога впадает в зал. Анива, следовательно, у особей из этих участков ареала существует больший потенциал миграций, чем у представителей географически удаленных популяций. Ранее были предприняты попытки выявить различия между *P. hakonensis* с о-ва Сахалин и из Приморского края по набору меристических признаков (Романов, 2019). Однако, несмотря на различия по средним значениям сумм дисперсий у выделяемых авторами форм

дальневосточных красноперок, выборки *P. hakonensis* из нескольких рек о-ва Сахалин (северная форма) объединялись с выборками из рек Приморского края (южная форма) (Романов, 2019). Нам удалось выделить пластические признаки, по которым различались как локальная приморская группировка, так и две локальные группировки о-ва Сахалин (рис. 3).

В ходе исследования выяснено, что основными индексами морфологических признаков, позволяющими разделить особей на видовые и локальные кластеры, являются пропорции головы, верхней и нижней челюстей и хвостового стебля. Эти индексы пластических признаков сходны с описанными ранее для выявления внутри- и межвидовой морфологической дифференциации *P. hakonensis* и *P. brandtii* (Гавренков, Иванков, 1979; Иванков и др., 1984; Гудков и др., 2010), а также *P. sachalinensis* (Гриценко, 1974). Однако наши результаты демонстрируют более рельефное выделение видов и внутривидовых группировок благодаря использованию специализированного комплекса признаков и многомерного подхода.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Фундаментального научного исследования по плановой теме РАН “Генетическое, популяционно-биологическое и биоинформационное исследование биологического разнообразия и видообразования водных организмов” (№ 115081110047) и программе Дальний Восток “Комплексное исследование биоразнообразия рыб и беспозвоночных животных на основе ДНК-штрихкодирования, разработки и поддержки баз данных и биобанкинга” (№ 0268-2018-0016), а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00144).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Афифи Ф., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. М.: Мир. 1982. 488 с.
Берг Л.С. Рыбы пресных вод Российской империи. М. 1916. 563 с.

Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 2. 4-е изд. М.; Л.: АН СССР. 1949. С. 469–925.

Большаков С.Г. Некоторые особенности биологии, рост и возраст мелкочешуйной *Tribolodon brandtii* и крупночешуйной *Tribolodon hakonensis* дальневосточных красноперок на юге Приморья // Изв. ТИНРО. 2013. Т. 175. С. 141–158.

Брыков В.А., Полякова Н.Е., Семина А.В. Филогенетический анализ выявляет два периода дивергенции у крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (Pisces, Cyprinidae) // Генетика. 2011. Т. 47. № 11. С. 1491–1500.

Брыков В.А., Полякова Н.Е., Семина А.В. Сравнительный анализ изменчивости митохондриальной ДНК у четырех видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // Генетика. 2013. Т. 49. № 3. С. 355–365.

Гавренков Ю.И., Иванков В.Н. Таксономический статус и биология дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* южного Приморья // Вопр. ихтиологии. 1979. Т. 19. № 6. С. 1014–1023.

Гавренков Ю.И., Свиридов В.В. Экология размножения дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* в бассейнах рек Приморья // Чтения памяти В.Я. Леванидова. 2001. № 1. С. 296–304.

Гриценко О.Ф. Систематика дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* Sauvage 1883 (*Leuciscus brandtii* (Dybowski)) (Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 1974. Т. 14. № 5. С. 782–795.

Гриценко О.Ф. Экология размножения дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 1982. Т. 22. № 6. С. 1015–1028.

Гриценко О.Ф. Проходные рыбы острова Сахалин (систематика, экология, промысел). М.: Изд-во ВНИРО. 2002. 248 с.

Гудков П.К., Полякова Н.Е., Семина А.В., Назаркин М.В. Сравнительный морфологический анализ красноперки *Tribolodon hakonensis* (Günther) острова Сахалин и южного Приморья // Вопр. ихтиологии. 2010. Т. 50. № 6. С. 772–776.

Дружинин А.Д. Материалы о дальневосточной красноперке *Leuciscus brandtii* (Dyb.) // Вопр. ихтиологии. 1970. Т. 10. № 4. С. 650–654.

Золотова А.О. Морфологическая и молекулярная изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Osteichthyes: Cyprinidae) с анализом последовательностей ДНК в систематике подсемейства Leuciscinae: Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток. 2019. 24 с.

Иванков В.Н., Борисовец Е.Э., Большаков С.Г. Анализ межпопуляционных и межвидовых морфологических различий дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Teleostei: Cyprinidae) // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 1. С. 3–12.

Иванков В.Н., Лукьянова П.Е., Мостовая Н.В., Рухлова Г.Ф. Таксономическое значение морфологических признаков двух видов дальневосточных красноперок // Биол. моря. 1984. № 3. С. 29–32.

- Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир. 1985. 398 с.
- Майр Э., Линсли Э., Юзингер Р. Методы и принципы зоологической систематики. М.: Изд-во иностранной литературы. 1956. 352 с.
- Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Товарищество науч. изд. КМК. 2014. 733 с.
- Полякова Н.Е., Семина А.В., Брыков В.А. Анализ мтДНК и ядерных маркеров свидетельствует о гомопloidном гибридном происхождении нового вида дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // Генетика. 2015. Т. 51. № 11. С. 1250–1263.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность. 1966. 376 с.
- Романов Н.С. Морфологическая изменчивость крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 2019. Т. 59. № 3. С. 258–267.
- Романов Н.С., Ковалев М.Ю. Морфологическая изменчивость мелкочешуйной красноперки *Tribolodon brandtii* (Cyprinidae) из некоторых водоемов Дальнего Востока // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. 2005. № 3. С. 483–491.
- Свиридов В.В., Иванков В.Н. Морфологическая дивергенция дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 132. С. 82–111.
- Семина А.В., Полякова Н.Е., Брыков В.А. Анализ митохондриальной ДНК: филогенетические взаимоотношения в двух таксонах рыб (Pisces: Mugilidae, Cyprinidae) // Биохимия. 2007. Т. 72. № 12. С. 1651–1658.
- Шмидт П.Ю. Рыбы восточных морей Российской империи. СПб. 1904. 466 с.
- Armbruster J.W. Standardized measurements, landmarks, and meristic counts for cypriniform fishes // Zootaxa. 2012. V. 5386. P. 8–16.
- Bogutskaya N.G., Naseka A.M., Shedko S.V. et al. The fishes of the Amur River: updated check-list and zoogeography // Ichthyol. Explor. Freshwaters. 2008. V. 19. № 4. P. 301–366.
- Dyldin Yu.V., Orlov A.M. Ichthyofauna of fresh and brackish waters of Sakhalin Island: An annotated list with taxonomic comments: 2. Cyprinidae–Salmonidae families // J. Ichthyol. 2016. V. 56. № 5. P. 656–693.
- Dyldin Yu.V., Orlov A.M. Annotated list of ichthyofauna of inland and coastal waters of Sakhalin Island. 1. Families Petromyzontidae–Salmonidae // J. Ichthyol. 2021. V. 61. № 1. P. 48–79.
- Eschmeyer's catalog of Fishes: Genera, Species, References // Eds Fricke R., Eschmeyer W.N., Van der Laan R. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Accessed 21.06.2021
- Hedges S.B., Marin J., Suleski M. et al. Tree of life reveals clock-like speciation and diversification // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 835–845.
- Kartavtsev Yu.Ph. Sequence divergence at mitochondrial genes in animals: Applicability of DNA data in genetics of speciation and molecular phylogenetics // Mar. Genomics. 2011. V. 4. P. 71–81.
- Kartavtsev Yu.Ph. Some examples of the use of molecular markers for needs of basic biology and modern society // Animals. 2021. V. 11. № 5. Art. ID 1473. <https://doi.org/10.3390/ani11051473>
- Kartavtsev Yu.F., Sviridov V.V., Hanzawa N., Sasaki T. Genetic divergence of Far-Eastern dace species belonging to the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) and closely related taxa // Russ. J. Genet. 2002. V. 38. № 11. P. 1285–1297.
- Kartavtsev Yu.Ph., Batischeva N.M., Bogutskaya N.G. et al. Molecular systematics and DNA barcoding of Altai osmans, *Oreoleuciscus* (Pisces, Cyprinidae, Leuciscinae), and their nearest relatives, inferred from sequences of cytochrome *b* (*Cyt-b*), cytochrome oxidase *c* (*Co-1*), and complete mitochondrial genome // Mitochondrial DNA, Part A. 2017. V. 28. № 4. P. 502–517.
- Nakamura M. Cyprinid fishes of Japan: Studies on the life history of cyprinid fishes of Japan. Tokyo: Res. Inst. Nat. Resour., 1969. 315 p.
- Nakamura M. Keys to the freshwater fishes of Japan. Tokyo: Hokuryukan, 1963. 258 p.
- Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia Univ. Press. 1987. 512 p.
- Okada Y. Studies on the freshwater fishes of Japan // J. Faculty of Fish. Prefectural University of Mie. 1960. V. 4. № 2. P. 267–588.
- Sakai H. Life-histories and genetic divergence in three species of *Tribolodon* (Cyprinidae) // Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ. 1995. V. 42. P. 1–98.
- Sakai H., Watanabe K., Goto A. A revised generic taxonomy for Far East Asian minnow *Rhynchocypris* and dace *Pseudaspius* // Ichthyol. Res. 2020. V. 67. P. 330–334.
- StatSoft. Statistica Data Analysis Software System, version 7. <http://www.statsoft.com/> Accessed 15.08.2013.
- Stout C.C., Tan M., Lemmon A.R. et al. Resolving Cypriniformes relationships using an anchored enrichment approach // BMC Evol. Biol. 2016. V. 16. Art. ID 244. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0819-5>
- Tan M., Armbruster J.W. Phylogenetic classification of extant genera of fishes of the order Cypriniformes (Teleostei: Ostariophysi) // Zootaxa. 2018. V. 4476. P. 6–39.
- Zolotova A.O., Kartavtsev Yu.Ph. Analysis of sequence divergence in redfin (Cypriniformes, Cyprinidae, *Tribolodon*) based on mtDNA and nDNA markers with inferences in systematics and genetics of speciation // Mitochondrial DNA, Part A. 2018. V. 29. № 7. P. 975–992.
- Zolotova A.O., Nikitin V.D., Dzen G.N. Identification of hybrids between the Far Eastern redfins *Tribolodon hakonensis* and *T. brandtii* based on the cephalic lateral-line system and four molecular genetic markers // J. Ichthyol. 2019. V. 59. № 3. P. 317–326.

Identification of Three Far Eastern Redfin Species of the Genus *Pseudaspius* (Osteichthyes: Cyprinidae) Based on Multidimensional Analysis of Measurable Characters

A. O. Zolotova and Yu. Ph. Kartavtsev

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

Significant differences between three Far Eastern redfin species, *Pseudaspius (Tribolodon) hakonensis*, *P. brandtii*, and *P. sachalinensis* (Osteichthyes, Cyprinidae), inhabiting Primorsky Krai and Sakhalin Island, and also between samples of the big-scaled redfin *P. hakonensis* from different habitats have been revealed by the analysis of variance and the canonical and discriminant analyses using measurable characters. Relative sizes of the head, snout, eye, upper and lower jaws, and caudal peduncle were the main features by which species and local groups of Far Eastern redfins differed.

Keywords: Far Eastern redfins, *Pseudaspius (Tribolodon)*, morphology, taxonomy, population structure, morphometry, analysis of variance, ANOVA, canonical analysis, discriminant analysis

УДК 575.174.015.3

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНЫХ ЛОКУСОВ У ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА *APOSTICHOPUS JAPONICUS* (SELENKA, 1867) (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA) В ВЫБОРКАХ ИЗ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ

© 2022 г. В. Д. Ягодина¹, *, Н. М. Батищева¹, В. А. Брыков¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: iagodinavd@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2022 г.

После доработки 25.04.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

На 122 особях из пяти выборок (зал. Петра Великого, Японское море) с применением пяти микросателлитных маркеров исследовано генетическое разнообразие дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*. Все локусы полиморфны; среднее значение наблюдаемой гетерозиготности для всех выборок и локусов составило 0.461 ± 0.027 , ожидаемой гетерозиготности — 0.575 ± 0.031 . Значения коэффициента инбридинга в среднем были выше 0, что обусловлено дефицитом гетерозигот. Для некоторых микросателлитных локусов выявлены нуль-аллели. После их обнаружения исправлены ошибки генотипирования и проведена корректировка статистических данных, которая показала, что присутствие нулевых аллелей в 1.5–2 раза снижало значение наблюдаемой гетерозиготности и вело к отклонению от равновесия Харди–Вайнберга.

Ключевые слова: *Apostichopus japonicus*, микросателлиты, нулевые аллели, генетическая изменчивость

DOI: 10.31857/S0134347522050102

Дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) широко распространен в прибрежных водах Восточной Азии, включая Японию, Китай, Северную и Южную Корею, а также Дальний Восток России (Chang et al., 2009). Этот вид имеет значительную коммерческую ценность и является одним из важнейших объектов аквакультуры, поскольку обладает высоким содержанием ценных питательных веществ, витаминов и минералов, а также рядом характерных биологически и фармакологически биоактивных соединений; способность *A. japonicus* к регенерации делает его важным объектом с медицинской точки зрения (Oh et al., 2017).

Для описания генетической изменчивости и структуры популяций дальневосточного трепанга применяются и разрабатываются в основном микросателлитные маркеры (Kanno et al., 2006; Chen et al., 2013) и однонуклеотидные полиморфизмы (Du et al., 2012; Dong et al., 2016). К основным преимуществам микросателлитных маркеров относят высокий уровень изменчивости как следствие высокой скорости накопления мутаций, кодоминантный тип наследования и легкую пробоподготовку. Недостатками микросателлитов считают появление “теневых полос”, или “за-

иканий” (Галинская и др., 2019), когда каждый аллель представляет собой серию фрагментов, кратных длине повторяющейся единицы микросателлита вследствие “проскальзывания” при репликации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также гомоплазию и наличие нулевых аллелей (Abdul-Muneer, 2014).

Нулевой аллель — любой аллель в микросателлитном локусе, который постоянно не амплифицируется с помощью полимеразной цепной реакции (Dakin, Avise, 2004). Исследования показали (Grimaldi, Crouau-Roy, 1997), что во фланкирующих локус областях происходят мутации, препятствующие отжигу праймеров с матричной ДНК во время ПЦР и приводящие к нулевым аллелям. Другие возможные причины возникновения нуль-аллелей — предпочтительная амплификация коротких аллелей из-за непостоянства качества или количества матрицы ДНК (Chapius, Estoup, 2007), а также проскальзывание ДНК-полимеразы во время амплификации (Ellegren, 2004). Наличие нулевых аллелей приводит к появлению ложных гомозигот, которые влияют на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга и ведут, как следствие, к некорректной интерпретации результатов (Carlsson, 2008).



Рис. 1. Карта-схема мест сбора материала.

С использованием микросателлитных маркеров проведены исследования генетической структуры и разнообразия *A. japonicus* из зал. Тояма (Япония) (Soliman et al., 2012). Изучение данной голотурии из разных локальностей побережья Южной Кореи показало применимость выбранных авторами микросателлитных локусов для генетического анализа (Kim et al., 2008). При исследовании популяций дальневосточного трепанга только в работе Канно с коллегами (Kanno et al., 2006) были определены нулевые аллели и проведена работа по корректировке этих ошибок генотипирования.

Большая часть работ в российской литературе посвящена изучению биологии и образа жизни дальневосточного трепанга, а также процессов, связанных со снижением его численности (Селин, 2001; Гаврилова, 2013; Лысенко и др., 2018). Исследования по определению популяционной структуры и уровней генетического разнообразия *A. japonicus* на Дальнем Востоке России не проводились.

