

---

---

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Номер 1, 2022

---

---

## БИОХИМИЯ

Влияние липидного комплекса из морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите

*В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко*

5

---

## ГЕНЕТИКА

Принципы идентификации нуклеотидных последовательностей в составе спектров ISSR-маркеров

*Н. В. Бардуков, В. С. Артамонова*

15

---

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Коллигативные эффекты растворов низкомолекулярных сахаров и их роль у растений при гипотермии

*А. Н. Дерябин, Т. И. Трунова*

26

Регуляция активности глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при изменении светового режима

*А. Т. Епринцев, Г. Б. Анохина, Д. Н. Федорин*

37

---

## ЗООЛОГИЯ

Пространственно-типологическая структура и организация населения птиц Алданского нагорья

*Е. В. Шемякин, Л. Г. Вартапетов*

46

Разнообразие и филогения азиатских краснощеких белок (Rodentia, Sciuridae, *Dremomys*) в Восточном Индокитае

*А. Е. Балакирев, А. В. Абрамов, Буй Суан Фьонг, В. В. Рожнов*

54

---

## ЭКОЛОГИЯ

Метагеномика – новое направление в экологии

*М. В. Вечерский, М. В. Семенов, А. А. Лисенкова, А. А. Степаньков*

70

Растительность и почвы тундровых ландшафтов Пур-Тазовского междуречья

*Е. А. Заров, Л. Л. Голубятников, Е. Д. Лапина, С. В. Лойко*

82

Сезонная изменчивость показателей системы крови домашней мыши (*Mus musculus* L.) в условиях гор Центрального Кавказа

*М. М. Емкужева, Ф. А. Темботова, Э. Ж. Темботова*

93

---

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Окислительные процессы и содержание иммунных комплексов в иммунокомпетентных органах гольцов бассейна Кроноцкого озера

*И. И. Гордеев, Д. В. Микряков, Н. И. Силкина, В. Р. Микряков, О. Ю. Бусарова*

102

Желтогорлая мышь (*Apodemus flavicollis* Muridae) — новый вид в фауне млекопитающих Ильменского заповедника (Челябинская обл., Южный Урал)

*Г. В. Оленев, О. Р. Гизулина, Е. Б. Григоркина*

108

---

# Contents

---

---

No. 1, 2022

---

---

## Biochemistry

Effect of Lipid Complex From Marine Red Algae *Ahnfeltia tobuchiensis* on the Metabolic Reactions of the Liver in Experimental Toxic Hepatitis

*V. G. Sprygin, N. F. Kushnerova, and S. E. Fomenko*

5

---

## Genetics

Principles of Nucleotide Sequences Identification ISSR Markers Spectra

*A. V. Bardukov and V. S. Artamonova*

15

---

## Plant Physiology

Colligative Effects of Solutions of Low-Molecular Sugars and Their Role in Plants at Hypothermia

*A. N. Deryabin and T. I. Trunova*

26

Regulation of Glutamate Dehydrogenase Activity in Corn Leaves (*Zea mays* L.) with Change of Light Mode

*A. T. Eprintsev, G. B. Anokhina, and D. N. Fedorin*

37

---

## Zoology

Spatial-typological Structure and Organization of Bird Communities of the Aldan Highlands

*E. V. Shemyakin and L. G. Vartapetov*

46

Natural Diversity and Phylogeny of Asian Red-Cheeked Squirrels (Rodentia, Sciuridae, *Dremomys*) in Eastern Indochina

*A. E. Balakirev, A. V. Abramov, Bui Xuan Phuong, and V. V. Rozhnov*

54

---

## Ecology

Metagenomics – A New Direction in Ecology

*M. V. Vecherskii, M. V. Semenov, A. A. Lisenkova, and A. A. Stepankov*

70

Vegetation and Soils of Tundra Landscapes in Pur-Taz Interfluvial Region

*E. A. Zarov, L. L. Golubyatnikov, E. D. Lapshina, and S. V. Loyko*

82

The Seasonal Variability of the Blood System Indicators of the House Mouse (*Mus musculus* L.) in the Central Caucasus Mountains

*M. M. Emkuzheva, F. A. Tembotova, and E. Zh. Tembotova*

93

---

## Short Communications

Oxidation Processes and Immune Complexes Content in the Immunocompetent Organs of Charr  
in the Kronotskoye Lake Basin

*I. I. Gordeev, D. V. Mikryakov, N. I. Silkina, V. R. Mikryakov, and O. Yu. Busarova*

102

Yellow-Necked Mouse (*Apodemus flavicollis* Muridae) – A New Species in the Mammal Fauna  
of the Il'men Reserve (Chelyabinsk Oblast, Southern Ural)

*G. V. Olenev, O. R. Gisullina, and E. B. Grigorkina*

108

---

УДК 577.125.8+615.322(272.4)

## ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ МОРСКОЙ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Ahnfeltia tobuchiensis* НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

© 2022 г. В. Г. Спрыгин\*, @, Н. Ф. Кушнерова\*, С. Е. Фоменко\*

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

@E-mail: vgs2006@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.

После доработки 06.06.2020 г.

Принята к публикации 06.06.2020 г.

Исследовано влияние липидного комплекса, выделенного из водно-этанольного экстракта таллома морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (ЛКА) на биохимические показатели крови и печени мышей при интоксикации четыреххлористым углеродом. Показано, что применение ЛКА оказывало выраженный антиоксидантный и гепатопротекторный эффект, который превосходил таковой у препарата сравнения “Эссенциале®” по способности восстанавливать массу животных, удельную массу печени, активность АЛАТ, показатели липидного обмена и снижать перекисное окисление липидов. Гепатопротекторный эффект ЛКА обусловлен действием входящих в его состав фосфолипидов и гликолипидов морского происхождения, характеризующихся высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот группы n-3.

**Ключевые слова:** *Ahnfeltia tobuchiensis*, морские липиды, n-3 ПНЖК, четыреххлористый углерод, гепатопротекторы, печень, липидный обмен, антиоксидантная система

**DOI:** 10.31857/S1026347022010140

Печень в организме человека и животных осуществляет важную роль в регуляции различных биохимических процессов, среди которых особо выделяются функции метаболизирования, секреции, хранения и детоксикации эндогенных и экзогенных ксенобиотиков (Madrigal-Santillan *et al.*, 2014). Наиболее часто повреждения печени реализуются через химические механизмы, приводящие к дегенеративным изменениям токсической природы. Ввиду важности функций, осуществляемых органом, заболевания печени представляют собой одну из главных угроз здоровью, оставаясь окончательно нерешенной проблемой во всем мире. По данным ВОЗ, смертность от заболеваний печени имеет устойчивую тенденцию к росту, и в ближайшие 10–20 лет вырастет в два раза. Поэтому лечение и профилактика заболеваний печени является одним из важнейших направлений современной медицины. Одной из групп лекарственных средств, которые используются для этих целей, являются гепатопротекторы. В связи с этим поиск эффективных и безвредных препаратов данной группы не теряет своей актуальности.

К числу наиболее хорошо изученных гепатопротекторов относятся эссенциальные фосфолипиды (ФЛ), в связи с этим в терапии гепатопато-

логий им отводится особое место (Ушкалова, 2003). Важным аспектом биологической активности, проявляемой ФЛ, являются их жирнокислотные заместители. В настоящее время основным источником получения препаратов эссенциальных ФЛ являются соевые бобы. Полученные из них субстанции содержат в качестве активного ингредиента полиненасыщенный фосфатидилхолин (1,2-дилинолеилфосфатидилхолин), в котором в качестве жирнокислотных остатков содержатся молекулы линолевой кислоты, относящейся к группе n-6, которые при окислении дают начало целому ряду активных метаболитов, способствующих развитию провоспалительных процессов в организме. В то же время показано, что жирные кислоты, относящиеся к группе n-3, в частности, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты, имеют большой потенциал применения для сохранения здоровья человека ввиду высокой эффективности при терапии различных патологий, включая атеросклероз, тромбоз, артрит, рак, а также различные заболевания печени (Jump *et al.*, 2015).

Одним из наиболее богатых источников получения n-3 кислот являются морские водоросли. Эти кислоты в значительных количествах входят

в состав полярных липидов водорослей — гликолипидов (ГЛ) и ФЛ (Хотимченко, 2003). Несмотря на то, что относительное содержание липидов в морских водорослях не так велико, большая прибрежная масса и быстрое самовозобновление определяет их как весьма важный источник этих функциональных метаболитов.

В качестве сырьевого источника биологически активных липидных комплексов большой интерес представляют собой красные водоросли, отряд Rhodophyta. Их отличает, с одной стороны, высокое содержание эйкозапентаеновой кислоты (Khotimchenko, Vaskovsky, 1990) в составе полярных липидов, а с другой — преобладающая доля фосфатидилхолина (ФХ) в составе фосфолипидной фракции липидов водоросли (Хотимченко, 2003). При этом известно, что ФХ является одним из основных структурных компонентов биологических мембран в организме животных и человека. Все это предполагает высокую фармакологическую активность липидов красных водорослей и, в частности, их гепатозащитное действие. В то же время исследований, посвященных изучению данной проблемы, в литературе почти не встречается, за исключением единичных работ (Bupesh *et al.*, 2012). Таким образом, представляется актуальным получение новых знаний о биологической активности липидной фракции красных водорослей. В качестве объекта исследования нами была выбрана промысловая морская красная водоросль *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kannoet Matsubara, Makienko), распространенная в морях Дальнего Востока (Титлянов, Титлянова, 2012), которая ранее не была исследована в данном аспекте.

Целью настоящей работы явилось изучение гепатозащитных свойств липидного комплекса, выделенного из водно-этанольного экстракта таллома морской красной водоросли *A. tobuchiensis* (Kannoet Matsubara, Makienko) при интоксикации четыреххлористым углеродом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы водоросли *A. tobuchiensis* собирали в августе—сентябре 2019 г. в заливе Петра Великого Японского моря (пролив Старка, о. Попова). Выборка водорослей составляла 100 талломов. Слоевища очищали от эпифитов и донного бентоса, промывали сначала морской, затем дистиллированной водой. После этого сырье отжимали и погружали в кипящую воду на 2 мин для инактивации ферментов. Обработанные таким способом водоросли сушили до суховоздушного состояния. Высушенный таллом измельчали с помощью лабораторной мельницы до размеров частиц 0.5—1 мм и экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л из 1 кг сухого сырья. Для выделения липидной составляющей экстракта и исследования ее состава,

экстракт предварительно освобождали от спирта путем упаривания под вакуумом на ротаторном испарителе при температуре не выше 37°C. Полученную маслообразную массу экстрагировали смесью хлороформ: метанол (2:1 по объему) в соответствии с общепринятым методом для выделения липидов из растительного и животного сырья (Folch *et al.*, 1957). Хлороформный экстракт промывали 0.73%-ным раствором хлористого калия в соотношении 1 : 0.2 (по объему). После разделения фаз хлороформный слой, содержащий липиды, отделяли на делительной воронке и упаривали под вакуумом на ротаторном испарителе ( $t < 37^\circ\text{C}$ ) до отсутствия запаха хлороформа. Общее содержание липидов определяли весовым методом. Стандартизацию липидной композиции экстракта *A. tobuchiensis* проводили по суммарному содержанию полярных липидов (гликолипиды и фосфолипиды), которые являются мембраноактивной фракцией и составляют 56% липидного комплекса. Острую токсичность полученного липидного комплекса, которую проводили по методу Кербера (Фисенко, 2000), составила более 2000 мг/кг, что позволяет отнести полученную субстанцию к 4 классу токсичности (как малоопасные).

Качественный анализ липидного комплекса осуществляли с помощью двумерной микротонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках 6 × 6 см с силикагелем марки “КСК”. Количество общих ГЛ определяли по методу Васковского и Хотимченко (Vaskovsky, Khotimchenko, 1982). Фракционное разделение ФЛ проводили, используя следующие системы растворителей: в первом направлении — хлороформ : метанол : аммиак (28%) (65 : 25 : 4 по объему), во втором — хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : вода (70 : 30 : 2.5 : 1 по объему) (Vaskovsky, Terekhova, 1979). Для проявления фракций ФЛ применяли молибдатный реактив (Vaskovsky *et al.*, 1975), для ГЛ — антроновый реагент (Van Gent *et al.*, 1973). Специфическое обнаружение липидов, содержащих аминогруппу (фосфатидилэтанолламин), обнаруживали 0.2%-ным раствором нингидрина в ацетоне (Rouser *et al.*, 1967), холинсодержащих — с помощью реактива Драгендорфа (Кейтс, 1975). ФЛ, содержащие гидроксильную группу (фосфатидилинозит, ФИ), обнаруживали с помощью периодатного реактива Шиффа (Кейтс, 1975). В качестве неспецифического реагента использовали 10%-ный раствор серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием пластинок до появления темных пятен. Количество общих ФЛ в экстракте и индивидуальных фракций на хроматограммах определяли спектрофотометрически с помощью универсального молибдатного реактива (Vaskovsky *et al.*, 1975).

Определение жирнокислотного состава липидного комплекса проводили методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Метилловые эфиры жир-

ных кислот (МЭЖК) получали переэтерификацией липидов по методу Карреу и Дюбак (Carreau, Dubaco, 1978), и очищали с помощью ТСХ, используя систему гексан : диэтиловый эфир (95 : 5 по объему). Зону МЭЖК удаляли с пластинки и элюировали с силикагеля гексаном. Элюат упаривали, МЭЖК перерастворяли в определенном объеме гексана и анализировали методом ГЖХ на газовом хроматографе “ЛХМ-2000” с пламенно-ионизационным детектором. ГЖХ-анализ МЭЖК проводили на капиллярной колонке (25–30 м), внутренний диаметр 0.25 мм. Анализ проводили при температуре 220°C с фазой HP-5-MS с 5%-ным фенилметилсилоксаном. Температура инжектора 180°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока 50 мл/мин. Идентификацию МЭЖК проводили сравнением времен удерживания со стандартами МЭЖК по значениям “углеродных чисел” (Christie, 1988). Результаты выражали в процентах от суммы жирных кислот.

Эксперимент проводили на беспородных белых мышах-самцах массой тела 25–30 г, содержащихся в стандартных условиях вивария и на стандартном рационе питания. Экспериментальную модель острого токсического гепатита (интоксикация четыреххлористым углеродом – ЧХУ) на животных (мышах) и введение препаратов осуществляли согласно руководству для проведения доклинических испытаний (Венгеровский и др., 2005). Для создания острого гепатита животным вводили подкожно (в дорсальную шейную складку) 2 мл/кг ЧХУ в 50%-ном масляном растворе (оливковое масло) ежедневно в течение 4 сут. Далее животные получали в течение 7 сут внутрижелудочно через зонд липидный комплекс анфельции в дозе 80 мг на кг массы животного, что соответствует рекомендованной терапевтической дозе для препаратов липидной природы (Венгеровский и др., 2005). Суммарное содержание мембранно-активной фракции полярных липидов составляло 45 мг в 80 мг липидного комплекса анфельции. Перед введением липидный комплекс разводили в вазелиновом масле соответствующего объема таким образом, чтобы необходимая доза исследуемого препарата содержалась в 0.2 мл. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество вазелинового масла. В качестве препарата сравнения использовали известный гепатопротектор “Эссенциале®” (“Sanofi”, Франция), изготовленный на основе фосфатидилхолина соевых бобов (производитель Германия), который вводили в виде раствора в вазелиновом масле тем же способом и в той же дозе.

Животные были разделены на 5 групп по 10 мышей в каждой: 1 группа – контроль; 2 группа – введение ЧХУ в течение 4 сут; 3-я группа – введение ЧХУ в течение 4 сут с последующей отменой в течение 7 сут; 4-я группа – введение ЧХУ в течение 4 сут с последующим введением липидного

комплекса *A. tobuchiensis* в течение 7 сут; 5-я группа – введение ЧХУ в течение 4 сут с последующим введением эссенциале в течение 7 сут. Животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением “Правил и международных рекомендаций Европейской комиссии по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 13 от 10.10.2018 г.).

Фармакологическую эффективность исследуемого липидного комплекса и препарата сравнения “Эссенциале” оценивали по их влиянию на весовые характеристики и биохимические показатели крови и печени в условиях интоксикации ЧХУ. В плазме крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) (“Ольвекс Диагностикум”, Россия). Состояние антиоксидантной системы животных оценивали по активности глутатионредуктазы (ГР) (Goldberg, Spooner, 1983), глутатионпероксидазы (ГП) (Burk *et al.*, 1980) в крови животных. В печени мышей исследовали активность супероксиддисмутазы (СОД) (Paoletti *et al.*, 1986), антирадикальную активность (АРА) (Re *et al.*, 1999), уровень восстановленного глутатиона (Г-SH) (Новгородцева и др., 2003) и содержание малонового диальдегида (МДА) (Гончаренко, Латинова, 1985). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Экстракты общих липидов из ткани печени готовили общепринятым методом (Folch *et al.*, 1957). Фракционное распределение ФЛ и их количественное определение проводили методом двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле (Svetashev, Vaskovsky, 1972; Vaskovsky *et al.*, 1975) с использованием системы растворителей, предложенных Роузером с соавт. (Rouser *et al.*, 1967). Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы ФЛ.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Instat 3.0 (Graph Pad Software Inc. USA, 2005), включающего функцию проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий для межгрупповых сравнений в зависимости от параметров распределения использовали параметрический *t*-тест множественных сравнений Даннета или непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, а также *t*-критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суммарное содержание общих липидов в экстракте составляло  $15.35 \pm 0.22$  мг/г сухой ткани, из которых гликолипиды составляли 30.30% ( $4.64 \pm 0.34$  мг/г сухой ткани), нейтральные липиды –

**Таблица 1.** Жирнокислотный состав липидного комплекса *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kannoet Matsubara, Makienko) (в % от суммы всех фракций)

Жирные кислоты	Показатели
14:0	2.00 ± 0.17
16:0	19.53 ± 0.65
18:0	4.97 ± 0.14
16:1 n-7	3.70 ± 0.11
18:1 n-7	1.50 ± 0.03
18:1 n-9	19.66 ± 1.68
18:2 n-6	1.70 ± 0.07
18:3 n-3	0.50 ± 0.02
20:4 n-6	26.24 ± 0.68
20:5 n-3	20.20 ± 0.43
Σ НЖК	26.50
Σ МНЖК	24.85
Σ ПНЖК	48.64
Σ n-6 ПНЖК	27.94
Σ n-3 ПНЖК	20.70
n-6/ n-3	1.35

Примечание. НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

44.0% ( $6.76 \pm 0.43$  мг/г сухой ткани), фосфолипиды – 25.7% ( $3.95 \pm 0.23$  мг/г сухой ткани). Среди нейтральных липидов в липидном комплексе преобладали триацилглицерины ( $43.45 \pm 2.35\%$ ). Также в его составе присутствовали моноацилглицерины + диацилглицерины ( $15.16 \pm 0.56\%$ ), свободные жирные кислоты ( $13.31 \pm 0.38\%$ ), свободные стерины ( $13.21 \pm 0.89\%$ ), эфиры стеринов ( $10.95 \pm 0.44\%$ ). Кроме неполярных липидов в составе липидного комплекса присутствуют четыре класса фосфолипидов: фосфатидилхолин ( $64.8 \pm 1.72\%$ ), фосфатидилглицерин ( $20.85 \pm 1.62\%$ ), фосфатидэтанолламин ( $8.20 \pm 0.12\%$ ), фосфатидилинозит ( $6.15 \pm 0.13\%$ ). Это согласуется с литературными данными (Kostetsky *et al.*, 2004). Фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилглицерин (ФГ) наряду с фосфатидилэтанолламином (ФЭ) являются наиболее значимыми структурными компонентами мембран, обеспечивающими структурно-пространственную организацию мембранного матрикса и функционирование мембранных структур.

Жирно-кислотный состав липидного комплекса экстракта *A. tobuchiensis* отличался высокой степенью ненасыщенности (табл. 1), что соответствует известным в литературе данным (Fomenko *et al.*, 2019). Из насыщенных жирных кислот (НЖК) доминировала пальмитиновая кислота (16:0), содержание которой составляло 20.0%. Мононенасыщенные жирные кислоты были представлены паль-

митолеиновой (16 : 1 n-7) и олеиновой (18 : 1 n-9) кислотами, суммарное содержание которых составляло 24.9%. Среди основных идентифицированных жирных кислот преобладали полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Следует отметить, что их содержание приближалось к 50% от общей суммы жирных кислот. Характерной особенностью красных водорослей является высокое содержание эйкозапентаеновой и арахидоновой кислот (Хотимченко, Гусарова, 2004). В исследуемом образце соотношение арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот или n-6/n-3 составляло 1.35, что является важным показателем, отражающим фармакологический потенциал липидного комплекса, как источника кислот n-3. Согласно рекомендации ВОЗ, при величине данного коэффициента в продуктах питания меньше 10, можно говорить об использовании их для предотвращения нарушений сердечно-сосудистой и гепатобилиарной систем.

В основе механизма гепатотоксичности ЧХУ лежит формирование оксидативного стресса, инициируемого свободнорадикальными метаболитами, включающими трихлорметил- и трихлорметилпероксил радикалы, которые образуются в процессе восстановительной дегалоизации с участием СУР2Е1 (Weber *et al.*, 2003). Трихлорметил-радикал образует ковалентные связи с компонентами клетки, такими как Г-SH, что приводит к его иттошению. При этом пероксильное производное инициирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) с последующим образованием вторичных продуктов перекисации, таких как МДА. В результате нарушается пространственный матрикс и целостность биологических мембран с последующей гибелью клеток (Boll *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003).

После 4-х суток введения ЧХУ (2 группа) масса животных снизилась на 42% ( $19.43 \pm 0.57$  г против  $33.40 \pm 0.88$  г в контроле;  $p < 0.001$ ) при одновременном увеличении удельной массы печени на 34% ( $7.98 \pm 0.30$  г/100 г массы тела против  $5.96 \pm 0.20$  г в контроле;  $p < 0.001$ ). В печени отмечалась сплошная зернистость жировых включений, т.е. проявлялась выраженная жировая инфильтрация, характерная при интоксикации ЧХУ.

Изменения биохимических параметров в крови и печени мышей представлены в табл. 2. Как видно из таблицы количество общих липидов в печени превышало контрольный уровень в три раза ( $p < 0.001$ ). О развитии токсического гепатита в данной экспериментальной модели свидетельствует повышение активности в крови маркерного фермента печени АлАТ в 4 раза ( $p < 0.001$ ), обусловленное выходом фермента из гепатоцитов в кровь в результате нарушения целостности мембранного матрикса. Увеличение количества МДА в 2.9 раза ( $p < 0.001$ ) при введении ЧХУ отражает

**Таблица 2.** Влияние липидного комплекса *Ahnfeltia tobuchiensis* и эссенциале на биохимические показатели плазмы крови и печени мышей после интоксикации четыреххлористым углеродом ( $M \pm m$ )

Показатели	1 группа Контроль (интактные)	2 группа ЧХУ	3 группа Отмена ЧХУ	4 группа Отмена ЧХУ + + анфельция	5 группа Отмена ЧХУ + + эссенциале
Общие липиды, мг/г	20.37 ± 1.03	80.48 ± 2.37 <sup>3</sup>	69.37 ± 1.93 <sup>3</sup>	23.47 ± 1.32 <sup>B</sup>	28.35 ± 1.24 <sup>3, B, *</sup>
АлАТ, Ед/л	25.17 ± 1.03	125.24 ± 3.67 <sup>3</sup>	72.36 ± 2.20 <sup>3</sup>	26.53 ± 1.24 <sup>B</sup>	35.87 ± 1.36 <sup>3, B, ***</sup>
Малоновыйдиальдегид, нмоль/г	160 ± 21	473 ± 43 <sup>3</sup>	392 ± 26 <sup>3</sup>	200 ± 23 <sup>B</sup>	252 ± 18 <sup>2, B</sup>
Глутатионредуктаза, нмоль/мин/мл плазмы	88.21 ± 4.26	39.68 ± 3.25 <sup>3</sup>	50.32 ± 2.54 <sup>3</sup>	85.33 ± 2.86 <sup>B</sup>	65.31 ± 4.07 <sup>3, B, ***</sup>
Глутатионпероксидаза, нмоль/мин/мл плазмы	139 ± 5	110 ± 4 <sup>3</sup>	106 ± 6 <sup>3</sup>	161 ± 4 <sup>2, B</sup>	134 ± 5 <sup>B, ***</sup>
Супероксидсмутаза, Ед/мг белка	21.43 ± 0.52	12.88 ± 0.43 <sup>3</sup>	14.56 ± 0.58 <sup>3</sup>	21.78 ± 0.68 <sup>B</sup>	19.56 ± 0.63 <sup>1, B, *</sup>
Восстановленный глутатион, мкмоль/г	4.70 ± 0.15	3.13 ± 0.14 <sup>3</sup>	2.81 ± 0.11 <sup>3</sup>	5.11 ± 0.20 <sup>B</sup>	4.46 ± 0.10 <sup>B, *</sup>
Антирадикальная активность, мкмольтролокса/г	6.70 ± 0.31	3.43 ± 0.19 <sup>3</sup>	3.68 ± 0.21 <sup>3</sup>	6.33 ± 0.30 <sup>B</sup>	5.47 ± 0.28 <sup>2, B, *</sup>

Примечание. Здесь и в табл. 3 различия статистически значимы при: <sup>1, a, \*</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>2, б</sup>  $p < 0.01$ ; <sup>3, B, \*\*\*</sup>  $p < 0.001$ . Цифры справа – сравнение с контрольной группой, буквы справа – сравнение с 3-й группой (отмена), звездочки справа – сравнение с 4-й группой.

высокую активность перекисного окисления жирных кислот мембранных ФЛ, что также обуславливает повышение проницаемости мембран гепатоцитов.

В результате увеличения интенсивности свободно-радикальных процессов отмечается рассогласование параметров системы антиоксидантной защиты. Это выражается в снижении активности ферментов глутатионового звена – ГР на 55% ( $p < 0.01$ ) и ГП на 21% ( $p < 0.001$ ) в крови на фоне снижения в печени пула Г-SH на 33% ( $p < 0.01$ ) и активности СОД на 40% ( $p < 0.001$ ). Полученные результаты указывают на истощение антиоксидантной системы защиты организма, что согласуется со снижением уровня АРА печени на 49% ( $p < 0.001$ ).

В фосфолипидном спектре печени под действием токсического агента и нарастающей активности процессов ПОЛ наблюдалось достоверное снижение содержания основных структурных фосфолипидов – ФХ на 5% ( $p < 0.05$ ) и ФЭ на 12% ( $p < 0.001$ ) (табл. 3). Одновременно отмечалось увеличение их лизоформ – лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 70% ( $p < 0.001$ ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 58% ( $p < 0.001$ ). Известно, что при активации свободнорадикальных процессов, в первую очередь, подвергаются окислению ПНЖК ФЛ мембран, что и вызывает уменьшение содержания их основных структурных компонентов, в частности, ФХ и ФЭ. Накопление лизофракций ФЛ в мембране гепатоцитов способствует повышению ее проницаемости. Увеличение количе-

ства лизофракций обусловлено не только усилением процессов ПОЛ, но и повышением активности фосфолипаз (Ryu *et al.*, 2000) в результате нарушения кальциевого обмена под действием ЧХУ. Данный факт подтверждается увеличением количества фосфатидной кислоты (ФК) в два раза ( $p < 0.001$ ), связанное с активацией фосфолипазы D при интоксикации ЧХУ (Day *et al.*, 1993). Увеличение содержания данного фосфолипида в мембранном матриксе, учитывая его избирательную ионофорную функцию по отношению к кальцию, приводит к росту потока данного катиона внутрь гепатоцитов, что способствует нарушению его обмена. Уменьшение количества фосфатидилинозита (ФИ) на 23% ( $p < 0.05$ ) и фосфатидилсерина (ФС) на 17% ( $p < 0.01$ ), являющихся метаболически активными фракциями, предполагает снижение активности мембраносвязанных транспортных АТФаз (Cognelius *et al.*, 2015). Компенсаторным механизмом на повышение проницаемости мембран является увеличение количества сфингомиелина (СМ) на 52% ( $p < 0.001$ ), являющегося совместно с холестерином ее стабилизатором. Снижение количества дифосфатидилглицерина (ДФГ) на 75% ( $p < 0.001$ ), являющегося маркером митохондрий, определяет нарушения в системе функционирования ферментов дыхательной цепи и угнетение процессов синтеза АТФ.

Через 7 сут после отмены ЧХУ (3 группа) в печени и крови подопытных животных большинство биохимических параметров не нормализовалось,

**Таблица 3.** Влияние липидного комплекса *Ahnfeltia tobuchiensis* и эссенциале на содержание фосфолипидных фракций печени мышей после интоксикации четыреххлористым углеродом ( $M \pm m$ )

Фракции	1 группа Контроль (интактные)	2 группа ЧХУ	3 группа Отмена ЧХУ	4 группа Отмена ЧХУ + + анфельция	5 группа Отмена ЧХУ + + эссенциале
Фосфатидилхолин	44.65 ± 0.70	42.35 ± 0.65 <sup>1</sup>	40.47 ± 0.53 <sup>3</sup>	44.33 ± 0.66 <sup>B</sup>	44.77 ± 0.51 <sup>B</sup>
Лизофосфатидилхолин	2.37 ± 0.27	4.03 ± 0.31 <sup>3</sup>	5.60 ± 0.26 <sup>3</sup>	2.48 ± 0.24 <sup>B</sup>	3.25 ± 0.33 <sup>1, B</sup>
Сфингомиелин	6.87 ± 0.35	10.42 ± 0.68 <sup>3</sup>	11.00 ± 0.59 <sup>3</sup>	7.56 ± 0.46 <sup>B</sup>	7.98 ± 0.40 <sup>1, B</sup>
Фосфатидилэтаноламин	26.80 ± 0.48	23.64 ± 0.51 <sup>3</sup>	23.51 ± 0.53 <sup>3</sup>	26.96 ± 0.49 <sup>B</sup>	24.89 ± 0.61 <sup>1, *</sup>
Лизофосфатидилэтаноламин	3.49 ± 0.23	5.53 ± 0.31 <sup>3</sup>	5.83 ± 0.29 <sup>3</sup>	3.33 ± 0.21 <sup>B</sup>	3.87 ± 0.25 <sup>B</sup>
Фосфатидилсерин	5.34 ± 0.19	4.45 ± 0.23 <sup>2</sup>	4.06 ± 0.21 <sup>3</sup>	5.40 ± 0.28 <sup>B</sup>	5.10 ± 0.26 <sup>B</sup>
Фосфатидилинозит	6.14 ± 0.43	4.73 ± 0.51 <sup>1</sup>	4.65 ± 0.39 <sup>1</sup>	6.27 ± 0.48 <sup>a</sup>	6.30 ± 0.42 <sup>a</sup>
Фосфатидная кислота	1.38 ± 0.15	4.12 ± 0.28 <sup>3</sup>	4.28 ± 0.31 <sup>3</sup>	1.35 ± 0.19 <sup>B</sup>	2.00 ± 0.20 <sup>1, B, *</sup>
Дифосфатидилглицерин	2.96 ± 0.14	0.73 ± 0.04 <sup>3</sup>	0.60 ± 0.11 <sup>3</sup>	2.32 ± 0.25 <sup>1, B</sup>	1.84 ± 0.16 <sup>3, B</sup>

что свидетельствует о продолжающемся токсическом стрессе и недостаточности собственных защитных сил организма противостоять действию токсиканта. Известно, что значительная часть ЧХУ, попадая в организм, депонируется в жировой ткани с периодом полувыведения более суток (Sanzgiri *et al.*, 1997). Это позволяет предположить, что при отмене токсиканта, выделение депонированного в жировой ткани ЧХУ обеспечивает дальнейшее развитие токсической патологии. Масса тела животных оставалась на 30% ниже контроля ( $23.50 \pm 1.95$  г;  $p < 0.001$ ), при этом удельная масса печени была достоверно выше на 21% ( $7.22 \pm 0.28$  г/100 г массы тела;  $p < 0.01$ ). При осмотре печени наблюдали выраженную жировую инфильтрацию, что подтверждается увеличением количества общих липидов в 2.4 раза ( $p < 0.001$ ) (табл. 2) по сравнению с таковым в контроле. О сохранении токсического гепатита в данной группе животных свидетельствует достоверно высокая активность маркерного фермента печени АЛАТ (в 1.87 раза;  $p < 0.001$ ) и увеличение количества МДА в 2.4 раза ( $p < 0.001$ ), что определяет продолжающийся процесс ПОЛ. Активность ГР и ГП оставалась сниженной на 43 и 24% ( $p < 0.001$ ), соответственно, что привело к дальнейшему истощению пула Г-SH (снижение на 40%;  $p < 0.001$ ). Сохранялась более низкая, чем у интактных животных, активность СОД (на 32%;  $p < 0.001$ ) и значение уровня АРА (на 45%,  $p < 0.001$ ). Анализ фракционного состава ФЛ печени в период отмены ЧХУ показал, что содержание ЛФХ превышало контрольный уровень в 2.4 раза ( $p < 0.001$ ), а содержание ЛФЭ – на 67% ( $p < 0.001$ ) (табл. 3). Это свидетельствует о дальнейшем усилении ПОЛ и активности фосфолипаз, на что указывает и рост содержания ФК в 3.1 раза ( $p < 0.001$ ) по сравнению с контро-

лем. Содержание основного структурного компонента мембран гепатоцитов – ФХ стало еще ниже, чем таковое во 2-ой группе, а по сравнению с контролем достоверно снизилось на 10% ( $p < 0.01$ ). Также еще ниже, чем во 2-ой группе, было количество ФИ, ФС иДФГ, необходимых для функционирования мембраносвязанных ферментов. Обращает на себя внимание тот факт, что количество СМ стало еще выше (на 60% по сравнению с контролем,  $p < 0.01$ ), обусловленное компенсаторной реакцией на нарушение проницаемости мембран. Данные по анализу исследованных биохимических параметров печени указывает на продолжающиеся и углубляющиеся нарушения метаболических реакций даже в отсутствии поступления токсического агента (период отмены).

При введении животным липидного комплекса анфельции в период отмены ЧХУ (4 группа) наблюдалось восстановление исследуемых биохимических показателей до контрольных значений. Масса тела мышей составляла  $34.50 \pm 1.52$  г, а удельная масса печени –  $5.68 \pm 0.14$  г/100 г массы тела. В то же время при сравнении полученных результатов с таковыми в 3-й группе (отмена токсиканта) отмечалось снижение количества общих липидов печени на 66% ( $p < 0.01$ ), МДА – на 49% ( $p < 0.01$ ) на фоне повышения АРА на 72% ( $p < 0.001$ ), что указывает на снижение свободно-радикальных реакций в организме мышей. Активность СОД возросла на 50% ( $p < 0.001$ ), активность ферментов глутатионового звена (ГР и ГП) увеличилась на 70 и 52% ( $p < 0.01$ ), соответственно, а содержание Г-SH – в 1.8 раза ( $p < 0.01$ ). В то же время активность ГП превышала контрольные значения на 16% ( $p < 0.05$ ), а ГР – на 9%. Данный эффект может быть обусловлен способностью п-3 кислот, в частности эйкозапентаеновой кислоты,

активировать индукцию СОД в печени в условиях оксидативного стресса (Garrel *et al.*, 2012), а также предохранять от окисления пул восстановленного глутатиона (Patten *et al.*, 2013).

Введение липидного комплекса анфельции в период отмены сопровождалось снижением количества лизофракций фосфолипидов: ЛФХ – на 56% ( $p < 0.001$ ) и ЛФЭ – на 43% ( $p < 0.001$ ), а также СМ – на 31% ( $p < 0.001$ ). По нашему мнению, данный феномен связан со способностью  $n-3$  кислот снижать активность фосфолипаз (Asztalos *et al.*, 2016). Полученные результаты указывают на восстановление структурно-функциональных свойств мембран гепатоцитов и нормализацию проницаемости липидным комплексом анфельции, что определяет его как мембраностабилизатор. В пользу этого свидетельствует сохранение активности маркерного фермента печени АлАТ на уровне контроля, а по сравнению с 3-й группой следует отметить снижение активности в 3 раза ( $p < 0.01$ ).

При введении препарата сравнения эссенциале (5-я группа) направленность изменений изученных биохимических показателей была сопоставима с таковой у животных 4-й группы, но отличалась по степени выраженности и достоверным отличиям ряда показателей от контрольных величин. Масса тела животных и удельная масса печени статистически достоверно не отличались от контроля и составляли  $31.14 \pm 1.55$  г и  $6.09 \pm 0.16$  г/100 г массы тела, соответственно. В то же время, содержание общих липидов превышало таковое у животных контрольной группы на 20% ( $p < 0.001$ ), что в совокупности с наличием жировых включений в печени определяло сохранение жировой инфильтрации. Также отмечалась сниженная активность ГР в крови (на 26%,  $p < 0.001$ ) и АРА (на 18%,  $p < 0.01$ ) в печени. Содержание МДА превышало контрольные показатели на 58% ( $p < 0.001$ ), что указывает на сохраняющуюся активность свободно-радикальных процессов. Среди фосфолипидных фракций следует отметить увеличенные относительно контроля количества ЛФЭ и ФК на 37 и 45% ( $p < 0.001$ ), соответственно, что определяет сохраняющуюся повышенную активность фосфолипаз. Кроме того, сохранялось достоверно более высокое содержание СМ (на 16%,  $p < 0.05$ ) и низкоеДФГ (на 45%,  $p < 0.001$ ).

Сравнивая полученные величины изученных биохимических параметров между 4-й и 5-й группами (табл. 3) следует отметить, что при введении эссенциале оставались повышенными количество общих липидов печени на 21% ( $p < 0.05$ ) и активность АлАТ на 35% ( $p < 0.001$ ), чем таковые при введении липидного комплекса анфельции. В системе антиоксидантной защиты активности СОД, ГР и ГП были достоверно снижены на 10%, 23% и 17% соответственно. Также были ниже на 14% ( $p < 0.05$ ) значения АРА. Следует отметить бо-

лее низкое значение ФЭ (снижение на 8%,  $p < 0.05$ ) и более высокое значение ФК (увеличение на 48%,  $p < 0.05$ ).

Введение липидного экстракта из анфельции и эссенциале способствовало коррекции нарушений, вызванных интоксикацией ЧХУ. Биохимический механизм, по нашему мнению, определяется особенностью входящих в их состав эссенциальных липидов, доминирующим из которых является ФХ. Этот фосфолипид отличается высокой степенью биодоступности, в результате чего более 50% экзогенного ФХ депонируется в клеточных мембранах печени (Oette *et al.*, 1995), что и обуславливает его высокий терапевтический потенциал.

В нашем исследовании гепатозащитное действие липидного комплекса анфельции имело преимущества перед препаратом сравнения эссенциале. Основной причиной наблюдаемого фармацевтического эффекта является то, что биологической активности полиненасыщенного фосфатидилхолина соевых бобов, входящего в состав эссенциале, противопоставлен многокомпонентный комплекс полярных липидов из экстракта таллома анфельции. Большая эффективность комплекса обусловлена не только наличием в его составе известных классов ФЛ морского происхождения, обладающих репаративными свойствами, но также комплексом ГЛ, которые представляют собой важный источник ПНЖК. Жирно-кислотный состав липидного комплекса анфельции отличается высокой степенью ненасыщенности за счет присутствия в своем составе значительных количеств ПНЖК семейства  $n-3$  (эйкозапентаеновая; 22:5) и  $n-6$  (арахидоновая; 20:4), что согласуется с известными литературными данными (Kostetsky *et al.*, 2004). Эти жирные кислоты необходимы для преобразования лизофосфолипидов в основные структурные компоненты мембран – ФХ и ФЭ. ПНЖК способны напрямую включаться в структурные процессы восстановления основных фосфолипидов плазматических мембран гепатоцитов, так как в отличие от ПНЖК 18:3  $n-3$  ( $\alpha$ -линоленовая) и 18:4  $n-3$  (стеариновая), входящих в состав эссенциале, не требуют предварительного процесса элонгации и десатурации и, которые ввиду крайней ограниченности взаимного превращения в организме человека, не вносят значимый вклад в пул длинноцепочечных  $n-3$  кислот. Кроме этого известно, что эйкозапентаеновая кислота является эффективным антиоксидантом, способным поглощать пероксил-анион радикал в два раза активнее, чем линолевая кислота (Richard *et al.*, 2008), содержание которой в эссенциале составляет до 70%. Также из литературы известно, что  $n-3$  кислоты способны напрямую снижать экспрессию прооксидантного фермента системы цитохрома P450–CYP2E1 (Huang *et al.*, 2015). Этот фермент является центральным звеном при обра-

зовании свободных радикалов из ЧХУ, а также при окислении арахидоновой кислоты с образованием провоспалительных метаболитов. При этом n-3 кислоты активируют биосинтез антиоксидантных белков по пути Nrf2/НО-1 (Maksymchuk *et al.*, 2015) и индукцию супероксиддисмутазы (Garrel *et al.*, 2012). В результате при оксидативном стрессе n-3 ПНЖК препятствуют образованию супероксиданионов и гидроксил-радикалов, а также восстанавливают пул низкомолекулярных антиоксидантов, таких как Г-SH (Patten *et al.*, 2013).

Важным аспектом гепатозащитного действия n-3 кислот является, с одной стороны, их способность преимущественно встраиваться в фосфолипиды мембран, вытесняя арахидоновую кислоту (Maksymchuk *et al.*, 2015), более подверженную липопероксидации, а с другой предотвращать ее окисление в провоспалительные метаболиты по пути циклооксигеназы-2 и липоксигеназы-5 (Gonzalez-Periz *et al.*, 2006).

\* \* \*

Показано, что комплекс липидов из морской красной водоросли *A. tobuchiensis*, содержащий мембрано-активную фракцию фосфо- и гликолипидов с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот семейства n-3, обладает выраженным антиоксидантным и гепатозащитным эффектом в условиях поражения печени ЧХУ. Оно выражается в восстановлении параметров системы антиоксидантной защиты, включая нормализацию активности СОД, ГП, ГР и восстановлении пула Г-SH, а также в снижении уровня перекисного окисления липидов и восстановлении антирадикальной активности печени. Кроме этого, липиды из экстракта анфельции способствует нормализации фракционного состава фосфолипидов мембран гепатоцитов и торможению выхода в кровь печеночных ферментов. Исследуемый комплекс липидов из анфельции не только не уступает по своей эффективности эталонному гепатопротектору “Эссенциале”, но и превосходит его по способности восстанавливать массу животных, удельную массу печени, активность АЛТ, показатели липидного обмена и процессов перекисного окисления, более эффективно устраняя последствия токсического стресса.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0271-2019-0004 (№ государственной регистрации АААА-А17-117030110038-5).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств.

М.: ОАО “Издательство “Медицина”, 2005. С. 683–691.

Гончаренко М.С., Латинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лабораторное дело. 1985. № 1. Р. 60–61.

Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 324 с.

Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы “Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита” в биологических жидкостях. Владивосток: ДВГУ. 2003. 80 с.

Титлянов Э.А., Титлянова Т.В. Морские растения стран Азиатско-Тихоокеанского региона, их использование и культивирование. Владивосток: Дальнаука. 2012. 377 с.

Ушкалова Е.А. Место эссенциальных фосфолипидов в современной медицине // Фарматека. 2003. № 10. С. 40–46.

Фисенко В.П. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. 398 с.

Хотимченко С.В. Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Структура, распределение, анализ. Владивосток: Дальнаука. 2003. 230 с.

Хотимченко С.В., Гусарова И.С. Красные водоросли залива Петра Великого как источник арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот // Биология моря. 2004. Т. 30. № 3. С. 215–218.

Asztalos I.B., Gleason J.A., Sever S., Gedik R., Asztalos B.F., Horvath K.V., Dansinger M.L., Lamou-Fava S., Schaefer E.J. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular disease risk factors: a randomized clinical trial // Metab. Clin. Exp. 2016. V. 65. № 11. P. 1636–1645.

Boll M., Weber L.W., Becker E., Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites // Z. Naturforsch. C. 2001. V. 56. № 7–8. P. 649–659.

Bradford M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.

Bupesh G., Amutha C., Vasanth S., Manoharan N., Raja R.S., Krishnamoorthy R., Subramanian P. Hepatoprotective efficacy of hypnea muciformis ethanolic extract on CCl<sub>4</sub> induced toxicity in rats // Braz. Arch. Biol. Technol. 2012. V. 55. № 6. P. 857–863.

Burk R.F., Lawrence R.A., Lane J.M. Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. Effect of selenium deficiency // J. Clin. Invest. 1980. V. 65. № 5. P. 1024–1031.

Carreau J.P., Dubaco J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // J. Chromatogr. A. 1978. V. 151. № 3. P. 384–390.

Christie W.W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography A reappraisal // J. Chromatogr. A. 1988. V. 447. P. 305–314.

- Cornelius F., Habeck M., Kanai R., Toyoshima C., Karlsh S.J.D. General and specific lipid-protein interactions in Na,K-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes*. 2015. V. 1848. № 9. P. 1729–743.
- Day C.P., Burt A.D., Brown A.S.M., Bennett M.K., Farrell D.J., James O.F.W., Yeaman S.J. Plasma-membrane form of phosphatidate phosphohydrolase – a possible role in signal-transduction during liver fibrogenesis // *Clin. Sci*. 1993. V. 85. № 3. P. 281–287.
- Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem*. 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
- Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Drugova E.S., Lesnikova L.N., Merzlyakov V.Y., Momot T.V. Lipid composition, content of polyphenols, and antiradical activity in some representatives of marine algae // *Russ. J. Plant Physiol*. 2019. V. 66. № 6. P. 942–949.
- Garrel C., Alessandri J.-M., Guesnet P., Al-Gubory K.H. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012. V. 44. № 1. P. 123–131.
- Goldberg D.M., Spooner R.J. Assay of glutathione reductase // *Method. Enzymat. Anal.* – Deerfield Beach: Verlog Chemie. 1983. V. 3. P. 258–265.
- Gonzalez-Periz A., Planaguma A., Gronert K., Miquel R., Lopez-Parra M., Titos E., Horrillo R., Ferre N., Deulofeu R., Arroyo V., Rodes J., Claria J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA // *Faseb J*. 2006. V. 20. № 14. P. 1844–1855.
- Huang W., Wang B., Li X.Y., Kang J.X. Endogenously elevated n-3 polyunsaturated fatty acids alleviate acute ethanol-induced liver steatosis // *Biofactors*. 2015. V. 41. № 6. P. 453–462.
- Jump D.B., Depner C.M., Tripathy S., Lytle K.A. Potential for dietary omega-3 fatty acids to prevent nonalcoholic fatty liver disease and reduce the risk of primary liver cancer // *Adv. Nutr*. 2015. V. 6. № 6. P. 694–702.
- Khotimchenko S.V., Vaskovsky V.E. Distribution of C20 polyenoic fatty-acids in red macrophytic algae // *Bot. Mar*. 1990. V. 33. № 6. P. 525–528.
- Kostetsky E.Y., Goncharova S.N., Sanina N.M., Shnyrov V.L. Season influence on lipid composition of marine macrophytes // *Bot. Mar*. 2004. V. 47. № 2. P. 134–139.
- Madrigal-Santillan E., Madrigal-Bujaidar E., Alvarez-Gonzalez I., Sumaya-Martinez M.T., Gutierrez-Salinas J., Bautista M., Morales-Gonzalez A., Gonzalez-Rubio M., Aguilar-Faisal J.L., Morales-Gonzalez J.A. Review of natural products with hepatoprotective effects // *World J. Gastroenterol*. 2014. V. 20. № 40. P. 14787–14804.
- Maksymchuk O., Shysh A., Chashchyn M., Moibenko O. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids alter fatty acid composition of lipids and CYP2E1 expression in rat liver tissue // *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 2015. V. 85. № 5–6. P. 322–328.
- Oette K., Kuhn G., Romer A., Niemann R., Gundermann K.J., Schumacher R. Absorption of di-linoleoylphosphatidylcholine after oral administration // *Arzneimittel-Forschung*. 1995. V. 45. № 8. P. 875–879.
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide-dismutase activity in tissue-extracts // *Anal. Biochem*. 1986. V. 154. № 2. P. 536–541.
- Patten A.R., Brocardo P.S., Christie B.R. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure // *J. Nutr. Biochem*. 2013. V. 24. № 5. P. 760–769.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radic. Biol. Med*. 1999. V. 26. № 9–10. P. 1231–1237.
- Richard D., Kefi K., Barbe U., Bausero P., Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants // *Pharmacol. Res*. 2008. V. 57. № 6. P. 451–455.
- Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glicolipids // *Lipid Chromatographic Analysis*. N.Y.: Dekker, 1967. V. 1. P. 99–162.
- Ryu A., Itabe H., Mutoh M., Kudo I., Arai H., Inoue K. Enhanced degradation of phospholipids by phospholipase A2 in liver of carbon tetrachloride-treated rat // *J. Health Sci*. 2000. V. 46. № 4. P. 275–281.
- Sanzgiri U.Y., Srivatsan V., Muralidhara S., Dallas C.E., Bruckner J.V. Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1997. V. 143. № 1. P. 120–129.
- Svetachev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // *J. Chromatogr*. 1972. V. 67. № 2. P. 376–3788.
- Van Gent C.M., Roseleur O.J., Van Der Bijl P. The detection of cerebrosides on thin-layer chromatograms with an anthrone spray reagent // *J. Chromatogr. A*. 1973. V. 85. № 1. P. 174–176.
- Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V. HPTLC of polar lipids of algae and other plants // *J. High Resol. Chromatogr*. 1982. V. 5. № 11. P. 635–636.
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr*. 1975. V. 114. № 1. P. 129–141.
- Vaskovsky V.E., Terekhova T.A. HPTLC of Phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol // *J. Sep. Sci*. 1979. V. 2. № 11. P. 671–672.
- Weber L.W.D., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model // *Crit. Rev. Toxicol*. 2003. V. 33. № 2. P. 105–136.

## **Effect of Lipid Complex From Marine Red Algae *Ahnfeltia tobuchiensis* on the Metabolic Reactions of the Liver in Experimental Toxic Hepatitis**

**V. G. Sprygin<sup>1, #</sup>, N. F. Kushnerova<sup>1</sup>, and S. E. Fomenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute FEBRAS, Vladivostok, 690041 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: vgs2006@mail.ru*

The effect of the lipid complex isolated from water-ethanol extract of thallus from the species red seaweed *Ahnfeltia tobuchiensis* (LCA) was studied on the biochemical parameter of blood and liver of mice at carbon tetrachloride impact. The administration of LCA was shown to offer a pronounced antioxidant and hepatoprotective effect, which exceeded that of “Essentiale®” referenced hepatoprotector in its ability to restore animal weight, specific liver mass, A1AT activity, lipid metabolism and reduce lipid peroxidation. The hepatoprotective effect of LCA is due to the action of its constituent phospholipids and glycolipids of marine origin, characterized by a high content of polyunsaturated fatty acids of group n-3.

*Keywords:* *Ahnfeltia tobuchiensis*, marine lipids, n-3 PUFA, carbone tetrachloride, hepatoprotectors, liver, lipids metabolism, antioxidant system

## ПРИНЦИПЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В СОСТАВЕ СПЕКТРОВ ISSR-МАРКЕРОВ

© 2022 г. Н. В. Бардуков\*, @, В. С. Артамонова\*

\*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,  
Ленинский проспект, д. 33, Москва, 119071 Россия

@E-mail: bardukv-nikolaj@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2020 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

Разработан алгоритм для теоретического прогнозирования нуклеотидных последовательностей, амплифицирующихся в результате ISSR-PCR, на примере секвенированного генома лошади. Экспериментально показано, что теоретически предсказанные последовательности присутствуют в реальном электрофоретическом спектре ампликонов. Обсуждаются перспективы применения разработанного подхода для расшифровки спектров анонимной амплификации.

**Ключевые слова:** ISSR-маркеры, анонимная амплификация, *Equus caballus*, секвенированный геном, ПЦР *in silico*

**DOI:** 10.31857/S102634702201005X

Системы геномного сканирования, т.е. одно-временного анализа множества локусов, очень востребованы. В основном их создают на основе SNP-чипов (Kulbrock *et al.*, 2013; Porto-Neto *et al.*, 2013), хотя более простыми и доступными являются системы, основанные на принципе анонимной амплификации, в частности, ISSR-анализ (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994). При использовании в ПЦР праймера, комплементарного какому-либо микросателлитному мотиву и имеющего “якорные” нуклеотиды на 3'-конце, на тестируемой ДНК-матрице синтезируется набор ампликонов, который различается у представителей разных видов, пород (сортов), и даже у отдельных животных (растений). Это позволяет сравнивать между собой виды, популяции (породы, сорта), отдельных особей (Basha, Sujatha, 2007; Воронкова и др., 2011; Столповский, 2013; Al-Ameri *et al.*, 2016; Kalia *et al.*, 2017).

Однако многие исследователи скептически относятся к работе с такими системами, поскольку остается неизвестным, из каких участков генома происходят ампликоны, составляющие ISSR-спектр, и чем обусловлен выявляемый полиморфизм (Банникова, 2004).

С другой стороны, несмотря на наличие объективных недостатков, данный тип ДНК-маркеров востребован и в настоящее время. Наибольшее количество исследований, выполняемых с помощью ISSR-анализа, лежит в области изучения генетики растений. Они востребованы при селекции, а также

для оценки разнообразия в генофондах диких видов (Дорогина и др., 2019; Степанов и др., 2019; Kim *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Продолжаются, хотя и с меньшей интенсивностью, исследования генетики животных. В частности, в последнее время ISSR-маркеры применяли при изучении азиатских слонов (Kriangwanich *et al.*, 2018), псовых (Глазко и др., 2020), искусственно выведенных пород и природных популяций рыб (Пелеева и др., 2018). Имеются работы, объектами которых становились лошади. Так, с помощью ISSR-анализа изучали особенности генетики чистокровных лошадей арабской породы (Sheikh *et al.*, 2018), а в работе (Донт и др., 2018) с помощью ISSR-маркеров были найдены локусы, характерные для лошадей траккененской, тяжеловозных и рысистых пород. Авторы последней работы рекомендуют использовать разработанную ими систему для определения породной принадлежности и при создании генетических паспортов животных. Таким образом, можно утверждать, что ISSR-анализ до сих пор имеет свою нишу и активно используется исследователями в разных странах.

Однако лишь в настоящее время, когда стали известны полные последовательности геномов животных тех видов, которых изучают методами анонимной амплификации, стало возможно с помощью *in silico* PCR (моделирование результатов ПЦР по секвенированным последовательностям) рассчитать ISSR-спектры ампликонов и сравнить теоретически ожидаемые спектры с эксперимен-

тальными. Такой способ позволяет понять, какие именно нуклеотидные последовательности формируют ISSR-спектры. Для решения подобных задач были созданы специальные компьютерные программы (Kalendar *et al.*, 2017), но, судя по работам, опубликованным в настоящее время, несмотря на принципиальную возможность их использования для моделирования спектров анонимных ДНК-маркеров, с этой целью они не применяются.

В настоящей работе представлен пример использования подхода *in silico* PCR для расшифровки состава спектров ISSR-маркеров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном исследовании в качестве примера был создан алгоритм для теоретического прогнозирования нуклеотидных последовательностей, получаемых в результате ISSR-PCR при использовании праймеров (GA)<sub>n</sub>C или (AG)<sub>n</sub>C, записанный на языке Python 2.6. (рис. 1). Расчеты выполняли в программе IDLE (Python GUI) (<http://www.python.org/>). Предварительный вариант алгоритма был опубликован в работе (Бардуков и др., 2014). Преимуществом данного алгоритма является большая гибкость и прозрачность настройки поискового запроса (например, имеется возможность учесть различные варианты неполной комплементарности ДНК-матрицы заданному праймеру) по сравнению с поиском с помощью программ *in silico* PCR. Это условие особенно важно в случае анонимной амплификации, при которой существует высокая вероятность отжига праймера на не полностью комплементарной ему матрице. Важной особенностью алгоритма является то, что первые пять нуклеотидов матрицы должны точно соответствовать 3'-концу праймера, поскольку было экспериментально показано, что именно эта область оказывает определяющее влияние на эффективность синтеза ампликонов (Rejiali, 2018).

При поиске теоретически возможных ампликонов были использованы последовательности секвенированного генома домашней лошади (*Equus caballus*), представленные в GenBank (EquCab2.0; NC\_009144.2 – NC\_009175.2).

Поскольку программного обеспечения, позволяющего адекватно оценивать температуру отжига праймера на не полностью комплементарной матрице, в настоящее время не существует, с целью сегрегации найденных последовательностей по степени вероятности их появления в составе спектра, для каждого возможного сайта отжига

праймера оценивали температуру плавления дуплексов, образуемых ими с праймером, по формуле:

$$T_{\text{теор}} = 100.5 + (41(yG + zC)/(wA + xT + yG + zC)) - (820/(wA + xT + yG + zC)) + 16.6 \log_{10}([Na^+]),$$

где  $wA$ ,  $xT$ ,  $yG$ ,  $zC$  – число нуклеотидов А, Т, G и С в составе праймера, а  $[Na^+]$  – концентрация ионов натрия (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). При этом условно принимали, что при наличии в составе дуплекса неспаренных нуклеотидов, праймер укорачивается в соответствии с их количеством.

Теоретически рассчитанный спектр ампликонов сравнивали с экспериментальным, для чего производили генотипирование лошадей алтайской и карачаевской пород, образцы крови которых имелись в коллекции Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Образцы крови лошадей алтайской породы (48 образцов из хозяйства СПК “Энчи”, СПК зарегистрирован в селе Чибиля Улаганского района Республики Алтай, а также 48 образцов из СПК “Чингиз”, СПК зарегистрирован в селе Кара-Кудюр Улаганского района Республики Алтай) были собраны в ходе экспедиции сотрудников Лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН в Республику Алтай, а 34 образца крови лошадей карачаевской породы были собраны сотрудниками Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева в частных хозяйствах Карачаево-Черкесской Республики и Ставропольского Края.

ДНК выделяли из образцов периферической крови лошадей с помощью набора реагентов “ДНК-Экстран-1” (ООО “Синтол”, Москва) согласно инструкции фирмы-производителя.

Для выполнения ПЦР использовали амплификатор Терцик (“ДНК-технология”, Россия) и наборы реагентов ПЦР-РВ (ООО “Синтол”). Концентрацию  $MgCl_2$  в ПЦР-смеси доводили до 2.5 мМ. Условия ПЦР были следующими: первичная денатурация ДНК ( $t = 94^\circ C$ , 2 мин); 35 циклов синтеза ПЦР-продукта, включающих три этапа (денатурация ( $t = 94^\circ C$ , 30 с), элонгация ( $t = 72^\circ C$ , 2 мин)); финальная элонгация цепей ДНК ( $t = 72^\circ C$ , 10 мин). В качестве ISSR-праймеров использовали олигонуклеотиды с последовательностями (GA)<sub>n</sub>C и (AG)<sub>n</sub>C.

Разделение ПЦР-продуктов проводили методом горизонтального электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Для уточнения размеров ампликонов при сопоставлении длины теоретически рассчитанного амплифицируемого фрагмента с локусами экспериментального ISSR-спектра выполняли электрофорез в 5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Во всех случаях для электро-

```

# -*- coding: cp1251 -*-
import re
f=open("chromosome.txt", "r")
for line in f.readlines():
    print
    re.findall(r".....AGAGA [^...]{0,4}AGAGAGAC [^...]{50,2000}GTCT
CTC [^...]{0,4}TCTCT.....", line)
    print
    re.findall(r".....AGAGA [^...]{0,4}AGAGAGAC [^...]{50,2000}GTCT
CT [^...]{0,2}CTCT [^...]{0,2}CTC.....", line)
    print
    re.findall(r".....AGAGA [^...]{0,4}AGAGAGAC [^...]{50,2000}GTCT
C [^...]{0,2}TCT [^...]{0,2}CTC [^...]{0,2}TCT.....", line)
    print
    re.findall(r".....GAG [^...]{0,2}AGAG [^...]{0,2}AGAGAC [^...]{50
,2000}GTCTCTC [^...]{0,4}TCTCT.....", line)
    print
    re.findall(r".....GAG [^...]{0,2}AGAG [^...]{0,2}AGAGAC [^...]{50
,2000}GTCTCT [^...]{0,2}CTCT [^...]{0,2}CTC.....", line)
    print
    re.findall(r".....GAG [^...]{0,2}AGAG [^...]{0,2}AGAGAC [^...]{50
,2000}GTCTC [^...]{0,2}TCT [^...]{0,2}CTC [^...]{0,2}TCT.....",
line)
    print
    re.findall(r".....AGA [^...]{0,2}GAG [^...]{0,2}AGA [^...]{0,2}GA
GAC [^...]{50,2000}GTCTCTC [^...]{0,4}TCTCT.....", line)
    print
    re.findall(r".....AGA [^...]{0,2}GAG [^...]{0,2}AGA [^...]{0,2}GA
GAC [^...]{50,2000}GTCTCT [^...]{0,2}CTCT [^...]{0,2}CTC.....",
line)
    print
    re.findall(r".....AGA [^...]{0,2}GAG [^...]{0,2}AGA [^...]{0,2}GA
GAC [^...]{50,2000}GTCTC [^...]{0,2}TCT [^...]{0,2}CTC [^...]{0,2}
TCT.....", line)
f.close()

```

Рис. 1. Алгоритм поиска теоретически возможных ампликонов, которые могут присутствовать в ISSR-спектре при использовании в ПЦР праймера (GA)<sub>n</sub>C. Алгоритм для праймера (AG)<sub>n</sub>C аналогичен.

фореза использовали Tris-боратный буфер (1xTBE: 89 mM Tris, 89 mM борная кислота, 2 mM ЭДТА, pH 8.3) (Маниатис и др., 1984).

Окрашивание ПЦР-продуктов производили раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл), визуализацию результатов – на трансиллюминаторе УВТ-1 (“Биоком”, Россия) и системе геле-документирования INGENIUS (“SYNGENE”, Великобритания) при длине волны 312 нм. Для определения длин ампликонов использовали маркеры молекулярных масс “M 27” (“СибЭнзим”, Россия) и “50 bp DNA Step Ladder” (“Promega”, США).

Поиск последовательностей, гомологичных заданным, в геномах животных разных видов, представленных в GenBank, выполняли с использованием встроенной программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью разработанного алгоритма было выявлено 185 теоретически возможных ампликонов длиной не более 2000 п.о. Следует отметить однако, что, несмотря на их большое количество, ни один из этих ампликонов не имел сайтов от-

жига, полностью комплементарных праймеру (GA)<sub>9</sub>C.