Цель настоящей работы – оценка генетической изменчивости у трепанга *A. japonicus* с помощью микросателлитных локусов в выборках из зал. Петра Великого Японского моря, а также изучение распределения выявленных нуль-аллелей и оценка их влияния на интерпретацию популяционных данных с использованием разных популяционно-генетических подходов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследовано пять выборок трепанга *Apostichopus japonicus*, собранных водолазным способом в зал. Петра Великого Японского моря в 2015 и 2018 гг.: зал. Восток (Vos, $n = 28$, июль 2015 г.), мыс Красный, Амурский залив (Krs, $n = 20$, июнь 2015 г.), зал. Посьета (Pos15, $n = 34$, июль 2015 г.), б. Федорова, Амурский залив (Fed, $n = 26$, июнь 2015 г.) и зал. Посьета (Pos18, $n = 22$, июль 2018 г.). Две выборки из зал. Посьета (3 и 5) были взяты с интервалом в три года в одной и той же локальности (рис. 1).

Геномную ДНК из фиксированной в 96% этаноле ткани выделяли методом щелочного лизиса (Truett, 2006). Выборки трепанга были проанализированы по пяти микросателлитным локусам. В полимеразной цепной реакции использовали праймеры, представленные в табл. 1. К 5'-концу каждого прямого праймера был пришит хвост M13 (в табл. 1 указан мелким шрифтом), который был помечен одним из четырех флуоресцентных красителей: ROX, 6FAM, R6G или TAMRA.

ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей дистиллированную воду, 10X буфер (Евроген), dNTP (содержание каждого дезоксирибонуклеотида 5 мМ), прямой праймер (5 мМ), обратный праймер (5 мМ), флуоресцентный краситель (5 мМ), Taq ДНК-полимеразу (5000 ед., Евроген) – 0.1 мкл и ДНК – 40–60 нг. Конечный объем реак-

Таблица 1. Используемые для анализа выборки трепанга *Apostichopus japonicus* локусы, праймеры и исследуемый повтор

№	Локус	Последовательности праймеров (5'-3')	Повтор	Размер без праймера (пн)
1	AJ10675	F: TGGAAACAGCTATGACCATGAGATGTCAGCCACATGCAAC R: GGTAAGCTTGTGGGAATGGA	(TAG) ₅	185–190
2	AJ13361	F: TGGAAACAGCTATGACCATGTGGAAGACGAAGATGAGCAA R: GGAATGACCCTACGTCCAAA	(CAG) ₅	165–205
3	AJ20333	F: TGGAAACAGCTATGACCATGCGTCGACCAAAGAGAGCAAT R: TCCCTGGACTGGCACTAATC	(AGT) ₇	181–198
4	AJ20385	F: TGGAAACAGCTATGACCATGAGCAAACCACCGAGTACACC R: CTCCACCACTCTCCGATTCT	(CAA) ₅	187–205
5	AJ21199	F: TGGAAACAGCTATGACCATGTACGCCTTTTGTCCGTTTTCT R: TGCAAGGCACAATTCTAAAAGA	(CTA) ₆	162–216

Примечание. Мелким шрифтом указан пришитый к 5'-концу каждого прямого праймера хвост M13, который был помечен одним из четырех флуоресцентных красителей ROX, 6FAM, R6G или TAMRA.

ции составлял 13 мкл. Условия для ПЦР были следующими: начальная денатурация при 94° в течение 3 мин; далее для 30 циклов денатурация при 94° – 45 с, отжиг (60°) – 30 с, элонгация (72°) – 2 мин; завершающая элонгация (72°) – 5 мин.

Продукт ПЦР проверяли с помощью гелеэлектрофореза в 1.5% агарозном геле; 1 мкл ПЦР-смеси добавляли в смесь для генотипирования, содержащую формамид и размерный стандарт (S450) (COGrDIS), затем подвергали электрофорезу на секвенаторе ABI3130 (Applied Biosystems). Длину фрагментов в полученных продуктах ПЦР визуализировали с помощью программы GeneMapper ver. 5.0 (Applied Biosystems).

Для генетической характеристики локусов определяли частоту аллелей в каждом локусе с использованием пакета GenAlEx версии 6.5.1 (Peakall, Smouse, 2012). При помощи программы “Arlequin” версии 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010) рассчитывали наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность, коэффициент инбридинга (F_{IS}), а также проводили тест на соответствие ожиданиям Харди–Вайнберга (P) с использованием метода цепей Маркова. Коэффициент инбридинга с корректировкой данных по нулевым аллелям рассчитывали при помощи ПМ-модели (байесовский подход) с 50000 итерациями, значением burn-in в 10000 итераций в программе INEST 2.2 (Chybicki, Burczyk, 2009).

Частоты нулевых аллелей оценивали в следующих программах: FreeNA (Chapius, Estoup, 2007) в соответствии с алгоритмом максимизации ожиданий (EM-алгоритм – Expectation-maximization algorithm) Демпстера, Лэрда и Рубина (Dempster et al., 1977); INEST 2.2 – при помощи ПМ подхода (байесовский подход) с количеством циклов в 50000 и значением burn-in в 10000; модель выбора включала нуль-аллели, инбридинг и ошибки генотипирования; MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) – исходя из пропорций Харди–Вайнберга, частоты нулевых аллелей оценены и скорректированы в соответствии с методами, разработанными Ван Остерхоутом (Van Oosterhout et al., 2004).

Если частота нулевого аллеля меньше или равна 0.1, некоторые оценки можно использовать напрямую без корректировки; если она больше или равна 0.5, эффективность оценки слишком мала и такой локус следует исключить (Huang et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическая изменчивость трепанга

В исследованных выборках все локусы оказались полиморфными, частоты аллелей характеризовались значительной изменчивостью. Размер аллелей варьировал от 172 до 219 п. н. Всего обнаружено 36 аллелей по всем локусам, среднее число аллелей на локус составило 7.2.

Для пяти выборок трепанга по каждому локусу были рассчитаны основные статистические показатели, необходимые для интерпретации полученных результатов. Наибольшие различия в значениях H_o и H_e отмечены в двух локусах трех выборок: в группе особей из зал. Восток в локусе AJ20333; в выборках из зал. Посыета, отобранных в 2015 и 2018 гг., показатели также различались по локусу AJ13361. Средние для всех выборок и локусов значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составили 0.439 ± 0.032 и 0.563 ± 0.030 соответственно (табл. 2).

Средние значения генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам представлены в табл. 3. Для всех выборок наблюдаемая гетерозиготность была меньше ожидаемой, значение F_{IS} для популяций Vos, Pos15 и Pos18 было больше 0.2.

Влияние нулевых аллелей на генетическое разнообразие трепанга

Частота нулевых аллелей по отдельным локусам в индивидуальных выборках, рассчитанная в программе MICRO-CHECKER, варьировала от -0.2957 до 0.7928 . Частота нуль-аллелей в программе FreeNA изменялась от 0 до 0.3207; результаты программы INEST 2.2 по определению частоты нулевых аллелей варьировали от 0.0250 до 0.4580.

В программе MICRO-CHECKER обнаружены нулевые аллели в пяти локусах для всех выборок трепанга, которые нуждались в корректировке генотипов (см. приложение). После корректировки генотипов по методу Ван Остерхоута получены значения H_o , H_e и F_{IS} для локусов с нуль-аллелями (табл. 4).

Сравнение данных без коррекции и с коррекцией генотипов показывает сильное изменение коэффициента инбридинга. Так, для особей из зал. Восток F_{IS} по локусу AJ20333 без учета нулевых аллелей он составил 0.612, а с их учетом – 0.379; для особей из зал. Посыета, собранных в 2018 г., F_{IS} был равен соответственно 0.758 и 0.515.

Средние значения генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам с учетом нуль-аллелей представлены в табл. 5. Значения коэффициента инбридинга, полученные в программе INEST 2.2, скорректированы исходя из частоты нулевых аллелей.

Средние значения H_o и H_e до и после корректировки значительно различались, наблюдаемая гетерозиготность была меньше ожидаемой. Коэффициент инбридинга, полученный после корректировки генотипов в программе MICRO-CHECKER и с учетом нуль-аллелей в программе INEST 2.2, различался для некоторых выборок более чем на 0.1.

Таблица 2. Характеристика генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus*

Выборка	Локус	Ho	He	F _{IS}	P
Vos	AJ20333	0.250	0.627	0.612	0.006**
	AJ20385	0.500	0.642	0.232	0.849
	AJ10675	0.571	0.595	0.040	0.000***
	AJ13361	0.333	0.503	0.343	0.011*
	AJ21199	0.571	0.780	0.275	0.037*
Krs	AJ20333	0.538	0.440	-0.235	0.623
	AJ20385	0.538	0.714	0.253	0.647
	AJ10675	0.438	0.353	-0.250	0.263
	AJ13361	0.455	0.593	0.242	0.072
	AJ21199	0.500	0.700	0.300	0.009**
Pos15	AJ20333	0.607	0.571	-0.064	0.907
	AJ20385	0.375	0.492	0.242	0.030*
	AJ10675	0.355	0.337	-0.054	0.694
	AJ13361	0.065	0.567	0.888	0.000***
	AJ21199	0.536	0.682	0.218	0.067
Fed	AJ20333	0.467	0.671	0.312	0.123
	AJ20385	0.750	0.633	-0.200	0.436
	AJ10675	0.522	0.464	-0.128	0.472
	AJ13361	0.417	0.543	0.237	0.002**
	AJ21199	0.600	0.747	0.206	0.044*
Pos18	AJ20333	0.526	0.595	0.118	0.000***
	AJ20385	0.300	0.514	0.423	0.001**
	AJ10675	0.133	0.129	-0.037	0.782
	AJ13361	0.182	0.723	0.758	0.003**
	AJ21199	0.444	0.464	0.045	0.601
Среднее для всех выборок и локусов		0.439 ± 0.032	0.563 ± 0.030	0.175 ± 0.228	

Примечание. Здесь и в таблицах 3–5: Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга, P – значение отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

Таблица 3. Средние значения генетической изменчивости по всем локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus*

Выборка	N	Ho	He	F _{IS}
Vos	15.2	0.445	0.629	0.301
Krs	12.2	0.494	0.560	0.107
Pos15	28.4	0.387	0.530	0.246
Fed	16.0	0.551	0.612	0.085
Pos18	14.8	0.317	0.485	0.261

Примечание. N – число особей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая изменчивость дальневосточного трепанга

При использовании микросателлитных локусов для исследования популяционно-генетической структуры видов возникает вопрос о необходимом и достаточном числе локусов. Некоторые исследователи считают, что, чем их больше, тем лучше. Однако показано, что для изучения размера популяции дикого кабана (Kolodziej et al., 2012) число маркёров можно сократить до четырех без изменения результата; в работе по определению минимального количества микросателлитных локусов, необходимых для оценки генетической структуры популяции (Arthofer et al., 2018), генети-

Таблица 4. Характеристика генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus* с учетом нулевых аллелей

Выборка	Локус	Ho	He	F _{IS}	P
Vos	AJ20333	0.250	0.627	0.612	0.006**
	AJ20333	0.429	0.670	0.379	0.040*
Pos15	AJ13361	0.065	0.567	0.888	0.000***
	AJ13361	0.154	0.674	0.779	0.000***
Pos18	AJ20385	0.300	0.514	0.423	0.001**
	AJ20385	0.375	0.599	0.381	0.009**
	AJ13361	0.182	0.723	0.758	0.003**
	AJ13361	0.400	0.778	0.515	0.339
Среднее для всех выборок и локусов		0.461 ± 0.027	0.575 ± 0.031	0.200 ± 0.270	

Примечание. Серым цветом отмечены данные, скорректированные по нуль-аллелям в программе MICRO-CHECKER.

Таблица 5. Средние значения генетической изменчивости по всем локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus* с учетом нуль-аллелей

Выборка	N	Ho	He	F _{IS}	F _{IS} ИМ
Vos	15.2	0.481	0.638	0.254	0.1132 (0–0.2919)
Krs	12.2	0.494	0.560	0.107	0.0794 (0–0.2162)
Pos15	28.4	0.405	0.551	0.224	0.0860 (0–0.2097)
Fed	16	0.551	0.612	0.085	0.1056 (0–0.2359)
Pos18	14.8	0.376	0.513	0.204	0.1001 (0–0.2833)

Примечание. F_{IS}ИМ – коэффициент инбридинга, скорректированный по нулевым аллелям в программе INEST 2.2; в скобках – 95% доверительный интервал.

ческая дифференциация групп особей определяется даже при использовании всего двух локусов. Наше исследование является предварительной оценкой генетического разнообразия дальневосточного трепанга в зал. Петра Великого (Японское море) с изучением влияния нулевых аллелей на полученные данные, поэтому использование пяти локусов можно считать достаточным.

Согласно полученным результатам, среднее значение Ho для всех выборок *Apostichopus japonicus* из зал. Петра Великого и локусов составило 0.439 ± 0.032 , He = 0.563 ± 0.030 . В других работах наблюдаемая гетерозиготность была также меньше ожидаемой: Ho = 0.378, He = 0.850 (Chang et al., 2009) и Ho = 0.537, He = 0.634 (Kanno et al., 2006), при этом особи были взяты из разных районов Японского моря и побережья Тихого океана. В работе Кима с коллегами (Kim et al., 2008) указано, что Ho = 0.576, He = 0.761; авторы связывают это с недостатком гетерозигот. В целом можно говорить о дефиците гетерозигот для изучаемых групп особей *A. japonicus*.

Во всех исследованных нами выборках значения F_{IS} были выше нуля, что согласуется со значениями Ho и He. В работах других авторов этот коэффициент также имел положительные значения:

для нескольких особей из зал. Петра Великого, собранных у г. Владивостока, F_{IS} = 0.523 (Chang et al., 2009); для популяций трепанга из б. Тояма F_{IS} = 0.347 (Soliman et al., 2012), а для трепанга из побережья Южной Кореи F_{IS} = 0.260 (Kim et al., 2008).

В нашем случае отклонение от равновесия Харди–Вайнберга выявлено в каждой выборке *A. japonicus*: для Krs минимально – в локусе AJ21199, а для Vos – во всех локусах, кроме AJ20385. В работе Кима с коллегами (Kim et al., 2008) по исследованию популяционной структуры дальневосточного трепанга у берегов Южной Кореи 8 из 9 локусов демонстрировали отклонение от равновесия Харди–Вайнберга. При изучении *A. japonicus*, отловленного в водах Японии, Южной Кореи, Китая и Дальнего Востока России, Чанг с соавторами (Chang et al., 2009) отметили, что для выбранных локусов в 85% случаев наблюдалось отклонение от равновесия. В работе южнокорейских ученых (An et al., 2013) для дикой популяции трепанга показана такая же ситуация с отклонением от равновесия Харди–Вайнберга по выбранным маркерам.

Возможными причинами различия в значениях наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности

по отклоняемым от равновесия Харди–Вайнберга локусам называют эффект Валунда, наличие нулевых аллелей и выпуск в акватории искусственно выращенного трепанга (Chang et al., 2009). Дефицит гетерозигот для дикой популяции трепанга Ан с соавторами (An et al., 2013) объясняют наличием нераспознанных нулевых аллелей, естественным отбором, действующим на генетические маркеры, близкородственным скрещиванием и возможным эффектом Валунда, а также сочетанием этих причин. Авторы другой работы (см.: Chen et al., 2008) значительные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга для дикой популяции трепанга связывают с большим количеством нулевых аллелей, что частично объясняет недостаток гетерозигот.

Дефицит гетерозигот в нашем случае может быть обусловлен антропогенными факторами, когда при искусственном разведении для воспроизводства используется ограниченное количество особей. Однако хозяйств марикультуры в Приморье немного и их влияние на генетические параметры естественных популяций крайне незначительно.