Теоретическая оценка температуры плавления ( $T_m$ ) дуплексов показала, что, даже при полной комплементарности праймера и матрицы, она не превышает 57°C, а для теоретически предсказанных сайтов, образуемых праймером и флангами расчетных ампликонов, не превышает 55°C. Между тем, принято считать, что температура отжига праймера  $T_{A \text{ теор.}} \approx T_m - 5$ , т.е., примерно на пять градусов ниже температуры плавления дуплексов, образуемых праймером и матрицей (ПЦР “в реальном времени”, 2009).

Это означает, в свою очередь, что при температуре отжига праймера, равной 55°C, получение богатого ампликонами ISSR-спектра на матрице, не имеющей участка, полностью комплементарных матрицы, теоретически невозможно ( $T_{A \text{ теор.}} \approx 50^\circ\text{C}$  для теоретически предсказанных сайтов отжига, наиболее комплементарных праймеру). Однако известно, что при использовании праймера (GA)<sub>9</sub>C и температуре отжига 55°C разные исследователи неоднократно получали на ДНК лошадей ISSR-спектры, насыщенные ампликонами (Glazko *et al.*, 2016; Голик и др., 2018).

В связи с этим, мы поставили серию экспериментов и определили, что в реальных условиях амплификация большинства ампликонов для выбранной нами системы матрица-праймер полностью прекращается только при температуре отжига праймера  $\geq 65^\circ\text{C}$ , т.е.  $T_{A \text{ макс. эксп.}} \approx T_{A \text{ теор.}} + 15^\circ\text{C}$ .

Далее, мы ранжировали теоретически предсказанные ампликоны по степени вероятности их появления в экспериментальном спектре, исходя из теоретической оценки температуры плавления дуплексов на обоих концах каждого из ампликонов. Для дальнейшего анализа были отобраны только те ампликоны, которые имели расчетную температуру плавления ДНК-дуплексов, образуемых матрицей и праймером, не ниже 40°C (табл. 1). В результате для последующего анализа было отобрано 25 последовательностей.

Теоретически рассчитанный спектр сравнивали с экспериментальным, полученным в ПЦР с использованием праймера (GA)<sub>9</sub>C (Бардуков и др., 2014) при температуре отжига праймера равной 55°C.

Сопоставление показало хорошее соответствие между теоретически ожидаемым и экспериментальными спектрами: для всех мажорных и большинства минорных локусов экспериментального ISSR-спектра были найдены расчетные ампликоны, соответствующие им по длине.

Наибольшее число расчетных ампликонов было найдено для широких мажорных полос, состоящих, по всей видимости, из ампликонов сходной длины, но происходящих из разных частей

генома – т.н. гетерогенных кластеров (рис. 2). Теоретически предсказанные ампликоны, совпадающие по длине с мажорными полосами и полосами в составе гетерогенных кластеров, имели более высокие расчетные температуры плавления дуплексов (от 52 до 54°C), по сравнению с другими предполагаемыми ампликонами, найденными в геноме (рис. 2). Это хорошо согласовывалось с особенностями реального электрофоретического спектра, однако являлось лишь косвенным подтверждением того, что были найдены ампликоны, действительно входящие в состав ISSR-спектра.

Дальнейшую проверку возможностей выявления в ISSR-спектрах теоретически предсказанных ампликонов выполняли двумя способами.

На первом этапе был рассмотрен клонированный и секвенированный ранее полиморфный ампликон длиной ~420 п.о. из ISSR-спектра, полученного на геномной ДНК лошадей при использовании в ПЦР праймера (AG)<sub>9</sub>C (Глазко и др., 2013). На основе секвенированной последовательности (длина ампликона составляла, как оказалось, 416 п.о.) были спланированы праймеры F-416 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGCCCATGG-3') и R-416 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGCGAAAGAGC-3') для избирательной амплификации данного локуса. Массовое тестирование лошадей показало, что амплификация этого локуса проходит успешно только у жеребцов, что говорит о его локализации в Y-хромосоме, которая в геноме лошади, представленном в GenBank, отсутствует (в GenBank представлен геном кобылы). В связи с этим, как и ожидалось, найти данный фрагмент в геноме домашней лошади с помощью алгоритма, разработанного в настоящей работе, не удалось.

При поиске в GenBank последовательностей, гомологичных клонированному ампликону выяснилось, что участок Y-хромосомы, найденный в ISSR-спектре лошади, секвенирован у лошади Пржевальского (*Equus przewalskii*, NW\_007676839.1) и осла (*Equus asinus*, NW\_014638651.1). Эти последовательности обозначены как “unplaced genomic scaffold”, т.е. их локализацию в геноме авторам установить не удалось. Однако наше исследование доказывает, что это участки Y-хромосомы.

Применение разработанного алгоритма к участкам хромосом *E. przewalskii* и *E. asinus* показало, что внутри последовательностей NW\_007676839.1 и NW\_014638651.1 действительно удается выявить ампликоны, гомологичные последовательности полиморфного ампликона домашней лошади. Таким образом, с помощью разработанного алгоритма поиска в последовательностях Y-хромосом близких видов удалось найти ампликон, который ранее был выделен из ISSR-спектра, полученного

**Таблица 1.** Соответствие между теоретически рассчитанными и экспериментально полученными спектрами ампликонов

Название теоретически предсказанного ампликона	Последовательности ДНК на сайтах посадки праймера с расчетной температурой плавления дуплексов и длина теоретически предсказанного ампликона	Локализация теоретически предсказанного ампликона на хромосоме	Соответствие спектру
17 <sup>1</sup> –1326	GGAAGAGAGAGAGAGAC <sup>2</sup> (52°C); GTCTCTCTCTCTCTTTCTC <sup>3</sup> (54°C); 1326 п.о.	NC_009160.3 (48971749–48973074)	Мажорный кластер около 1250–1350 п.о.
1–1319	ATCCTAGAGAGAGAGAC (41°C); GTCTCTCTGGCTCTGTCTT (44°C); 1319 п.о.	NC_009144.3 (163465329–163466647)	
2–1302	GAAAGAGAGAGAGAGAC (54°C); GTCTCTCTCCCTCTGTCTG (48°C); 1302 п.о.	NC_009145.3 (28343941–28345242)	
6–1301	TAAAGAGAATGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCTCTCAGTCTTCT (41°C); 1301 п.о.	NC_009149.3 (51069282–51070582)	
25–1281	GAGGGAGAGAGACAGAGAC (52°C); GTCTCTCAGCATCTCTCTG (41°C); 1281 п.о.	NC_009168.3 (29106855–29108135)	
3–1214	GCCTGAGAGAGAAAGAGAC (46°C); GTCTCTCTGTCTCTGTCTG (46°C); 1214 п.о.	NC_009146.3 (30151710–30152923)	Полоса около 1100–1150 п.о.
4–1148	TCTCGAGAGACAGAGAGAC (41°C); GTCTCTCTCTCTCTTCC (52°C); 1148 п.о.	NC_009147.3 (17092678–17093825)	
25–1281	ATGAGAGAGAGAGAGAC (52°C); GTCTCTCAGCATCTCTCTG (41°C); 1140 п.о.	NC_009168.3 (29106996–29108135)	
20–1115	GAGGGGCAGAGAGAGAGAC (51°C); GTCTCTCTCTCTCGCTGGG (46°C); 1115 п.о.	NC_009163.3 (7278613–7279727)	
10–1102	AACTGAGAGACAGAGAGAC (44°C); GTCTCTGTCTCTTCCCTCGG (40°C); 1102 п.о.	NC_009153.3 (20333365–20334465)	
21–1060	GAGAGAGGATGAGAGAGAC (51°C); GTCTCTCTCTTGCTCTGAC (46°C); 1060 п.о.	NC_009164.3 (57129665–57130724)	Нет типичных четких полос
15–922	GGAAGAGAGAGAGAGAGAC (52°C); GTCTCTCGCTGTGTCTCTCTCCCTCTCTATG <sup>4</sup> (48°C); 910–922 п.о.	NC_009158.3 (88931543–88932464)	Нет типичных четких полос
24–900	TAGAAAGAGAGAGAGAGAC (50°C); GTCTCTCTCTCTAACATGC (44°C); 900 п.о.	NC_009167.3 (24755030–24755929)	Мажорный кластер около 820–880 п.о.
X–876	TTTATAGAGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCTCTCTCACTCAC (55°C); 876 п.о.	NC_009175.3 (76760564–76761439)	
18–871	AAGACAGAGAGAGAGAGACAGAGAGAC <sup>4</sup> (50–54°C); GTCTCTCTTTCTCTCTCTC (54°C); 863–871 п.о.	NC_009161.3 (27521579–27522449)	
15–922	GGAAGAGAGAGAGAGAGAC (52°C); GTCTCTCTCTGTCTCTCTCTATTCTTTCT <sup>4</sup> (46–54°C); 855–865 п.о.	NC_009158.3 (88931543–88932407)	
18–871	GAGAGAGAGGGAGAGAGAC (55°C); GTCTCTCTTTCTCTCTCTC (54°C); 835 п.о.	NC_009161.3 (27521615–27522449)	
10–833	CTGAATGAGAGAGAGAGAC (46°C); GTCTCTCTGTCTCCATCTCTCTCTCTC <sup>4</sup> (48–52°C); 825–833 п.о.	NC_009153.3 (60737537–60738369)	Нет типичных четких полос
19–823	TAGAGAGAGAGAGAGAGAC (54°C); GTCTCTCTGTGTCTCTATG (41°C); 823 п.о.	NC_009162.3 (43532121–43532942)	
8–805	GGGAGACAGAGACAGAGAC (48°C); GTCTCTCTTTCTCTCTGTCTC (50°C); 805 п.о.	NC_009151.3 (8521975–8522779)	Нет типичных четких полос

Таблица 1. Окончание

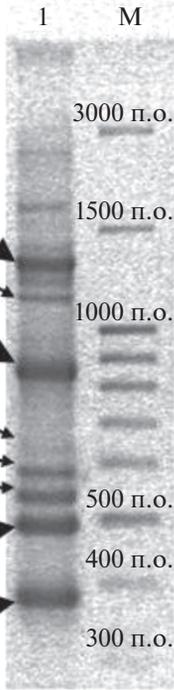
Название теоретически предсказанного ампликона	Последовательности ДНК на сайтах посадки праймера с расчетной температурой плавления дуплексов и длина теоретически предсказанного ампликона	Локализация теоретически предсказанного ампликона на хромосоме	Соответствие спектру
X-637	CAAAACGAGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCCATCTCTCTCTC (52°C); 637 п.о.	NC_009175.3 (1358676–1359312)	Минорные полосы 610–690 п.о.
10-572	AAGAAAGAGGGAGAGAGAC (48°C); GTCTCTCTCTTTCTCTT (50°C); 572 п.о.	NC_009153.3 (29331545–29332116)	Полосы около 540–580 п.о.
18-871	TAGAGAGAGACAGAGAGAC (50°C); GTCTCTCTTTCTCTCTCTC (54°C); 563 п.о.	NC_009161.3 (27521887–27522449)	
X-637	CAAAACGAGAGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCTATCTCTCTCCA (48°C); 552 п.о.	NC_009175.3 (1358676–1359227)	
10-572	AAGAAAGAGGGAGAGAGAGAC (48°C); GTCTCTCTCTGTTTCTATC (46°C); 551 п.о.	NC_009153.3 (29331545–29332094)	
10-546	GGGAGGAAGAGAGAGAGAGAC (51°C); GTCTCTCTGTGTCTCTTTC (46°C); 546 п.о.	NC_009153.3 (23373675–23374221)	
11-513	GAGGGAGAGAGAGAGAGAGAC (55°C); GTCTCTCTGGTTCTCTCCT (41°C); 513 п.о.	NC_009154.3 (121598–122110)	Нет типичных четких полос
11-513	AGGAGACAGAGAGAGAGAGAC (48°C); GTCTCTCTGGTTCTCTCCT (41°C); 491 п.о.	NC_009154.3 (121620–122110)	Мажорная полоса около 490 п.о.
28-489	GAGAGAAAGAGAGAGAGAGAC (54°C); GTCTCTCTCTCTCACACAC (53°C); 489 п.о.	NC_009171.3 (34185907–34186395)	
X-637	CAAAACGAGAGAGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCCATCTCTCTCCA (46°C); 450 п.о.	NC_009175.3 (1358676–1359125)	Нет типичных четких полос
X-637	CAAAACGAGAGAGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCCATCTCTCTCCA (46°C); 418 п.о.	NC_009175.3 (1358676–1359093)	
21-377	TGAGGAGAGGGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCTATCTCTCTCTA (50°C); 377 п.о.	NC_009164.3 (41224113–41224489)	Мажорная полоса около 380 п.о.
X-637	CAAAACGAGAGAGAGAGAGAGAC (44°C); GTCTCTCTCTCCATCTTTT (44°C); 366 п.о.	NC_009175.3 (1358676–1359041)	
10-394	ACAGCAAGAGAGAGAGAGACAGAGAGAAAGAGAG AGACTGAGTGAGTGAGAGACAGAGAGAGAC <sup>4</sup> (44–52°C); GTCTCTCTCTCTCTCTCCA (52°C); 354–394 п.о.	NC_009153.3 (58797548–58797941)	
7-349	GAGAGATGGAGAGAGAGAGAC (52°C); GTCTCTTCCTCTCTCTTCC (46°C); 349 п.о.	NC_009150.3 (85378714–85379062)	Нет типичных четких полос

Примечание. <sup>1</sup>Номер хромосомы, в которой локализован предполагаемый ампликон; <sup>2</sup>последовательность прямого сайта отжига; <sup>3</sup> последовательность обратного сайта отжига; <sup>4</sup> расчетные сайты посадки праймера (GA)<sub>9</sub>C с возможностью отжига праймера на разных участках сайта, подчеркиванием выделены возможные положения нуклеотида, связывающегося с 3'-концевым нуклеотидом праймера.

с использованием в качестве матрицы ДНК лошади, и затем клонирован.

Сравнение трех последовательностей показало, что участок Y-хромосомы лошади, амплифицирующийся при использовании ISSR-праймера (AG)<sub>9</sub>C, имеет не один, а два возможных сайта посадки праймера на 3'-конце (рис. 3), но отжиг ISSR-праймера (AG)<sub>9</sub>C, судя по клонированному

ПЦР-продукту, происходит на внешнем сайте. В то же время для лошади Пржевальского и осла отжиг на этом сайте невозможен из-за точечной замены, и затравка синтеза ПЦР-продукта может иметь место только с внутреннего сайта (рис. 3). Таким образом, в ISSR-спектрах осла и лошади Пржевальского будет отсутствовать ампликон, точно совпадающий по длине с соответствующим

Наиболее характерные зоны в экспериментальном спектре	Количество совпадающих расчетных фрагментов	Совпадение результатов с электрофоретическим спектром
Мажорный кластер 1250–1350 п.о.	5	 <p>1      М</p> <p>3000 п.о.</p> <p>1500 п.о.</p> <p>1000 п.о.</p> <p>500 п.о.</p> <p>400 п.о.</p> <p>300 п.о.</p> <p>М — маркер молекулярных масс; 1 — пример электрофоретического спектра ISSR-маркеров, полученного на ДНК карачаевской лошади с помощью праймера (GA)<sub>9</sub>C</p>
Полоса около 1100–1150 п.о.	4	
Мажорный кластер 800–900 п.о.	8	
Минорные полосы со слабым сигналом около 610–690 п.о.	1	
Полоса около 580 п.о.	1	
Полосы около 540–560 п.о.	4	
Мажорная полоса около 490 п.о.	1	
Мажорная полоса около 380 п.о.	1	

**Рис. 2.** Соответствие между теоретически предсказанными ( $T_m \geq 40^\circ\text{C}$ ) и экспериментально полученными ампликонами. Жирные стрелки указывают на мажорные полосы, для которых теоретически предсказаны ампликоны с высокой температурой плавления (от 52 до 54 $^\circ\text{C}$ ) на расчетных сайтах посадки праймера (GA)<sub>9</sub>C.

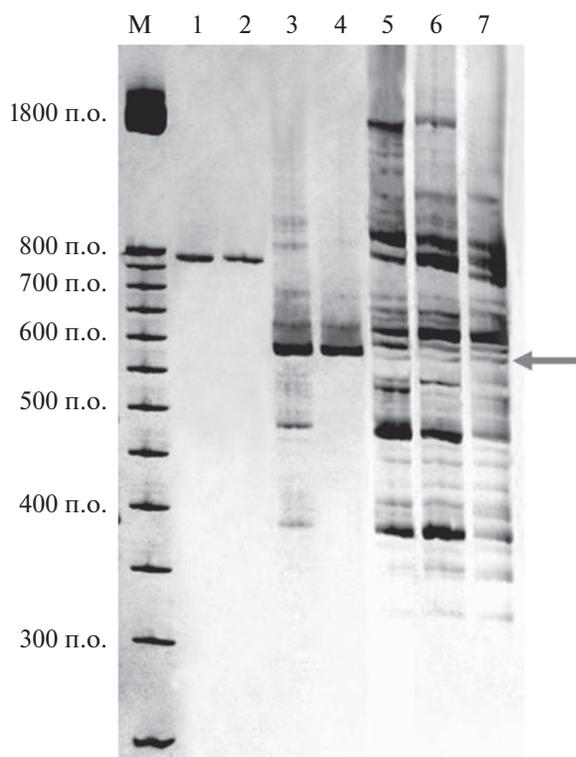
ампликоном из ISSR-спектра домашней лошади. Это показывает, что единичные точечные мутации могут менять температуру отжига праймера в том или ином его положении, давая преимущества в связывании праймера одному из двух-трех возможных сайтов, с чем, видимо, связана, по крайней мере, часть полиморфизма, который демонстрируют ISSR-маркеры.

На втором этапе проверки возможности выявления в ISSR-спектрах теоретически предсказанных ампликонов была поставлена обратная задача. Предстояло экспериментально подтвердить возможность амплификации теоретически предсказанного ампликона в ISSR-спектре, полученном с применением праймера (GA)<sub>9</sub>C при стандартных условиях ПЦР. С этой целью в экспериментальном ISSR-спектре, полученном при исполь-

зовании в качестве матрицы ДНК лошади карачаевской породы, был выбран ампликон, который имел длину порядка 570 п.о., не входил в состав крупных мажорных кластеров и отличался минорным характером проявления (рис. 4). С помощью алгоритма, разработанного в данном исследовании, в 10-й хромосоме лошади был найден схожий по длине ампликон (572 п.о.), фланкированный последовательностями, частично комплементарными праймеру (GA)<sub>9</sub>C.

Для экспериментальной проверки соответствия расчетного ампликона ампликону, присутствующему в экспериментальном спектре, были подобраны праймеры F-10-740 (5'-GGCTCTCTTTAAGGATCTAGAAC-3') и R-10-740 (5'-GTAATTCTTTCACTCATCTGCTAC-3'), комплементарные участкам, находящимся от последователь-





**Рис. 4.** Электрофорез в 5%-ом ПААГ. М – маркер молекулярных масс; 1, 2 – ПЦР-продукт, полученный с праймеров F-10-740 и R-10-740 на геномной ДНК лошади; 3, 4 – ПЦР-продукт, полученный с использованием праймера (GA)<sub>9</sub>C, когда матрицей служил ПЦР-продукт, представленный на дорожках 1 и 2 (синтез дополнительных минорных ампликонов происходил на геномной ДНК, остатки которой присутствовали в пробе); 5–7 – электрофоретический спектр, полученный при использовании в ПЦР праймера (GA)<sub>9</sub>C и геномной ДНК лошадей карачаевской породы в качестве матрицы. Стрелка указывает на теоретически предсказанный ампликон длиной 572 п.о.

(GA)<sub>9</sub>C и сайтом посадки праймера R-10-740, его аллельные варианты представлены на рис. 5.

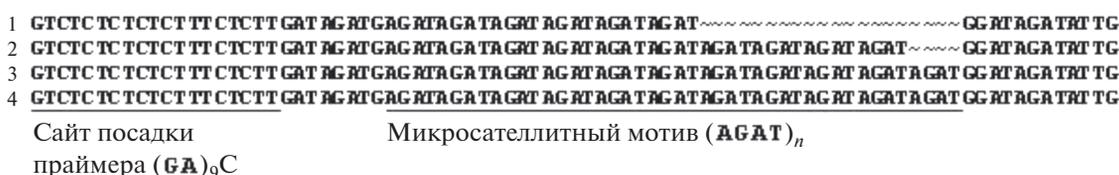
Пример ампликона, происходящего из десятой хромосомы, с прилегающим к нему полиморфным микросателлитным локусом (AGAT)<sub>n</sub> представляет большой интерес, поскольку внутри

25-ти теоретически рассчитанных ампликонов было найдено множество микросателлитных мотивов (в табл. 1 наряду с фланговыми последовательностями ампликонов даны ссылки на локализацию этих ампликонов в секвенированных хромосомах лошади, что позволяет убедиться в наличии микросателлитных мотивов внутри данных ампликонов). Таким образом, представляется весьма вероятным, что в ряде случаев полиморфизм ISSR-спектров наблюдается из-за различий в длине микросателлитов, расположенных внутри ампликонов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Полученные результаты показывают, что моделирование ISSR-спектров с помощью анализа последовательностей секвенированных хромосом позволяет расшифровать значительную часть анонимного спектра, а также определить типичные для конкретного спектра причины полиморфизма его ампликонов. В настоящем исследовании установлено, что основными причинами полиморфизма ISSR-спектров, полученных с использованием праймеров (GA)<sub>9</sub>C и (AG)<sub>9</sub>C являются, по всей видимости, точечные нуклеотидные замены в т. н. якорных нуклеотидах и полиморфизм микросателлитов, расположенных внутри ампликонов.

Результаты работы показывают, что комплексный подход, включающий методы биоинформатики и экспериментальные приемы работы с последовательностями, способными воспроизводиться при анонимной амплификации, перспективен для расшифровки последовательностей, составляющих наблюдаемый спектр. В будущем он позволит выявлять общие закономерности формирования спектров ампликонов, что значительно упростит интерпретацию получаемых результатов. Не менее важно и то, что данный подход позволяет значительно снизить трудозатраты при создании на основе ISSR-ампликонов узкоспециализированных локус-специфичных маркеров. Упрощение разработки таких ДНК-маркеров позволит исключить целый каскад биотехнологических про-



**Рис. 5.** Аллельные варианты микросателлитного локуса с коровым мотивом (AGAT)<sub>n</sub>, находящегося между теоретически рассчитанным сайтом отжига праймера (GA)<sub>9</sub>C и сайтом отжига праймера R-10-740. 1 – участок нуклеотидной последовательности из 10-й хромосомы лошади, представленной в GenBank; 2, 3 – аналогичные участки последовательности у лошади карачаевской породы, являющейся гетерозиготной по микросателлитному локусу с коровым мотивом (AGAT)<sub>n</sub>; 4 – соответствующий участок последовательности лошади карачаевской породы, гомозиготной по данному микросателлитному локусу.

цедур, а значит, появится возможность быстро создавать их под необходимые задачи — будь то определение принадлежности животного или растения к конкретной популяции, породе, сорту, выявление гибридов, поиск надежных маркеров для выявления филогенетических связей.

**Благодарности.** Авторы благодарят сотрудников Центра нанобиотехнологий ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева за предоставленные пробы ДНК лошадей.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госзадания (тема 6: Экология и биоразнообразие водных сообществ 0109-2018-0076 АААА-А18-118042490059-5).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журн. общей биологии. 2004. Т. 65. № 4. С. 278–305.
- Бардуков Н.В., Феофилов А.В., Глазко Т.Т., Глазко В.И. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геноме домашней лошади *Equus caballus* // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 4. С. 42–57.
- Воронкова В.Н., Цэндсүрэн Цэдэв, Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей // Генетика. 2011. Т. 47. № 8. С. 1131–1134.
- Глазко В.И., Гладырь Е.А., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 2. С. 71–76.
- Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Блохина Т.В., Есин А.Г., Глазко Т.Т. Геномный “портрет” некоторых видов псовых, полученный с помощью ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров // Кролиководство и звероводство. 2020. № 1. С. 28–39.
- Голик Т.В., Эркенов Т.А., Глазко Т.Т., Глазко В.И. Спектры ISSR-PCR маркеров в оценках популяционно-генетической дифференциации карачаевской лошади в хозяйствах Карачаево-Черкесской Республики // Известия ТСХА. 2018. № 3. С. 61–77.
- Донт Ю.У., Тимарова А.В., Комарова Л.В., Боронникова С.В. Генетический полиморфизм трех пород лошади домашней // Вестник Пермского университета. Сер.: Биология. 2018. Вып. 1. С. 50–56.
- Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нуржидина Н.С., Буглова Л.В., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Кубан И.С., Гусар А.С., Дудкин Р.В. Формирование и изучение коллекционного генофонда ресурсных видов рода *Miscanthus* Anderss. в условиях лесостепи Западной Сибири // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 7. С. 926–932.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Пелеева А.Р., Комарова Л.В., Васильева Ю.С. Анализ генетического разнообразия естественных популяций и ремонтно-маточных стад стерляди на основании полиморфизма межмикросателлитных маркеров // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. № 4. С. 20–29.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимова Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР “в реальном времени” / Под ред. Ребрикова Д.В. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.
- Степанов И.В., Супрун И.И., Токмаков С.В., Лободина Е.В. Поиск эффективных IRAP и ISSR маркеров для генетического анализа подвоев яблони // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2019. № 60. С. 11–20.
- Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domesticiрованных видов животных // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 900–915.
- Al-Ameri A.A., Al-Qurainy F., Gaafar A.-R.Z., Khan S., Nadeem M. Molecular identification of sex in *Phoenix dactylifera* using inter simple sequence repeat markers // BioMed Res. Intern. V. 2016. № 4530846.
- Basha S.D., Sujatha M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers // Euphytica. 2007. V. 156. P. 375–386.
- Chen X., Feng H., Du Y., Luo S., Li W., Yu L., Feng Z., Cui T., Zhou L. Genetic polymorphisms in mutagenesis progeny of *Arabidopsis thaliana* irradiated by carbon-ion beams and  $\gamma$ -rays irradiations // Int J Radiat Biol. 2020. V. 96(2). P. 267–275.
- Glazko V.I., Erkenov T.A., Glazko T.T., Dzatoev K.M. Genetic structure of Karachai horses on ISSR-PCR markers // Biogeosystem Technique. 2016. V. 9. № 3. P. 195–204.
- Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Ivanov K.I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis // Genomics. 2017. V. 109(3–4). P. 312–319.
- Kalia P., Saha P., Ray S. Development of RAPD and ISSR derived SCAR markers linked to Xca1Bo gene conferring resistance to black rot disease in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) // Euphytica. 2017. V. 213. № 232.
- Kim J.Y., Adhikari P.B., Ahn C.H., Kim D.H., Kim Y.C., Han J.Y., Kondeti S., Yong Choi Y.E. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* // J. Ginseng Res. 2019 V. 43(1). P. 38–48.
- Kriangwanich W., Nganvongpanit K., Buddhachat K., Brown J.L., Siengdee P., Chomdej S., Bansiddhi P., Thitaram C. Genetic diversity and variation in captive Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand // Trop. Conser. Science. 2018. V. 11.
- Kulbrock M., Lehner S., Metzger J., Ohnesorge B., Distl O. A genome-wide association study identifies risk loci to equine recurrent uveitis in German warmblood horses // PLoS One. 2013. V. 8(8). e71619.
- Porto-Neto L.R., Sonstegard T.S., Liu G.E., Bickhart D.M., Da Silva M.V., Machado M.A., Utsunomiya Y.T., Garcia J.F., Gondro C., Van Tassell C.P. Genomic divergence of zebu and taurine cattle identified through high-density SNP genotyping // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 876.

Rejali N.A., Moric E., Wittwer C.T. The effect of single mismatches on primer extension // *Clin Chem.* 2018. V. 64. № 5. P. 801–809.

Sheikh A., Ahmed M.M.M., Mutwakil M.H.Z., Saini K.S., Alsulaimany F.A.S., EL Hanafy A.A., Sabir J.S.M. Comparative molecular analysis of ISSR markers in

Arabian horse breeds // *J. Anim. Plant Sciences.* 2018. V. 28(1). P. 332–336.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* 1994. V. 20. P. 176–183.

## Principles of Nucleotide Sequences Identification ISSR Markers Spectra

A. V. Bardukov<sup>1, #</sup> and V. S. Artamonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences,  
Leninskij prosp. 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: bardukv-nikolajj@mail.ru*

An algorithm for theoretical prediction of nucleotide sequences obtained in ISSR PCR was developed. The calculation was performed using one of the sequenced horse genomes as an example. Presence of theoretically calculated sequences in the real electrophoretic spectrum of amplification was experimentally confirmed. The possibility of applying the developed approach for identifying nucleotide sequences in anonymous amplification spectra was discussed.

*Keywords:* ISSR markers, anonymous amplification, *Equus caballus*, sequenced genome, *in silico* PCR

## КОЛЛИГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАСТВОРОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ САХАРОВ И ИХ РОЛЬ У РАСТЕНИЙ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

© 2022 г. А. Н. Дерябин\*, @, Т. И. Трунова\*

\*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, 127276 Россия

@E-mail: anderyabin@mail.ru

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.

После доработки 17.03.2020 г.

Принята к публикации 10.04.2020 г.

В обзоре рассмотрены коллигативные эффекты высококонцентрированных растворов сахаров при действии отрицательных температур на морозостойкие растения, связанные с предотвращением обезвоживания клеток, образованием межклеточного льда, снижением точки замерзания протопласта и нейтрализацией токсических веществ. Обсуждается роль сахаров при действии гипотермии на растения, связанная со стабилизацией структуры мембран, молекул липидов и белков, нейтрализацией активных форм кислорода, а также их участием в сигналинге и метаболических процессах в качестве источника энергии и предшественников синтеза других соединений-протекторов.

Ключевые слова: сахара, низкая температура, активные формы кислорода, сигналинг, растения

DOI: 10.31857/S1026347021060044

### НАКОПЛЕНИЕ САХАРОВ – ОДНА ИЗ СТРАТЕГИЙ ВЫЖИВАНИЯ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОТЕРМИИ

Температура является одним из ведущих экологических факторов, влияющих на все стороны жизнедеятельности растений и определяющих их географическое распространение и продуктивность (Levitt, 1980; Nievola *et al.*, 2017). На Земле сезонному снижению температуры ниже 0°C подвергается ~64% территории (Żłobek-Sokolnik, 2012), из них 26% приходится на сельскохозяйственные угодья (Nievola *et al.*, 2017). Растения восприимчивы к температурным перепадам окружающей среды на протяжении всей своей жизни: от прорастания семян до их созревания. Отсутствие возможности перемещения (миграции), а также механизмов регуляции теплового режима вынуждает растения адаптироваться к перепадам температуры посредством перепрограммирования своего транскриптома, протеома и метаболома (Sakina *et al.*, 2019).

В настоящее время все высшие растения по устойчивости к низким температурам (гипотермии) делят на три группы (Трунова, 2007; Kumar *et al.*, 2018):

1) теплолюбивые (chilling-sensitive plants), которые способны адаптироваться к ограниченному диапазону действия пониженных температур, при этом большинство из них повреждаются при температуре ниже 15°C. К растениям этой группы принадлежат тропические и субтропические сельскохозяйственные культуры, такие как гре-

чиха, кукуруза, огурец, просо, рис, соя, хлопчатник и др.;

2) холодостойкие (chilling-resistant plants), которые способны выдерживать любые низкие температуры, не сопровождающиеся тканевым льдообразованием. К этой группе относят картофель, морковь, редьку, шпинат и др.;

3) морозостойкие (frost-resistant plants) – растения северных широт – большинство деревьев и кустарников, а также травянистые озимые культуры (пшеница, рожь, ячмень и др.). Растения этой группы способны выживать при отрицательных температурах, сопровождающихся образованием межклеточного льда.