Более существенной причиной может быть незаконный (браконьерский) лов трепанга, который в последние десятилетия сказывается на естественных популяциях. В акватории Приморья ведется наблюдение за изменением численности этой голотурии. В частности, в 2014 и 2018 гг. состояние его популяции оценено в Дальневосточном морском заповеднике (Лысенко и др., 2015, 2018). Было показано, что численность *A. japonicus* после запрещения браконьерского промысла стабилизировалась и дальневосточный трепанг не находится под угрозой исчезновения. Однако в настоящее время средняя плотность поселений этой голотурии приблизительно в 20 раз ниже, чем до начала незаконного вылова (Лысенко и др., 2018). При снижении численности особей в акваториях снижается и эффективный размер популяции, затрудняется поиск партнеров для размножения, а это приводит к повышению уровня инбридинга.

Другой причиной отклонения от равновесия Харди–Вайнберга может быть присутствие нулевых аллелей, влияние которых обсуждается ниже.

Влияние нуль-аллелей на генетические данные

Все использованные программы рассчитывают частоты нулевых аллелей и корректируют один или несколько статистических показателей. Рассчитанные частоты нуль-аллелей во всех программах были приблизительно одинаковы.

В программе FreeNA оценка частоты нулевых аллелей для каждого локуса и популяции проводится в соответствии с EM-алгоритмом (Dempster

et al., 1977). С помощью этой программы можно не только оценивать частоту нуль-аллелей, но и корректировать долю изменчивости в субпопуляции по отношению к общей генетической изменчивости, так как показано, что присутствие нулевых аллелей влияет на генетическую дистанцию между популяциями (Chapius, Estoup, 2007).

Основное назначение INEST 2.2 – оценка коэффициента инбридинга, исходя из оценок наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности с поправкой на нулевые аллели. Программа предлагает два подхода (Chybicki, Burczyk, 2009): PIM (модель популяционного инбридинга, или максимальная вероятность) и IIM (модель индивидуального инбридинга, или байесовский подход). Подсчет коэффициента инбридинга возможен только для всех локусов в рамках одной выборки, вычисление F_{IS} для отдельного локуса не проводится.

MICRO-CHECKER рассчитывает частоту нулевых аллелей по методам, описанным Чакаборти с соавторами (Chakraborty et al., 1992) и Брукфилдом (Brookfield, 1996) с использованием двух уравнений, а также Ван Остерхоутом с соавторами (Van Oosterhout et al., 2004). Особенностью программы является корректировка генотипов после обнаружения нулевых аллелей. При этом пользователь самостоятельно может выбрать метод оценки нуль-аллелей, с помощью которого будет произведено исправление генотипов. На основе наших данных в MICRO-CHECKER нулевые аллели определены в случаях, когда величины наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности значительно различались (для локусов AJ20333 выборки Vos, AJ13361 выборки Vos, Pos15 и Pos18, AJ20385 группы особей выборки Pos18).

При исследовании популяций дальневосточного трепанга Канно с коллегами (Kanno et al., 2006) также столкнулись с наличием нулевых аллелей в разных микросателлитных локусах. Они скорректировали частоты аллелей во избежание статистических ошибок, однако до и после коррекции большинство результатов не различалось из-за большого количества локусов, использованных в этом исследовании.

В нашей работе нулевые аллели выявлены не во всех локусах и не во всех исследованных выборках трепанга. Из пяти микросателлитных локусов три локуса (AJ13361, AJ2033, AJ20385) показали наличие нулевых аллелей в разных группах. В целом присутствие нулевых аллелей в 1.5–2 раза снижало значение наблюдаемой гетерозиготности и вело к отклонению от равновесия Харди–Вайнберга. Для локуса AJ13361 в популяции Pos18 после корректировки генотипов отклонение от равновесия не отмечено. Следовательно,

не во всех случаях равновесие Харди–Вайнберга нарушено из-за дефицита гетерозигот, на него влияют также ошибки генотипирования.

При сравнении коэффициентов инбридинга для средних значений генетической изменчивости с корректировкой по нуль-аллелям и без нее данные с исправленными генотипами демонстрировали меньшие величины, более близкие к 0. Рассчитанный в двух разных программах (MICRO-CHECKER и INEST 2.2) F_{IS} с учетом нуль-аллелей по всем локусам для некоторых выборок различался более чем на 0.2. Различие значений связано с тем, что INEST 2.2 корректирует коэффициент инбридинга даже при минимальных частотах нуль-аллелей, в то время как MICRO-CHECKER корректирует генотипы только для тех локусов, для которых частота нулевых аллелей превышает допустимый уровень с учетом методов подсчета.

Проверка наличия и эффекта нуль-аллелей на разные генетические параметры с использованием определенных аналитических инструментов проведена в некоторых исследованиях (Kalinowski, Taper, 2006; Chapuis, Estoup, 2007; Girard, 2011; De Meeûs, 2018), однако лишь в немногих из них эмпирически проверено это влияние (Girard, Angers, 2008; Dąbrowski et al., 2015; Rico et al., 2017). Опубликованы работы, оценивающие воздействие нулевых аллелей путем изменения дизайна праймеров и сравнения исходных результатов с результатами “новых” праймеров, свободных от нулевых аллелей (Lemer et al., 2011).

Таким образом, в настоящее время проблема нулевых аллелей решается разными способами: меняется дизайн праймеров, корректируются частоты аллелей и генотипов на основе предполагаемых частот нулевых аллелей; иногда определенные локусы исключают из популяционного анализа. Последний метод коррекции не всегда применим при масштабных исследованиях, так как при увеличении выборок возрастает вероятность появления нулевых аллелей на каждый локус, что может привести к исключению большого числа локусов из популяционного анализа и отрицательно сказаться на качестве исследования.

Частота нулевых аллелей для пяти локусов выборок трепанга *Apostichopus japonicus* по данным статистических программ

Локус	Программа						Наличие нуль-аллелей
	FreeNA	INEST 2.2	MICRO-CHECKER				
			Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2	
Vos							
AJ20333	0.2306	0.3262	0.2599	0.4122	0.2191	0.7301	Да
AJ20385	0.0412	0.1536	0.0920	0.0922	0.0634	0.8126	Нет
AJ10675	0.0061	0.0586	0.0179	0.0079	0.0057	0.2120	Нет
AJ13361	0.1073	0.1254	0.1617	0.1912	0.1057	0.2891	Да

На основе полученных результатов для дальнейшей работы с применением данного типа маркеров мы планируем использовать MICRO-CHECKER с возможностью выбора метода оценки нуль-аллелей и их корректировки. Данный подход поможет избежать исключения локусов с наиболее часто встречаемой ошибкой генотипирования, что особенно актуально для видов, не являющихся промысловыми объектами. Для подсчета коэффициента инбридинга для всех локусов в рамках одной выборки мы рекомендуем программу INEST 2.2; при использовании программы FreeNA можно не только оценивать частоту, но и скорректировать генетическую дистанцию между популяциями с учетом нуль-аллелей.

Применение статистических подходов при изучении популяционной генетики *A. japonicus*, в частности генетического разнообразия и генетической дифференциации данной голотурии, мы считаем необходимым шагом на пути к оценке состояния диких популяций дальневосточного трепанга, который является важным промысловым объектом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Е.И. Бондарь (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН), И.Я. Чибицкому (Университет им. Казимира Великого, Польша) и М.Я. Домбровски (Музей и Институт зоологии Польской академии наук) за помощь в работе.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Локус	Программа						Наличие нуль-аллелей
	FreeNA	INest 2.2	MICRO-CHECKER				
			Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2	
AJ21199	0.1214	0.1169	0.1124	0.1368	0.1033	0.5931	Нет
Krs							
AJ20333	0.0000	0.0266	-0.2957	-0.1200	-0.0811	0.5001	Нет
AJ20385	0.0556	0.0436	0.1190	0.1208	0.0877	0.5512	Нет
AJ10675	0.0000	0.0300	-0.2500	-0.1228	-0.0713	0.3589	Нет
AJ13361	0.1108	0.0734	0.0719	0.1093	0.0712	0.6468	Нет
AJ21199	0.0921	0.0888	0.1100	0.1351	0.0943	0.7788	Нет
Pos15							
AJ20333	0.0000	0.0307	-0.0553	-0.0393	-0.0294	0.2816	Нет
AJ20385	0.0501	0.0749	0.1303	0.1246	0.0721	0.4899	Нет
AJ10675	0.0000	0.0578	-0.0375	-0.0341	-0.0176	0.1912	Нет
AJ13361	0.3207	0.3220	0.3814	0.7928	0.3169	0.4073	Да
AJ21199	0.0885	0.0985	0.0979	0.1116	0.0806	0.3359	Нет
Fed							
AJ20333	0.0948	0.0603	0.1502	0.1633	0.1105	0.5911	Нет
AJ20385	0.0000	0.0395	-0.168	-0.1163	-0.098	0.7771	Нет
AJ10675	0.0000	0.0250	-0.0796	-0.0698	-0.0468	0.1238	Нет
AJ13361	0.0959	0.0375	0.0965	0.1217	0.0754	0.0754	Нет
AJ21199	0.1008	0.0579	0.0538	0.0840	0.0643	0.7526	Нет
Pos18							
AJ20333	0.0240	0.1051	0.0348	0.0476	0.0333	0.2983	Нет
AJ20385	0.1540	0.1945	0.1812	0.2512	0.1341	0.3132	Да
AJ10675	0.0000	0.2760	-0.0691	-0.0345	-0.0079	0.5443	Нет
AJ13361	0.3069	0.4580	0.3361	0.5829	0.3007	0.7748	Да
AJ21199	0.0000	0.1946	0.0317	-0.007	-0.0043	0.7474	Нет

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гаврилова Г.С. Товарное выращивание дальневосточного трепанга // Владивосток: ТИПРО-Центр. 2013. 99 с.

Галинская Т.В., Щенетов Д.М., Лысенков С.Н. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 617–632. <https://doi.org/10.1134/S0016675819060043>

Лысенко В.Н., Жариков В.В., Лебедев А.М. Численность и распределение дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Stichopodidae) в прибрежной зоне южного участка Дальневосточного морского заповедника ДВО РАН // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 2. С. 146–149.

Лысенко В.Н., Жариков В.В., Лебедев А.М., Долганов С.М. Современное состояние популяции дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* в Дальневосточном морском заповеднике // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 2. С. 133–139.

Селин Н.И. Вертикальное распределение дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* в заливе Восток Японского моря // Биол. моря. 2001. Т. 27. № 4. С. 297–299.

Abdul-Muneer P.M. Application of microsatellite markers in conservation and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies // Genet. Res. Int. 2014. V. 2014. Art. ID 691759.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997932>. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>

An H.S., Lee J.W., Hong S.W. et al. Genetic differences between wild and hatchery populations of red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) inferred from microsatellite markers: implications for production and stocking programs design // Genes Genomics. 2013. V. 35. P. 709–717. <https://doi.org/10.1007/s13258-013-0139-8>

Arthofer W., Heussler C., Krapf P. et al. Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: a case study in fly culturing // Fly. 2018. V. 12. № 1. P. 13–22. <https://doi.org/10.1080/19336934.2017.1396400>

Brookfield J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // Mol. Ecol. 1996. V. 5. P. 453–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00336.x>

Carlsson J. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing // J. Hered. 2008. V. 99. № 6. P. 616–623. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn048>

Chakraborty R., de Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications // Ann. Hum. Genet. 1992. V. 56. P. 45–57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1992.tb01128.x>

Chang Y., Feng Z., Yu J., Ding J. Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber *Stichopus (Apostichopus) japonicus* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers // Mar. Ecol.

2009. V. 30. P. 455–461.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00292.x>
- Chapuis M.-P., Estoup A.* Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 621–631.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- Chen L., Li Q., Yang J.* Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China // *Aquacult. Res.* 2008. V. 39. P. 1541–1549.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02027.x>
- Chen M., Gao L., Zhang W. et al.* Identification of forty-five gene-derived polymorphic microsatellite loci for the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [Электронный ресурс] // *J. Genet.* 2013. V. 92. Art. e31–35.
<http://www.ias.as.in/jgenet/OnlineResources/92/e31.pdf>.
<https://doi.org/10.1007/s12041-013-0234-2>
- Chybicki I., Burezyk J.* Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients // *J. Hered.* 2009. V. 100. № 1. P. 106–113.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esn088>
- Dąbrowski M.J., Bornelöv S., Kruczyk M. et al.* 'True' null allele detection in microsatellite loci: a comparison of methods, assessment of difficulties and survey of possible improvements // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. V. 15. № 3. P. 477–488.
- Dakin E.E., Avise J.C.* Microsatellite null alleles in parentage analysis // *Heredity.* 2004. V. 93. № 5. P. 504–509.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>
- De Meeûs T.* Revisiting Fis, Fst, Wahlund effects, and null alleles // *J. Hered.* 2018. V. 109. № 4. P. 446–456.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esx106>
- Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B.* Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm // *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1977. V. 39. № 1. P. 1–38.
<https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x>
- Dong Y., Li Q., Zhong X., Kong L.* Development of gene-derived SNP markers and their application for the assessment of genetic diversity in wild and cultured populations in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *J. World Aquacult. Soc.* 2016. V. 47. № 6. P. 873–888.
<https://doi.org/10.1007/s12686-013-9858-z>
- Du H., Bao Z., Yan J. et al.* Development of 101 gene-based single nucleotide polymorphism markers in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 7080–7097.
<https://doi.org/10.3390/ijms13067080>
- Ellegren H.* Microsatellites: simple sequences with complex evolution // *Nat. Rev. Genet.* 2004. V. 5. P. 435–445.
<https://doi.org/10.1038/nrg1348>
- Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Girard P.* A robust statistical method to detect null alleles in microsatellite and SNP datasets in both panmictic and inbred populations // *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2011. V. 10. Art. 9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21381434/>.
<https://doi.org/10.2202/1544-6115.1620>
- Girard P., Angers B.* Assessment of power and accuracy of methods for detection and frequency-estimation of null alleles // *Genetica.* 2008. V. 134. № 2. P. 187–197.
<https://doi.org/10.1007/s10709-007-9224-8>
- Grimaldi M.-C., Crouau-Roy B.* Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences // *J. Mol. Evol.* 1997. V. 44. P. 336–340.
<https://doi.org/10.1007/PL00006151>
- Huang K., Ritland K., Dunn D.W. et al.* Estimating relatedness in the presence of null alleles // *Genetics.* 2016. V. 202. P. 247–260.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.163956>
- Kalinowski S.T., Taper M.L.* Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci // *Conserv. Genet.* 2006. V. 7. P. 991–995.
<https://doi.org/10.1007/s10592-006-9134-9>
- Kanno M., Suyama J., Li Q., Kijima A.* Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, supports reproductive isolation in color variants // *Mar. Biotechnol.* 2006. V. 8. P. 672–685.
<https://doi.org/10.1007/s10126-006-6014-8>
- Kim M., Choi T., An H.S.* Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers // *Aquacult. Res.* 2008. V. 39. P. 1038–1045.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01962.x>
- Kolodziej K., Theissing K., Brün J. et al.* Determination of the minimum number of microsatellite markers for individual genotyping in wild boar (*Sus scrofa*) using a test with close relatives // *Eur. J. Wildl. Research.* 2012. V. 58. P. 621–628.
<https://doi.org/10.1007/s10344-011-0588-9>
- Lemer S., Rochel E., Planes S.* Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* // *J. Hered.* 2011. V. 102. № 2. P. 243–246.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esq123>
- Oh G.-W., Ko S.-C., Lee D.H. et al.* Biological activities and biomedical potential of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): a review // *Fish. Aquat. Sci.* 2017. V. 20. Art. 28.
<https://doi.org/10.1186/s41240-017-0071-y>
- Peakall R., Smouse P.E.* GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Rico C., Cuesta J.A., Drake P. et al.* Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the Wedge Clam (*Donax trunculus*) // *PeerJ.* 2017. V. 5. Art. ID e3188.
<https://peerj.com/articles/3188/>.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3188>
- Selenka E.* Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien // *Z. Wiss. Zool.* 1867. V. 17. P. 291–374.
- Soliman T., Kanno M., Kijima A., Yamazaki Y.* Population genetic structure and gene flow in the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* across Toyama Bay, Japan // *Fish. Sci.* 2012. V. 78. P. 775–783.
<https://doi.org/10.1007/s12562-012-0509-1>
- Truett G.E.* Preparation of genomic DNA from animal tissues // *DNA sequencing II: Optimizing preparation and cleanup.* Boston: Jones and Bartlett Publishers. 2006. Ch. 3. P. 33–46.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.* MICRO-CHECKER: software for identifying and cor-

recting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. P. 535–538.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

Variation at Nuclear Loci in the Japanese Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Holothuroidea) in Samples from Peter the Great Bay, Sea of Japan

V. D. Yagodina^a, N. M. Batishcheva^a, and V. A. Brykov^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The genetic diversity of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* was assessed using five microsatellite markers. A total of 122 specimens of sea cucumber from five samples collected in Peter the Great Bay (Sea of Japan) were examined. All loci were polymorphic. For all samples and loci, the average value of the observed heterozygosity was 0.461 ± 0.027 , the expected heterozygosity was 0.575 ± 0.031 . The values of the inbreeding coefficient were, on average, greater than zero due to the deficiency of heterozygotes. Null alleles were identified for some microsatellite loci. After their detection, genotyping errors and statistical data were corrected. The presence of null alleles caused a 1.5–2-fold decrease in the value of observed heterozygosity and led to deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium.