Процесс низкотемпературной адаптации (закаливания) или холодовой акклимации (cold hardening/cold acclimation) происходит при экспозиции растений в условиях низких неповреждающих (закаливающих) температур, что обеспечивает им защиту при возможном последующем действии более низких повреждающих температур. При этом низкие закаливающие температуры всегда должны предшествовать повреждающим, и только в этом случае можно существенно повысить холодо- или морозостойкость растений (Трунова, 2007). Важно, что свойства холодо- и морозостойкости растений развиваются только в процессе низкотемпературного закаливания, которое периодически происходит в течение всего онтогенеза растений и осуществляется в пределах нормы реакции. Однако само приобретенное свойство не

сохраняется при последующем повышении температуры. У холодостойких и морозостойких растений наследуется лишь генетически детерминированный уровень устойчивости к гипотермии, который реализуется исключительно в процессе их низкотемпературного закаливания в благоприятных для данного генотипа условиях (Трунова, 2007). Процесс низкотемпературного закаливания обратим, и при возврате растений в оптимальные для роста температурные условия происходит их раззакаливание (deacclimation) (Hidekazu *et al.*, 1996). В связи с этим, в летний период растения часто не могут противостоять внезапному действию низких повреждающих температур.

При переносе растений с оптимальной на низкую закаливающую температуру в их клетках происходят глубокие изменения в метаболизме, в том числе, возрастает содержание высокомолекулярных водорастворимых белков, липидов и некоторых олигосахаридов, но особенно заметно низкомолекулярных сахаров. Например, у модельного для физиологов и биохимиков растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia) накопление сахарозы, глюкозы и фруктозы становилось заметным уже после 1–4 ч их пребывания в условиях низких положительных температур (Wanner, Junttila, 1999; Kaplan *et al.*, 2007). Содержание низкомолекулярных сахаров положительно коррелирует с уровнем развиваемой холодо- и морозостойкости растений (Трунова, 1979). Если в условиях гипотермии у теплолюбивых растений накопление сахаров происходит в основном в результате гидролиза крахмальных зерен (Апакидзе, Буадзе, 2000), то у холодостойких – еще и за счет процесса фотосинтеза (Wanner, Junttila, 1999; Астахова и др., 2014), тогда как у морозостойких травянистых растений – преимущественно благодаря процессу фотосинтеза (Трунова, 1979), а у древесных – гидролиза различных олиго- и полисахаридов (Касперска-Палач, 1983).

Нами представлена таблица с данными по суммарному содержанию в листьях самых распространенных низкомолекулярных растворимых углеводов – сахарозы, глюкозы и фруктозы – у различных по устойчивости к гипотермии групп растений, конститутивно и в последствии холодовой экспозиции. Из данных таблицы видно, что устойчивые к низким положительным температурам виды, принадлежащие к группе холодостойких растений, в норме содержат в 2–4 раза больше сахаров, чем представители теплолюбивых растений, которые, в свою очередь, содержат в 15–18 раз меньше сахаров, по сравнению с морозостойкими растениями. Группа холодостойких растений занимает промежуточное положение по уровню накопления сахаров. Согласно приведенным в таблице данным, низкотемпературное закаливание всех групп растений сопровождается повышением в их листьях сахаров. При этом по абсо-

лютному показателю у представителей группы теплолюбивых растений суммарное содержание сахаров в несколько раз меньше, чем у морозостойких и холодостойких видов, а у холодостойких растений меньше, чем у морозостойких.

Накопление сахаров – это не только одна из стратегий выживания всех групп растений при действии гипотермии, но и неспецифическая составляющая их стрессового ответа (Трунова, 2007). Разные аспекты роли сахаров в формировании повышенной устойчивости растений к абиотическим стресс-факторам подробно изложены в обзорах последних лет (Krasavina *et al.*, 2014; Sami *et al.*, 2016; Gangola, Ramadoss., 2018; Fürtauer *et al.*, 2019). Однако в них не акцентировано внимание на коллигативные эффекты высококонцентрированных растворов сахаров, характерные, преимущественно, для группы морозостойких растений, подверженных воздействию отрицательных температур. Напомним, что коллигативными называют физические свойства растворов, которые определяются только числом частиц растворенного вещества (концентрацией) и не зависят от их химической природы, массы и размеров (Пучков, 2017). К коллигативным свойствам, в частности, относят понижение температуры замерзания раствора, по сравнению с чистым растворителем и осмотическое давление. В данной работе обобщены сведения о роли низкомолекулярных сахаров (преимущественно, сахарозы, глюкозы и фруктозы) и коллигативных эффектах высококонцентрированных растворов сахаров у растений при гипотермии.

## РОЛЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ САХАРОВ У РАСТЕНИЙ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

**Сахара как источники энергии и углерода.** В растениях самым распространенным углеводом является дисахарид сахароза ( $C_{12}H_{22}O_{12}$ ), молекулы которой содержат остаток D-глюкозы и D-фруктозы, соединенные ковалентной (гликозидной) связью (Levitt, 1980; Bohnert, Sheveleva, 1998). Известно, что основной синтез сахарозы происходит в цитозоле клеток мезофилла, куда транспортируются триозы, образующиеся в хлоропластах в процессе фотосинтеза. В цитозоле молекулы сахарозы перераспределяются, накапливаются в вакуоли, используются для синтеза сложных углеводов или гидролизуются на глюкозу и фруктозу (Ruan, 2014). Сахароза считается главной транспортной формой ассимилятов, в виде которой восстановленный углерод и энергия транспортируются по растению. Главный поток сахарозы поступает из фотосинтезирующих клеток (донор) в русло дальнего транспорта (флоэму) симпластным и/или апопластным путем и далее в запасующие органы (акцепор), а также органы, которые не способны самостоятельно ее синтезировать.

Преимущество сахарозы, как транспортной формы, заключается в том, что она является химически инертным соединением, в котором аномерные атомы углерода связаны друг с другом. Благодаря этому молекула сахарозы защищена от атаки окислительных или гидролитических ферментов в процессе ее переноса из одной части растений в другую (Ленинджер, 1985). Молекуле сахарозы, чтобы быть использованной в обменных процессах, предварительно необходимо расщепиться на простые углеводы – глюкозу и фруктозу, например, с помощью инвертазы ( $\beta$ -фруктофуранозидаза, КФ 3.2.1.26). Молекулы низкомолекулярных сахаров богаты энергией, в связи с чем они являются основными субстратами для клеточного дыхания и синтеза стрессовых белков и липидов, протекающих в процессе низкотемпературного закаливания (Rolland *et al.*, 2002). Основными субстратами для реорганизации и формирования устойчивой к гипотермии структуры клеток выступают метаболически активные сахара – фруктоза и глюкоза (Колупаев, Трунова, 1992).

**Стабилизация сахарами структуры мембран, белков и липидов.** Температура фазового перехода и жидкостные свойства биологических мембран, наряду с другими факторами, зависят также от содержания сахаров в окружающем их растворе (Quinn, 1989). В модельных экспериментах показано, что сахара в условиях гипотермии стабилизируют структуру и текучесть мембран клеток (Crowe *et al.*, 1984, 1987; Sum *et al.*, 2003), за счет взаимодействия с входящими в их состав липидами и белками (Anchordoguy *et al.*, 1987; Kamata, Uemura, 2004). Возможный механизм защитного действия сахаров заключается в образовании многочисленных водородных связей между атомами водорода в гидроксильных группах молекул сахаров и кислородными атомами фосфатов в составе молекул фосфолипидов мембран (Strauss, Hauser, 1986; Crowe, Crowe, 1988; Sum *et al.*, 2003), благодаря чему сохраняется жидко-кристаллическое состояние липидов плазмалеммы. Способность сахаров замещать молекулы воды, образуя дополнительные гидрофобные связи, обеспечивает не только стабилизацию клеточных мембран в целом, но также защиту белковых комплексов тилакоидов от разрушения (Caffery *et al.*, 1988). Сахара, по сравнению с белками, играют бóльшую роль в защите цитоплазмы клеток при действии гипотермии (Gusta *et al.*, 2004).

**Нейтрализация сахарами активных форм кислорода (АФК).** При оптимальных для роста температурах в клетках растений поддерживается баланс между скоростью генерации АФК и их утилизацией благодаря наличию специализированной системы антиоксидантной защиты, состоящей из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и др.) и низкомолекулярных соединений-антиоксидантов (аскорбиновая кислота,

восстановленный глутатион, флавоноиды и др.). При действии гипотермии этот баланс может быть нарушен из-за резкого возрастания в клетке содержания АФК, в результате которого развивается окислительный стресс, приводящий к необратимым повреждениям наиболее важных биополимеров – нуклеиновых кислот, белков и липидов. Установлено, что для холодостойких и морозостойких растений противодействие окислительному стрессу, вызванному гипотермией, в значительной мере связано с деятельностью низкомолекулярных антиоксидантов на фоне стабилизации активности антиоксидантных ферментов, тогда как для теплолюбивых растений, наоборот, в основном с повышенной активностью антиоксидантных ферментов (Hurry *et al.*, 1995). Кроме того, происходит быстрая инактивация конститутивного пула антиоксидантных ферментов свободными радикалами и поэтому требуется значительное время, необходимое для индукции их синтеза. В связи с этим, в этих условиях более эффективной, чем ферментативная, становится защита с помощью низкомолекулярных антиоксидантов, чья избыточность и относительная свобода миграции в клеточной и тканевой среде выступают на передний план (Кения и др., 1993).

В настоящее время низкомолекулярные сахара рассматриваются как полноправные компоненты неферментативной системы антиоксидантной защиты растительной клетки (Peshev, Van den Ende, 2013; Soares, 2019). Способность моносахаридов за счет окисления карбонильной группы восстанавливать такие сильные окислители, как феррицианид, пероксид водорода или ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , известна давно (Ленинджер, 1985). Установлено, что сахара взаимодействуют с АФК как напрямую, так и опосредованно, усиливая экспрессию генов, кодирующих низкомолекулярные антиоксиданты (Sami *et al.*, 2016). Наиболее вероятны реакции радикальных АФК с молекулами  $\alpha$ -глюкозы с образованием нестойких перокси-соединений и последующим их распадом до стабильных и легко метаболизируемых  $\text{C}_3$ -фрагментов, а также образованием циклических лактонов (Синькевич и др., 2009). В модельных экспериментах *in vitro* показана способность сахаров, таких как глюкозы, сахарозы, фруктозы, раффинозы и маннита перехватывать гидроксильный радикал и таким образом предотвращать вызываемые им повреждения биомолекул (Аверьянов, Лапикова, 1989; Smirnoff, Cumbes, 1989; Bohnert, Sheveleva 1998; Bogdanović *et al.*, 2008; Peshev, Van den Ende 2013; Matros *et al.*, 2015). По способности *in vitro* перехватывать гидроксильный радикал сахара располагаются в следующем порядке: мальтоза > сахароза > фруктоза > глюкоза > сорбит (Morelli *et al.*, 2003). Видно, что дисахариды являются более активными перехватчиками АФК, чем моносахара. Среди моносахаридов фруктоза оказалась в два раза более эффективна в

роли перехватчика АФК, чем глюкоза (Bogdanović *et al.*, 2008). Авторы показали, что не только фруктоза, но и ее фосфорилированные формы являются важными антиоксидантами – перехватчиками АФК. Учитывая отсутствие в клетках растений антиоксидантных ферментов, нейтрализующих гидроксильный радикал, роль сахаров, как перехватчиков этой АФК, возрастает (Bogdanović *et al.*, 2008; Matros *et al.*, 2015). Наши исследования *in vitro* с трансформированными растениями картофеля, экспрессирующими ген инвертазы дрожжей апопластной локализации, показали, что наличие 2% сахарозы в МС-среде снижает интенсивность перекисного окисления липидов в листьях (Дерябин и др., 2011). Накапливаемые в норме (за счет экспрессии встроенного гена инвертазы дрожжей) и при низкотемпературном закаливании (5°C, 3 сут) сахара стабилизируют структурно-функциональное состояние клеточных мембран, снижали интенсивность процессов свободнорадикального окисления, протекающих с участием АФК, и повышали холодоустойчивость растений картофеля (Дерябин и др., 2007; 2016). Низкомолекулярным антиоксидантам присуща нелинейная зависимость между их внутриклеточной концентрацией и степенью ингибирования свободнорадикальных процессов (Кения и др., 1993), что было показано и в наших экспериментах с растениями картофеля, экспрессирующими ген инвертазы дрожжей (Дерябин и др., 2011). У растений, испытывающих сахарное голодание, наблюдалось накопление в тканях АФК, тогда как повышение внутриклеточной концентрации сахаров способствовало их нейтрализации (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010). Обработка растений раствором глюкозы приводила к меньшему накоплению в их тканях АФК, в частности, синглетного кислорода и пероксида водорода (Ramel *et al.*, 2009). Таким образом, убедительно показана способность сахаров нейтрализовать АФК, выступая в роли низкомолекулярных антиоксидантов.

**Роль сахаров в восприятии и трансдукции внешнего сигнала.** Известно, что в норме и под действием стрессоров различной природы (в том числе, низкотемпературного стрессора), сахара в миллимолярных концентрациях контролируют онтогенез растений посредством активации/репрессии генов, регулирующих такие морфофизиологические и биохимические процессы, как, клеточный цикл, рост, органогенез, прорастание пыльцы, цветение, формирование плодов, старение, фотосинтез, биосинтез метаболитов (белков, липидов, органических кислот и др.) (Koch, 1996; Gupta, Kaur, 2005; Rosa *et al.*, 2009; Ruan, 2012; Li, Sheen, 2016; Sami *et al.*, 2016; Марковская, Шиббаева, 2017; Ciereszko, 2018; Ahmad, 2019). Кроме того, концентрация и пул сахаров служат сигналами для экспрессии генов углеводного метаболизма, в частности, кодирующих инвертазу и сахарозсинтазу

(*D*-фруктозо-2-глюкозил-трансфераза, КФ 2.4.1.13). Предполагается участие инвертаз в рецепции сахарного сигнала (Ruan, 2014; Wan *et al.*, 2018), что указывает на наличие нескольких путей для его восприятия и трансдукции. Показано, что высокая активность инвертазы клеточных стенок задерживала АБК-индуцируемое старение листьев томата, что свидетельствует о сигнальной функции продуктов деятельности фермента – глюкозы и фруктозы (Jin *et al.*, 2009). Сигнальная функция сахаров была убедительно показана при использовании растений с нокаутом генов, кодирующих цитоплазматическую инвертазу (Rossouw *et al.*, 2010). Сигнальная функция сахаров проявляется на разных уровнях организации растительного организма: на уровне клетки – при взаимоотношении между органеллами и посредством регуляции транскрипции (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 2006); на уровне целого организма – между фотосинтезирующими (донор) и запасующими (акцептор) тканями (Baier *et al.*, 2004).

Установлено, что в передаче внешних сигналов участвуют гексозы, поступающие из апопласта в цитозоль с помощью сахарпереносящих белков (STPs) (Sherson *et al.*, 2003; Ruan, 2012). Центральными компонентами внутриклеточной сигнальной системы гексоз являются гексокиназа (КФ 2.7.1.1; НХК) (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003) и фруктокиназа (КФ 2.7.1.4) (Rolland *et al.*, 2006). Являясь первым ферментом в катаболизме глюкозы, НХК рассматривается как ее сенсор, интегрирующий субстратные и гормональные сигналы для управления экспрессией генов и ростом растений в условиях действия абиотических стресс-факторов, в том числе, гипотермии (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003). НХК обладает низкой специфичностью в отношении моносахаридного субстрата, в связи с чем способна катализировать реакцию фосфорилирования не только *D*-глюкозы, но также *D*-фруктозы, *D*-маннозы и *D*-глюкозамина. Участие НХК в восприятии и трансдукции глюкозного сигнала было исследовано как с применением ингибиторов НХК, так и на трансгенных растениях, экспрессирующих *A. thaliana* hexokinase1 (*AtHXK1*), и растениях, в которых этот ген имел антисмысловую ориентацию (Gibson, 2005). В настоящее время *AtHXK1* является наиболее изученным внутриклеточным рецептором сахаров. НХКs локализованы в цитозоле (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006), а также связаны с мембранами хлоропластов, митохондрий и ядра (Jang *et al.*, 1997; Gupta, Kaur, 2005; Hanson, Smeekens 2009). Установлено, что локализованная в митохондриях НХК осуществляет контроль программированной клеточной смерти (Kim *et al.*, 2006). Ядерная НХК, в случае увеличения внутриклеточной концентрации глюкозы, посылает сигнал подавления процессов фотосин-

теза (Valluru, Van den Ende, 2011), роста и развития растения (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010).

У растений имеется три пути передачи глюкозного сигнала: 1) гексокиназ-зависимый, с фосфорилированием сахаров; 2) гликолиз-зависимый и, 3) гексокиназ-независимый, без фосфорилирования сахаров (Rolland *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2009; Häusler *et al.*, 2014). В качестве дополнительного сенсора, в обход гексокиназ-зависимого пути, когда гидролиз сахарозы происходит за счет работы сахарозосинтазы, действует фруктокиназа (Pego, Smeekens, 2000). Однако не только гексозы, но и сахароза является сигнальной молекулой (Koch, 2004; Gupta, Kaur, 2005; Wind *et al.*, 2010), при этом клетки растений имеют независимые сенсоры для гексоз и сахарозы (Rosa *et al.*, 2009). Предполагают, что в качестве сенсоров сахарозы, а также регуляторов ее внеклеточной концентрации, выступают сахарозосинтаза, кальциевые каналы и STPs (Lalonde *et al.*, 1999; Li, Sheen, 2016). Источником сигнала служит транспортировка сахарозы до акцепторных клеток и последующий ее гидролиз (Koch, 2004; Rolland *et al.*, 2006). Следует учесть, что сахарный сигналинг изменяет стрессовый ответ растения во взаимодействии с другими сигнальными путями, в том числе, гормональным (Ruan 2014; Ciereszko, 2018). Именно сахара и гормоны осуществляют “дальний” сигналинг (Rolland *et al.*, 2006; Ljung *et al.*, 2015). Следовательно, влияя на экспрессию генов, сахара избирательно усиливают либо ослабляют пути биосинтеза ключевых метаболитов (белки, липиды и др.), что оказывает непосредственное влияние на процесс формирования устойчивости растений к гипотермии.

#### КОЛЛИГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ САХАРОВ У МОРОЗОСТОЙКИХ РАСТЕНИЙ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Коллигативные (существенно зависящие от концентрации растворенного вещества) эффекты растворов сахаров наиболее выражены у группы морозостойких растений при действии отрицательных температур, и в меньшей мере у холодостойких растений при переохлаждении (сохранение воды в некристаллической форме) в условиях заморозка.

Впервые предположение о протекторной роли высококонцентрированных растворов сахаров в образовании льда в клетках растений высказано нашим соотечественником Н.А. Максимовым в 1912 г. (Maximow, 1912). Позднее было установлено, что в условиях гипотермии защитным эффектом обладают только те растворимые сахара, которые способны вступать в метаболизм клетки и накапливаться в них в больших количествах (Туманов, 1979; Трунова, 1979). Морозостойкие растения при низкотемпературном закаливании на-

капливают в большом количестве различные нетоксичные осмотически активные вещества (преимущественно, низкомолекулярные сахара), обладающие стресс-протекторным действием (Levitt, 1980; Kamata, Uemura, 2004; Ouellet, 2007; Rosa *et al.*, 2009; Jha, Sharma, 2019; Kolupaev *et al.*, 2020). Поздней осенью сахароза и фруктоза являются основными сахарами в злаках кущения озимой пшеницы (Halford *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011). Количество растворимых сахаров у озимых злаков достигает 50–60% от массы сухого вещества клеток (Трунова, 1979; Nawaz *et al.*, 2019). При гипотермии некоторые злаки накапливают олигосахарид раффинозу, однако по абсолютному содержанию она существенно уступает другим низкомолекулярным сахарам (Kamata, Uemura, 2004; Nägele *et al.*, 2011). Согласно ряду исследований, вклад сахаров раффинозного ряда в формировании устойчивости растений к гипотермии признан не существенным (Zuther *et al.*, 2004; Knaupp *et al.*, 2011).

В естественных условиях при отрицательных температурах у морозостойких растений увеличивается проницаемость мембран для свободного выхода воды, способной к кристаллизации, и происходит ее отток в межклетники по специализированным водным каналам — аквапоринам (Gandola, Ramadoss, 2018). Это необходимо для предотвращения формирования кристаллов льда внутри клеток (внутриклеточное льдообразование летально для всех групп растений). Кристаллы льда сначала образуются в межклетниках, так как внутриклеточная вода имеет более низкую температуру замерзания в связи с высокой концентрацией осмотически активных веществ. Для растений при температуре ниже 0°C характерна гетерогенная нуклеация (образование кристаллических зародышей, или центров кристаллизации), которая происходит обязательно при наличии в апопласте нуклеаторов льда, в основном, сапрофитных бактерий (Трунова, 2007). Увеличивающиеся в размерах кристаллы льда не только оказывают механическое действие на структуру клеток, но также продолжают оттягивать из них свободную воду, при этом изменяется внутриклеточный осмотический потенциал и развивается обезвоживание (дегидратация). Наиболее сильное обезвоживание клеток достигается у самых морозостойких деревьев, таких как береза и ива, у которых при –60°C сохраняется 7.6–8.9% незамерзшей воды, тогда как озимые злаки выдерживают лишь 50% потерю воды (Красавцев, 1972). Следовательно, для древесных растений более эффективным механизмом морозостойкости является своевременный отток свободной воды из протопласта в межклетники с последующим развитием сильного обезвоживания клеток. Для зимующих травянистых злаков морозостойкость базируется в значительной степени на водоудерживающей способности клеток (Трунова, 2007). Известно,

**Таблица 1.** Суммарное содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы в листьях различных по устойчивости к гипотермии групп растений, в норме и после гипотермии

Вид	Условия опыта	Суммарное содержание сахаров	Источник
Теплолюбивые растения			
Огурец ( <i>Cucumis sativus</i> L., сорт Конкурент)	20°C	12*	Климов и др., 2002
	6°C, 3 сут	26*	
Томат ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., сорт Сибирский скороспелый)	20°C	14*	
	6°C, 3 сут	82*	
Табак ( <i>Nicotiana tabacum</i> L., сортотип Samsun)	23°C	12.3**	Попов и др., 2013
	8°C, 6 сут	17.8**	
Виноград ( <i>Vitis vinifera</i> L., сорт Flame seedless)	24°C	26.0**	Rooy <i>et al.</i> , 2017
	4°C, 4 ч	32.8**	
Рис ( <i>Oryza sativa</i> L., сорт INIAP12)	30/27°C	12.3**	Morsy <i>et al.</i> , 2007
	(день/ночь)	17.7**	
	13/10°C		
	(день/ночь)		
Тростник ( <i>Arundo donax</i> L.)	22°C	34***	Pompeiano <i>et al.</i> , 2015
	10°C, 7 сут	70***	
Холодостойкие растения			
Резушка Талля ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L., экотип Col-0)	22°C	30.6*	Ristic, Ashworyh, 1993
	4°C, 5 сут	148.6*	
Картофель ( <i>Solanum tuberosum</i> L., сорт Дезире)	22°C	59*	Данные авторов (неопубл.)
	5°C, 3 сут	115*	
Капуста ( <i>Brassica oleraceae</i> L., сорт Banchurisou)	20/15°C	3.4**	Sasaki <i>et al.</i> , 2001
	(день/ночь)	16.6**	
Теллунгиелла ( <i>Thellungiella salsuginea</i> (Pall.) O.E.Schulz, экотип Tuva)	20/18°C	13.5***	Lee <i>et al.</i> , 2012
	(день/ночь)	95.0***	
Шпинат ( <i>Spinacia oleraceae</i> L., сорт Winter Bloomsdale)	25°C	3.9***	Guy <i>et al.</i> , 1992
	5°C, 14 сут	63.3***	
Морозостойкие растения			
Пшеница озимая ( <i>Triticum aestivum</i> L., сорт Лютеценс 329)	20°C	180*	Колупаев и др., 2015
	2°C, 7 сут	320*	
Рожь озимая ( <i>Secale cereale</i> L., сорт Память Худоерко)	20°C	230*	
	2°C, 7 сут	330*	
Ячмень озимый ( <i>Hordeum vulgare</i> L., сорт Жерар)	20°C	170*	
	2°C, 7 сут	240*	
Тритикале озимый ( <i>Triticale</i> , сорт Раритет)	20–22°C	29**	Kolupaev <i>et al.</i> , 2020
	2–4°C, 6 сут	42**	
Пшеница озимая ( <i>Triticum aestivum</i> L., сорт Norstar)	21°C	23***	Kamata, Uemura, 2004
	3°C, 4 нед	167***	

Примечание. \* – мг/г сухой массы, \*\* – мг/г сырой массы, \*\*\* – мкмоль/г сырой массы.

что благодаря своей химической структуре (главным образом, наличию гидроксильных групп) молекулы низкомолекулярных сахаров связываются водородными связями молекулы воды, тем самым, часть внутриклеточной воды сохраняется в коллоидно-связанной форме. Вода, входящая в состав гидратных оболочек молекул сахаров, не замерзает и не транспортируется, оставаясь в клетке. Связанная вода не может участвовать в химических реакциях, транспортироваться по растению, но благодаря ей снижается точка замерзания раствора. Так, за счет высоких водоудерживающих свойств молекул сахаров в меристематических клетках хвойных растений в зимний период обеспечивается наличие незамерзающей (переохлажденной) жидкой фазы (почти до  $-40^{\circ}\text{C}$ ) в виде высококонцентрированного внутриклеточного раствора (Алаудинова, 2011). В январе в цитоплазме меристематических клеток почек ели сибирской (*Picea obovata* L.) концентрация водорастворимых сахаров составляла 17%, а у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) – 21% от сухой массы ткани (Алаудинова и др., 2010). Таким образом, высококонцентрированные растворы сахаров помогают морозостойким растениям в зимний период избежать внутриклеточных повреждений (денатурация белков, разрушение структуры плазмалеммы и органелл и др.), вызванных обезвоживанием и внеклеточным льдообразованием.

Осмотическое давление является важным коллигативным свойством не только растений, но всех живых систем (Костюк, 2016). Чем выше концентрация веществ в растворе, тем выше осмотическое давление. При развитии обезвоживания концентрации растворенных веществ (преимущественно, неорганических ионов) в клетках многократно возрастают, и они начинают оказывать токсическое действие. В этих условиях высокие концентрации низкомолекулярных сахара нейтрализуют токсичные вещества путем их разбавления. При высоких концентрациях сахара нетоксичны, поскольку не способны напрямую взаимодействовать с макромолекулами, при этом они могут выступать в роли биогенных коллигативных антифризов (Пучков, 2017). Сахара повышают осмотический потенциал клетки, тем самым снижают температуру замерзания раствора, при которой происходит нуклеация льда (Reyes-Diaz *et al.*, 2006). Таким образом, растворы сахаров защищают ткани морозостойких растений от адгезии с кристаллами льда, а благодаря своим коллигативным свойствам контролируют льдообразование в клетках и предохраняют их от чрезмерного обезвоживания.

\* \* \*

Низкомолекулярные сахара (преимущественно, фруктоза, глюкоза и сахароза) отражают уровень метаболической активности растительной клет-

ки, а в условиях гипотермии выполняют полифункциональную роль. Роль сахаров в повышении устойчивости растений к гипотермии связана, прежде всего, с их способностью стабилизировать структуру мембран, молекул липидов и белков, нейтрализовать АФК, участвовать в сигналинге и метаболических процессах в качестве источника энергии и предшественников синтеза других соединений. Внутриклеточная концентрация сахаров влияет на экспрессию генов, задействованных в усилении или ослаблении пути биосинтеза биополимеров, что отражается на формировании устойчивости растений к гипотермии. Однако для устойчивости морозостойких растений к отрицательным температурам одним из важнейших факторов является высокое содержание в их тканях растворимых сахаров. Коллигативные эффекты высококонцентрированных растворов сахаров связаны с повышением водоудерживающей способности клеток, предотвращением их обезвоживания при внеклеточном льдообразовании, снижением величины водного потенциала и температуры замерзания протопласта, нейтрализацией токсичных веществ. Именно высокое содержание сахаров как до, и особенно после низкотемпературного закалывания, является характерным признаком группы морозостойких растений (см. табл. 1). И, наоборот, более низкое содержание сахаров у холодостойких растений, а тем более у теплолюбивых, является одной из важнейших причин генетической неустойчивости к образующимся в них кристаллам льда.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Взаимодействие сахаров с гидроксильным радикалом в связи с фунгитоксичностью выделений листьев // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 1646–1651.
- Алаудинова Е.В., Симкина С.Ю., Миронов П.В. Водорастворимые вещества меристем почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L.: содержание, состав и свойства при формировании состояния низкотемпературной устойчивости // Сиб. экологический журнал. 2010. Т. 17. С. 327–333.
- Алаудинова Е.В. Экологические особенности низкотемпературной адаптации лесообразующих хвойных видов Сибири: структурно-химические изменения меристем почек // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. д. б. н. Красноярск: ФГБОУ “Сиб. гос. технологический университет”. 2011. 36 с.
- Апакидзе А.В., Буадзе О.А. Ультраструктура клеток и углеводный обмен некоторых видов виноградного растения в связи с их морозоустойчивостью // Физиология и биохимия культурных растений. 2000. Т. 32. № 2. С. 114–120.
- Астахова Н.В., Попов В.Н., Селиванов А.А., Бураханова Е.А., Алиева Г.П., Мошков И.Е. Реорганизация ультраструктуры хлоропластов при низкотемпературном закалывании растений арабидопсиса // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 790–797.