Keywords: *Apostichopus japonicus*, microsatellites, null alleles, genetic variability

УДК 591.1.05+592/595

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭНДОФИТА *LAMINARIOCOLAX AECIDIOIDES*
(ROSENVINGE) A.F. PETERS, 1998 (PHAEOPHYCEAE: ECTOCARPALES)
НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *UNDARIA PINNATIFIDA*
(HARVEY) SURINGAR, 1873 (PHAEOPHYCEAE: LAMINARIALES)**

© 2022 г. О. А. Чадова¹, П. В. Веланский¹, *¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: velansky.pv@gmail.com

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 10.02.2022 г.

Принята к публикации 24.03.2022 г.

Исследован состав классов полярных липидов, а также состав жирных кислот фракций нейтральных и полярных липидов в тканях бурой водоросли *Undaria pinnatifida* при инфицировании эндофитом *Laminariocolax aecidioides*. Впервые в бурых водорослях обнаружен липид глюкуронозилдиацилглицерин, а в водорослях порядка Laminariales также впервые найдены церамидфосфоинозит, диацилглицерилтриметилгомосерин и диацилглицерилгидроксиметилтриметилаланин в значимых количествах. Установлено, что наличие эндофита приводит к снижению содержания фосфатидил-инозита и церамидфосфоинозита, к существенному повышению концентрации насыщенных жирных кислот и к снижению содержания ω3 полиненасыщенных кислот в нейтральных липидах.

Ключевые слова: эндофит, липиды, жирные кислоты, бурые водоросли

DOI: 10.31857/S0134347522040039

Однолетняя бурая водоросль *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 произрастает в сублиторальной зоне на глубине от 1 до 15 м. Популяции *U. pinnatifida* обнаружены у берегов Японии, Китая, Кореи, Франции, Новой Зеландии, Тасмании, Аргентины, Англии и южной Австралии, а также на Нормандских островах (Stuart et al., 1999; Pereira, Yarish, 2008). В российских водах *U. pinnatifida* была обнаружена в зал. Петра Великого Японского моря (Skriptsova et al., 2004). Благодаря высокому содержанию биологически активных веществ эта водоросль представляет большой интерес для биомедицины и фармацевтики (Cho et al., 2007; Hayashi et al., 2008; Shibata et al., 2008; Faggio et al., 2015). Высокая концентрация эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот позволяет рассматривать *U. pinnatifida* в качестве потенциально важного источника липидов (Tabakaeva, Tabakaev, 2017).

В естественных условиях спорофиты *U. pinnatifida* часто инфицируются эндофитом – бурой водорослью *Laminariocolax aecidioides* (Rosenvinge) A.F. Peters, 1998 (Ectocarpales: Phaeophyceae) (см.: Gauna et al., 2009; Skriptsova, Kalita, 2020). Немногочисленные исследования показали, что заражение этим эндофитом не влияет на репродуктивный потенциал и развитие *U. pinnatifida*. Однако

из-за образования перфораций в тканях инфицированные макрофиты могут подвергаться вторичному заражению бактериальными или другими инфекциями, что может быть причиной гибели водоросли (Camro et al., 1998). Эпифитизм культивируемых водорослей является серьезной проблемой, приводящей к снижению количества и качества продукции (Titlyanov, Titlyanova, 2010).

Комплексные исследования эндофитов бурых водорослей крайне скудны. Отсутствует информация о биохимическом, в частности липидном, составе, а также о взаимном воздействии эндофита и хозяина. Настоящая работа посвящена изучению влияния эндофита *L. aecidioides* на липидный состав макрофита-хозяина *U. pinnatifida*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы водорослей были собраны в ноябре 2020 г. в б. Соболев (зал. Петра Великого, Японское море) при температуре воды 5°C. Отбирали по три инфицированных и неинфицированных экземпляра *Undaria pinnatifida*; у каждого брали образцы ткани (масса 0.2–0.5 г) нижней части пластины, а также интактных участков верхней части пластины и хорошо различимых пораженных пигментированных участков у инфициро-

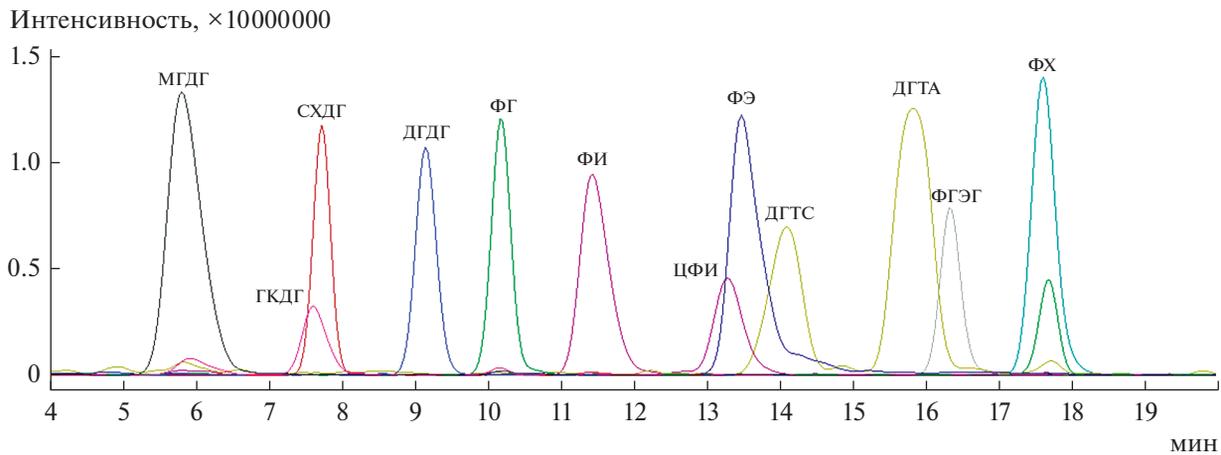


Рис. 1. Разделение классов полярных липидов методом ВЭЖХ-МС/МС в липидном экстракте верхней части пластины инфицированной особи *Undaria pinnatifida*. Представлено наложение хроматограмм специфических реакций фрагментации для каждого класса. Для выравнивания интенсивности хроматограммы приведены в разном масштабе.

ванных водорослей. Кусочки ткани быстро сушили при помощи фильтровальной бумаги, взвешивали и гомогенизировали в 5 мл смеси хлороформ : метанол (1 : 1 по объему). К гомогенату добавляли 1 мл воды, тщательно перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин. Нижний слой отбирали, упаривали до постоянной массы и перерастворяли в хлороформе.

Липидный экстракт разделяли на фракции полярных и нейтральных липидов на колонке с силикагелем (100–160 мкм) диаметром 1 см и высотой 3 см. На колонку наносили 100 мкл экстракта (концентрация 10 мг/мл); нейтральные липиды элюировали чистым хлороформом, полярные — смесью метанол : вода (40 : 1) (3 раза по 1 мл каждый элюентом). Метилловые эфиры жирных кислот получали гидролизом липидных фракций в метаноле с 2% серной кислотой при температуре 90°C в течение 1 ч. Анализ метилловых эфиров жирных кислот проводили на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 с пламенно-ионизационным детектором на колонке Supelcowax-10 30 м × 0.25 мм (Supelco, USA) в изотермическом режиме при температуре 200°C. Метилловые эфиры ЖК идентифицировали путем расчёта эквивалентной длины цепи (Jamieson, 1975).

Классы полярных липидов анализировали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Ascentis Si 25 см × 2.1 мм (Supelco, USA) в режиме гидрофильной хроматографии (рис. 1). В качестве элюентов использовали следующие составы: А — ацетонитрил + 50 мМ муравьиной кислоты и В — ацетонитрил : вода (1 : 1 по объему) + 100 мМ муравьиной кислоты + 40 мМ аммиака. Элюирование градиентное, по следующей программе: старт (2% В, суммарный поток 0.2 мл/мин), 2.5 мин (24% В), 3 мин (снижение потока с 0.2 до 0.15 мл/мин), 5 мин (26% В),

10 мин (40% В), 15 мин (100% В), 19 мин (повышение потока с 0.15 до 0.3 мл/мин), 21 мин (снижение концентрации с 100 до 2% В), 24 мин (снижение потока с 0.3 до 0.2 мл/мин) и 26 мин (стоп).

Классы полярных липидов детектировали при помощи масс-спектрометра с тройным квадруполом Shimadzu LCMS-8060 с ионизацией распылением в электростатическом поле. Параметры ионизатора: поток газа-испарителя (азот) — 3 л/мин, осушающего газа (азот) — 10 л/мин, вспомогательного газа прогрева (воздух) — 10 л/мин; температура капилляра испарения — 300°C, линии десольватации — 250°C, нагревательного блока — 400°C. Каждый липидный класс детектировали по специфичной для него реакции фрагментации, заключающейся в потере определенного нейтрального фрагмента или образовании дочернего иона (табл. 1). При этом скорость сканирования первого квадруполь составляла 3000 а. е./с, а время полного цикла фрагментации всех классов липидов составляло 2 с. Для идентификации, оптимизации параметров фрагментации и построения калибровочных графиков использовали стандарты соответствующих липидов от Avanti Polar Lipids (USA). Ввиду отсутствия стандартов для глюконозилдиацилглицерина (ГКДГ), диацилглицерил-гидроксиметилтриметилаланина (ДГТА) и фосфатидилгидроксиэтилглицина (ФГЭГ) при расчете содержания липидов этих классов применяли калибровочные данные для сульфохинозилдиацилглицерина (СХДГ), диацилглицерилтриметилгомосерина (ДГТС) и фосфатидилсерина соответственно. Идентифицировали ГКДГ (Okazaki et al., 2013), ДГТА (Li et al., 2017), ФГЭГ и церамидфосфоинозит (ЦФИ) (см.: Vyssotski et al., 2017) на основе опубликованных ранее механизмов фрагментации. Масс-спектры распада и механизм фрагментации ГКДГ — липида, впервые об-

Таблица 1. Параметры фрагментации, использованные при детектировании классов полярных липидов

Липид	Ион-прекурсор	Тип регистрируемой реакции	Масса фрагмента	Энергия фрагментации, eV
МГДГ	$[M + NH_4]^+$	Потеря фрагмента	179.1	18
ГКДГ	$[M + NH_4]^+$	Потеря фрагмента	211.1	22
СХДГ	$[M + NH_4]^+$	Потеря фрагмента	261.1	32
ДГДГ	$[M + NH_4]^+$	Потеря фрагмента	341.1	21
ФГ	$[M + NH_4]^+$	Потеря фрагмента	189.0	25
ФИ, ЦФИ	$[M-H]^-$	Дочерний ион	241.0	44
ФЭ	$[M + H]^+$	Потеря фрагмента	141.0	24
ДГТС, ДГТА	$[M + H]^+$	Дочерний ион	236.1	50
ФГЭГ	$[M + H]^+$	Потеря фрагмента	199.0	26
ФХ	$[M + H]^+$	Дочерний ион	184.0	33

Примечание. Список сокращений названий классов полярных липидов см. в тексте.

наруженного в водорослях-макрофитах, приведены на рис. 2.

Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel, для оценки достоверности изменений использовали критерий Стьюдента. Достоверными считали изменения с уровнем значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав полярных липидов

Проведенный анализ позволил обнаружить в тканях *Undaria pinnatifida* гликолипиды моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ), СХДГ и ГКДГ; фосфолипиды фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтанолламин (ФЭ), фосфатидилинозит (ФИ), церамидфосфоинозит (ЦФИ), фосфатидилглицерин (ФГ) и ФГЭГ, а также бетаиновые липиды ДГТС и ДГТА (табл. 2). Содержание МГДГ (25.7–28.7%) и СХДГ (9.7–11.1%) оставалось на одном уровне во всех исследованных тканях. Содержание ДГДГ в нижней части пластины было заметно ниже, чем в верхней (14.7–16.8% против 20.9–23.3%).

Содержание большинства фосфолипидов *U. pinnatifida* также практически не изменилось и составляло: ФГ – 10.4–14.2%, ФЭ – 9.1–10.9%, ФХ – 7.5–10.3% и ФГЭГ – 2.5–3.5%. Повышенное количество ФГ выявлено в нижних частях пластин инфицированных растений (14.2% против 10.3–11.1% в остальных участках пластин), повышенный уровень ФХ – в нижних частях неинфицированных растений (10.3% против 7.5% в инфицированных).

Содержание фосфолипидов с инозитом в составе полярной группы (ФИ и ЦФИ) в верхней части пластины инфицированных водорослей было ниже, чем у незараженных растений, причем и в ткани, имеющей явные признаки наличия эндофита (Вэ), и в прилегающей ткани (Ви). Так, содержание ФИ снижалось с 3.7 до 2.5–2.6%, а ЦФИ – с 2.1 до 1.0%. В нижней части пластин инфицированных растений содержание ФИ тоже было ниже: 3.5% против 4.2% у неинфицированных.

Содержание бетаиновых липидов ДГТС и ДГТА (1.5–3.2%) и гликолипида ГКДГ (0.5–1.3%) не имело корреляций с наличием эндофита.

Следует отметить, что не было обнаружено значимых количеств лизолипидов, кроме следов лизо-МГДГ в некоторых образцах.

Состав жирных кислот

Главными жирными кислотами *U. pinnatifida* являлись 16:0, 18:0, 18:2n-6, 18:1n-9, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-6 и 20:5n-3, при этом во фракции полярных липидов было существенно выше содержание полиненасыщенных ЖК (табл. 3). У неинфицированных особей отмечен более высокий уровень эйкозапентаеновой кислоты в верхних частях пластин.