- Дерябин А.Н., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Участие апопластной инвертазы в формировании устойчивости холодостойких растений к гипотермии // Известия РАН. Сер. биол. 2016. № 1. С. 32–40.
- Дерябин А.Н., Сабельникова Е.П., Бураханова Е.А. Зависимость формирования холодоустойчивости у растений *in vitro* от концентрации сахарозы в среде выращивания // Вестник Мордовского университета. 2011. № 4. С. 200–205.
- Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Влияние сахаров на развитие окислительного стресса, вызванного гипотермией (на примере растений картофеля, экспрессирующих ген инвертазы дрожжей) // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 39–46.
- Касперска-Палач А. Механизм закаливания травянистых растений // В кн.: Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. М.: Колос, 1983. С. 112–123.
- Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. Вып. 4. С. 456–470.
- Климов С.В., Попов В.Н., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Пониженная холодостойкость теплолюбивых растений связана с ингибированием ассимиляции CO<sub>2</sub> в листьях и накопления сахаров в корнях // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 871–877.
- Колупаев Ю.В., Трунова Т.И. Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов // Физиология и биохимия культурных растений. 1992. Т. 24. С. 523–533.
- Колупаев Ю.Е., Рябчун Н.И., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 533–541.
- Красавцев О.А. Калориметрия растений при температурах ниже нуля. М.: Наука, 1972. 117 с.
- Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 1. Пер с англ. М.: Мир, 1985. 367 с. Lehninger A. Principles of biochemistry. Worth Publishers, Inc. 1982.
- Марковская Е.Ф., Шibaева Т.Г. Низкотемпературные сенсоры у растений: гипотезы и предположения // Известия РАН. Сер. биол. 2017. № 2. С. 120–128.
- Попов В.Н., Антипина О.В., Бураханова Е.А. Участие инвертазы клеточной стенки в низкотемпературном закаливании растений табака // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 214–221.
- Пучков Е. Биогенное управление образованием льда // Природа. 2017. № 2. С. 27–37.
- Синькевич М.С., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 186–192.
- Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс // 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
- Трунова Т.И. Физиология закаливания озимых злаков к морозу низкими положительными температурами: Автореф. дис. на соиск. уч. ст. д. б. н. М., 1979. 48 с.
- Туманов И.И. Физиология закаливания и зимостойкости растений. М.: Наука, 1979. 350 с.
- Ahmad I.Z. Role of sugars in abiotic stress signaling in plants // Plant signaling molecules / Eds Iqbal M., Khan R., Reddy P.S., Ferrante A., Khan N.A.; Woodhead Publishing, 2019. P. 207–217.
- Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology. 1987. V. 24. P. 324–331.
- Baier M., Hemman G., Holman R., Corke F., Card R., Smith C., Rook F., Bevan M.W. Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 81–91.
- Bogdanović J., Mojović M., Milosavić N., Mitrović A., Vućinić L., Spasojević I. Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress // Eur. Biophys J. 2008. V. 37. P. 1241–1246.
- Bohnert H.J., Sheveleva E. Plant stress adaptations – making metabolism move // Curr. Opin. Plant Biol. 1998. V. 1. P. 267–274.
- Bolouri-Moghaddam M.R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F., Van den Ende W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells // FEBS J. 2010. V. 277. P. 2022–2037.
- Caffery M., Tonseca V., Leopold A.C. Lipid-sugar interactions reveal a new biology // Plant Physiol. 1988. V. 86. P. 754–758.
- Ciereszko I. Regulatory roles of sugars in plant growth and development // Acta Soc. Bot. Pol. 2018. V. 87. P. 3583–3596.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Wistrom C.A. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars // Biochem. J. 1987. V. 242. P. 1–10.
- Crowe L.M., Crowe J.H. Effects of water and carbohydrates on membrane fluidity // Physiological regulation of membrane fluidity / Ed. Cherry J.H. N.Y.: Alan R. Liss, Inc., 1988. P. 75–99.
- Crowe L.M., Mouradian R., Crowe J.H., Jackson S.A., Womersley C. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 769. P. 141–150.
- Fürtauer L., Weiszmann J., Weckwerth W., Nägele T. Dynamics of plant metabolism during cold acclimation // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 5411–5426.
- Gangola M.P., Ramadoss B.R. Sugars play a critical role in abiotic stress tolerance in plants // Biochemical, physiological and molecular avenues for combating abiotic stress in plants / Eds. Wani S.H. Academic Press. 2018. P. 17–38.
- Gibson S.I. Control of plant development and gene regulation by sugar signaling // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 93–102.
- Gupta A.K., Kaur N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants // J. BioSci. 2005. V. 30. P. 761–776.
- Gusta L.V., Wisniewski M., Nesbitt N.T., Gusta M.L. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice

- nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 1642–1653.
- Guy Ch.L., Huber J.L.A., Huber S.C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature // *Plant Physiol.* 1992. V. 100. P. 502–508.
- Halford N.G., Curtis T.Y., Muttucumararu N., Postles J., Mottram D.S. Sugars in crop plants // *Ann. Appl. Biol.* 2011. V. 158. P. 1–25.
- Hanson J., Smeekens S. Sugar perception and signaling – an update // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. V. 12. P. 562–567.
- Häusler R.E., Heinrichs L., Schmitz J., Flügge U.I. How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities // *Mol. Plant.* 2014. V. 7. P. 1121–1137.
- Hidekazu S., Kazuo I., Masayuki O. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings // *Ann. Bot.* 1996. V. 78. P. 365–369.
- Hurry V.M., Strand A., Tobiaeson M., Gardstrom P., Oquist G. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 697–706.
- Jang J.C., León P., Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 5–19.
- Jha A.B., Sharma P. Regulation of osmolytes syntheses and improvement of abiotic stress tolerance in plants // Approaches for enhancing abiotic stress tolerance in plants / Eds Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M., Oku H., Islam T. CRC Press, 2019. P. 1971–2005.
- Jin Y., Ni D.A., Ruan Y.L. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level // *Plant Cell.* 2009. V. 21. P. 2072–2089.
- Kamata T., Uemura M. Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance // *CryoLetters.* 2004. V. 25. P. 311–322.
- Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y., Zhao W., Popp M., Porat R., Guy C.L. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content // *Plant J.* 2007. V. 50. P. 967–981.
- Kim M., Lim J.H., Ahn C.S., Park K., Kim G.T., Kim W.T., Pai H.S. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell.* 2006. V. 18. P. 2341–2355.
- Knaupp M., Mishra K.B., Nedbal L., Heyer A.G. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze–thaw cycles // *Planta.* 2011. V. 234. P. 477–486.
- Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. V. 7. P. 235–246.
- Koch K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 509–540.
- Kolupaev Y.E., Horielova E.I., Yastreb T.O., Ryabchun N.I. State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance // *Cereal Research Communications.* 2020. P. 1–7.
- Krasavina M.S., Burmistrova N.A., Raldugina G.N. The role of carbohydrates in plant resistance to abiotic stresses // Emerging technologies and management of crop stress tolerance / Eds Ahmad P., Rasool S. Elsevier Inc., 2014. P. 229–270.
- Kumar R., Chaurasiya P.C., Singh R.N., Singh S. A review report: low temperature stress for crop production // *Int. J. Pure App. Biosci.* 2018. V. 6. P. 575–598.
- Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J.W., Frommer W.B., Ward J.M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing // *The Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 707–726.
- Lee Y.P., Babakov A., de Boer B., Zuther E., Hincha D.K. Comparison of freezing tolerance, compatible solutes and polyamines in geographically diverse collections of *Thellungiella* sp. and *Arabidopsis thaliana* accessions // *BMC Plant Biology.* 2012. V. 12. P. 131.
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. V. 1. Chilling, freezing and high temperature stresses. N.Y.: Acad. Press, 1980. 426 p.
- Li L., Sheen J. Dynamic and diverse sugar signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016. V. 33. P. 116–125.
- Ljung K., Nemhauser J.L., Perata P. New mechanistic links between sugar and hormone signaling networks // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 25. P. 130–137.
- Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H.P., Van den Ende W. Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2015. V. 82. P. 822–839.
- Maximow N.A. Chemische schutzmittel der pflanzen gegen Erfrieren: I // *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1912. V. 30. S. 504–516.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // *Science.* 2003. V. 300. P. 332–336.
- Morelli R., Russo-Volpe S., Bruno N., Lo Scalzo R. Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 7418–7425.
- Morsy M.R., Jouve L., Hausman J.F., Hoffmann L., Stewart J.M. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance // *J. Plant Physiol.* 2007. V. 164. P. 157–167.
- Nägele T., Kandel B.A., Frana S., Meißner M., Heyer A.G. A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 506–518.
- Nawaz F., Majeed S., Ahmad Kh.Sh., Hamid A., Shabbir R.N., Aqib M., Ikram R.M. Use of osmolytes in improving abiotic stress tolerance to wheat (*Triticum aestivum* L.) // Wheat production in changing environments. Springer, Singapore, 2019. P. 497–519.
- Nievola C.C., Carvalho C.P., Carvalho V., Rodrigues E. Rapid responses of plants to temperature changes // *Temperature.* 2017. V. 4. P. 371–405.

- Ouellet F.* Cold acclimation and freezing tolerance in plants // Encyclopedia of life sciences. Wiley, London, 2007. P. 1–6.
- Pego J., Smeekens S.C.M.* Plant fructokinases: a sweet family get-together // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 531–536.
- Peshev D., Van den Ende W.* Sugars as antioxidants in plants // Crop improvement under adverse conditions / Eds. Tuteja N., Gill S.S. N.Y.: Springer Science+Business Media, 2013. P. 285–307.
- Pompeiano A., Vita F., Miele S., Guglielminetti L.* Freeze tolerance and physiological changes during cold acclimation of giant reed [*Arundo donax* (L.)] // Grass and Forage Science. 2015. V. 70. P. 168–175.
- Quinn P.J.* Effect of sugars on the phase behaviour of phospholipid model membranes // Biochem. Soc. Transactions. 1989. V. 17. P. 957–960.
- Ramel F., Sulmon C., Bogard M., Couée I., Gouesbet G.* Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets // BMC Plant Biol. 2009. V. 9. P. 28–46.
- Reyes-Diaz M., Ulloa N., Zuniga-Feest A., Gutierrez A., Gidekel M., Alberdi M., Corcuera L.J., Bravo L.A.* *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3687–3696.
- Ristic Z., Ashworth E.N.* Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation // Protoplasma. 1993. V. 172. P. 111–123.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J.* Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 675–709.
- Rolland F., Moore B., Sheen J.* Sugar sensing and signaling in plants // Plant Cell. 2002. V. 14. P. S185–S205.
- Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., Gonzalez J.A., Hilal M., Prado F.E.* Soluble sugars – metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants // Plant Signaling & Behavior. 2009. V. 4. P. 388–393.
- Rossouw D., Kossmann J., Botha F.C., Groenewald J.H.* Reduced neutral invertase activity in the culm tissues of transgenic sugarcane plants results in a decrease in respiration and sucrose cycling and an increase in the sucrose to hexose ratio // Functional Plant Biol. 2010. V. 37. P. 22–31.
- Rooy S.S.B., Salekdeh G.H., Ghabooli M., Gholami M., Karimi R.* Cold-induced physiological and biochemical responses of three grapevine cultivars differing in cold tolerance // Acta Physiol. Plant. 2017. V. 39. P. 264.
- Ruan Y.-L.* Signaling role of sucrose metabolism in development // Molecular Plant. 2012. V. 53. P. 763–765.
- Ruan Y.L.* Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling // Annu. Rev. Plant Biol. 2014. V. 65. P. 33–67.
- Sakina A., Wani W., Mushtaq M., Wani S.H., Shikari A.B.* Omics approaches for cold stress tolerance in plants // Recent approaches in omics for plant resilience to climate change / Eds. Wani S. Springer, Cham, 2019. P. 331–356.
- Sami F., Yusuf M., Faizan M., Faraz A., Hayat S.* Role of sugars under abiotic stress // Plant. Physiol. Biochem. 2016. V. 109. P. 54–61.
- Sasaki H., Ichimura K., Imada S., Yamaki S.* Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings // J. Plant Physiol. 2001. V. 158. P. 847–852.
- Sherson S.M., Alford H.L., Forbes S.M., Wallac G., Smith S.M.* Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2003. V. 54. P. 525–531.
- Smirnoff N., Cumbes Q.J.* Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes // Phytochemistry. 1989. V. 28. P. 1057–1060.
- Soares C., Carvalho M.E., Azevedo R.A., Fidalgo F.* Plants facing oxidative challenges – a little help from the antioxidant networks // Environmental and Experimental Botany. 2019. V. 161. P. 4–25.
- Strauss G., Hauser H.* Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2422–2426.
- Sum A.K., Faller R., de Pablo J.J.* Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides // Biophysical J. 2003. V. 85. P. 2830–2844.
- Valluru R., Van den Ende W.* Myo-inositol and beyond – emerging networks under stress // Plant Sci. 2011. V. 181. P. 387–400.
- Wan H., Wu M., Yang Y., Zhou G., Ruan Y.L.* Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 163–177.
- Wanner L.A., Junttila O.* Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1999. V. 120. P. 391–399.
- Wind J., Smeekens S., Hanson J.* Sucrose: metabolite and signaling molecule // Phytochemistry. 2010. V. 71. P. 1610–1614.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.* Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 781–803.
- Zeng Y., Yu J., Cang J., Liu L., Mu Y., Wang J., Zhang D.* Detection of sugar accumulation and expression levels of correlative key enzymes in winter wheat (*Triticum aestivum*) at low temperatures // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. P. 681–687.
- Żrobek-Sokolnik A.* Temperature stress and responses of plants // Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change / Eds Ahmad P., Prasad M.N.V. Springer Science & Business Media., 2012. P. 113–134.
- Zuther E., Büchel K., Hundertmark M., Stitt M., Hincha D.K., Heyer A.G.* The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. 2004. V. 576. P. 169–173.

## **Colligative Effects of Solutions of Low-Molecular Sugars and Their Role in Plants at Hypothermia**

**A. N. Deryabin<sup>1, #</sup> and T. I. Trunova<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Botanicheskaya str., 35, Moscow, 126276 Russia*

*<sup>#</sup>e-mail: anderyabin@mail.ru*

The review discusses the colligative effects of high sugar level at negative temperatures are typical only to frost-resistant plants and are associated with preventing cells from dehydration and formation of intercellular ice, decreasing the protoplast freezing point, and neutralizing toxic substances. The ability of plant sugars to manifest a protective effect, namely to stabilize the membrane structure, lipid and protein molecules, to neutralize reactive oxygen species, to participate in signaling and metabolic processes as an energy source and precursors for the synthesis of other protector compounds under the conditions of hypothermia are also discussed.

*Keywords:* sugars, low temperature, reactive oxygen species, signaling, plants

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.) ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СВЕТОВОГО РЕЖИМА

© 2022 г. А. Т. Епринцев\*, @, Г. Б. Анохина\*, Д. Н. Федорин\*

\*ФГБОУВО «Воронежский государственный университет»,  
Университетская площадь, д. 1, Воронеж, 394018 Россия

@E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 30.09.2019 г.

После доработки 26.12.2019 г.

Принята к публикации 26.12.2019 г.

Изучены молекулярные и биохимические механизмы регуляции активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в листьях кукурузы при изменении светового режима. Установлено внутриклеточное распределение глутаматдегидрогеназной активности, показавшее, что исследуемый фермент локализован главным образом в митохондриях (86%). Выявлено, что величина активности ГДГ регулируется световым режимом. В темноте и при облучении дальним красным светом (ДКС) глутаматдегидрогеназная активность возрастает, что обусловлено активацией экспрессии генов, кодирующих  $\alpha$ -субъединицу (*gdh-2*) и  $\beta$ -субъединицу (*gdh-1*). Уровень транскриптов генов *gdh-1*, *gdh-2*, кодирующих различные субъединицы этого фермента, увеличивался в темноте, но снижался на свету и при облучении красным светом. Показано, что трансдукция фитохромного сигнала осуществляется с участием вторичного мессенджера – катионов кальция.

**Ключевые слова:** глутаматдегидрогеназа, свет, фитохром, криптохром, транскрипция, кукуруза

**DOI:** 10.31857/S1026347021060068

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, который катализирует обратимую реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до глутамата с использованием НАД<sup>+</sup> и/или НАД(Ф) в качестве кофермента. Если классифицировать данный фермент по коферментной специфичности, существуют три основных типа ГДГ: НАД-зависимая (НАД-ГДГ, КФ 1.4.1.2), НАДФ-зависимая (НАДФ-ГДГ, КФ 1.4.1.4) и та, которая может использовать два кофермента сразу (НАД(Ф)-ГДГ, КФ 1.4.1.3) (Fontaine *et al.*, 2013).

Большая часть ГДГ в растительной клетке имеет митохондриальную локализацию. Однако данный фермент также присутствует в цитоплазме и хлоропластах (Fontaine *et al.*, 2006). Следует отметить, что глутаматдегидрогеназа в растениях может встречаться в корнях, семядолях, а также побегах. Наличие специфичных типов ГДГ (по используемому кофактору) в разных органах и тканях обусловлено такими факторами как клеточная дифференцировка и физиологическая функция, что связано с различиями в азотном обмене корней и листьев. Изоформы ГДГ могут быть вовлечены в анаболические процессы. Кроме того, могут обеспечивать катаболические процессы:

удаление избыточного азота, также данный фермент обеспечивает преобладающий путь синтеза из глутамата 2-оскоглутарата, окисляемого в ЦТК (Engel, 2014).

Известно, что активность глутаматдегидрогеназы может регулироваться световым режимом (Miyashita, Good, 2008). Более того, имеются данные, что у *Arabidopsis thaliana* экспрессия генов ГДГ изменяется при смене условий темнота/свет (Гарник и др., 2013). Однако до сих пор в полной мере механизм, посредством которого осуществляется контроль работы данной ферментной системы недостаточно изучен. В связи с тем, что у растительных организмов имеются митохондриальный, хлоропластный, а также ядерный геномы, возникает необходимость в сложной системе передачи сигнала для осуществления процесса транскрипции. В настоящее время не изучено, каким образом осуществляется трансдукция сигнала: от органелл к ядру, обеспечивая процесс транскрипции (ретроградная регуляция), или же сигнал идет от ядра к органеллам (антероградная регуляция) (Petrillo *et al.*, 2014).

Филогенетический анализ показал, что растительная ГДГ кодируется небольшим семейством генов, имеющим высокий процент гомологии. У

кукурузы ГДГ в геноме представлена двумя генами, каждый из которых кодирует отдельные типы субъединиц ГДГ:  $\alpha$  и  $\beta$  (Lehmann, Ratajczak, 2008). Sakakibara et al. изолировали полноразмерную копию кДНК *gdh-1* (LOC542220), кодирующую  $\beta$ -субъединицу ГДГ кукурузы, которая локализована в хромосоме 1 (Sakakibara et al., 1995). Исследования структуры гена показали, что открытая рамка считывания кодирует 411 аминокислотный остаток (а. о.). Транскрипты данного гена обнаружены в корнях, его локализация связана с клетками оболочки проводящего пучка. Ген *gdh-2* (LOC100193614), локализованный в хромосоме 10, кодирует  $\alpha$ -субъединицу ГДГ кукурузы. Известно, что *gdh-2* относится к генам с циркадной регуляцией. По предположению Гарника с соавт., в циркадной регуляции экспрессии гена *gdh-2* ГДГ арабидопсиса участвуют различные сигнальные пути клетки, обеспечивающие координацию между отдельными компартментами (Гарник и др., 2013).

Все больше фактов указывает на важность  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулина в регуляции транскрипционных процессов в ответ на эндогенные и экзогенные раздражители. Существуют предположения, согласно которым изменение в уровне цитозольного кальция в ответ на раздражители может оказывать влияние на ядерную кальциевую сигнализацию путем простой диффузии  $\text{Ca}^{2+}$  через ядерный поровый комплекс. Было показано, что ядра растительных клеток обладают собственным механизмом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации. При этом, в ядрах отмечается явное и независимое изменение в концентрации двухвалентных катионов кальция (по сравнению с цитоплазмой) в ответ на облучение синим светом, осмотические, механические и тепловые раздражители (Labuz et al., 2016).

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что регуляция активности некоторых ключевых ферментов цикла Кребса, таких как цитратсинтаза, сукцинатдегидрогеназа, фумаратгидратаза и аконитатгидратаза в листьях растений в условиях стресса осуществляется на экспрессионном уровне с участием катионов кальция как вторичных мессенджеров (Попов и др., 2007; Епринцев и др., 2012; Eprintsev et al., 2013, 2016, 2018).

Цель данной работы – исследование особенностей регуляции функционирования глутаматдегидрогеназы (НАД(Ф)-ГДГ, КФ 1.4.1.3) в листьях кукурузы при изменении светового режима.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали 14-дневные листья растений кукурузы (*Zea*

*mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенных гидропонным способом при 10-часовом световом дне с интенсивностью света  $25 \text{ Вт/м}^2$  (“LabTech”, Корея). Температура выращивания растений составляла  $25^\circ\text{C}$ .

Растения экспонировали 12 ч на белом свете (вариант “свет”). Для создания разных световых режимов растения помещали в темноту на 24 ч (вариант “темнота”), после чего облучали красным (вариант “КС”), и/или дальним красным (вариант “ДКС” и “КС + ДКС”) светом в течение 15 мин, используя соответственно светодиоды 640–680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) для облучения красным светом, 710–750 нм (ЗЛ127А-5-5, Россия) для облучения дальним красным светом. Интенсивность света составляла  $0.044 \text{ Вт/м}^2$ . Пробы для анализа отбирали через три часа с момента облучения (Eprintsev et al., 2013).

Применяли специфические ингибиторы: рутений красный (25 мМ) для блокировки транспорта кальция через ионные каналы, и этиленгуанинтетраацетат (ЭГТА) (5 мкМ) для хелатирования свободного кальция.

Для выделения митохондриальной фракции навеску листьев кукурузы 5 г растирали в фарфоровой ступке со средой выделения: 0.15 М Tris-HCl буфер (pH 7.4), 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорид калия, 4 мМ хлорид магния, 0.05% Triton X-100 в соотношении 1 : 10. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 3 мин при 3000 g на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804R (“Eppendorf”, Германия). Супернатант центрифугировали 10 мин при 18000 g. Выделенную фракцию митохондрий разрушали осмотическим шоком в среде, содержащей 0.15 М Tris-HCl буфер, pH 7.4. Степень разрушения митохондрий была более 90%, что контролировали методом микроскопии на Olympus CX41RF (“Olympus”, Япония). Полученную фракцию митохондрий использовали для определения активности ГДГ. Все манипуляции проводили при температуре  $+4^\circ\text{C}$ .

Активность ГДГ определяли спектрофотометрическим методом при 340 нм в среде, содержащей 13 мМ 2-оксоглутарата, 0.25 мМ НАДН, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 50 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 мМ Tris-HCl буфер pH 8.0 (Sarasketa et al., 2016).

Для выделения различных мембранных фракций из клеточного гомогената проводили центрифугирование в градиенте плотности сахарозы (Геннис, 1997). Градиент создавали путем последовательного наложения растворов сахарозы в концентрациях: 2.5, 2.3, 1.8, 1.5, 1.3 М. Гомогенизировали исследуемый объект в среде выделения (1:5), которая содержала 0.1 М Tris-HCl буфер, pH

**Таблица 1.** Праймеры к генам глутаматдегидрогеназы для проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
<i>gdh-1</i>	Прямой	СТСССТГТТГТАТССТСТТГГГТС	58
	Обратный	GCCATTGCCATTGCCATTGTT	
<i>gdh-2</i>	Прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	60
	Обратный	GTAATGCGCGGTCAATGGTC	

8.0; 0.4 М сахарозу; 2 мМ КСl; 1 мМ ЭДТА; 3 мМ ДТТ. Далее отфильтровывали супернатант и центрифугировали 3–4 мин при 1000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость центрифугировали еще 3–4 мин с той же скоростью. Затем супернатант снова центрифугировали при 11000 об/мин. Осадок растворяли в 10 мл среды выделения и наслаивали на вершину охлажденного до 0°С ступенчатого сахарозного градиента: 2.5 М (2 мл); 2.3 М (5 мл); 1.8 М (6 мл); 1.5 М (5 мл); 1.3 М (5 мл).

Разделение органелл достигалось путем центрифугирования на центрифуге Beckman (США) при 100000 g 90 мин при 0°С. Полученные фракции осторожно собирали и разбавляли буфером до концентрации сахарозы 0.4–0.5 М, а затем центрифугировали 30 мин при 11000 об/мин для осаждения органелл. Полученные осадки разрушали осмотическим шоком (в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.5) и далее использовали для измерения активности ферментов.

Перекрестное загрязнение определяли по активности маркерных ферментов: цитоплазмы – алкогольдегидрогеназы (Pathuri *et al.*, 2011) и митохондрий – сукцинатдегидрогеназы (Попов и др., 2007).

Общее количество белка определяли методом Лоури с соавт. (Lowry *et al.*, 1951).

Суммарную РНК из растений выделяли фенол-хлороформным методом (Chomczynski, Sacchi, 1987). Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (“Евроген”, Россия). Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей из GenBank, с помощью программы Primer-BLAST (табл. 1). Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция) с красителем SybrGreen I (“Евроген”, Россия). Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* (Nicot *et al.*, 2005).

В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода (Livak, Schmittgen, 2001).

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительную оценку характера распределения проводили по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовали с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения (Лакин, 1990). Дополнительно применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при  $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения субклеточной локализации ГДГ в листьях кукурузы было проведено центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, которое позволило исследовать четыре фракции: цитоплазму, хлоропласты, митохондрии и пероксисомы. Результаты проведенного исследования представлены в табл. 2.

Из полученных данных следует, что ГДГ локализована в цитозоле (9.53%), хлоропластах (3.92%) и в большей степени в митохондриях (86.54%), что в целом согласуется с имеющимися литературными данными (Яковлева и др., 1964). В пероксисомальной фракции активности исследуемого фермента обнаружено не было. Как уже упоминалось, согласно данным, полученным Яковлевой с соавт., ГДГ в корнях кукурузы большей частью локализована в митохондриях.

**Таблица 2.** Субклеточная локализация глутаматдегидрогеназной активности в листьях кукурузы ( $n = 3; p \leq 0.05$ )

Фракция органоидов	Общая активность, Е/грамм сырой массы	% Активности фермента от общего содержания
Пероксисомы	–	–
Цитоплазма	15.5	9.53
Хлоропласты	6.38	3.92
Митохондрии	140.7	86.54

Для определения чистоты полученных фракций был произведен анализ перекрестного загрязнения (табл. 3). Полученные результаты показывают, что степень перекрестного загрязнения для цитоплазматической фракции не превышает 4.5%, для хлоропластной и митохондриальной фракций – 10%, для пероксисомальной фракции – 1%.

В связи с тем, что в листьях кукурузы ГДГ в клетке имеет различную локализацию, нами была исследована общая (суммарная) активность данного фермента, являющаяся суммой активностей всех трех субклеточных фракций. Исследование фракции хлоропластов не проводилось, так как в них функционирует глутамин-синтезный путь (Измайлов, 1986).

В результате проведенных исследований по влиянию различного светового режима на функционирование ГДГ было установлено, что в листьях кукурузы, находившихся на свету, общая активность ГДГ составила 8.11 Е/г сырой массы, в то время как в темноте наблюдалось ее увеличение в 2.4 раза выше (19.2 Е/г сырой массы)

(рис. 1). После облучения растений красным светом с длиной волны 660 нм глутаматдегидрогеназная активность снижалась в несколько раз относительно этого показателя у растений, находящихся в темноте. Однако облучение листьев кукурузы ДКС и КС + ДКС не изменяло работу ферментативной системы – активность ГДГ была близка к значению в варианте “темнота”.

Для исследования влияния светового режима на активность митохондриальной формы ГДГ было проведено выделение митохондриальной фракции из зеленых листьев кукурузы методом дифференциального центрифугирования.

Расчет степени перекрестного загрязнения осуществлен на основе анализа активности маркерного фермента цитоплазмы – алкогольдегидрогеназы. Установлено, что данная величина в наших исследованиях для фракции митохондрий составляла 10%. Степень перекрестного загрязнения учитывали при анализе результатов по определению скорости функционирования ГДГ.

Анализ изменения активности митохондриальной ГДГ в листьях кукурузы в условиях разного освещения продемонстрировал низкие значения общей ферментативной активности в растениях вариантов “свет” и “КС” по сравнению с растениями, находившимися в темноте на протяжении всего времени эксперимента. Активность ГДГ в растениях, экспонированных на свету, составила 4.8 Е/г сырой массы, что почти в два раза ниже, чем данный показатель у растений, находившихся в темноте. При облучении кукурузы красным светом скорость функционирования ГДГ была близкой к таковому показателю у растений варианта “свет”. Однако иная картина характерна для растений вариантов облучения “ДКС” и “КС + ДКС”. У этих опытных образцов активность составила 8.9 и 9.2 Е/г сырой массы соответственно. При этом исследуемая величина ва-

**Таблица 3.** Активность маркерных ферментов, используемых для определения чистоты фракций ( $n = 3; p \leq 0.05$ )

Фракция органоидов	Активность СДГ		Активность АДГ		Активность каталазы		Содержание хлорофилла	
	Е/мл	%	Е/мл	%	Е/мл	%	мг/мл	%
Цитоплазма	0.03	4.05	5.2	86.52	н/о	н/о	2.08	2.49
Хлоропласты	0.07	9.5	0.40	6.65	0.01	7.69	80.70	96.54
Митохондрии	0.64	86.5	0.35	5.82	0.01	7.69	0.81	1.51
Пероксисомы	н/о	н/о	0.06	1	0.11	84.6	н/о	н/о

риантов “ДКС” и “КС + ДКС” была в 1.9 раза выше этого показателя в варианте “свет” (рис. 2).

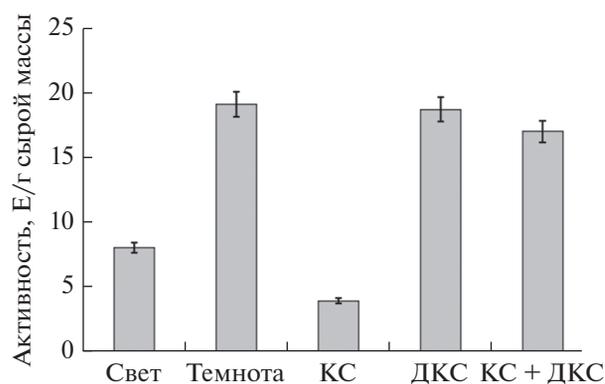
Полученные данные свидетельствуют о том, что действующим фактором в передаче сигнала выступает фитохромная система, осуществляющая рецепцию светового сигнала в области длин волн 660 и 730 нм. Угнетение функционирования ГДГ наблюдается в присутствии в клетке активной формы фитохрома, что связано с облучением кукурузы светом с длиной волны 660 нм. Следует отметить, что воздействие на растения дальнего красного света с длиной волны 730 нм приводит к активации глутаматдегидрогеназной активности.

Фитохромы имеют несколько вариантов контроля активности ферментов, как через непосредственное взаимодействие, так и через опосредованное влияние на геном — изменение экспрессии генетического аппарата клетки с участием различных мессенджеров (Феденко и др., 1995; Kreslavski *et al.*, 2012; Eprintsev *et al.*, 2016; Eprintsev *et al.*, 2018).

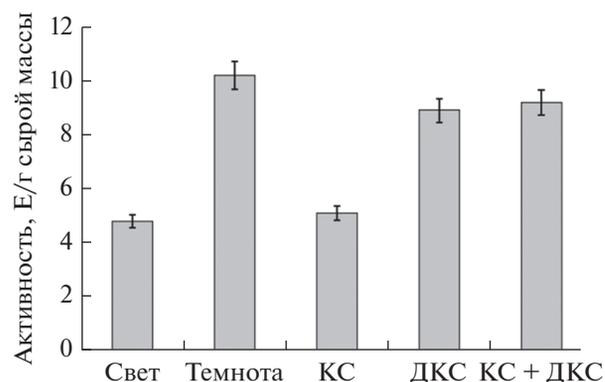
В связи с этим нами был проведен анализ транскрипционной активности генов *gdh-1* и *gdh-2* ГДГ в условиях различного светового режима (рис. 3, 4). Установлено, что в растениях, экспонированных на свету, содержание мРНК обоих генов ниже такового показателя в сравнении с растениями варианта “темнота”: концентрация транскриптов гена *gdh-1* в растениях в темноте была выше таковой в 3.25 раза относительно варианта “свет”, в то время как значения относительного уровня транскриптов гена *gdh-2* в темноте были выше, чем на свету в 1.38 раз. При облучении растений красным светом были получены аналогичные данные. Облучение растений красным светом индуцировало снижение концентрации мРНК гена *gdh-1* в 1.77 раза и гена *gdh-2* в 1.36 по сравнению с аналогичными показателями у растений, экспонируемых в темноте.