В ткани водоросли с явным наличием эндофита (Вэ) наблюдалось значительное изменение в составе жирных кислот как полярных, так и нейтральных липидов, которое выразилось в повышении концентрации насыщенных (16:0 и 18:0) и снижении уровня полиненасыщенных ЖК $\omega 3$ ряда 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3 (рис. 3). При этом такие изменения жирных кислот полярных липидов выявлены лишь в той части пластины, где на-

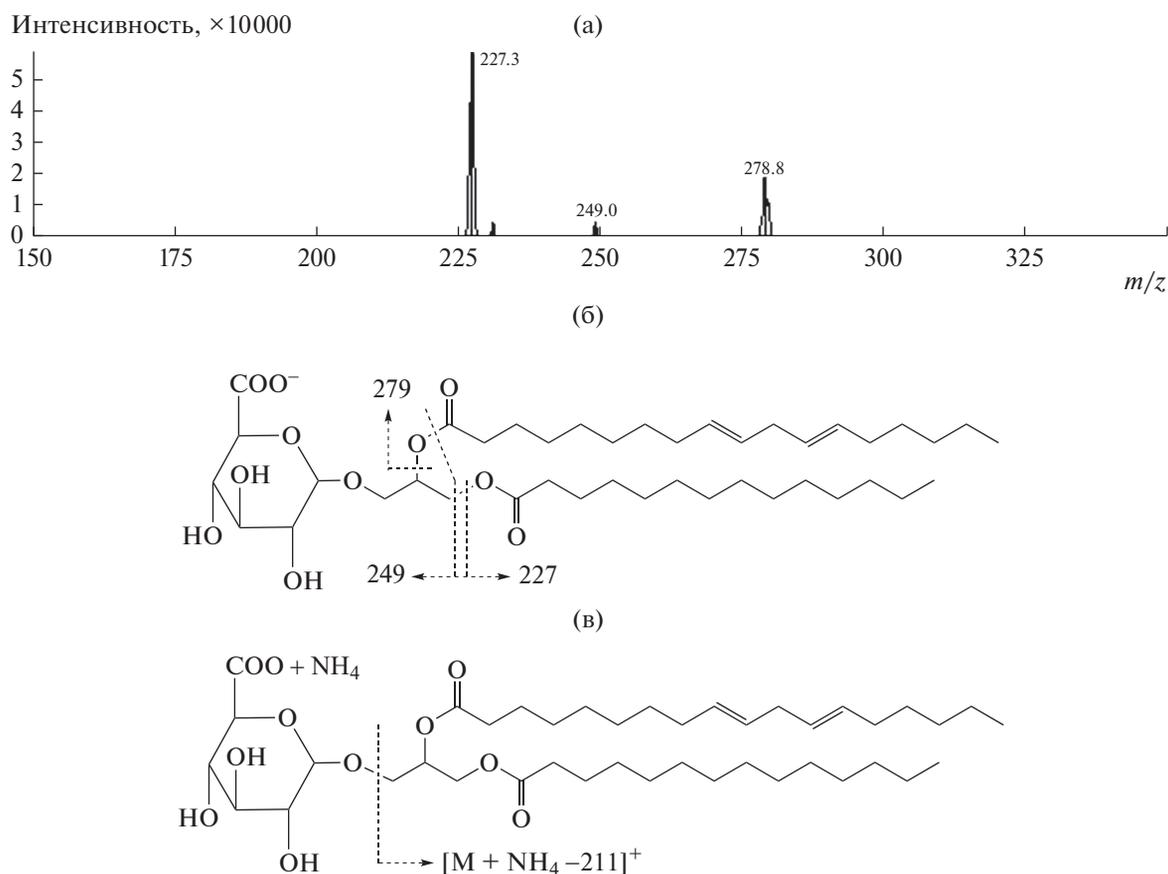


Рис. 2. Масс-спектр фрагментации ГКДГ 14:0/18:2, ион-прекурсор $[M-N]^-$, 739.5 m/z (а), схема фрагментации ГКДГ (б) и специфическая фрагментация, используемая для идентификации класса ГКДГ в режиме регистрации положительных ионов (в).

личие эндофита определялось визуально, а в нейтральных липидах данный эффект проявлялся во всех частях пластины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гликолипиды наряду с ФГ составляют основу мембран хлоропластов и являются главными полярными липидами водорослей, поэтому для интенсивно фотосинтезирующих тканей характерен высокий уровень содержания пластидных полярных липидов. В результате исследования, проведенного ранее на бурой водоросли *Saccharina japonica* из порядка Laminariales, выявлено повышенное содержание ДГДГ и СХДГ в старых частях таллома, что можно объяснить более интенсивным, чем в молодых тканях, фотосинтезом (Khotimchenko, Kulikova, 2000). Пластина *U. pinnatifida* растет за счет расположенной в ее основании интеркалярной меристемы, поэтому верхняя часть пластины представлена более старой тканью с активным фотосинтезом и, соответственно, с более высоким уровнем ДГДГ. Повышенное

содержание эйкозапентаеновой кислоты в верхней части пластины также можно объяснить более интенсивным фотосинтезом и синтезом ЖК *de novo*. В работе на *Laminaria japonica* была выявлена и более общая закономерность — повышение соотношения $\omega 3/\omega 6$ ЖК в верхних частях таллома (Khotimchenko, Kulikova, 2000).

Ранее ГКДГ в водорослях-макрофитах не был обнаружен. Его наличие показано в высших растениях (Okazaki et al., 2013), одноклеточных водорослях (Eichenberger, Gribi, 1994), морских травах (Koelmel et al., 2019), а также в некоторых бактериях и грибах (Hölzl, Dörmann, 2007). Роль данного липида до сих пор не выяснена, однако известно, что его содержание увеличивается при фосфорном голодании (Okazaki et al., 2013).

Только в одном исследовании (Vyssotski et al., 2017) в бурых водорослях был обнаружен ЦФИ, который обычен для красных водорослей, а также грибов и простейших (Smith, Lester, 1974; Kanehiro et al., 1986). Нельзя исключать, что ЦФИ указывает на наличие в исследованных тканях *U. pinnatifida* грибов, а также эндофитных крас-

Таблица 2. Содержание классов полярных липидов в разных частях пластины *Undaria pinnatifida* (в моль % от суммы всех полярных липидов)

Липид	Н	Ни	В	Ви	Вэ
МГДГ	26.3 ± 1.3	28.7 ± 1.2	25.7 ± 1.6	27.7 ± 1.9	27.7 ± 1.7
СХДГ	10.2 ± 1.6	10.8 ± 2.3	11.1 ± 0.2	9.7 ± 1.3	10.0 ± 0.3
ДГДГ	14.7 ± 1.8	16.8 ± 0.3	23.3 ± 1.1	20.9 ± 1.2	22.4 ± 0.3
ГКДГ	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2
ФГ	10.4 ± 1.8	14.2 ± 0.7	10.3 ± 1.7	11.0 ± 0.8	11.1 ± 2.1
ФИ	4.2 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.2	2.5 ± 0.7	2.6 ± 0.5
ЦФИ	2.7 ± 0.2	2.3 ± 0.7	2.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
ФЭ	10.9 ± 0.8	9.1 ± 0.4	9.1 ± 0.6	10.1 ± 0.6	9.4 ± 0.7
ДГТС	3.2 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.3
ДГТА	2.1 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
ФГЭГ	3.5 ± 0.5	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.2
ФХ	10.3 ± 1.7	7.5 ± 0.1	7.7 ± 0.7	9.0 ± 0.5	9.2 ± 0.4

Примечание. Н – нижняя и В – верхняя части пластины здоровых особей; Ни – нижняя и Ви – верхняя части пластины инфицированных особей; Вэ – верхняя часть пластины инфицированных особей с визуально выраженным наличием эндофита на поверхности пластины. Список сокращений названий классов полярных липидов см. в тексте. Значения приведены как среднее ± стандартное отклонение для $n = 3$.

Таблица 3. Жирнокислотный состав (ЖК) полярных и нейтральных липидов разных частей пластины *Undaria pinnatifida* (% от суммы всех ЖК)

ЖК	Полярные липиды					Нейтральные липиды				
	Н	Ни	В	Ви	Вэ	Н	Ни	В	Ви	Вэ
14:0	4.6 ± 0.5	3.2 ± 0.3	3.5 ± 0.4	3.5 ± 0.8	4.0 ± 0.1	5.8 ± 0.7	5.9 ± 0.6	5.8 ± 0.4	6.4 ± 0.7	5.4 ± 0.9
15:0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.5
16:0	16.0 ± 2.1	12.9 ± 1.1	13.4 ± 1.5	13.9 ± 0.9	17.2 ± 0.2	16.8 ± 1.3	20.2 ± 1.7	17.6 ± 2.1	17.6 ± 2.3	22.8 ± 1.5
18:0	2.6 ± 0.3	3.4 ± 0.2	2.7 ± 0.3	3.6 ± 1.1	5.1 ± 1.4	6.7 ± 0.7	14.2 ± 1.7	4.6 ± 0.4	8.9 ± 2.5	9.2 ± 1.7
14:1n-7	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.0	2.4 ± 0.2	3.7 ± 0.4	1.3 ± 0.2	3.2 ± 0.8	2.7 ± 1.3
14:1n-5	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	+	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.4	1.8 ± 0.1	2.7 ± 0.3	0.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.2
16:1n-9	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.2	1.3 ± 1.0	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.5	1.7 ± 0.2	5.1 ± 2.9	4.1 ± 1.2
16:1n-7	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	3.2 ± 0.3	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.3
16:1n-13	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2
18:1n-9	8.4 ± 0.7	7.2 ± 1.0	6.4 ± 0.9	6.5 ± 0.0	6.5 ± 0.2	13.0 ± 1.8	12.3 ± 1.1	11.5 ± 1.5	10.1 ± 0.3	14.3 ± 0.9
18:2n-6	4.7 ± 0.6	4.0 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.2	6.8 ± 0.9	5.4 ± 0.5	7.2 ± 0.7	5.7 ± 1.5	5.0 ± 1.2
20:2n-6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.5
18:3n-3	9.2 ± 1.1	10.4 ± 0.8	9.3 ± 1.2	9.8 ± 0.6	7.2 ± 0.3	7.6 ± 0.5	4.5 ± 0.5	7.9 ± 0.7	6.0 ± 1.4	3.6 ± 1.1
18:4n-3	26.6 ± 2.3	28.6 ± 3.3	25.5 ± 3.0	24.3 ± 2.9	20.9 ± 0.7	4.2 ± 0.5	2.1 ± 0.2	7.5 ± 0.9	3.9 ± 1.4	2.6 ± 1.2
20:4n-6	8.6 ± 0.7	10.0 ± 1.1	10.1 ± 0.9	9.8 ± 0.9	7.9 ± 0.8	2.7 ± 0.4	1.7 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.2 ± 0.8	1.1 ± 0.3
20:4n-3	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.3
20:5n-3	10.1 ± 0.6	11.7 ± 1.1	16.0 ± 2.2	14.3 ± 1.3	13.2 ± 0.1	5.9 ± 0.7	2.9 ± 0.2	11.9 ± 1.1	6.2 ± 2.2	4.0 ± 1.5

Примечание. См. примечание к табл. 2. Приведены ЖК, содержание которых хотя бы в одном случае превышало 1%; “+” – содержание ЖК менее 0.1%.

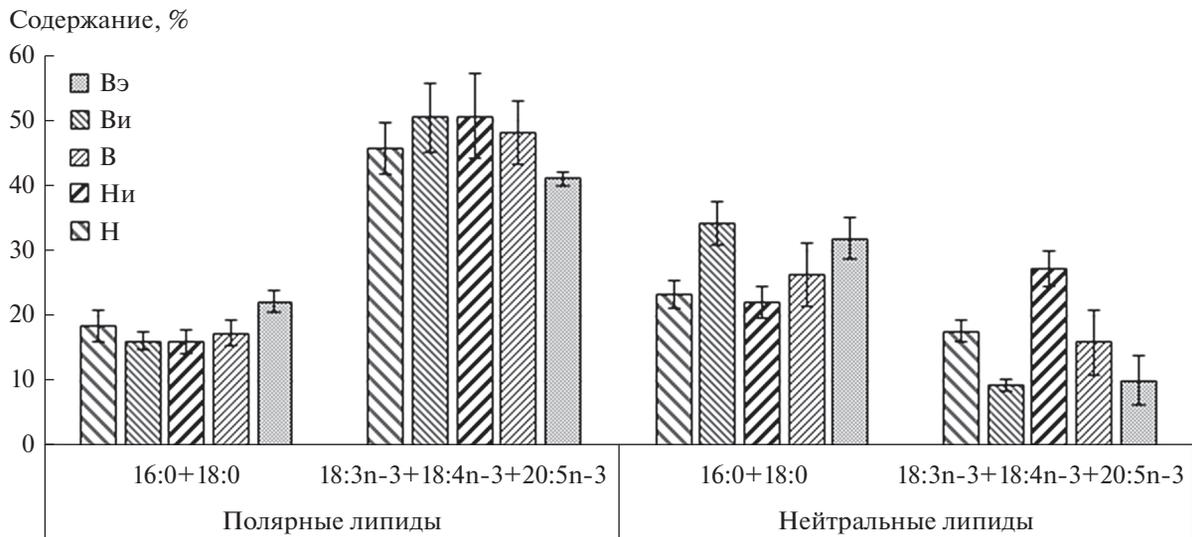


Рис. 3. Влияние эндофита на содержание жирных кислот в полярных и нейтральных липидах из разных частей пластины *Undaria pinnatifida* (в % от суммы всех ЖК). Н – нижняя и В – верхняя части пластины здоровых особей; Ни – нижняя и Ви – верхняя части пластины инфицированных особей; Вэ – верхняя часть пластины инфицированных особей с визуальным наличием эндофита на поверхности пластины.

ных водорослей. Однако высокая степень инфицирования обычно характерна для более старых тканей, но полученные данные свидетельствуют об обратном: уровень ЦФИ был выше в нижней более молодой части пластины, что свидетельствует об эндогенном происхождении этого липида.

ДГТА обнаружен во многих бурых водорослях, однако не характерен для порядка Laminariales, а ДГТС вообще редко встречается в бурых водорослях (Хотимченко, 2003). Ранее в водорослях порядка Laminariales эти липиды были обнаружены только в следовых количествах (Eichenberger et al., 1991).