Следует отметить, что значения относительно уровня транскриптов гена *gdh-1* в клетках растений после их облучения светом 730 нм и последовательным облучением 660 и 730 нм были в 3.8 и 3.3 раза больше, чем на свету соответственно. Величины транскриптов гена *gdh-2* после облучения растений ДКС и последовательном облучении КС и ДКС оставались выше значений, отмеченных для варианта “свет”.

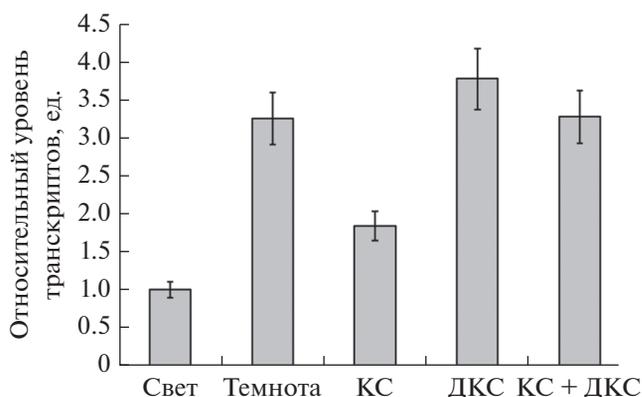
Результаты исследования данного этапа работы свидетельствуют о фитохром-зависимой регуляции экспрессии генов *gdh-1* и *gdh-2* глутаматдегидрогеназы, которая проявляется при освещении растений КС и ДКС, специфически акцептируемыми фитохромной системой. Активация фитохрома путем облучения растений красным светом индуцировала



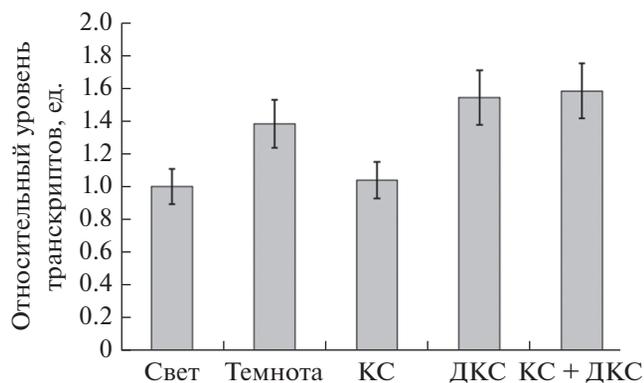
**Рис. 1.** Активность глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы в условиях различного светового режима. Свет — растения, освещенные белым светом; темнота — растения, выдержанные в темноте; КС — растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; ДКС — растения, освещенные светом с длиной волны 730 нм; КС + ДКС — растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 и 730 нм; СС — растения, освещенные светом с длиной волны 465 нм. Продолжительность освещения — 15 мин. Разными буквами отмечены данные, достоверно различающиеся при  $p < 0.05$ .



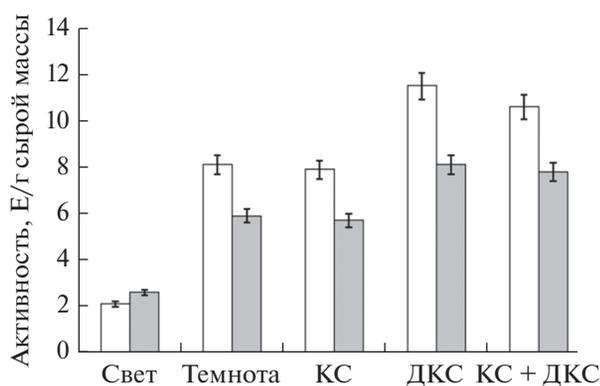
**Рис. 2.** Активность глутаматдегидрогеназы в митохондриальной фракции из листьев кукурузы в условиях различного светового режима. Обозначения: см. рис. 1.



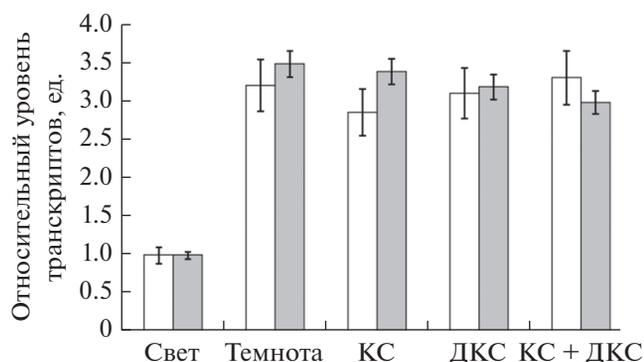
**Рис. 3.** Относительный уровень экспрессии гена *gdh-1* в листьях кукурузы при разных световых режимах. Обозначения: см. рис. 1.



**Рис. 4.** Относительный уровень экспрессии гена *gdh-2* в листьях кукурузы при разных световых режимах. Обозначения: см. рис. 1.



**Рис. 5.** Активность глутаматдегидрогеназы митохондриальной фракции в листьях кукурузы в условиях различного светового режима в присутствии комплекса ЭГТА (белые столбцы) и ингибитора кальциевых каналов рутения красного (серые столбцы). Обозначения: см. рис. 1.



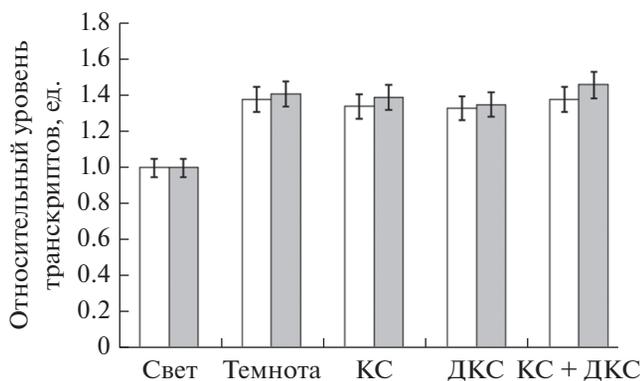
**Рис. 6.** Уровень транскриптов гена *gdh-1* в листьях кукурузы в присутствии комплекса ЭГТА (белые столбцы) и ингибитора кальциевых каналов рутения красного (серые столбцы). Обозначения: см. рис. 1.

изменение содержания мРНК, проявляющееся в уменьшении величины анализируемого показателя. Как уже упоминалось, фитохромы имеют несколько вариантов контроля активности ферментов, и одним из них является изменение экспрессии генетического аппарата клетки с участием различных мессенджеров. Известно, что механизм регуляции экспрессии гена *sdh 1-2* сукцинатдегидрогеназы при смене светового режима может осуществляться через изменение активности факторов транскрипции вторичными мессенджерами ( $\text{Ca}^{2+}$ , цГМФ) (Епринцев и др., 2016; Eprintsev *et al.*, 2013).

Для определения влияния свободных катионов кальция на передачу светового сигнала применяли комплексон ЭГТА, который, являясь хелатирующим агентом, имеет высокое сродство к кальцию, и рутении красный, блокирующий кальциевые каналы ядерной мембраны.

На рис. 5 представлены результаты исследования ферментативной активности ГДГ в присутствии ЭГТА и рутения красного. Применение данных агентов приводило к связыванию кальция, что сопровождалось снятием ингибирующего эффекта действия красного света. Облучение красным светом не вызывало падения общей ферментативной активности, что полностью коррелировало с результатами, полученными в ходе исследования относительного уровня транскриптов генов *gdh-1* и *gdh-2*. Применение комплексона ЭГТА обеспечивало ингибирующий эффект красного света на транскрипционную активность исследуемых генов (рис. 6, 7). Воздействие дальнего красного, а также сочетанного действия красного и дальнего красного света не вызывало изменения скорости транскрипции исследуемого гена в листьях исследуемых растений относительно темнового варианта. Кроме того, при использовании рутения красного установлено, что инкубация растений кукурузы в темноте приводила к увеличению содержания транскриптов генов ГДГ. В присутствии рутения не происходит изменение скорости функционирования митохондриальной ГДГ в листьях кукурузы при облучении растений красным, дальним красным светом и последовательным действием красным и дальним красным светом, относительно контроля – варианта “темнота”. Следовательно, ингибирование кальциевых каналов не приводит к изменению в работе исследуемого энзима.

Таким образом, полученные результаты исследования транскрипционной активности генов *gdh-1* и *gdh-2* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима в присутствии ЭГТА и рутения



**Рис. 7.** Уровень экспрессии гена *gdh-2* в листьях кукурузы в присутствии комплексона ЭГТА (белые столбцы) и ингибитора кальциевых каналов рутения красного (серые столбцы). Обозначения: см. рис. 1.

красного, позволили установить роль кальций-зависимой регуляции данных генов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных свидетельствует о сложном влиянии светового режима на функционирование ГДГ в листьях кукурузы. Полное освещение и инсоляция красным светом вызывали резкое снижение глутаматдегидрогеназной активности. При облучении листьев дальним красным светом и в темноте происходило увеличение интенсивности работы данной ферментной системы. Ранее были получены данные для ферментов цикла Кребса, свидетельствующие о ингибировании работы аконитатгидратазы, цитратсинтазы и сукцинатдегидрогеназы в листьях растений. Следует отметить, что такой тормозящий эффект был характерен для митохондриальных изоформ этих энзимов. В данной работе было показано, что глутаматдегидрогеназная активность доминирует в митохондриальной фракции клеток листьев кукурузы, и ее общая активность в этом органоиде составляет 86.5%. Известно, что АТФ в высоких концентрациях является ингибитором работы ГДГ (в сторону образования 2-оксоглутарата) и дыхательного метаболизма митохондрии (Mastorodemos *et al.*, 2005). Подобный эффект тормозящего действия света на активность ферментов связывается с трансформацией клеточного метаболизма, обусловленного индукцией фотосинтетического образования АТФ, т.е. на свету роль цикла Кребса в биоэнергетике клетки резко снижается (Eprintsev *et al.*, 2016). Интересно отметить, что ГДГ активировала свою деятельность в темноте и при облучении дальним красным светом, что обусловлено интенсификацией функционирования цикла трикарбоновых

кислот. В некоторых работах отмечается, что в листьях в темновых условиях ГДГ катализирует в большей степени реакцию аминирования (Turano *et al.*, 1997; Fontaine *et al.*, 2012, 2013). Важным вопросом интерпретации полученных данных является механизм трансдукции фитохромного сигнала в растительной клетке. Полученные результаты с использованием специфических ингибиторов катионов кальция ЭГТА и рутения красного подтвердили, что изменение в концентрации кальция служит переносчиком сигнала (Eprintsev *et al.*, 2013).

Содержание  $Ca^{2+}$  в ядрах листьев на свету значительно ниже, чем в темноте. В отсутствие света в клетках функционирует окислительный метаболизм, обеспечивающий энергией клетку. Это способствует активации митохондриального метаболизма, в том числе и цикла трикарбоновых кислот.

Увеличение транскрипционной активности гена *gdh-1* в темноте значительно выше, чем гена *gdh-2*. Как известно, ген *gdh-1* кодирует  $\beta$ -субъединицу ГДГ (Marchi *et al.*, 2014). По имеющимся данным, преобладание в структуре фермента  $\beta$ -субъединиц приводит к смещению равновесия в работе фермента в сторону реакции аминирования 2-оксоглутарата — образования 2ОГ. Вероятно, существенное увеличение транскрипционной активности гена *gdh-1* в темноте связано с поставкой глутамата для синтеза аминокислот. Возрастание уровня транскриптов генов глутаматдегидрогеназы может свидетельствовать об увеличении доли этого фермента в анализируемых условиях, необходимой для поддержания нормального метаболизма митохондрий в темноте (при отсутствии фотосинтеза).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-04-00296).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гарник Е.Ю., Бельков В.И., Тарасенко В.И., Потапова Т.В., Корзун М.А., Константинов Ю.М. Экспрессия гена глутаматдегидрогеназы *gdh-2* арабидопсиса индуцируется под влиянием ингибитора синтеза тетрапирролов норфлуразона // Журн. стресс-физиологии и биохимии. 2013. № 4. С. 299–309.
- Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. М.: Мир, 1997. 624 с.
- Епринцев А.Т., Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Башкин С.С., Селезнева Е.А., Дадакина И.В., Махмуд Али С. Роль катионов кальция в механизме фитохром-зависимой регуляции экспрессии гена *sdh1-2* и активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы // Биол. мембраны. 2012. Т. 29. № 3. С. 165–168.

- Измайлов С.Ф. Азотный обмен в растениях. М.: Наука, 1986. 320 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 351 с.
- Попов В.Н., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т. Световая регуляция экспрессии сукцинатдегидрогеназы в листьях *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 3. С. 40–415.
- Феденко Е.П., Касумов К.К., Ланко В.Н. Система ЦАМФ как посредник фитохрома в действии света // Физиология и биохимия культурных растений. 1995. Т. 27. № 1–2. С. 3–11.
- Яковлева В.И., Кретович В.Л., Гильманов М.К. О локализации глутаматдегидрогеназы в корнях кукурузы // Биохимия. 1964. Т. 29. № 3. С. 463–469.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
- Engel P.C. Glutamate Dehydrogenases: the why and how of coenzyme specificity // Neurochem. Res. 2014. V. 39. P. 426–432.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Sazonova O.V., Igamberdiev A.U. Light inhibition of fumarase in *Arabidopsis* leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium // Plant Physiol Biochem. 2016. V. 102. P. 161–166.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychnina M.A., Igamberdiev A.U. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light // Plant Sci. 2018. V. 272. P. 157–163.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. Ca<sup>2+</sup> is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene *sdh1-2* in *Arabidopsis* // J. Plant Physiol. 2013. V. 170. P. 1349–1352.
- Fontaine J.X., Saladino F., Agrimonti C., Bedu M., Terce-Laforgue T., Tetu T., Hirel B., Restivo F.M., Dubois F. Control of the synthesis and subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana glauca* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 410–418.
- Fontaine J.X., Terce-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signal. Behav. 2013. V. 8. P. 1–5.
- Fontaine J.X., Tercé-Laforgue T., Armengaud P., Clément G., Renou J.-P., Pelletier S., Dubois F. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 4044–4065.
- Kreslavski V.D., Fomina I.R., Los D.A., Carpentier R., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. Red and near infrared signaling: hypothesis and perspectives // J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Reviews. 2012. V. 13. P. 190–203.
- Labuz J., Samardakiewicz S., Hermanowicz P., Wyroba E., Pilarska M., Gabrys H. Blue light-dependent changes in loosely bound calcium in *Arabidopsis* mesophyll cells: an X-ray microanalysis study // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 3953–3964.
- Lehmann T., Ratajczak L. The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine // J. Plant. Physiol. 2008. V. 165. P. 149–58.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Marchi L., Polverini E., Degola F., Baruffini E., Restivo F.M. Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is less thermostable than GDH1 and GDH2 isoenzymes // Plant Physiol Biochem. 2014. V. 83. P. 225–231.
- Mastorodemos V., Zaganas I., Spanaki C., Bessa M., Plaitakis A. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands // J. Neurosci. Res. 2005. V. 79. P. 65–73.
- Miyashita Y., Good A. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 667–680.
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907–2914.
- Pathuri I.P., Ines E., Reitberger, Ralph Hückelhoven, Reinhard K., Proels. Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei // J. Exp. Bot. 2011. V. 10. P. 3449–3457.
- Petrillo E., Godoy Herz M.A., Barta A., Kalyna M., Kornblihtt A.R. Let there be light: regulation of gene expression in plants // RNA Biol. 2014. V. 11. P. 1215–1220.
- Sakakibara H., Fujii K., Sugiyama T. Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. P. 789–797.
- Sarasketa A., Gonzalez-Moro M.B., Gonzalez-Murua C., Marino D. Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1–12.
- Turano F., Thakkar S., Fang T. Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 1997. V. 113. P. 1329–1341.

## Regulation of Glutamate Dehydrogenase Activity in Corn Leaves (*Zea mays* L.) with Change of Light Mode

A. T. Eprintsev<sup>1, #</sup>, G. B. Anokhina<sup>1</sup>, and D. N. Fedorin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Voronezh State University, Universitetskaya sq. 1, Voronezh, 394018 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: bc366@bio.vsu.ru*

The molecular and biochemical mechanisms of regulation of the activity of glutamate dehydrogenase (GDH) in maize leaves were studied when the light regime was changed. The intracellular distribution of glutamate dehydrogenase activity was established, which showed that the studied enzyme is localized mainly in mitochondria (86%). It was revealed that the magnitude of the GDH activity is regulated by the light regime. In the dark and under irradiation with far red light (FRL), glutamate dehydrogenase activity increases, which is due to the activation of the expression of genes encoding the  $\alpha$ -subunit (*gdh-2*) and  $\beta$ -subunit (*gdh-1*). The level of transcripts of genes *gdh-1*, *gdh-2*, encoding various subunits of this enzyme, increased in the dark, but decreased in the light and upon irradiation with red light. It was shown that the transduction of the phytochrome signal is carried out with the participation of a secondary messenger – calcium cations.

*Keywords:* glutamate dehydrogenase, light, phytochrome, cryptochrome, transcription, corn

УДК 591.5:598.2(235.3)(571.56-12)

## ПРОСТРАНСТВЕННО-ТИПОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ОРГАНИЗАЦИЯ НАСЕЛЕНИЯ ПТИЦ АЛДАНСКОГО НАГОРЬЯ

© 2022 г. Е. В. Шемякин\*, Л. Г. Вартапетов\*\*, @

\*Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, пр. Ленина, 41, Якутск, 677980 Россия

\*\*Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

@E-mail: lvartapetov@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.04.2020 г.

После доработки 19.06.2020 г.

Принята к публикации 19.06.2020 г.

На основе многолетних учетов изучено население птиц одного из наименее обследованных регионов Якутии – Алданского нагорья. Впервые составлена наиболее полная и подробная иерархическая классификация сообществ птиц. Выявлена пространственно-типологическая структура населения птиц, оценена значимость факторов среды в формировании орнитокомплексов. Установлены региональные особенности формирования орнитокомплексов.

*Ключевые слова:* Алданское нагорье, классификация и пространственно-типологическая структура населения птиц, пространственная организация орнитосообществ

DOI: 10.31857/S1026347022010127

Алданское нагорье – северо-восточная часть Байкальской горной страны, его территория занимает 189 тыс. км<sup>2</sup>. Этот регион характеризуется сложной структурой высотной поясности и значительным ландшафтным разнообразием. Рассматриваемая территория отличается широким диапазоном природных условий, которые определяются сложным сочетанием горных хребтов и межгорных котловин. Алданское нагорье соседствует с таежными равнинными пространствами Лено-Алданского плато с северо-запада и горными территориями Верхоянского хребта с северо-востока, а также – Станового хребта с юга, без сколько-нибудь значительных зоогеографических барьеров, что обуславливает высокий уровень его биологического разнообразия.

До недавнего времени Алданское нагорье, особенно его верхние высотные пояса, гольцово-тундровый и подгольцово-редколесный, оставались мало обследованными. Орнитокомплексы этих поясов стали изучать в наибольшей степени после публикации наших первых результатов (Вартапетов и др., 2012). Поэтому данная работа в значительной степени дополняет и расширяет опубликованные ранее представления о классификации и пространственно-типологической структуре населения птиц этого региона.

Результат исследования является значимым не только с фундаментальных позиций орнитогеографии и синэкологии, но и для решения региональных эколого-географических проблем, в

том числе связанных с сохранением биоразнообразия сообществ птиц. Количественные оценки населения птиц, в том числе выполненные на ландшафтной основе, служат для развития международных систем орнитологического мониторинга, в основном направленных на выявление популяционных трендов гнездящихся и мигрирующих птиц (Gregory, 2000; Svensson, 2000; Sander-son *et al.*, 2006; Gregory *et al.*, 2007). В России ландшафтно-типологический подход в орнитологическом мониторинге направлен на решение общих задач экологического мониторинга, а также сохранения и восстановления биологических ресурсов и биоразнообразия (Гармаев и др., 2016).

Основные задачи данной работы – на основе иерархической классификации населения птиц Алданского нагорья определить главные направления его территориальных изменений (пространственно-типологическую структуру), а также оценить и сопоставить значимость основных факторов среды для формирования населения птиц или пространственную организацию орнито-сообществ. Кроме этого, установить региональную специфику населения птиц Алданского нагорья в сопоставлении с другими равнинными и горными природно-географическими областями.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пространственная неоднородность фауны и населения птиц Алданского нагорья выявлена на

основе собственных неопубликованных данных, а также с использованием материалов из банка данных коллективного пользования Института систематики и экологии животных СО РАН, ранее опубликованных авторами и другими специалистами (Егоров и др., 2002; Исаев и др., 2006; Вартапетов и др., 2008, 2012; Шемякин и др., 2014, 2016). Использованы результаты учетов птиц в первой половине лета (с конца мая до середины июля). В этот период завершается пролет и прилет птиц, а гнездящиеся виды уже приступили к размножению. Таким образом, результаты маршрутных учетов в этот период позволяют описать относительно стабильное гнездовое население птиц. Доля пролетных особей (в основном, гусеобразных и ржанкообразных), в этот период незначительна.

Маршрутные учеты проведены без ограничения ширины трансекта с последующим отдельным пересчетом полученных данных на площадь по средним групповым дальностям обнаружения, рассчитанным интервальным методом (Равкин, Ливанов, 2008). В период с 2000 по 2016 гг. пешими и водными маршрутами на территории Алданского нагорья пройдено 3272 км. Всего проанализировано 84 варианта населения птиц. Вариант населения — это список видов с указанием обилия каждого из них для каждого из обследованных местообитаний (показатели усреднены за первую половину лета).

Классификация населения проведена с помощью одного из методов кластерного анализа (Трофимов, Равкин, 1980) с использованием коэффициента сходства Жаккара (Jaccard, 1902) для количественных признаков (Наумов, 1964). Суть метода сводится к разделению совокупности рассматриваемых объектов (вариантов населения) на заданное число групп по степени сходства каждой пробы со всеми остальными. Крупные группы орнитокомплексов подразделяли на подгруппы, пока для каждой из них можно было установить природный режим, определяющий их выделение (Вартапетов, 1998). Результаты первого разделения считали делением на типы населения, а последующих — делениями на подтипы и классы. В итоге была составлена иерархическая классификация населения птиц. Основное значение таких классификаций — выявить взаимосвязи между признаками фаун или животного населения и факторами окружающей среды (Харвей, 1974; Hengeveld, 1990).

Пространственно-типологическая структура построена по матрице средних коэффициентов сходства на уровне подтипа населения. Порог значимости связей определяли так, чтобы полученная схема наилучшим образом отображала выявленные тренды орнитокомплексов и ее можно было построить в двухмерном пространстве.

Оценка силы связи факторов среды и неразделимых сочетаний (природно-антропогенных режимов) с пространственной неоднородностью населения птиц проведена с помощью линейной качественной аппроксимации по выделенным грациям факторов (Равкин и др., 1978).

К фоновым отнесены виды, доля которых в населении птиц по обилию составляла не менее одной особи на 1 км<sup>2</sup> (Кузякин, 1962). Лидирующими считали первые пять видов, преобладающих по обилию (Равкин, Ливанов, 2008). Названия типов фаун даны по Б.К. Штегману (1938) с некоторыми дополнениями. Видовые названия птиц приведены по Л.С. Степаняну (2003), с некоторыми дополнениями из “Списка птиц Российской Федерации” (Коблик и др., 2006). Для расчета биомассы использованы сведения из монографии “Птицы Советского Союза” (1951–1954). Показатели рассчитаны как суммарная сырая масса особей, приходящих на 1 км<sup>2</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ КЛАССИФИКАЦИЯ НАСЕЛЕНИЯ

В приведенной ниже классификации для каждого из выделенных таксонов приведено по пять лидирующих по обилию (преобладающих) видов с указанием их доли (в %) в сообществах, а также суммарное обилие/биомасса и число встреченных/фоновых видов. Кроме того, в классификацию включены сведения о фаунистическом составе населения с указанием доминирующих типов фауны и их доли по количеству особей (в %).

**1. Лесной тип населения** (лесов и гарей) преобладает по обилию — юрок (10), пятнистый конек (8), буроголовая гаичка (7), корольковая пеночка (6), зеленая пеночка (5); плотность населения/биомасса — 201 особь/км<sup>2</sup>/10 кг/км<sup>2</sup>; всего видов/фоновых видов — 114/38; доля по количеству особей, в %: сибирского типа фауны — 65, китайского — 24, транспалеарктов — 6 и европейского — 4.

**1.1. Подтип населения приречных лесов:** юрок (14), зеленая пеночка (8), корольковая пеночка (6), буроголовая гаичка (6), пятнистый конек (5); 228/11; 88/39; сибирского типа фауны — 65, китайского — 24, транспалеарктов — 6 и европейского — 5.

### Классы населения:

**1.1.1** — ивово-березово-тополевых пойменных лесов: юрок (28), зеленая пеночка (11), пятнистый конек (8), седоголовая овсянка (5), бурая пеночка (4); 233/8; 45/31; китайского типа фауны — 31, сибирского — 6, транспалеарктов — 4;

**1.1.2** — надпойменных лиственнично-елово-березовых лесов: буроголовая гаичка (8), корольковая пеночка и зеленая пеночка (по 7), юрок (6),

синехвостка (5); 226/12; 83/41; сибирского типа фауны – 66, китайского – 20, транспалеарктов и европейского по 7.

**1.2. Подтип населения не приречных лесов:** пятнистый конек (10), буроголовая гаичка (8), корольковая пеночка и юрок (по 7), синехвостка (5); 174/8; 82/35; сибирского типа фауны – 68, китайского – 23, европейского – 5, транспалеарктов – 4.

**Классы населения:**

**1.2.1** – сосново-лиственничных лесов: пятнистый конек (14), юрок (13), седоголовая овсянка (12), пеночка-таловка (7), корольковая пеночка (6); 251/8; 34/30; сибирского типа фауны – 63, китайского – 31, европейского и транспалеарктов по 3;

**1.2.2** – лиственнично-сосновых лесов: корольковая пеночка и буроголовая гаичка (11), пятнистый конек (10), овсянка-ремез (8), пеночка-зарничка (5); 194/11; 68/28; сибирского типа фауны – 70, китайского – 18, европейского – 8, транспалеарктов – 4;

**1.2.3** – лиственничных лесов: синехвостка (11), дубровник (10), зеленая пеночка (9), рыжая овсянка и соловей-красношейка (по 7); 160/8; 36/28; сибирского типа фауны – 63; китайского – 31, транспалеарктов – 5;

**1.2.4** – сосновых лесов: сероголовая гаичка (18), овсянка-ремез (16), малая мухоловка (10), буроголовая гаичка (9), пятнистый конек (6); 115/6; 43/19; сибирского типа фауны – 76; китайского – 12, транспалеарктов – 9, европейского – 3;

**1.2.5** – еловых лесов: юрок (20), буроголовая гаичка (12), корольковая пеночка (9), сибирская завирушка и пеночка-таловка (по 8); 77/2; 22/20; сибирского типа фауны – 80, китайского – 13, европейского – 4.

**1.3. Подтип населения гарей по сосново-лиственничным и лиственничным лесам:** пятнистый конек (12), юрок и пеночка-зарничка (по 9), буроголовая гаичка и черноголовый чекан (по 6); 224/18; 79/40; сибирского типа фауны – 60; китайского – 24, транспалеарктов – 11.

**Классы населения:**

**1.3.1** – молодых (свежих) гарей: пятнистый конек (33), буроголовая гаичка и трехпалый дятел (по 9), овсянка-ремез (7), соловей-красношейка (5); 108/9; 37/23; сибирского типа фауны – 53, китайского – 37, транспалеарктов – 3;

**1.3.2** – старых и средневозрастных гарей: пятнистый конек и пеночка-зарничка (по 10), юрок (9), черноголовый чекан (7), буроголовая гаичка (6); 252/20; 71/40; сибирского типа фауны – 61, китайского – 23, транспалеарктов – 12.

**2. Редколесный тип населения** (лиственничных редколесий в сочетании с марями, кедровым стлаником и кустарниками, с участками луговин): бурая пеночка (14), пятнистый конек, зеленоголовая трясогузка, пеночка-таловка и буро-

ловая гаичка (по 8); 141/5; 84/30; сибирского типа фауны – 55, китайского – 29, транспалеарктов – 9, европейского – 3.

**2.1. Подтип населения ерниковых редколесий:** бурая пеночка (18), зеленоголовая трясогузка (13), юрок, седоголовая овсянка и пеночка-таловка (по 5); 145/5; 72/26; сибирского типа фауны – 50, китайского – 34, транспалеарктов – 10, европейского – 3;

**2.2. Подтип населения редколесий с зарослями кедрового стланика и кустарников:** бурая пеночка и буроголовая гаичка (по 12), пеночка-таловка и пятнистый конек (по 10), соловей-красношейка (6); 161/4; 47/30; сибирского типа фауны – 63, китайского – 29, европейского – 4, транспалеарктов – 3;

**2.3. Подтип населения мезотрофных кустарничково-осоково-сфагновых болот с участками редколесий:** черноголовый чекан (30), белокрылый клест (17), зеленоголовая трясогузка (16), пятнистый конек (9), соловей-красношейка (7); 144/10; 25/17; сибирского типа фауны – 48, транспалеарктов – 38, китайского – 12;

**2.4. Подтип населения зарослей кедрового стланика и кустарников с участками луговин и каменистых осыпей:** бурая пеночка (15), пятнистый конек (13), соловей-красношейка (9), рогатый жаворонок и зеленоголовая трясогузка (по 8); 90/4; 33/21; сибирского типа фауны – 49, китайского – 31, арктического – 11, транспалеарктов и европейского по 3.

**3. Горно-тундровый тип населения:** альпийская завирушка (32), зеленоголовая трясогузка и горный конек (по 14), каменка (12), сибирский горный вьюрок (10); 54/3; 16/7; тибетского типа фауны – 46, сибирского – 17, транспалеарктов – 14, арктического – 11, неясного происхождения – 10.

**4. Маревно-луговой тип населения:** бурая пеночка (19), певчий сверчок (16), обыкновенная чечевица (11), седоголовая овсянка (9), пятнистый сверчок (5); 328/18; 62/34; китайского типа фауны – 47, сибирского – 22, монгольского – 16.

**4.1. Подтип населения закустаренных марей:** бурая пеночка (27), певчий сверчок (23), пятнистый сверчок (7), дубровник (6), азиатский бекас (5); 466/20; 41/34; китайского типа фауны – 47, сибирского и монгольского – по 23, транспалеарктов – 7;

**4.2. Подтип населения пойменных лугов, кустарников и озер:** бурая пеночка (17), певчий сверчок (14), чечевица (11), толстоклювая камышевка (8), азиатский бекас (6); 268/19; 42/33; китайского типа фауны – 46, сибирского – 25, транспалеарктов – 15, монгольского – 14;

**4.3. Подтип населения антропогенных лугов:** чечевица (25), седоголовая овсянка (21), горная трясогузка (11), соловей-красношейка и белая трясогузка (по 7); 219/16; 25/22; китайского типа фауны – 50,

транспалеарктов – 23, сибирского – 18, европейского – 7, монгольского – 3.

**5. Селитебный тип населения (поселков):** домовый воробей (35), воронок (21), белая трясогузка (19), бурая пеночка (5), чечевица (3); 301/24; 21/18; транспалеарктов – 80, китайского типа фауны – 10, европейского – 6, сибирского – 3.