Самый заметный ответ на инфицирование эндофитом – повышение содержания насыщенных и снижение уровня полиненасыщенных ω3 ЖК во фракции нейтральных липидов. Ранее было установлено, что при инфицировании одноклеточных морских водорослей вирусом наблюдался усиленный синтез триглицеридов с насыщенными ЖК, которые накапливались в виде жировых капель (Malitsky et al., 2016). Возможной причиной снижения количества полиненасыщенных ЖК может быть их разрушение активными формами кислорода, образующимися в ответ на инфицирование (Evans et al., 2009). Однако мы обнаружили такие изменения в составе ЖК нейтральных липидов как в месте непосредственного инфицирования, так и в отдаленных нижних частях пластины. Известно, что наличие эндофита нарушает целостность наружных покровов, что

открывает доступ для вторичных инфекций (Gao et al., 2020). Именно вторичное вирусное или бактериальное инфицирование, распространившееся через пораженные участки верхней части пластины по всей пластине, могло спровоцировать изменения в составе ЖК в тканях, прилегающих к месту непосредственного воздействия эндофита.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90112.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудницу Лаборатории физиологии автотрофных организмов ННЦМБ ДВО РАН А.В. Скрипцову за помощь в определении водорослей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хотимченко С.В.* Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Владивосток: Дальнаука. 2003. 230 с.
- Campo E. del, Garcia-Reina G., Correa J.A.* Degradative disease in *Ulva rigida* (Chlorophyceae) associated with *Acrochaete geniculata* (Chlorophyceae) // *J. Phycology*. 1998. V. 34. № 1. P. 160–166.
- Cho J.-Y., Kang J.-Y., Khan M.N.A. et al.* Anti-inflammatory activities of *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica* (Phaeophyta) // *J. Fish. Sci. Technol.* 2007. V. 10. № 3. P. 127–132.
- Eichenberger W., Araki S., Müller D.G.* Betaine lipids and phospholipids in brown algae // *Phytochemistry*. 1991. V. 34. № 5. P. 1323–1333.
- Eichenberger W., Gribi C.* Diacylglycerol- α -D-glucuronide from *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) // *J. Plant Physiol.* 1994. V. 144. № 3. P. 272–276.
- Evans C., Pond D.W., Wilson W.H.* Changes in *Emiliania huxleyi* fatty acid profiles during infection with *E. huxleyi* virus 86: physiological and ecological implications // *Aquat. Microb. Ecol.* 2009. V. 55. № 3. P. 219–228.
- Faggio C., Morabito M., Minicante S.A. et al.* Potential use of polysaccharides from the brown alga *Undaria pinnatifida* as anticoagulants // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2015. V. 58. № 5. P. 798–804.
<https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500400>
- Gao X., Ogandaga C.A.M., Park S.K et al.* Algal endophytes of commercial *Chondrus ocellatus* (Gigartinales, Rhodophyta) from different wild populations in Korea // *J. Appl. Phycol.* 2020. V. 32. № 1. P. 697–703.
- Gauna M.C., Parodi E.R., Cáceres E.J.* Epi-endophytic symbiosis between *Laminariocolax aecidioides* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) growing on Argentinian coasts // *J. Appl. Phycol.* 2009. V. 21. № 1. P. 11–18.
- Hayashi K., Nakano T., Hashimoto M. et al.* Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection // *Int. Immunopharmacol.* 2008. V. 8. № 1. P. 109–116.
- Hölzl G., Dörmann P.* Structure and function of glycolipids in plants and bacteria // *Prog. Lipid Res.* 2007. V. 46. № 5. P. 225–243.
- Jamieson G.R.* GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // *J. Chromatogr. Sci.* 1975. V. 13. № 10. P. 491–497.
- Kaneshiro E.S., Jayasimhulu K., Lester R.L.* Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingophospholipid // *J. Lipid Res.* 1986. V. 27. № 12. P. 1294–1303.
- Khotimchenko S.V., Kulikova I.V.* Lipids of different parts of the lamina of *Laminaria japonica* Aresch. // *Bot. Mar.* 2000. V. 43. P. 87–91.
- Koelmel J.P., Campbell J.E., Guingab-Cagmat J. et al.* Remodeling of foliar membrane lipids in a seagrass allows for growth in phosphorus-deplete conditions // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 11. P. 1–10.
- Li Y., Lou Y., Mu T. et al.* Simultaneous structural identification of diacylglycerol-N-trimethylhomoserine (DGTS) and diacylglycerolhydroxymethyl-N,N,N-trimethyl- β -alanine (DGTA) in microalgae using dual Li^+/H^+ adduct ion mode by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2017. V. 31 № 5. P. 457–468.
<https://doi.org/10.1002/rcm.7818>
- Malitsky S., Ziv C., Rosenwasser S. et al.* Viral infection of the marine alga *Emiliania huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol // *New Phytol.* 2016. V. 210. № 1. P. 88–96.
- Okazaki Y., Otsuki H., Nishizawa T.* A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. № 1. P. 1510.
- Pereira R., Yarish C.* Mass production of marine macroalgae // *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier. 2008. P. 2236–2247.
- Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S. et al.* Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae // *J. Appl. Phycol.* 2008. V. 20. № 5. P. 705–711.
- Skriptsova A., Khomenko V., Isakov V.I.* Seasonal changes in growth rate, morphology and alginate content in *Undaria pinnatifida* at the northern limit in the Sea of Japan (Russia) // *J. Appl. Phycol.* 2004. V. 16. № 1. P. 17–21.
- Skriptsova A.V., Kalita T.L.* The first record of the brown endophytic alga *Laminariocolax aecidioides* (Rosenvinge) A.F. Peters, 1998 in the Russian Far-Eastern Seas // *Russ. J. Mar. Biol.* 2020. V. 46. № 1. P. 42–48.
- Smith S.W., Lester R.L.* Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 11. P. 3395–3405.
- Stuart M.D., Hurd C.L., Brown M.T.* Effects of seasonal growth rate on morphological variation of *Undaria pinnatifida* (Alariaceae, Phaeophyceae) // *Hydrobiologia*. 1999. V. 398–399. № 1911. P. 191–199.
- Tabakaeva O.V., Tabakaev A.V.* Compositions of lipids and fatty acids from various parts of the brown alga *Undaria pinnatifida* // *Chem. Nat. Compd.* 2017. V. 53. № 5. P. 843–848.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V.* Seaweed cultivation: methods and problems // *Russ. J. Mar. Biol.* 2010. V. 36. № 4. P. 227–242.
- Vyssotski M., Lagutin K., MacKenzie A. et al.* Phospholipids of New Zealand edible brown algae // *Lipids*. 2017. V. 52. № 7. P. 629–639.

Influence of Endophyte *Laminariocolax aecidioides* (Rosenvinge) A.F. Peters, 1998 (Phaeophyceae: Ectocarpales) on the Lipid Composition of the Brown Alga *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 (Phaeophyceae: Laminariales)

O. A. Chadova^a and P. V. Velansky^a

^a*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

Composition of polar lipid classes and composition of fatty acids of neutral and polar lipid fractions were studied in tissues of the brown alga *Undaria pinnatifida* infected with the endophyte *Laminariocolax aecidioides*. For the first time, the lipid glucuronosyldiacylglycerol was found in brown algae; while ceramide phosphoinositol, diacylglyceryltrimethylhomoserine, and diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- β -alanine were also for the first time found in significant amounts in algae of the order Laminariales. It has been established that presence of the endophyte leads to a decrease in the contents of phosphatidylinositol and ceramide phosphoinositol, to a significant increase in the concentration of saturated fatty acids and to a decrease in the content of ω 3 polyunsaturated acids in neutral lipids.

Keywords: endophyte, lipids, fatty acids, brown algae

УДК 597.2/5

СЛУЧАИ ПОИМОК МАЛЬКОВ РЫБ СЕМЕЙСТВА ДОЛГОХВОСТОВЫЕ (GADIFORMES: MACROURIDAE) В ТИХООКЕАНСКИХ ВОДАХ КАМЧАТКИ В 2006–2018 ГГ.

© 2022 г. Д. Я. Саушкина*

Камчатский филиал ФГБНУ «ВНИРО» (КамчатНИРО),
Петропавловск-Камчатский 683000, Россия

*e-mail: melnik.d.y@kamniro.ru

Поступила в редакцию 14.12.2021 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Описаны новые случаи поимок мальков трех видов рыб из семейства долгохвостовые (Macrouridae) весной в тихоокеанских водах Камчатки. Приведены сведения о пойманных экземплярах, местах и глубинах их обнаружения и температуре воды.

Ключевые слова: долгохвостовые, малоглазый макрурус *Coryphaenoides pectoralis*, черный макрурус *C. acrolepis*, пепельный макрурус *C. cinereus*, мальки, тихоокеанские воды Камчатки

DOI: 10.31857/S0134347522050084

Качественный состав весеннего ихтиопланктона тихоокеанских вод Камчатки достаточно разнообразен. В него входят икра, личинки и мальки многих рыб, относящихся к разным экологическим группировкам. К представителям батибентального ихтиоценоза относятся три вида обитающих в тихоокеанских водах Камчатки долгохвостовых, мальки которых попадают в ихтиопланктоне. Это малоглазый *Coryphaenoides pectoralis* (Gilbert, 1892), черный *C. acrolepis* (Bean, 1884) и пепельный *C. cinereus* (Gilbert, 1896) макрурусы (Парин и др., 2014; Григорьев, 2019, 2020; <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).

Публикации о встречаемости мальков долгохвостовых у берегов юго-восточной Камчатки и в дальневосточных морях в целом немногочисленны, скудны и фрагментарны. Мальки макрурусов отмечены в Беринговом море (Мусиенко, 1963; Булатов, 1994; Балыкин, Балыкина, 2000) и в северной части Тихого океана (Кашкина, 1965; Новиков, 1974; Stein, 1980; Endo et al., 1993). В районе исследований в ихтиопланктонных пробах они встречаются достаточно редко. Известно лишь несколько сообщений о поимках данных видов. В одном из них (Буслов и др., 2006) приведены сведения о находке единственного малька Macrouridae рода *Coryphaenoides*, указаны его размер и глубина поимки. Кроме того, ранее нами был обнаружен один экземпляр *C. cinereus* (Саушкина, 2013).

Цель настоящей работы – описать места обнаружения мальков рыб семейства долгохвостовые, указать глубины и придонную температуру мест их обитания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для сообщения послужили сборы ихтиопланктона в тихоокеанских водах Камчатки в весенние периоды 2006, 2010–2012, 2016 и 2018 гг. (табл. 1, рис. 1), выполненные икорной сетью ИКС-80 диаметром 80 см с площадью входного отверстия 0.5 м². Вертикальные тотальные обловы проводили от дна до поверхности; в районе верхней части материкового склона горизонт лова не превышал 600–0 м. К сети дополнительно крепили автономный гидрологический зонд, по показаниям которого определяли фактическую глубину погружения оборудования, температуру и соленость воды в исследуемой толще. Интервал измерения по глубине был установлен на 0.5 м. Записанные в память зонда натурные данные о температуре и солености считывались на компьютер. Из-за закрепленного оборудования положить кольцо сети на грунт полностью не представлялось возможным.

Ихтиопланктонные пробы фиксировали в 4% растворе формальдегида для последующей камеральной обработки в лабораторных условиях. При идентификации мальков руководствовались опубликованными ранее работами (Stein, 1980;

Таблица 1. Данные по ихтиопланктонным съемкам, выполненным весной в тихоокеанских водах Камчатки

Год	Дата проведения съемки	Количество станций	Глубина, м
2006	17.04–09.05	119	43–570
2010	19.03–28.04	106	29–550
2011	01.04–06.05	94	29–600
2012	28.03–10.05	110	25–600
2016	23.04–07.05	117	30–600
2018	16.03–02.05	108	27–600

Matarese et al., 1989; Endo et al., 1993; Григорьев, 2007). Названия таксонов приведены в соответствии с современными систематическими представлениями (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). У пойманных мальков измеряли полную длину тела

(*TL*). Фотография черного макруруса выполнена с помощью бинокулярного микроскопа Olympus SZX10 и цифровой фотокамеры Olympus DP27. Фотографии мальков пепельного и малоглазого макрурусов отсутствуют, так как пойманные экземпляры не сохранились.

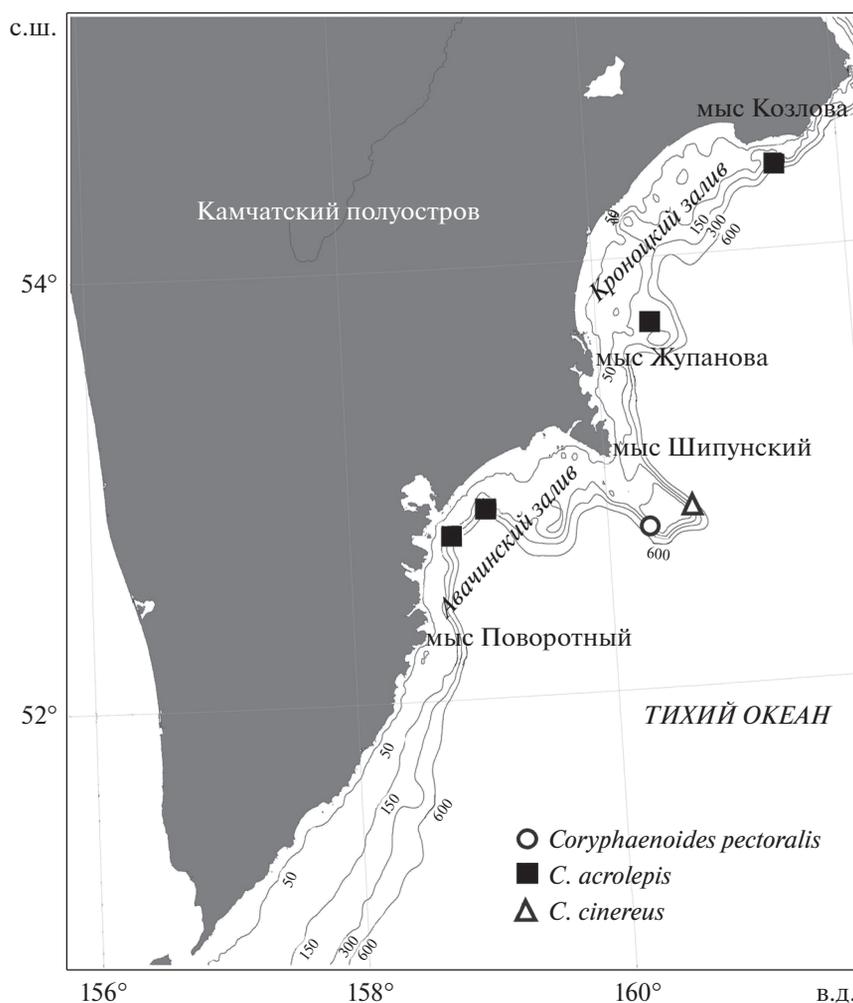


Рис. 1. Места поимок мальков макрурусов: малоглазого *Coryphaenoides pectoralis*, черного *C. acrolepis* и пепельного *C. cinereus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженные в тихоокеанских водах Камчатки мальки трех видов макрурусов имели морфологические признаки, соответствовавшие известным описаниям мальков долгохвостовых рыб (Stein, 1980; Endo et al., 1993). Тело мальков утолщенное в передней части и заостряющееся к концу; голова крупная, умеренно сжатая; глаза большие; рыло неразвитое, тупое; имеется подбородочный усик; рот большой и косой; зубы на обеих челюстях мелкие, расположены в один или два ряда; хвостовой плавник отсутствует; основание грудного плавника стебельчатое (рис. 2). Помимо количества лучей в спинных и брюшных плавниках одним из наиболее полезных и удобных признаков для определения видовой принадлежности личинок и мальков макрурусов (особенно на ранних стадиях развития) служит пигментация в каудальной области. Особи могут быть пигментированы снаружи (на поверхности кожи) или внутри (внутри миомеров, на миомерах, на желудке или брюшине и т.д.). При фиксации в растворе формальдегида интенсивность пигментации может изменяться. У малоглазого макруруса внешние меланофоры крупные в брюшной области и в основании первого спинного плавника. Кроме этого пигментация присутствует на затылке и в окологлазничной области. В каудальной области появляются внутренние меланофоры. Они проходят по всей длине хвостового отдела. Пигментация ярче выражена у более взрослых особей.

Единственный малек малоглазого макруруса ($TL = 30.5$ мм) обнаружен 17 апреля 2006 г. при температуре воды у дна 2.78°C . Результативный лов отмечен в центральной части Авачинского залива в районе глубоководного каньона ($52^{\circ}48'$ с.ш., $158^{\circ}48'$ в.д.) над глубиной 490 м (рис. 1).

В ихтиопланктонных пробах встречались также мальки черного макруруса. Всего за период исследований поймано 4 особи черного макруруса. Положительными были ловы в центральной части Авачинского залива ($TL = 17.0$ мм, дата поимки 28 апреля 2016 г., координаты $52^{\circ}46'$ с.ш. и $158^{\circ}45'$ в.д., глубина 540 м, температура у дна 3.63°C ; $TL = 20.5$ мм, дата поимки 10 апреля 2011 г., координаты $52^{\circ}54'$ и $159^{\circ}01'$ в.д., глубина 533 м, температура у дна 3.35°C), а также в Кроноцком заливе юго-западнее мыса Козлова ($TL = 13.5$ мм, дата поимки 1 мая 2018 г., координаты $54^{\circ}23'$ с.ш. и $161^{\circ}28'$ в.д., глубина 357 м, температура у дна 1.95°C) и восточнее мыса Жуланова ($TL = 26.8$ мм, дата поимки 27 апреля 2010 г., координаты $53^{\circ}42'$ с.ш. и $160^{\circ}24'$ в.д., глубина 385 м, температура у дна 3.09°C) (рис. 1).

У мальков черного макруруса отмечен характерный для этого вида пигментный рисунок: все тело пигментировано внутри или снаружи, за исключением задней части хвоста (рис. 2). Отсут-



Рис. 2. Малек черного макруруса *Coryphaenoides acrolepis* из тихоокеанских вод Камчатки, $TL = 17.0$ мм (фото автора).