**6. Водно-околоводный тип населения (рек, озер и их берегов):** перевозчик (17), речная крачка (10), горная трясогузка и гоголь (по 8), сизая чайка (7); 55/20; 58/16; транспалеарктов – 61, сибирского типа фауны – 27, голарктов – 8.

**6.1. Подтип населения крупных рек:** речная крачка (31), сизая чайка (15), озерная чайка (12), перевозчик (9), кряква (3); 3/11; 32/0; транспалеарктов – 70, голарктов – 15, сибирского типа фауны – 8, европейского – 4;

**6.2. Подтип населения средних и малых рек:** перевозчик – 41, гоголь и горная трясогузка (по 16), воронок – 6, речная крачка – 3; 63/17; 34/8; транспалеарктов – 74, сибирского типа фауны – 20, голарктов – 3;

**6.3. Подтип населения озер и стариц:** речная крачка (13), зеленоголовая трясогузка (11), сизая чайка (10), кряква (8), большой улит (7); 63/27; 45/16; транспалеарктов – 53, сибирского типа фауны – 31, голарктов – 11, арктического – 3.

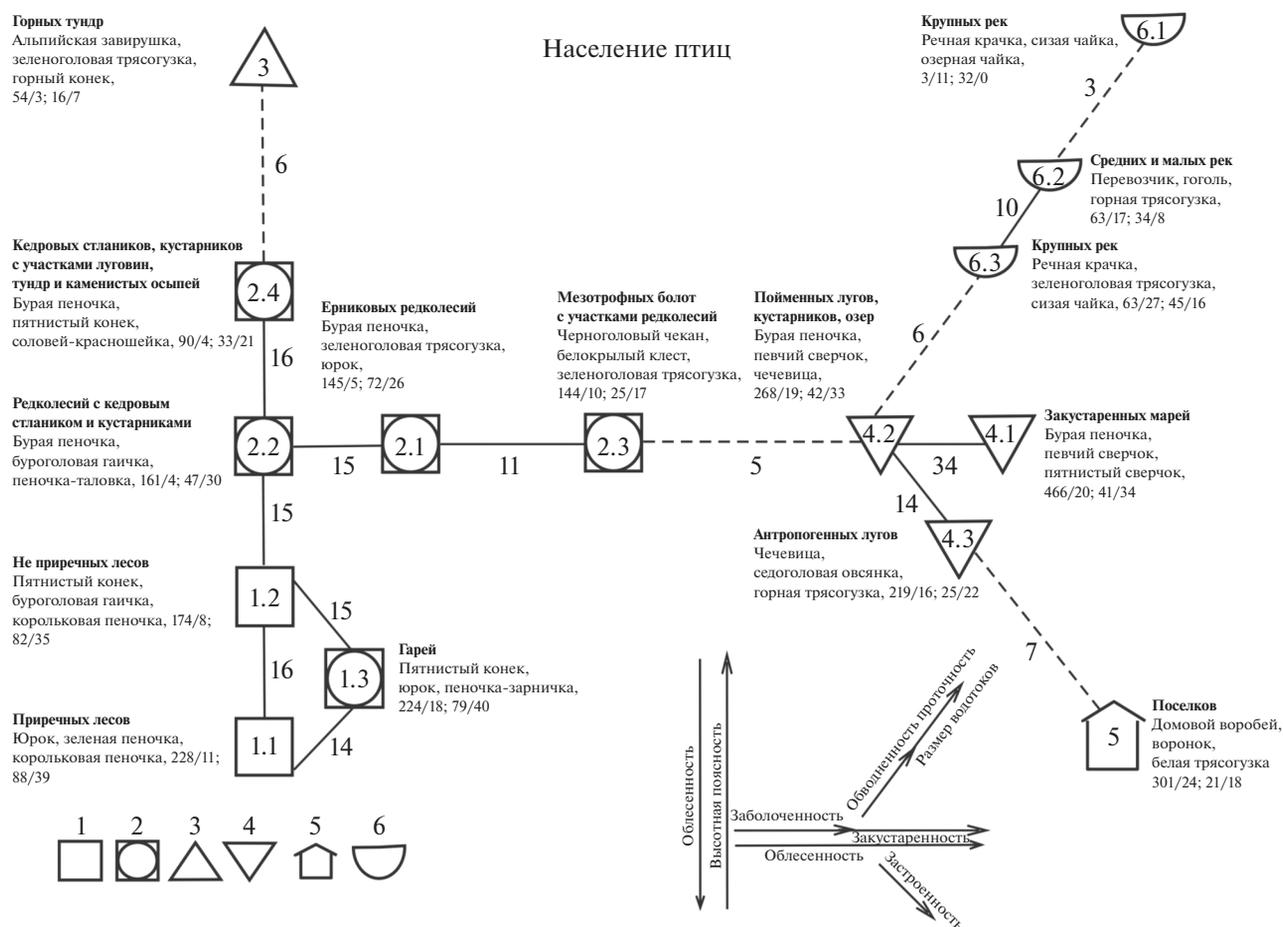
Рассмотренная классификация отражает различия в населении птиц незастроенной и застроенной суши, а также рек и озер. Незастроенные местообитания представлены четырьмя типами, десятью подтипами и девятью классами, застроенные – одним типом, а водно-околоводные – одним типом и тремя подтипами населения. При дифференциации типов населения птиц прослежено воздействие облесенности, высотной поясности и продуктивности биоценозов, которые определяют выделение первых трех типов. Формирование четвертого типа населения (марей и лугов) связано с воздействием увлажнения и закустаренности. Выделение пятого типа связано с антропогенным воздействием, проявляющемся в основном как застроенность, а выделение шестого типа определяется наличием водоемов. На более низком классификационном уровне выделение подтипов населения птиц определяется также совместным воздействием облесенности, высотной поясности, различий в рельефе, продуктивности и влияния пожаров. Кроме того, в формировании подтипов орнитокомплексов (2.1; 2.2; 2.3; 2.4 и в подтипах 4.1; 4.2 и 4.3) заметно воздействие заболоченности, закустаренности и антропогенного воздействия, а в подтипах (6.1; 6.2 и 6.3) – размеров водотоков и различий между реками и озерами.

Лесной тип населения наиболее дробный. Только он, кроме подтипов, подразделяется и далее – на классы. Он занимает наиболее широкий набор местообитаний в связи с обширным распро-

странением на территории Алданского нагорья лесных сообществ и их формаций, но при этом определяющим становится не только разнообразие лесообразующих пород, но и уровень абсолютных высот. Так, с ростом абсолютных высот местности класс приречных пойменных лесов (1.1.1), сменяется таковым на склонах долин и надпойменных террас (класс 1.1.2), далее – на водоразделах (классы 1.2.1–1.2.5). Изменение орнитокомплексов в этом ряду связано с породным составом лесных растительных формаций. На приречных участках он характеризуется участием березы, ели, лиственницы, тополя и высоких ивовых кустарников. На склонах долин и их надпойменных террасах преобладают лиственничные и сосновые древостои, а на водоразделах – лиственничные леса с участием ели. Кроме того, здесь представлены классы орнитокомплексов гарей, которые разделены по возрасту (класс 1.3.1 и 1.3.2).

## ПРОСТРАНСТВЕННО-ТИПОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЛЕТНЕГО НАСЕЛЕНИЯ ПТИЦ АЛДАНСКОГО НАГОРЬЯ

Пространственно-типологическая структура орнитокомплексов выявлена на уровне подтипов населения птиц при пороге значимости связей в 10%. На схеме вертикальный ряд отражает изменения в облесенности и высотной поясности, направленный снизу вверх от лесных местообитаний через редколесья к горным тундрам (рис. 1). В приречных лесах (подтип 1.1), отмечены наибольшие видовое богатство и плотность населения птиц, которые последовательно уменьшаются с увеличением абсолютных высот. В пределах орнитокомплексов лесов и редколесий (подтипы 1.2 и 2.2) это уменьшение относительно невелико, но становится наиболее заметным при переходе к сообществам стлаников и кустарников (подтип 2.4) и особенно – горных тундр (тип 3). В лесных сообществах лидируют – пятнистый конек, буроголовая гаичка, корольковая пеночка и юрок, в редколесьях и кустарниках – пеночки: бурая и таловка, пятнистый конек и соловей-красношейка, а в горных тундрах – альпийская завирушка, зеленоголовая трясогузка, горный конек и каменка. Таким образом, с подъемом вверх лесные виды постепенно сменяются кустарниковыми, а последние – арктоальпийскими. Почти повсеместно сохраняется китайско-сибирский фаунистический состав населения птиц, и только в горных тундрах он становится сибирско-тибетским. Отклонение от вертикального ряда (подтип 1.3) связано с воздействием пожаров. На гарях продолжают доминировать лесные виды (пятнистый конек, юрок, пеночка-зарничка), а видовое богатство и плотность населения птиц лишь немного меньше, чем в приречных лесах.



**Рис. 1.** Пространственно-типологическая структура летнего населения птиц Алданского нагорья. Условные обозначения. Орнитокомплексы: 1 – лесов, 2 – редколесий, 3 – горных тундр, 4 – марей и лугов, 5 – поселков, 6 – водоемов и водотоков. Цифрами внутри значков показаны номера типов и подтипов населения птиц, а у связей между значками – межклассовое сходство. Сплошные линии – значимое сверхпороговое сходство, прерывистые – максимальное при отсутствии значимого. Для каждого типа и подтипа населения птиц указаны лидирующие виды (первые три по обилию), среднее суммарное обилие птиц (особей/км<sup>2</sup>) и (через косую черту) биомасса (кг/км<sup>2</sup>), далее общее количество и число фоновых видов. Стрелками показаны основные направления пространственной изменчивости сообществ птиц и определяющие их факторы среды.

Горизонтальный ряд последовательно образуют сообщества птиц редколесий, мезотрофных болот, пойменных лугов и закустаренных марей (подклассы 2.2–4.1). Этот ряд формируется при воздействии заболоченности (от сообществ редколесий к таковым мезотрофных болот) и далее закустаренности – при переходе от орнитокомплексов мезотрофных болот к таковым в лугах, кустарниках и далее к закустаренным марям. При этом плотность населения птиц резко возрастает при переходе от орнитосообществ редколесий к таковым пойменных лугов и марей за счет обитателей кустарников и высокотравий (бурая пеночка, певчий и пятнистый сверчки, обыкновенная чечевица). Изменяется и фаунистический состав населения птиц: в редколесьях и на мезотрофных болотах он китайско-сибирский, а на лугах и в закустаренных марях – сибирско-китайский, при

высоком участии транспалеарктов в лугово-болотных местообитаниях.

От сообществ пойменных лугов, кустарников и озер начинаются два диагональных ряда изменений. В нижнем из них значима связь орнитокомплексов пойменных и антропогенных лугов, которые в свою очередь имеют запороговое сходство с населением поселков. Лидирующие виды в населении антропогенных лугов представлены чечевицей, седоголовой овсянкой и горной трясогузкой, а в поселках преобладают домовый воробей, воронок и белая трясогузка. Верхний ряд образуют сообщества птиц водно-околоводных местообитаний. В этом ряду происходит снижение плотности населения от пойменных лугов и кустарников к озерам и небольшим рекам с минимумом на крупных реках. Это сопровождается сменой лидирующих видов сначала на речную

крачку, зеленоголовую трясогузку и сизую чайку по берегам озер и стариц, на средних и малых реках их сменяют перевозчик, гоголь и горная трясогузка, а затем на крупных реках снова в качестве лидеров появляются речная крачка и сизая чайка. Таким образом, основные тренды в населении птиц Алданского нагорья связаны с высотной поясностью, облесенностью, заболоченностью и закустаренностью, а также с застроенностью и обводненностью. Кроме того, прослежено влияние проточности и размера акваторий.

При сопоставлении пространственно-типологической структуры населения птиц Алданского нагорья и Алтая (Цыбулин, 2009) установлено, что большинство перечисленных трендов характерно и для Алтая, и, по-видимому, для остальных гор Северной Евразии. Однако только для Алданского нагорья характерны такие структурообразующие факторы, как заболоченность и закустаренность. Это определяется наличием обширных мезотрофных болот в межгорных котловинах и закустаренных марей в его предгорьях. К общим трендам неоднородности населения птиц изучаемой территории и Центрально-Якутской равнины (Вартапетов, Ларионов, 2014) относятся воздействие облесенности, заболоченности, закустаренности, увлажненности, застроенности и обводненности. При этом только на Центрально-Якутской равнине выделены тренды, связанные с зональностью и с пойменным режимом рек, а только на Алданском нагорье – изменения орни-

токомплексов, которые определяются высотной поясностью.

### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НАСЕЛЕНИЯ ПТИЦ АЛДАНСКОГО НАГОРЬЯ

По результатам кластерного анализа на Алданском нагорье выделено 12 значимых факторов среды, определяющих территориальную изменчивость орнитокомплексов. При оценке силы и общности их влияния на формирование орнитокомплексов природные и антропогенные факторы разделены. Основным фактором среды, влияющим на неоднородность летнего населения птиц, следует считать облесенность местообитаний (табл. 1). Менее значимы по доле учтенной дисперсии состав лесообразующих пород, продуктивность биоценозов, рельеф местности и обводненность. Еще меньше связь с абсолютными высотами и высотной поясностью, в связи с взаимопроникновением соседних поясов и широким распространением кедрового стланика от нижнего лесного пояса до верхнего тундрового. Наименьшее значение имеют закустаренность, наличие стлаников и заболоченность. Антропогенные факторы (наличие гарей и застроенность) мало значимы по сравнению с природными. Все перечисленные факторы совместно учитывают 59% дисперсии, что соответствует множественному коэффициенту корреляции, равному 0.77%.

**Таблица 1.** Оценка силы и общности связи факторов среды и неоднородности летнего населения птиц Алданского нагорья

Фактор, режим	Учтенная дисперсия, %
<b>Природные факторы</b>	<b>52</b>
Облесенность	35
Состав лесообразующих пород	16
Рельеф	15
Продуктивность (кормность)	15
Обводненность	14
Абсолютные высоты	9
Высотная поясность	7
Закустаренность	5
Наличие стлаников	4
Заболоченность	1
<b>Антропогенные факторы:</b>	<b>5</b>
Застроенность	3
Наличие гарей	2
<b>Все факторы</b>	<b>53</b>
<b>Режимы (классификационные и структурные)</b>	<b>38</b>
<b>Все факторы и режимы</b>	<b>59</b>
<b>Множественный коэффициент корреляции</b>	<b>0.77</b>

При сравнении оценки силы и общности связи факторов среды с неоднородностью населения птиц Алданского нагорья и Алтая, выявлено некоторое сходство этих связей, которое сводится к значимому влиянию облесенности, обводненности и относительно слабому антропогенному воздействию. Кроме того, на Алтае, по мнению С.М. Цыбулина (2009), формирование орнитокомплексов существенно зависит от сложных комплексных факторов: тип растительного покрова, гидротермический режим, ландшафтная дифференциация. На Алданском нагорье вместо них мы выделяем более простые и легче объясняемые факторы: рельеф, продуктивность, абсолютные высоты и высотная поясность, но это скорее различия трактовок, а не реальных причин формирования орнитокомплексов. На Центрально-Якутской равнине по сравнению с Алданским нагорьем территориальная неоднородность населения птиц в большей степени зависит от обводненности и, особенно — от антропогенных факторов, связанных с выпасом, сенокосением и пирогенными сукцессиями лесной растительности (Вартапетов, Ларионов, 2014, Вартапетов и др. 2016, 2018).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Два основных тренда пространственно-типологической структуры сообществ птиц Алданского нагорья определяют высотная поясность и развитие кустарниковой растительности, а также снижение облесенности в обоих направлениях. При подъеме вверх, снижении теплообеспеченности и смене высотных поясов происходит обеднение орнитокомплексов по числу видов и особей. При увеличении закустаренности и заболоченности видовое богатство населения птиц тоже уменьшается, но их суммарное обилие возрастает.

Пространственную неоднородность населения птиц Алданского нагорья определяет преимущественно облесенность местообитаний. Менее значимы другие “равнинные” факторы: состав лесообразующих пород, продуктивность и обводненность. Еще меньше сила и общность связи с “горными” факторами: абсолютные высоты, высотная поясность, наличие зарослей кедрового стланика. Из антропогенных факторов, которые в 10 раз менее значимы, чем перечисленные природные, заметно влияние наличия гарей и застроенности. Региональные особенности пространственной организации населения птиц Алданского нагорья — большая значимость закустаренности и заболоченности в формировании орнитокомплексов по сравнению с Алтаем, а по сравнению с Центрально-Якутской равниной — меньшее значение обводненности и особенно — антропогенного воздействия. Видовое богатство и плотность населения птиц Алданского нагорья меньше таковых на Северном Урале, в средней

тайге Западной Сибири, и примерно такое же, что и в среднесибирской средней тайге. Это определяется усилением континентальности климата, снижением продуктивности биоценозов, “выпадением” темнохвойных из состава лесообразующих пород и преобладанием криогенных ландшафтов.

Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту № 0376-2019-0004 АААА-А17-117020110058-4 “Структура и динамика популяций и сообществ животных холодного региона Северо-Востока России в современных условиях глобального изменения климата и антропогенной трансформации северных экосистем: факторы, механизмы, адаптации, сохранение” и поддержана проектом РФФИ (17-04-00088а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вартапетов Л.Г.* Птицы северной тайги Западно-Сибирской равнины. Новосибирск: Наука, 1998. 327 с.
- Вартапетов Л.Г., Егоров Н.Н., Дегтярев В.Г., Исаев А.П.* Летнее население птиц долины нижнего течения р. Мая // Сиб. экол. журн. 2008. № 1. С. 161–170.
- Вартапетов Л.Г., Исаев А.П., Ларионов А.Г., Егоров Н.Н.* Классификация и структура населения птиц Алданского нагорья // Поволж. экол. журн. 2012. № 2. С. 157–164.
- Вартапетов Л.Г., Ларионов А.Г.* Классификация и пространственно-типологическая структура населения птиц Центрально-Якутской равнины // Успехи современ. биологии. Т. 134. № 5. 2014. С. 519–528.
- Вартапетов Л.Г., Ларионов А.Г., Егоров Н.Н.* Пространственное разнообразие населения птиц средней тайги Среднесибирского плоскогорья // Сиб. экол. журн. 2016. № 1. С. 13–23.
- Вартапетов Л.Г., Железнова Т.К., Юдкин В.А.* Пространственная организация населения птиц средней тайги Западно-Сибирской равнины // Известия РАН. Сер. биол. 2018. № 1. С. 71–78.
- Гармаев Е.Ж., Намжилова Л.Г., Ананин А.А., Бешенцев А.Н.* Разработка программы мониторинга биоразнообразия на особо охраняемых природных территориях в бассейне озера Байкал // География и природные ресурсы. 2016. № 5. С. 247–254.
- Егоров Н.Н., Исаев А.П., Находкин Н.А.* Орнитофауна среднего течения р. Алгама // Наземные позвоночные Якутии: экология, распространение, численность. Якутск: ЯФ Изд-во СО РАН. 2002. С. 42–50.
- Исаев А.П., Егоров Н.Н., Находкин Н.А.* Население птиц в районе промышленного освоения Эльгинского каменноугольного месторождения (ср. течение р. Алгама, Южная Якутия) // Естественнонаучные и гуманизм. Сб. научных работ. Т. 3. № 2. Томск: Изд-во ТГУ. 2006. С. 42–43.
- Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архипов В.Ю.* Список птиц Российской Федерации. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2006. 256 с.

- Кузякин А.П. Зоогеография СССР. Ученые записки Моск. Обл. пед. Ин-та им. Н.К. Крупской. 1962. 109 с.
- Наумов Р.Л. Птицы в очагах клещевого энцефалита: Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1964. 19 с.
- Птицы Советского Союза. М.: Наука, 1951–1954. Т. 1–6.
- Равкин Ю.С., Куперитрох В.Л., Трофимов В.А. Птицы лесной зоны Приобья. Новосибирск: Наука. Сиб. отд., 1978. 288 с.
- Равкин Ю.С., Ливанов С.Г. Факторная зоогеография: принципы, методы и теоретические представления. Новосибирск: Наука. 2008. 205 с.
- Степанян Л.С. Конспект орнитологической фауны России и сопредельных территорий. М.: Академкнига, 2003. 808 с.
- Трофимов В.А., Равкин Ю.С. Экспресс-метод оценки связи пространственной неоднородности животного населения и факторов среды // Количественные методы в экологии животных. Л. 1980. С. 135–138.
- Харвей Д. Научное объяснение в географии. М.: Изд-во Прогресс, 1974. 502 с.
- Цыбулин С.М. Птицы Алтая: пространственно-временная дифференциация, структура и организация населения. Новосибирск: Наука, 2009. 234 с.
- Шемякин Е.В., Вартанетов Л.Г., Борисов Б.З., Борисов З.З., Исаев А.П. Летнее население птиц верхних высоко-растительных поясов Алданского нагорья (на примере горы Эвота) // Вестник СВФУ. Т. 11. № 3. 2014. С. 53–59.
- Шемякин Е.В., Ларионов А.Г., Егоров Н.Н., Секов А.Н., Исаев А.П. Характеристика летнего населения и вертикальное распределение птиц в горных районах юга Среднетаежной зоны // Научная жизнь. № 2. 2016. С. 220–227.
- Штегман Б.К. Основы орнитологического деления Палеарктики. Фауна СССР. Птицы. Т. 1. М. Л. 1938. Вып. 2. 156 с.
- Gregory R.D. Development of breeding bird monitoring in the United Kingdom and adopting its principles elsewhere // Ring. 2000. V. 22. P. 35–44.
- Gregory, R.D. Vorisek P., Strien A. Van, Meyling W.G., Jiguet F., Fornasari L., Reif J., Chylarecki P., Burfield I.J. Population trends of widespread woodland birds in Europe // Biol. Conservation. 2007. V. 149. P. 78–97.
- Hengeveld R. Dynamic biogeography. Cambridge, University press, 1990. 249 p.
- Jaccard P. Lois de distribution florale dans la zone alpine // Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles. 1902. V. 38. P. 69–130.
- Sanderson F.J., Donald P.F., Paln D.J., Burfield I.J., Bommel F.P. van. Long term population declines in Afro-Palaearctic migrant birds // Biol. Conservation. 2006. Vol. 131. P. 93–105.
- Svensson S.E. European bird monitoring: geographical scales and sampling strategies // Ring. 2000. V. 22. P. 3–23.

## Spatial-typological Structure and Organization of Bird Communities of the Aldan Highlands

E. V. Shemyakin<sup>1</sup> and L. G. Vartanetov<sup>2, #</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological Problems of the Cryolithozone SB RAS, Yakutsk, 677980 Russia

<sup>2</sup>Institute of Animal Systematics and Ecology SB RAS, Novosibirsk, 630091 Russia

<sup>#</sup>e-mail: lvartanetov@yandex.ru

The bird communities of one of the least surveyed regions of Yakutia, the Aldan highlands, was studied on the basis of long – term records. The most complete and detailed hierarchical classification of bird communities were compiled for the first time. The spatial and typological structure of the bird population is revealed, and the significance of environmental factors in the formation of ornithocomplexes is estimated. Regional features of formation of ornithocomplexes are established.

**Keywords:** Aldan Highlands, classification and spatial-typological structure of the bird population, spatial organization of ornithological communities

УДК 575:599.322.2

## РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНИЯ АЗИАТСКИХ КРАСНОЩЕКИХ БЕЛОК (Rodentia, Sciuridae, *Dremomys*) В ВОСТОЧНОМ ИНДОКИТАЕ

© 2022 г. А. Е. Балакирев\*, \*\*, @, А. В. Абрамов\*\*, \*\*\*, Буй Суан Фьонг\*\*, В. В. Рожнов\*, \*\*

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

\*\*Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, ул. Нгуйен Ван Хуйен, 63, Ханой, Вьетнам

\*\*\*Зоологический институт РАН, Университетская наб., 1, Санкт-Петербург, 199034 Россия

@E-mail: alexbalakirev@mail.ru

Поступила в редакцию 13.08.2021 г.

После доработки 17.08.2021 г.

Принята к публикации 18.08.2021 г.

На основе новых молекулярных данных о митохондриальных (*Cyt b*) и ядерных генов (*IRBP*, *RAG1*), а также обширных морфологических материалов исследованы таксономия и взаимоотношения внутри рода азиатских краснощеких белок *Dremomys*, распространенных на территории восточного Индокитая и южного Китая. Филогенетический анализ показал, что азиатские краснощекие белки, которых в настоящее время относят к *D. rufigenis*, не являются гомогенной группой, а подразделяются на две независимые клады видового уровня – северную и южно-центральную. Последняя по *Cyt b*, в свою очередь, также подразделяется на две глубоко дивергентные клады, между которыми прослеживаются лишь незначительные морфологические отличия в строении черепа, выявляемые методами многомерной математической статистики (метод главных компонент, PCA), что дает основание рассматривать их в качестве криптических видов. На основании наших данных краснощекие белки, населяющие северный Вьетнам и южный Китай, обычно относимые к *D. rufigenis*, должны рассматриваться в качестве отдельного вида *D. ornatus* (Thomas, 1914). Белки, населяющие южные и центральные районы Вьетнама, на основании их специфической внешней морфологии должны быть отнесены к *D. rufigenis*, а именно к подвидам *D. r. fuscus* (Bonhote, 1907) и *D. r. laomache* (Bonhote, 1921) соответственно.

**Ключевые слова:** краснощекие белки, *Dremomys*, Юго-Восточная Азия, молекулярная филогения, морфология, таксономия, криптические виды

**DOI:** 10.31857/S1026347022010048

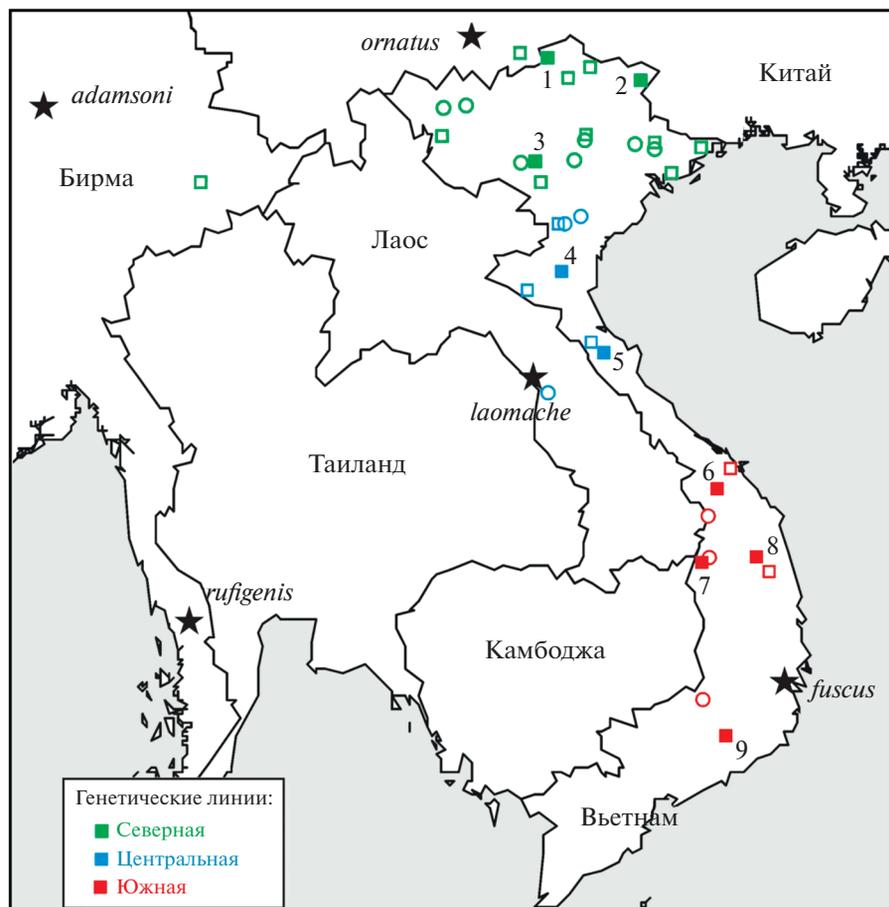
Краснощекие или, длинноносые белки рода *Dremomys* (Heude, 1898) это широко распространенная группа древесных млекопитающих, представленная в фаунах Индокитая, Малайского п-ва и Китая (Corbet, Hill 1992; Thorington, Hoffmann, 2005; Thorington *et al.*, 2012). Таксономический состав этого рода долгое время оставался дискуссионным. После серии ревизий (Росcock, 1923; Osgood, 1932; Ellerman, 1940; Moore, Tate, 1965; Thorington, Hoffmann, 2005) род был определен в составе шести видов: *D. lokriah* Hodgson, 1836, *D. everetti* Thomas, 1890, *D. gularis* Osgood, 1932, *D. pernyi* Milne-Edwards, 1867, *D. pyrrhomerus* Thomas, 1895 и *D. rufigenis* Blanford, 1878. По самым последним данным (Hawkins *et al.*, 2016) было показано, что *D. everetti*,

по-видимому, принадлежит к роду *Sundasciurus*. Таким образом, краснощекие белки оказываются полностью ориентальной группой, отсутствующей на территории Зондской суши.

Среди краснощеких белок большое количество форм предлагалось исторически в качестве подвигов *D. rufigenis*. Мур и Тат (Moore, Tate, 1965) предлагали лишь три подвида: *D. r. rufigenis* Blanford, 1878, *D. r. belfieldi* Bonhote, 1908 и *D. r. opimus* Thomas et Wroughton, 1916, в более поздних сводках (Corbet, Hill, 1992; Thorington, Hoffmann, 2005) было предложено еще два таксона *fuscus* Bonhote, 1907) и *ornatus* Thomas, 1914, при этом *opimus* стал рассматриваться в качестве младшего синонима *adamsoni* Thomas, 1914.

В соответствии с последними сводками для Вьетнама описаны два подвида: *D. r. rufigenis*, населяющий северный Вьетнам и Юньнань в Китае, и

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S1026347022010048 для авторизованных пользователей.



**Рис. 1.** Карта локалитетов исследованных образцов. Показано географическое распространение митохондриальных линий *Dremomys* в Индокитае. Генотипированные образцы показаны закрашенными, морфологические материалы представлены пустыми квадратами и кружками для черепов и шкурок соответственно. Типовые локалитеты *D. rufigenis* s. lato отмечены звездочками. Нумерация локалитетов как в приложении 1.

*D. r. fuscus*, распространенный на юге Вьетнама и в Лаосе (Thorington *et al.* 2012).

Главной целью настоящей работы явилось исследование морфологической и генетической вариабельности *D. rufigenis* во Вьетнаме для оценки таксономического состава и морфологической вариабельности этого таксона.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы *Dremomys* из Вьетнама были получены в ходе серии экспедиций Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра в период с 1998 по 2018 гг. Данные материалы были собраны в полном соответствии с действующим законодательством Вьетнама в сфере охраны природы и биологического разнообразия. При сборе образцов и обращении с живыми зверьками мы также следовали рекомендациям Американского маммологического общества (Gannon *et al.* 2011). Всего было исследовано

64 черепа, 107 шкурок и 7 фиксированных в этаноле образцов *D. rufigenis*, а также 12 черепов и 13 шкурок *D. pernyi*. В целом, образцы были получены из 47 локалитетов в Индокитае и южном Китае (рис. 1, приложение 1), материалы находятся в фондах Зоологического института РАН (ZIN), Санкт-Петербург, Россия, Зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ZMMU), Москва, Музея Ханойского университета (HUS), Ханой, Вьетнам и Биологического музея Института экологии и биоресурсов Национальной академии наук Вьетнама (IEBR).