ствием пигмента в задней части хвоста мальки черного макруруса отличаются от мальков малоглазого макруруса, а в остальном их пигментация сходна. Звездчатые меланофоры образуют пятно на лобной области головы. Нижняя челюсть полностью слабо пигментирована. В основании спинных и анальных плавниковых складок видны очень мелкие рассеянные меланофоры, которые особенно заметны на задней части хвостового отдела. Обширная внутренняя пигментация имеется в миомерах и на брюшине. Миомерный пигмент отсутствует в задней части хвоста. Пигментированная часть тела довольно постоянна. Размер меланофоров не зависит от размера особи. В процессе роста черного макруруса пигмент вдоль основания спинного и анального плавников присутствует, однако в задней части хвоста становится менее заметным.

Единственный малек пепельного макруруса ($TL = 16.5$ мм) обнаружен 19 апреля 2012 г. в центральной части Авачинского залива в районе глубоководного каньона ($52^{\circ}54'$ с.ш., $159^{\circ}01'$ в.д.) над глубиной 550 м при температуре воды у дна 3.59°C . Отличительная особенность этого вида — наличие наружных меланофоров на задней половине хвостового отдела. Пигмент обильный в брюшной области, плотный в основании первого спинного плавника, разбросанный на затылке и обеих челюстях, а также в окологлазничной и глазной областях. Меланофоры на основании первого спинного плавника почти достигают преддорсальной области. Внутренние меланофоры отмечены по всей длине хвостового отдела.

Из приведенных данных видно, что мальки долгохвостовых выловлены в придонных слоях воды в районе свала глубин (глубоководные каньоны Авачинского и Кроноцкого заливов). Весенние ихтиопланктонные работы в тихоокеанских водах Камчатки проводились ежегодно, однако поимки

мальков долгохвостовых рыб единичны. Редкую встречаемость мальков макрурусов в уловах можно объяснить, во-первых, особенностями нереста долгохвостовых, который проходит на больших глубинах вблизи материкового склона; в районе исследования нерест растянут и длится с января по декабрь с пиком в весенне-летние месяцы (Новиков, 1974; Сюсина, 1986; Тупоногов, Куренной, 1986; Кодолов, 2003; Тупоногов, 2003; Токранов и др., 2005; Датский, 2017; Григорьев, 2020), а период проведения ихтиопланктонных съемок захватывал лишь малую часть этого времени. Во-вторых, низкая частота поимок макрурусов в исследуемом районе в период их раннего онтогенеза обусловлена отсутствием возможности проведения ихтиопланктонных работ глубже 600 м и стандартизированной сеткой станций, не охватывающей весь материковый склон. В-третьих, икринки долгохвостовых развиваются преимущественно в средних слоях воды за пределами шельфа; личинки, мальки и молодь достаточно долго (до 1–3 лет) ведут исключительно пелагический образ жизни, не разносятся от мест нереста, а по мере роста опускаются глубже (Мусяенко, 1963; Новиков, 1970, 1974; Сюсина, 1986; Тупоногов, Куренной, 1986; Токранов и др., 2005; Григорьев, 2019, 2020; Григорьев, Седова, 2020). Вероятно, к этому моменту мальки начинают вести активный образ жизни и не облавливаются ихтиопланктонной сетью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балыкин П.А., Балыкина Н.В. Ихтиопланктон Каргинского и Олюторского заливов в мае // Изв. ТИНРО. 2000. Т. 128. С. 751–760.
- Булатов О.А. Особенности размножения рыб и распределение ихтиопланктона восточной части Берингова моря // Изв. ТИНРО. 1994. Т. 115. С. 17–57.
- Буслов А.В., Тепнин О.Б., Дубинина А.Ю. Весенний ихтиопланктон в районе глубоководных каньонов Авачинского залива (Восточная Камчатка) // Изв. ТИНРО. 2006. Т. 144. С. 226–246.
- Григорьев С.С. Ранние стадии рыб северо-востока России (прибрежные морские воды и внутренние водоемы): Атлас-определитель. Владивосток: Дальнаука. 2007. 331 с.
- Григорьев С.С. Экологические группы морских рыб северо-востока России и условия их нереста и раннего развития // Материалы XX Международ. науч. конф., посвященной 150-летию со дня рождения академика РАН В.Л. Комарова. Изд-во: Камчатпресс. 2019. С. 104–109.
- Григорьев С.С. Экология нереста и раннего развития морских рыб прикамчатских вод // Вестн. Камчат. гос. техн. ун-та. 2020. № 51. С. 83–98.
- Григорьев С.С., Седова Н.А. Зоогеографическая характеристика морских рыб, обитающих вблизи п-ва Камчатка, на основании распределения ранних стадий развития // Вестн. Северо-Восточ. науч. центра ДВО РАН. 2020. № 3. С. 94–108.
- Датский А.В. Особенности биологии массовых рыб в Олюторско-Наваринском районе и прилегающих водах Берингова моря. 2. Семейства долгохвостовые (Macrouridae), сельдевые (Clupeidae), корюшковые (Osmeridae) // Вопр. ихтиологии. 2017. Т. 57. № 1. С. 66–81.
- Кашкина А.А. Зимний ихтиопланктон района Командорских островов // Тр. ВНИРО. 1965. Т. 58. Вып. 4. С. 179–189.
- Кодолов Л.С. Некоторые данные по биологии черного макруруса *Coryphanoides acrolepis* (Bean, 1883) // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 134. С. 144–153.
- Мусяенко Л.Н. Ихтиопланктон Берингова моря (по материалам Берингоморской экспедиции ТИНРО и ВНИРО 1958–1959 гг.) // Тр. ВНИРО. 1963. Т. 48. Вып. 1. С. 239–269.
- Новиков Н.П. Биология малоглазого долгохвоста (*Chalinura pectoralis*) в северной части Тихого океана // Тр. ВНИРО. 1970. Т. 70. С. 300–326.
- Новиков Н.П. Промысловые рыбы материкового склона северной части Тихого океана. М.: Пищ. пром-сть. 1974. 308 с.
- Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог // Сб. тр. Зоол. музея МГУ им. М.В. Ломоносова. 2014. Т. 53. 733 с.
- Саушкина Д.Я. Результаты весенних исследований ихтиопланктона в Авачинском заливе // Вестн. Камчат. гос. техн. ун-та. 2013. № 24. С. 56–59.
- Сюсина Т.И. Пепельный макрурус // Биологические ресурсы Тихого океана. М.: Наука. 1986. С. 241–247.
- Токранов А.М., Орлов А.М., Шейко Б.А. Промысловые рыбы материкового склона прикамчатских вод. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс. 2005. 52 с.
- Тупоногов В.Н. Распределение и биологическое состояние макрурусов в Охотском море и у Курильских островов летом-осенью 2000 г. // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 133. С. 56–66.
- Тупоногов В.Н., Куренной А.А. Малоглазый макрурус // Биологические ресурсы Тихого океана. М.: Наука. 1986. С. 233–240.
- Endo H., Yabe M., Amaoka K. Occurrence of the macrourid alevins genera *Albatrossia* and *Coryphaenoides* in the northern North Pacific Ocean // Jpn. J. Ichthyol. 1993. V. 40. № 2. P. 219–226.
- Matarese A.C., Kendall A.W.Jr., Blood D.M., Vinter B.M. Laboratory guide to early life history stages of Northeast Pacific fishes. NOAA Tech. Rep. NMFS. № 80. 1989. 652 p. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (Accessed 07.12.2021).
- Stein D.L. Description and occurrence of macrourid larvae and juveniles in the Northeast Pacific Ocean off Oregon, U.S.A. // Deep Sea Res. Part A. 1980. № 27. P. 889–900.

**Records of Capture of Juveniles of Grenadiers (Gadiformes: Macrouridae)
in Pacific Waters of Kamchatka in the years 2006–2018**

D. Ya. Saushkina

*Kamchatka Branch of Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography,
Petropavlovsk-Kamchatski 683000, Russia*

New records of capture of juveniles of three grenadier species (family Macrouridae) in spring in the Pacific waters of Kamchatka are reported. Data on the captured specimens, locations and depths of capture, and water temperature are provided.

Keywords: Macrouridae, giant grenadier *Coryphaenoides pectoralis*, Pacific grenadier *C. acrolepis*, popeye grenadier *C. cinereus*, juveniles, Pacific waters of Kamchatka

УДК 594:577.127(262.5)

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ФИЛЬТРАТОРА *POLITITAPES AUREUS* (GMELIN, 1791) ИЗ ЧЁРНОГО МОРЯ

© 2022 г. А. В. Бородина¹ *, П. А. Задорожный²¹Институт биологии южных морей РАН, Севастополь 299011, Россия²Институт химии ДВО РАН, Владивосток 690022, Россия

*e-mail: borodinaav@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.

После доработки 21.04.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Представлены результаты изучения состава каротиноидов в тканях морского двустворчатого моллюска-фильтратора *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791), обитающего в Чёрном море в одной из кутовых зон б. Казачья в районе г. Севастополь. В течение годового цикла динамика суммарных каротиноидов в мягких тканях моллюска была максимальной (1.7 ± 0.47 мг/100 г сырой ткани) весной в начале марта, к лету этот показатель снижался до 0.41 ± 0.10 мг/100 г сырой ткани и оставался практически неизменным до конца года (менее 0.5 мг/100 г сырой ткани). Качественный состав каротиноидов был исследован в весенних и осенних пробах. Идентифицированы β -каротин, эхиненон, лютеин, зеаксантин, аллоксантин, фукоксантин, амароциаксантин А, гетероксантин и мактраксантин, доля которых составляла около 80% от общего количества каротиноидов. Обсуждаются качественный состав каротиноидов у моллюсков-фильтраторов, обитающих в этом экотопе вместе с *P. aureus*, и возможные пути трансформации растительных каротиноидов в тканях *P. aureus*. Проведено сравнение состава каротиноидов в тканях *P. aureus* и других двустворчатых моллюсков рода *Polititapes* из разных регионов Мирового океана.

Ключевые слова: каротиноиды, *Polititapes aureus*, метаболизм, амароциаксантин А

DOI: 10.31857/S0134347522050035

Polititapes aureus (Gmelin, 1791) — морской вид двустворчатых моллюсков-фильтраторов из семейства Venegidae, обитающий в смешанных донных сообществах на илисто-песчаных грунтах (Киселева 1981; Промысловые биоресурсы..., 2011). Сведения о распространении этого моллюска в шельфовой зоне крымского побережья Черного моря в основном касаются глубоководной части (25–50 м) (Киселева, 1981; Промысловые биоресурсы..., 2011). Нами были обнаружены моллюски *P. aureus* в составе смешанного сообщества двустворчатых моллюсков *Chamelea gallina* (Bruguiere, 1789) и *Cerastoderma glaucum* (Linnaeus, 1758) на песчаном грунте в верховье б. Казачья на глубине 0–0.5 м. В это же время в данном районе проводился мониторинг состава зообентоса (Макаров, 2020).

Работы по исследованию моллюсков кутовых зон бухт (в зоне заплеска воды) немногочисленны, хотя очевидно, что условия жизни животных, обитающих в прибрежной зоне, по гидрохимическим, трофическим и кислородным условиям обитания отличаются от таковых в глубоковод-

ной части шельфовой зоны. Эти факторы влияют на участвующую в адаптации к изменяющимся внешним условиям обитания антиоксидантную систему двустворчатых моллюсков, приводя к количественному или качественному изменению состава каротиноидов (Бородина, Задорожный, 2020, 2021). Наиболее полно состав каротиноидов у двустворчатых моллюсков рода *Polititapes* (ранее *Raphia*) изучен у обитающих в тихоокеанском регионе видов *Raphia amabilis* и *P. euglypta*, у которых обнаружен амароциаксантин А — видоспецифичный каротиноид, являющийся своеобразным маркером рода *Polititapes* (Matsuno et al., 1985; Maoka et al., 2008; Маока, 2011). Каротиноид животного происхождения амароциаксантин А — продукт метаболической трансформации; в тканях моллюсков рода *Polititapes* он происходит от фукоксантина — каротиноида диатомовых и динофитовых микроводорослей (Маока, 2011). Показано, что для *P. amabilis* и *P. euglypta* характерно увеличение пути метаболизма перидинина до образования гидратоперидинина и циклопирроксантина (Matsuno et al., 1985; Маока et al., 2008;

Маака, 2011). Изменения экологии и гидрохимии Чёрного моря (Елкин и др., 2018) приводят к изменениям в организмах моллюсков, культивируемых на морских фермах (Трошенко и др., 2019) и обитающих в природных бентосных сообществах (Бородина, Солдатов, 2014; Бородина, Задорожный, 2021). Ранее были рассмотрены различия состава каротиноидов у черноморских двусторчатых моллюсков-фильтраторов и у моллюсков этих же видов или видов того же рода из других регионов Мирового океана (МО) (Бородина, Солдатов, 2014; Бородина, Задорожный, 2021). Настоящая работа является продолжением исследования сезонной годовой динамики состава каротиноидов у двусторчатых моллюсков-фильтраторов, обитающих в кутовой части бухт крымского побережья Чёрного моря (Бородина, Задорожный, 2020, 2021; Borodina, Zadorozhny, 2021). Цель работы — изучение состава каротиноидов в тканях *P. aureus*, обитающего в смешанном донном сообществе с *C. glaucum* и *Ch. galina*, а также сравнение состава каротиноидов у этих моллюсков и у представителей рода *Politiitapes* из других регионов МО.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования — двусторчатый моллюск *Politiitapes aureus* (Gmelin, 1791), обитающий в составе смешанного донного сообщества песчаной зоны верхней сублиторали (глубина 0–1 м) б. Казачья у г. Севастополь. Для определения годовой динамики содержания суммарных каротиноидов в тканях моллюска в течение 2019 и 2021 гг. один раз в месяц отбирали по 8–15 особей с длиной раковины 10–20 мм. Для изучения качественного состава каротиноидов использовали две выборки по 30 животных, взятые весной (апрель, май) и осенью (сентябрь, октябрь). Суммарное содержание каротиноидов (ССК) определяли спектрофотометрическим методом (Карнаухов, Федоров, 1982; Карнаухов, 1988). Мягкие ткани гомогенизировали в фарфоровой ступке, затем в ней же проводили экстракцию 100% ацетоном. Суммарный экстракт каротиноидов герметично упаковывали в атмосфере азота и при низкой температуре транспортировали в Институт химии ДВО РАН для идентификации методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (MS).

Хроматографические методы и масс-спектрометрия

Разделение пигментов проводили методом ВЭЖХ, как описано ранее (Бородина, Задорожный, 2020, 2021). Для разделения использовали хроматограф Shimadzu LC-20 с диодно-матричным детектором SPD-M20A; колонку Zorbax Sil

4.6 × 250 мм, скорость потока 1 мл/мин, в градиенте гексан : ацетон (0–20 мин гексан : ацетон 8 : 2, изократические условия; с 20 до 25 мин линейный градиент от 20 до 80% ацетона; 25–35 мин гексан : ацетон 2 : 8, изократический режим). Фракции каротиноидов собирали после разделения (10–15 разделений), объединяли, упаривали досуха на роторном испарителе при температуре 40°C, перерастворяли в метаноле и прописывали масс-спектры с использованием масс-спектрометрического детектора низкого разрешения Shimadzu LCMS-2010EV, источник АРСІ, в режиме положительных ионов. Омыление каротиноидов проводили повторным растворением их в 5%-ном растворе КОН в метаноле.

На основе данных ВЭЖХ при 450 нм оценивали содержание отдельных каротиноидов методом нормирования площадей пиков пигментов с использованием коэффициента А 1%/1 см: для фукоксантина — 2500, для его производных — 1600. Отношение максимумов III/II, % в спектрах поглощения рассчитывали, как описано ранее (Carotenoids..., 1994; Бородина, Задорожный, 2020, 2021). Количество каротиноидов в этерифицированном виде оценивали после щелочного гидролиза.

Статистический анализ

Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводились при помощи пакета “Grapher-7”. Результаты расчета суммарных каротиноидов на графике представлены как среднее арифметическое (\bar{x}) и стандартная ошибка средней ($S\bar{x}$). Для сравнения содержания каротиноидов в мягких тканях моллюсков в течение года применяли *U*-критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Большая часть тканей *Politiitapes aureus* окрашена в бледный розово-серый цвет, исключение составляют ярко-желтые гонады и темный зелено-коричневый гепатопанкреас, скрытый под ногой моллюска (рис. 1). Фотография сделана в марте, когда суммарный уровень каротиноидов максимально высок (рис. 2).

Наиболее высокое суммарное содержание каротиноидов в тканях *P. aureus* 1.68 ± 0.47 мг/100 г сырой массы отмечено в весенние месяцы с пиком в марте (рис. 2). В данный период начинается созревание гонад, которые в это время заметны при визуальном обследовании животных (рис. 1).

Качественный состав каротиноидов определяли весной и осенью. В суммарных экстрактах обеих проб методом ВЭЖХ идентифицированы следующие каротиноиды и их эфиры (рис. 3, табл. 1):



Рис. 1. Препарированный двустворчатый моллюск *Politiitapes aureus* (март 2021 г.).

β -каротин: время удерживания (R_t) – 2.74 мин, максимумы поглощения в элюенте (λ_{\max}) – 425, 448 и 474, отношение III/II, % – 15, отношение массы иона к его заряду (m/z [M + H]⁺) – 537;

эхиненон: R_t – 2.9 мин, λ_{\max} – 452, III/II, % – 0;

фракция этерифицированных каротиноидов: R_t – 2.9–3.2 мин, после омыления основной пик R_t – 30.72 мин, λ_{\max} – 427, 449 и 479, III/II, % – 65;

лютеин: R_t – 13.8 мин, λ_{\max} – 448 и 473, III/II, % – 44, m/z [M + H]⁺ – 569;

зеаксантин: R_t – 14.1 мин, λ_{\max} – 451 и 475, III/II, % – 5;

аллоксантин: R_t – 17.1 мин, λ_{\max} – 452 и 481, III/II, % – 50, m/z [M + H]⁺ – 565;

фукоксантин: R_t – 27.16 мин, λ_{\max} – 448 и (469), III/II, % – 0, m/z [M + H]⁺ – 659, m/z [M + Na]⁺ – 681, фракция неразделима со стандартом, выделенным из *Laminaria* sp.;

гетероксантин: R_t – 30.72 мин, λ_{\max} – 425, 448 и 477, III/II, % – 62, m/z [M + H]⁺ – 601;

амароциаксантин A: R_t – 32.27 мин, λ_{\max} – 440, III/II, % – 0;

мактраксантин: R_t – 33.09 мин, λ_{\max} – 418, 442 и 471, III/II, % – 91, m/z [M + H]⁺ – 637.

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение года из-за смены состава фитопланктона (сезонная сукцессия) у многих видов двустворчатых моллюсков суммарный состав каротиноидов меняется (Бородина, Солдатов, 2014; Бородина, Задорожный, 2020, 2021; Borodina, Zadorozhny, 2021). Весной обильный спектр питания и благоприятная температура стимулируют репродуктивный цикл у многих видов моллюсков (Холодов и др., 2010; Черноморские моллюски...

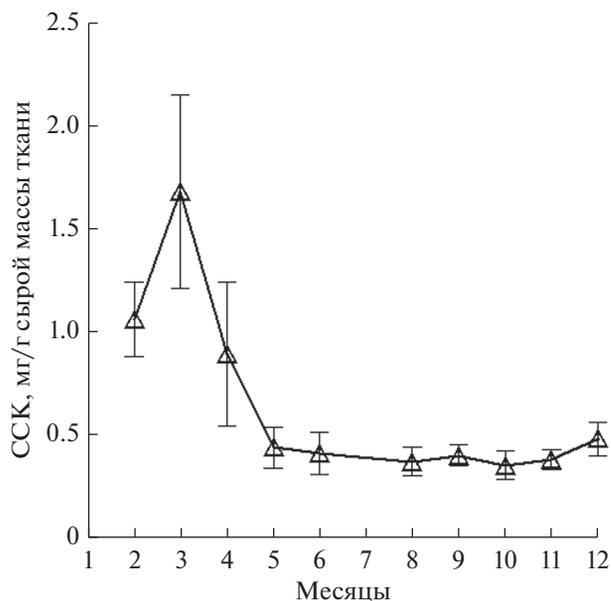


Рис. 2. Годовая динамика содержания суммарных каротиноидов в тканях двустворчатого моллюска *Politiitapes aureus*. ССК – содержание суммарных каротиноидов.

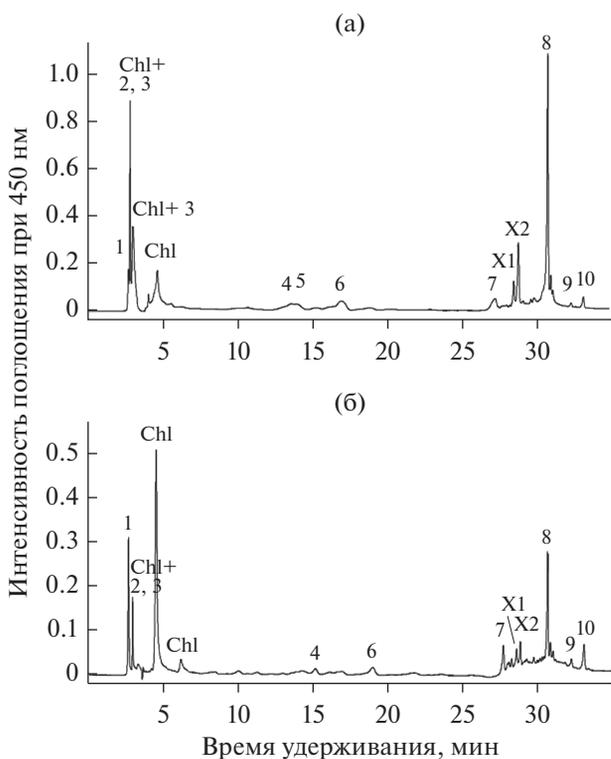


Рис. 3. Высокоэффективная жидкостная хроматография неомыленного экстракта каротиноидов мягких тканей двустворчатого моллюска *Politiitapes aureus* из весенней (а) и осенней (б) выборки. Обозначения пиков: 1 – β -каротин, 2 – эхиненон, 3 – эфиры каротиноидов, преимущественно гетероксантина, 4 – лютеин, 5 – зеаксантин, 6 – аллоксантин, 7 – фукоксантин, 8 – гетероксантин, 9 – амароциаксантин A, 10 – мактраксантин, Chl – хорофилл и его производные, X1 и X2 – неидентифицированные каротиноиды.

Таблица 1. Состав и содержание каротиноидов в мягких тканях двустворчатого моллюска *Polittapes aureus*

Каротиноиды	Проба, %	
	весенняя	осенняя
Каротины	6.1	23.1
Эхиненон	0.9	0.1
Эфиры каротиноидов	5.8	2.0
Лютеин	0.7	0.9
Зеаксантин	0.1	0.2
Аллоксантин	10.2	6.7
Фукоксантин	10.9	8.5
Гетероксантин	42.4	25.8
Амароциаксантин А	1.4	2.4
Мактраксантин	2.9	8.5
Неидентифицированные	18.6	21.8

2014). В эти периоды спектр каротиноидов в тканях *Valvula* обогащается и количественно, и качественно.

Согласно полученным результатам, гетероксантин был основным каротиноидом мягких тканей *Polittapes aureus*, в значительных количествах присутствовали также аллоксантин, фукоксантин и фракция каротинов (табл. 1). Сравнение весенней и осенних выборок показало, что основные различия между ними связаны с изменениями относительного содержания фракции каротинов и гетероксантина. В весенний период содержание каротинов было минимальным, а доля гетероксантина и других ксантофиллов увеличена.

Качественный состав каротиноидов в тканях *P. aureus* был близок к таковому у обитающих в этом же биотопе *Cerastoderma glaucum* и *Chamelea galina* (Бородина, Задорожный, 2020, 2021). При одинаковых внешних экологических условиях (спектр питания, температура и т.д.) эти моллюски накапливали в мягких тканях не менее шести одинаковых каротиноидов: каротины, лютеин, диатоксантин, аллоксантин, фукоксантин и гетероксантин; в неидентифицированных фракциях было возможно наличие других общих каротиноидов. Среди этих общих для *P. aureus*, *C. glaucum* и *Ch. galina* каротиноидов можно выделить каротиноиды, ассимилирующиеся из пищи, например, лютеин, диатоксантин, фукоксантин и гетероксантин. Однако с точки зрения энергетических затрат организма для моллюсков более важны их

собственные каротиноиды, образующиеся в тканях по определенным метаболическим путям в процессе преобразований растительных каротиноидов; это фукоксантин → ... амароциаксантин А (Маока, 2011) и (виолаксантин?) → ... мактраксантин (табл. 1) (Бородина, Задорожный, 2020). Путь образования мактраксантина изучен не полностью, предполагается, что его предшественником может быть виолаксантин – каротиноид зеленых микроводорослей (Бородина, Задорожный, 2020). У *P. aureus*, в отличие от *C. glaucum* и *Ch. galina* из этого же сообщества, отмечено накопление эхиненона, низкое содержание эфиров каротиноидов, отсутствие диатиноксантина и галоцинтиаксантина, а также зеаксантина, обнаруженного у *C. glaucum*. Это подтверждает наличие видовых особенностей в накоплении каротиноидов в тканях разных видов моллюсков из одного местообитания.

При сравнении состава каротиноидов у *P. aureus* и у видов этого рода из других регионов Мирового океана обнаружены существенные отличия. В тканях пафий из Японского моря (Matsuno et al., 1985; Маока et al., 2008; Маока, 2011) описан наиболее сложный путь трансформации растительного перидинина: перидинин → ... → гидратпирроксантин (эфиры). Согласно нашим результатам, у черноморского *P. aureus* среди идентифицированных соединений каротиноиды этого пути отсутствуют, из общих каротиноидов в тканях *P. amabilis* и *P. euglypta* из Японского моря, а так-

же *P. aureus* из Черного моря отмечен только амароциаксантином А.

Таким образом, у двустворчатого моллюска *P. aureus*, обитающего в кутовой части б. Казачья крымского побережья Чёрного моря, наблюдается только один (весенний) максимум накопления ССК; в течение года состав каротиноидов в тканях моллюска изменяется незначительно. Качественный состав каротиноидов на 80% представлен каротином, эхиненоном, лютеином, зеаксантином, аллоксантином, фукоксантином, амаруциаксантином А, гетероксантином, мактраксантином. У моллюсков-фильтраторов *P. aureus*, *C. glaucum* и *Ch. galina* набор каротиноидов может меняться в соответствии с условиями обитания, при этом сохраняются неизменными видоспецифичные каротиноиды животного происхождения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме № 121041400077-1 государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”. В работе использовано оборудование ЦКП “Дальневосточный центр структурных исследований” Института химии ДВО РАН.

ВКЛАД АВТОРОВ

Первый автор проводил сбор материала, определение суммарных каротиноидов и обработку полученных результатов, а также отвечал за подготовку и написание рукописи, подачу документов и ответы рецензентам. Второй автор проводил идентификацию каротиноидов методами ВЭЖХ и МС в течение всего периода исследований, а также редактировал и дополнил рукопись в области химии каротиноидов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бородина А.В., Задорожный П.А. Динамика каротиноидов в тканях моллюска-фильтратора *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) в годовом цикле // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2020. Т. 56. № 1. С. 3–12.

Бородина А.В., Задорожный П.А. Сезонная динамика каротиноидов двустворчатого моллюска *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) в Черном море // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2021. Т. 57. № 3. С. 250–256.

Бородина А.В., Солдатов А.А. Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков // Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014. С. 87–168.

Елкин Д.Н., Журбас В.М., Ижицкий А.С. и др. Гидрофизические и экологические процессы в прибрежной зоне Чёрного моря. М.: Научный мир. 2018. 414 с.

Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука. 1988. 240 с.

Карнаухов В.Н., Федоров Г.Г. Методы определения содержания каротиноидов и витамина А в клетках животных. Пушино: НЦБИ АН СССР. 1982. 28 с.

Киселева М.И. Бентос рыхлых грунтов Черного моря. Киев: Наукова думка. 1981. 409 с.

Макаров М.В. Современное состояние малакофауны рыхлых грунтов в вершинной части бухты Казачьей (Черное море) // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2020. № 1. С. 119–130.

Промысловые биоресурсы Чёрного и Азовского морей / Ред. В.Н. Еремеев, А.В. Гаевская, Г.Е. Шульман, Ю.А. Загородняя. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2011. 367 с.

Троценко О.А., Субботин А.А., Еремин И.Ю. Изменчивость основных лимитирующих факторов среды в процессе выращивания двустворчатых моллюсков на ферме в районе Севастополя // Уч. зап. Крымск. фед. ун-та им. В.И. Вернадского. География. Геология. 2019. Т. 5 (71). № 2. С. 308–321.

Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Выращивание мидий и устриц в Черном море. Севастополь: Ин-т биол. южных морей им. А.О. Ковалевского НАНУ. 2010. 424 с.

Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии / Ред. Г.Е. Шульман, А.А. Солдатов. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014. 323 с.

Borodina A.V., Zadorozhny P.A. Ecological features of the accumulation of carotenoids in the Black Sea mollusks // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021. V. 937. Art. 022077.

Carotenoids. V. 1B: Spectroscopy. Basel: Birkhäuser. 1994. 360 p.

Maoka T., Akimoto N., Yim M.J. et al. New C₃₇ skeletal carotenoid from the clam, *Paphia amabilis* // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 24. P. 12069–12072.

Maoka T. Carotenoids in Marine Animals // Mar. Drugs. 2011. V. 9. P. 278–293.

Matsumo T., Sakaguchi S., Ookubo M., Maoka T. Isolation and identification of amarouciaxanthin A from the bivalve *Paphia euglypta* (Sudaregai in Japanese) // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1985. V. 51. № 11. P. 1909–1985.

Distinctive Variations in Carotenoid Accumulation in Tissues of the Bivalve Mollusk *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) from the Black Sea

A. V. Borodina^a and P. A. Zadorozhny^b

^a*Institute of Biology of Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

^b*Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

The carotenoid composition has been analyzed in tissues of the marine filter-feeding bivalve mollusk *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791), dwelling in the top part of the Kazachya Bay near the Sevastopol City in the Black Sea. The dynamics of total carotenoids concentration in mollusk soft tissues follows a seasonal annual cycle, with maximum concentration (1.7 ± 0.47 mg/100 g of raw tissue) in the spring, at the beginning of March. This concentration declines to 0.41 ± 0.10 mg/100 g of raw tissue by the summer and remained almost unchanged through the rest of the year (less than 0.5 mg/100 g of raw tissue). Our investigation of qualitative composition of carotenoids is based on bivalves collected in the spring and fall. We identified: β -carotene, echinenone, lutein, zeaxanthin, alloxanthin, fucoxanthin, amarouciaxanthin A, heteroxanthin and mactraxanthin, which account for about 80% of the total amount of carotenoids. Additionally, we have qualitatively examined carotenoid composition in other filter-feeding mollusks that co-occur in this ecotope with *P. aureus* and report the possible pathways for transformation of plant carotenoids in *P. aureus* tissues. We also compare the composition of carotenoids in the tissues of *P. aureus* and other bivalves of the genus *Polititapes* from different regions of the World Ocean.

Keywords: carotenoids, *Polititapes aureus*, metabolism, amarouciaxanthin A