Для морфометрических измерений и сравнения было использовано 58 интактных черепов взрослых *D. rufigenis* из 20 локалитетов во Вьетнаме (приложение 1). Возраст зверьков оценивали по степени износа моляров и состоянию черепных швов. В качестве сравнительного материала использовали 9 черепов *D. pernyi* из коллекций

ZIN, IEBR и ZMMU. С помощью электронного штангенциркуля с точностью до 0.1 мм на черепе измеряли 19 краниодентальных параметров: наибольшая длина черепа (ONL), длина костного неба (PL), межорбитальная ширина (IB), ширина мозговой капсулы (BBC), высота мозговой капсулы (HBC), скуловая (зигоматическая) ширина (ZB), ширина между надглазничными отростками (SB), длина диастемы (LD), длина носовых костей (NL), небная длина (LBP), постнебная длина (PPL), длина ряда верхних моляров (CLM), длина ряда нижних моляров (CLm), ширина костного неба на уровне первых моляров (BBP1), ширина костного неба на уровне третьих моляров (BBP3), длина резцовых отверстий (LIF), ширина крыловидной ямки (BMF), длина слуховых барабанов (LB), высота слуховых барабанов (HB). Дополнительно рассчитывали 11 индексов: длины слухового барабана ( $ILB = LB/ONL$ ), скуловой ширины ( $IZB = ONL/ZB$ ), межглазничной ( $IOB = ONL/IB$ ), небной 1 ( $ILBP1 = LBP/ONL$ ), небной 2 ( $ILBP2 = LBP/PL$ ), молярной ( $IMOL = CLM/ONL$ ), общий краниальный ( $GCI = PL/PPL$ ), глазничных отростков ( $OPI = ZB/IB$ ), высоты черепа ( $IBH = HBC/ONL$ ), краниальный ( $CI = \sqrt{BBC \times HBC}$ ) и площади костного неба ( $PI = \sqrt{BBP1 \times BBP3} \times LBP$ ).

Для теста межгрупповых различий для всех промеров черепа и индексов применяли однофакторный анализ вариации (ANOVA). Для оценки морфологического разнообразия внутри популяций и видов *Dremomys* был применен метод главных компонент (PCA). Все статистические расчеты и процедуры выполняли с использованием программного пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Тотальную ДНК выделяли из фиксированной 96%-ным этанолом мышечной ткани с помощью стандартного фенол-хлороформного метода с обработкой протеиназой К (Kocher *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989). Далее ДНК очищали двукратным переосаждением этанолом или с помощью набора DNA Purification Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA, США).

Мы исследовали четыре гена, два митохондриальных и два ядерных, в отношении которых была показана пригодность для филогенетического анализа азиатских Sciuridae (Oshida *et al.*, 2000, 2006; Mercer, Roth, 2003; Steppan *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2008, 2013; Hawkins *et al.*, 2016). Три из этих генов, а именно полный ген цитохрома *b* (*Cyt b*, 1140 п.н.), фрагмент (до 1.610 п.н.) первого экзона ретиноид связывающего протеина (*IRBP*, также известен как *RBP3*) и часть (1.571 п.н.) первой субъединицы гена фактора активации ре-

комбинации (*RAG1*) использовали во всех анализах. Для некоторых образцов мы также секвенировали 5'-проксимальный участок гена первой субъединицы цитохром оксидазы (*COI*) длиной 680 п.н. (Hebert *et al.*, 2003).

Цитохром *b* амплифицировали с парой универсальных праймеров L14723 и H15915 (Irwin *et al.*, 1991), для *COI* были использованы универсальные консервативные праймеры BatL 5310 и R6036R (Kocher *et al.*, 1989; Irwin *et al.*, 1991). Амплификацию обоих митохондриальных фрагментов проводили по следующему общему ПЦР-протоколу: первичная денатурация в течение 90 с при 95°C, затем 35 циклов денатурации 30 с при 95°C, отжиг в течение 60 с при 52°C и элонгация в течение 30 с при 72°C, с финальной элонгацией в течение 2 мин при 72°C. ПЦР проводили в объеме 30–50 мкл в реакционной смеси, содержащей 2.5–3 мкл 10× стандартного ПЦР буфера (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA), 50 mM дезоксирибонуклеотидов, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10–12 пмоль праймеров, 1 ед Taq DNA полимеразы (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA) и 0.5 мкл (20–50 нг) тотальной ДНК-матрицы на пробирку. Ген *IRBP* амплифицировали с помощью набора праймеров IRBP125f, IRBP223, IRBP1435r, IRBP1125r, и IRBP1801r (Suzuki *et al.*, 2000) по методу Stanhope (Stanhope *et al.*, 1992). Фрагмент гена *RAG1* был получен с ранее известными праймерами S70 и S71; те же праймеры использовали как для первичной ПЦР, так и для прямого секвенирования как описано в работе Степана (Steppan *et al.*, 2004).

ПЦР-продукты очищали с помощью набора DNA Purification Kit, двуцепочечная ДНК была прямо секвенирована по обеим цепям по методу Sangera на секвенаторе ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с протоколом производителя. Все полученные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank (KX171231 – KX171276).

В целом, нами было генотипировано 17 особей из 8 географических локалитетов: 17 по *Cyt b*, 12 по *IRBP*, 12 по *RAG1* и 4 по *COI* (табл. S2 приложения). Для сравнения мы привлекли все последовательности генов *Cyt b*, *IRBP* и *RAG1* представителей *Dremomys* на настоящий момент, доступные в базах GenBank/NCBI/JNDB, а также несколько последовательностей видов *Callosciurus*, которые были использованы в качестве внешней группы для укоренения филогенетических деревьев (приложение 2).

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программ BioEdit v 7.0 (Hall, 1999) и Clustal W (встроена в BioEdit и MEGA 6) и верифицировали вручную. Расчет базовых параметров последовательностей (число переменных сайтов, парсимониально-информативных сайтов, сдвиг нуклеотидного состава, частоты оснований и таблицы частот нуклеотидных замен), а также оценку наилучшей модели нуклеотидных замен и меж- и внутригрупповой дивергенции проводили в программе MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Мы использовали наиболее применяемые алгоритмы построения филогенетических деревьев, такие как метод минимальной эволюции (ME), максимальной парсимонии (MP) и максимального правдоподобия (ML). Филогенетические деревья были построены на основе индивидуальных последовательностей трех генов: *Cyt b* (1-1140), *RAG1* (1141-2712) и *IRBP* (2713-3824 нуклеотидные положения) и обобщенной конкатенированной последовательности. Модели нуклеотидной эволюции тестировались при помощи соответствующего модуля программного пакета MEGA 6. Для *Cyt b* лучшей оказалась модель HKY + G (Hasegawa-Kishino-Yano, параметр  $\gamma = 0.16$ ), тогда как для *RAG1* более оптимальной оказалась модель K2 (Kimura 2 parameter); для гена *IRBP* и обобщенной последовательности лучшей оказалась более комплексная модель GTR + G + I (General Time Reversible, параметр  $\gamma = 0.21$ ). Параметр формы  $\gamma$  во всех случаях оценивался непосредственно из исследуемого набора данных. В силу обнаруженного значительного насыщения последовательность гена *COI* не использовалась для непосредственной филогенетической реконструкции и представлена здесь лишь как генетический ваучер для ДНК-баркодинга и сравнения генетических дистанций. Устойчивость топологии деревьев оценивали методом бутстрепа при 1000 повторениях. Деревья строили и визуализировали непосредственно в программе MEGA 6 или с помощью TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

Генетические дистанции оценивали с помощью MEGA 6 как парные дистанции по генам *Cyt b* и *COI*, используя наиболее комплексную вероятностную модель эволюции и ТЗР (Tamura 3 parameter) алгоритм (Tamura *et al.*, 2004). Для оценки равенства скоростей эволюции в различных филогенетических линиях был использован тест Тажимы (Tajima's Relative Rate Test), также выполненный в программе MEGA 6, который показал отсутствие оснований отвергнуть нуль-гипотезу о равенстве скоростей эволюции между линиями. Оценка возраста клад была проведена по референс точкам, указанным для некоторых событий би-

фуркации (Hawkins *et al.*, 2016) в модуле ML Clock Test, реализованном в MEGA 6 (Tajima, 1993) на базе ML-дерева гена *Cyt b*.

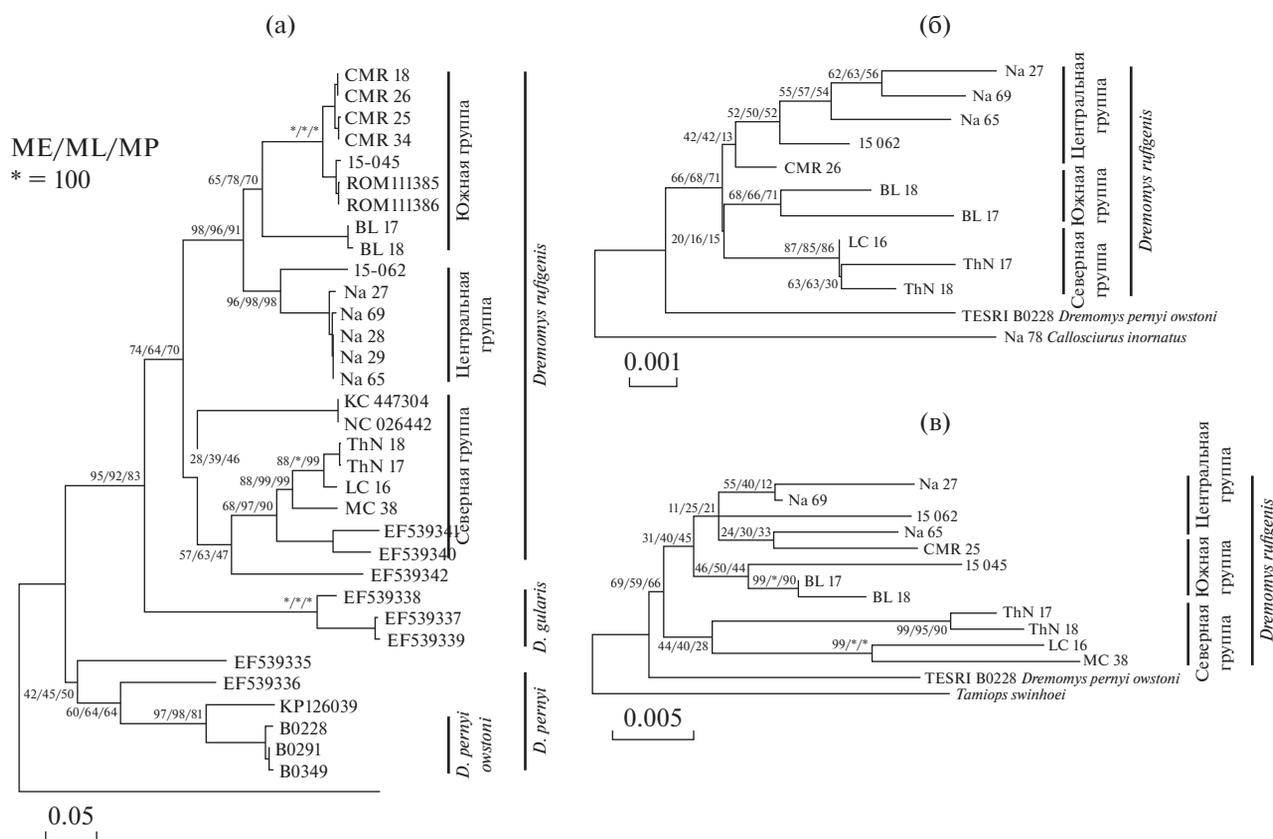
Для уточнения генеалогического родства и исследования эволюции генетических линий внутри *Dremomys* также была построена парсимониальная сеть на базе гаплотипов гена *Cyt b*. Мы исследовали эволюционные взаимоотношения внутри этой максимально-парсимониальной сети по методу объединения медиан (Median-Joining method) (Bandelt *et al.*, 1999), как реализовано в программе Network 5.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/shar-enet.htm>) с использованием параметров по умолчанию (Polzin, Daneschmand, 2003) и без применения MP-релаксации сети.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Филогенетический анализ.** Мы обнаружили высокое генетическое разнообразие среди видов *Dremomys* из популяций, населяющих Индокитай (приложение 3). По гену *Cyt b* генетические дистанции между обнаруженными в северном, центральном и южном Вьетнаме филогруппами ( $d = 11.5\text{--}19.3\%$ , ТЗР) соответствуют типичным межвидовым дистанциям, наблюдаемым у грызунов (Bradley, Baker, 2001).

Филогенетические деревья для *Cyt b*, *RAG1* и *IRBP* генов представлены на рис. 2. Внутри *Dremomys* наблюдается сложная филогенетическая структура и наиболее сложный паттерн демонстрируют именно восточно-индокитайские популяции. По гену *Cyt b* выявляются три достоверные высоко-дивергентные филогенетические линии *D. rufigenis* (рис. 2а), положение других клад не всегда устойчиво. Мы называем здесь эти ветви как северная (N) и сестринские по отношению к ней центральная (C) и южная (S) клады. Уровень поддержки для этих трех вьетнамских линий остается достоверным при использовании любого применяемого метода кластеризации. Одновременно, для ряда китайских клад, относимых к *D. pernyi*, *D. lokriah* и *D. pyrrhomerus*, отмечаются более низкие значения поддержки (бутстрепа), что может указывать на базальную радиацию этих ветвей.

Нуклеотидные последовательности, полученные из GenBank и помеченные как образцы NC026442 и KC447304, для которых неизвестен исходный локалитет, представляют наиболее нестабильную в топологическом отношении ветвь дерева. Она может появляться как сестринская к вьетнамским *D. rufigenis*, или к китайским *D. pernyi*, или даже к *D. pyrrhomerus* в зависимости от применяемого метода кластеризации, но неизменно с низкими значениями поддержки узла бифуркации.



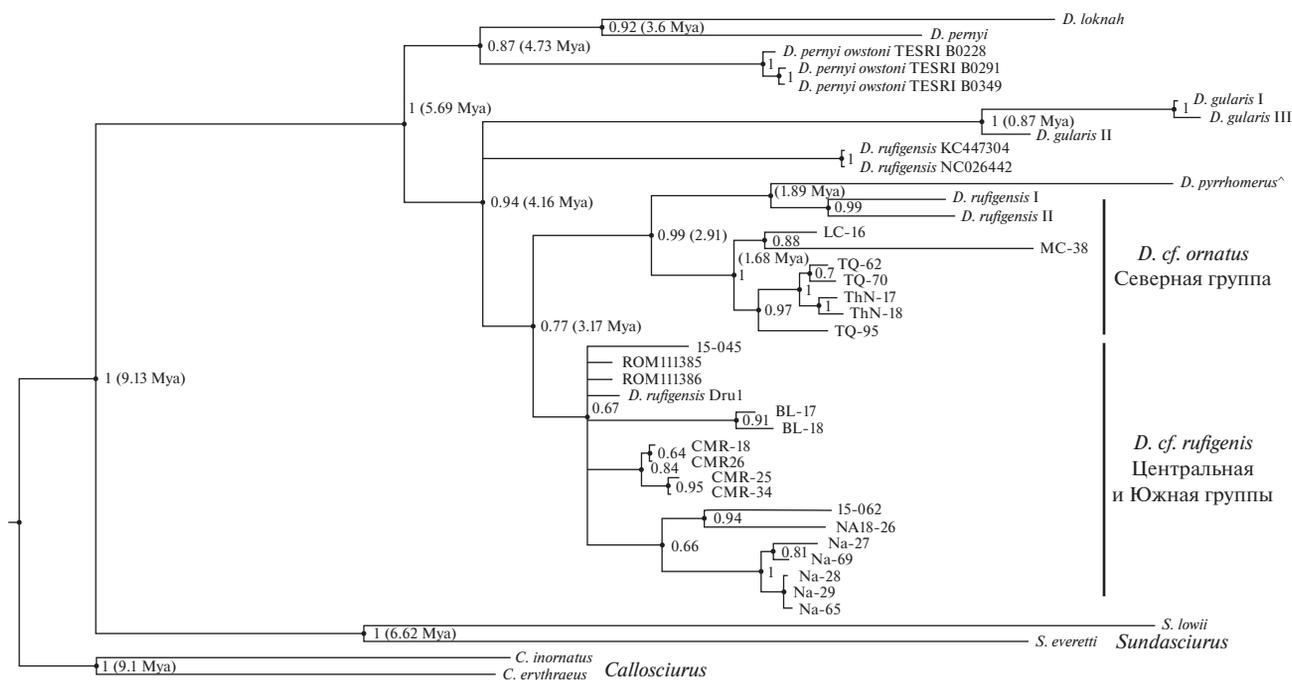
**Рис. 2.** Деревья филогенетической радиации линий *Dremomys*. а – *Cyt b*, ML-дерево (HKY + G); б – ген *IRBP*, ML-дерево (GTR + G + I); в – ген *RAG1* ML-дерево (K2). Значения поддержки (для различных методов кластеризации ML/ME/MP, /\*/ если = 100) указаны над узлами. Названия и коды ветвей (в скобках) для главных филогенетических линий как показано на рис. 1.

Три вышеуказанные вьетнамские ветви *D. rufigenis*, соответствующие северной, центральной и южной кладам (рис. 2б), выявляются и на дереве гена *IRBP*, хотя и с более низкой достоверностью. Структура древа *IRBP* оказывается более сложной, вероятно в силу того, что этот ген является одним из наиболее консервативных, медленно эволюционирующих и маловариабельных среди генов, используемых в филогении млекопитающих (Stanhope *et al.*, 1992). Дерево, полученное для гена *RAG1* (рис. 2в), выглядит наиболее интригующе. Несмотря на довольно низкий уровень поддержки (что вероятнее всего вызвано очень короткой длиной имеющихся в наличии последовательностей, представляющих китайские популяции *D. pennyi*), топология дерева остается неизменной при любом методе кластеризации, алгоритме расчета и базовых параметрах. При этом образцы с севера Вьетнама кластеризуются вместе с *D. pennyi*, а прочие формируют отдельную сестринскую группу.

Столкнувшись с ситуацией, когда, с одной стороны, очевидно наличие глубоко дивергентных филогенетических линий, а с другой – их взаимоотно-

шение не может быть достоверно определено по тому или иному индивидуальному гену, мы провели анализ конкатенированных последовательностей для улучшения достоверности топологии результирующих деревьев. Анализ комбинированной последовательности трех генов дал дерево с хорошими поддержками узлов (рис. 3), на котором хорошо выявляются две главные филогенетические клады *D. rufigenis* из Вьетнама – северная группа (N) и группа, объединяющая южную и центральную группы (C + S).

Анализ структуры медианной сети также показывает, что вьетнамские *Dremomys* представлены двумя независимыми субпопуляциями (рис. 4). Одну субпопуляцию формируют гаплотипы, относящиеся к северной филогенетической ветви, они формируют т. н. “торсо сети” и тяготеют к китайским *D. pyrrhomerus*. Гаплотипы из центральных и южных вьетнамских популяций формируют другую линию, которая может быть присоединена к “торсо” только через южные гаплотипы, а гаплотипы центральной группы значительно более дистантны от северных. Такой филогенетический



**Рис. 3.** Филогенетическое древо для видов *Dremomys* (ML), построенное по конкатенированным последовательностям *Cyt b* + *IRBP* + *RAG1* гены (GTR + G + I; 1-2-3 позиции), уровень поддержки указан в узлах ветвления, в скобках приведено оценочное время дивергенции.

паттерн не соответствует современным представлениям о характере распространения видов этой группы, однако определенно указывает на то, что южные и центральные популяции *D. rufigenis* следует рассматривать в качестве независимых от северных популяций.

Восточноиндокитайские линии выявляются как отдельные от объединенного “торсо”, что демонстрирует независимость их эволюции. Эволюционная траектория северной клады показывает явную широтную направленность и длинные ветви. Эволюция же в южно-центральной кладе (S-C clade) проявляется в виде постепенного перехода от южных к более северным гаплотипам внутри этой группы, что может отражать естественную историю ее распространения с юга на север.

Сеть также проясняет положение некоторых северных ветвей *D. rufigenis* и *D. pyrrhomerus*, демонстрируя неустойчивость филогенетического древа (рис. 2а). Северные популяции *D. rufigenis* представляются наиболее дивергентной кладой, берущей начало от общего пула северных филогенетических линий. Значительная длина некоторых филогенетических ветвей в ней соответствует их видовому статусу, в то время как другие, более короткие, следует рассматривать в контексте внутривидовой изменчивости.

**Анализ внешней морфологии.** Окраска шкурки и некоторые другие характеристики меха у азиатских краснощеких белок подвержены значительной индивидуальной изменчивости (Dao, 1969; Cao, 1984; Dao, Cao 1990). Это наиболее характерно для популяций из провинций Тхайнгуйен, Виньфук, Нгеан, Куагнинь и Лангшон. Брюшная сторона шкурки у животных, отловленных в одном и том же географическом районе, может варьировать по окрасу от ярко-белой до грязно-желтой или серой. Окраска спинной стороны и щек тоже очень вариабельна. У некоторых экземпляров голова, спина и бедра окрашены в светло-коричневый цвет с желтым оттенком, тогда как другие демонстрируют явный коричневый окрас с рыжим оттенком. Этот паттерн может отражать и сезонную вариабельность окраски, потому что большинство светлоокрашенных индивидов были отловлены с мая по июль.

Зверьки из центрального Вьетнама (провинции Тханьхоа, Ниньбинь и Нгеан) и центрального Лаоса имеют заметно более светлую окраску с желто-рыжим и коричневатым оттенком окраски меха дорзальной стороны. Эта окраска соответствует морфе *laomache*, особой светлой расе, ранее описанной из Лаоса (Thomas, 1921).

Самыми характерными отличительными чертами большинства популяций *D. rufigenis* являются

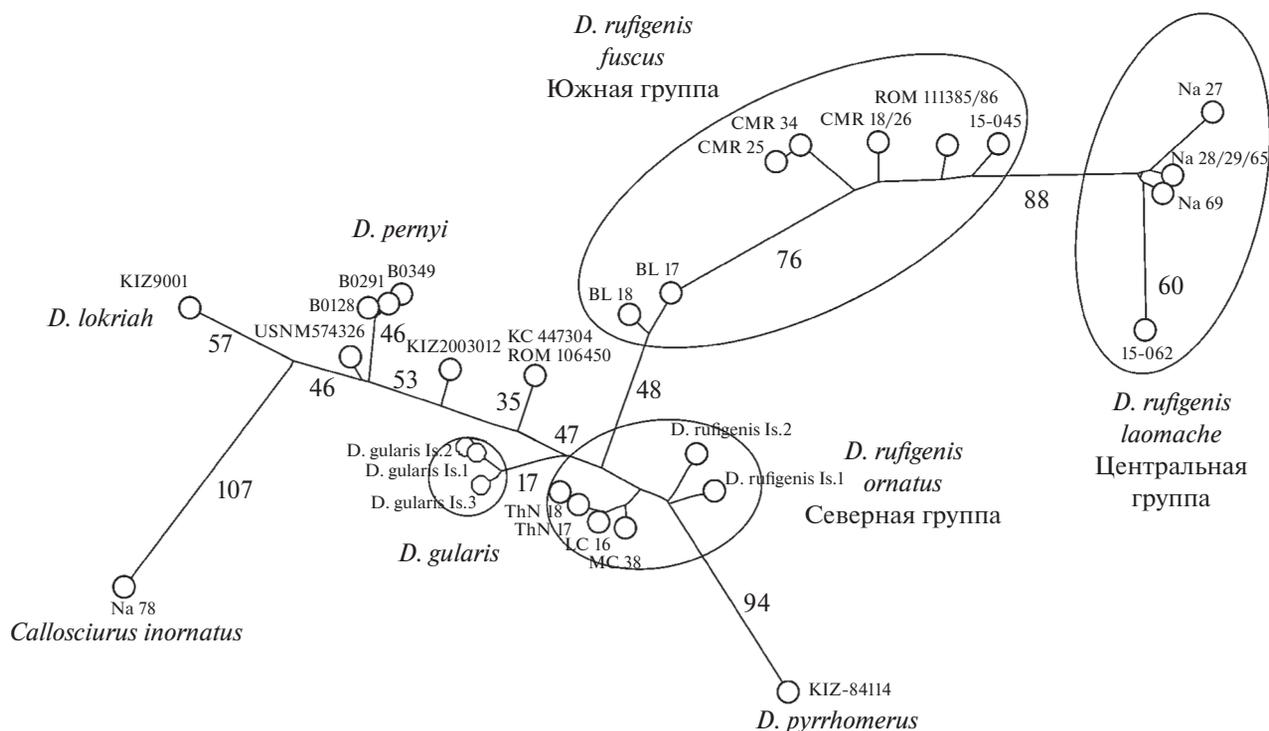


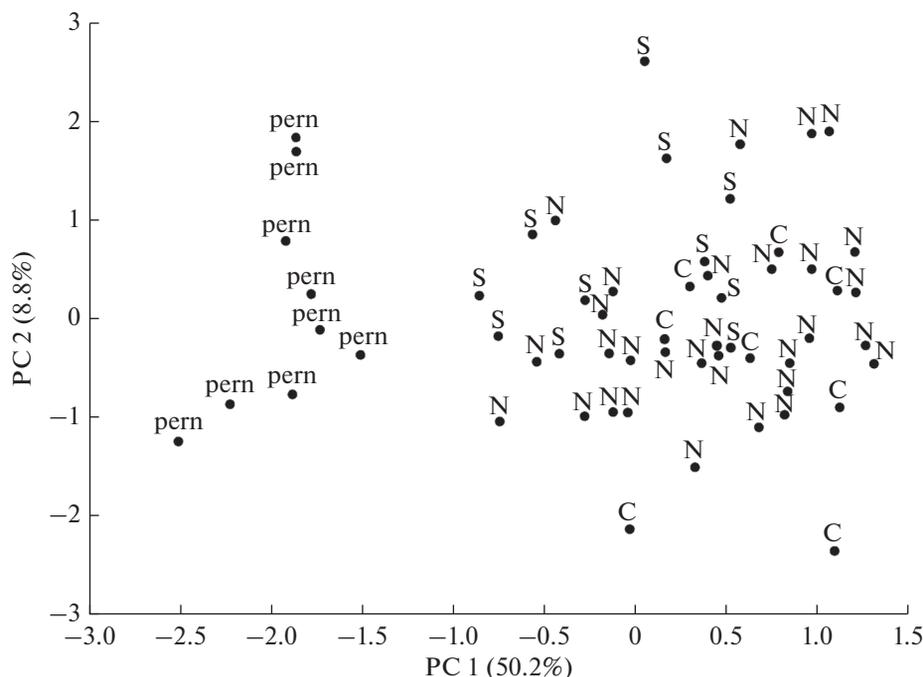
Рис. 4. Парсимониальная сеть (метод объединения медиан) для взаимоотношений *Dremomys*, построенная на основе гаплотипов гена *Cyt b*. Медианные векторы не показаны. Для главных ветвей видового/подвидового уровня цифрами указано количество нуклеотидных замен.

ся светлые пятна за ушами и текстура меха. Белки из популяций, относящихся к северной группе, имеют за ушами желтые или охристые пятна, которые хорошо просматриваются при взгляде сбоку. У зверьков, относящихся к южной и центральной популяциям, белые пятна хорошо заметны только при взгляде сзади или сверху. Наличие белых пятен за ушами было специально отмечено при первоописании *D. rufigenis* (Blanford, 1878) и впоследствии указывалось для экземпляров из Малайзии (Bonhote, 1908) и Бирмы (Thomas, Wroughton, 1916; Moore, Tate, 1965), а также для *D. fuscus* из южного Вьетнама (Нячанг) (Bonhote, 1907), тогда как для *D. ornatus* из Китая и *D. adamsoni* из северной Бирмы указывались желтые пятна за ушами (Thomas, 1914).

**Анализ краниальной морфологии.** Средние, пределы и стандартные отклонения промеров черепа и зубов, а также индексы для всех трех групп, идентифицированных генетически, представлены в приложении 4. Как показывает ANOVA, образцы южной группы значительно отличаются от северной и центральной по многим промерам, в частности у них значительно меньше ZB, BBC, LB, HB, LB, HB, CLM, PL и CLm; значительно у южной группы отличаются и некоторые индексы (IZB и

ПЛВ). Различия между образцами северной и центральной групп были низкими: единственный промер, показавший значимые отличия – ширина костного неба на уровне первых моляров (BBP1), которая оказалась больше у северных популяций.

Комплексная морфологическая вариабельность у 58 черепов *Dremomys* на базе всего набора из тридцати промеров и индексов черепа была проанализирована при помощи метода главных компонент (PCA). Большинство из промеров показали положительную корреляцию с первой факторной осью PC1 (приложение 5), что указывает на то, что ось PC1 отражает различия в общих размерах черепа. Вторая факторная ось PC2 показала сильную корреляцию с длиной ушных барабанов (LB). Образцы *D. pernyi* и *D. rufigenis* s. lato формируют две явно дискретные группы (рис. 5). Однако даже с применением мультифакторного анализа не удается обнаружить каких-либо ясных, визуально заметных черт строения черепа, пригодных для видовой идентификации исследуемых популяций *D. rufigenis* s. lato без применения специальных статистических процедур.



**Рис. 5.** Разделение не группированных морфометрических данных *Dremomys* Восточного Индокитая (метод главных компонент, PCA) в пространстве осей. Данные промеров черепа и индексов (см. приложение 4). Символы: pern — *D. pernyi*, N, C, и S — образцы *D. rufigenis* s. lato, относящиеся к северной, центральной и южной филогенетической группам соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Таксономические выводы.** Ранее черепа *D. rufigenis* из нескольких локалитетов в Индокитае были исследованы Эндо с соавт. (Endo et al., 2003). Эти авторы показали, что белки из южных районов (Малайзия) существенно крупнее белок из северных (южный Вьетнам, Лаос и Таиланд), в частности, по наибольшей длине черепа (51.47 мм SD = 1.24 против 50.32 мм, SD = 1.44 и 48.9 мм, SD = 2.32) для взрослых самцов. Малайские популяции демонстрировали большую длину сплахнокраниума и более узкую межглазничную ширину по сравнению с популяциями из Вьетнама-Лаоса и Таиланда. Однако при отсутствии каких-либо генетических данных, авторы не выдвинули никаких таксономических выводов, основанных на этих наблюдениях.

Полученные нами результаты позволяют констатировать, что белки, населяющие северный Вьетнам и южный Китай, которых обычно относят к *D. rufigenis*, должны рассматриваться в качестве отдельного криптического вида *D. ornatus* (Thomas, 1914), а не одноименного подвида *D. rufigenis*. Как отмечено выше, молекулярно-генетическое разнообразие внутри исследованных популяций оказалось существенно выше морфологического. Эта ситуация не уникальна: сегодня известно много

пар и групп видов, которые могут демонстрировать полное отсутствие морфологических различий, при этом оставаясь валидными видами. Криптические, или генетические, виды были выявлены, в основном или даже всецело основываясь на их значительных генетических отличиях (Baker, Bradley, 2006). Примером их могут быть такие виды млекопитающих, как *Loxodonta cyclotis* (Roca et al., 2001), *Carollia sowelli* (Baker et al., 2002; Solari, Baker, 2006), *Neotoma macrotis* (Matocq, 2002), *Myotis occultus* (Piaggio et al., 2002), *Notiosorex cockrumi* (Baker et al., 2003), *Lophostoma equatorialis* (Baker et al., 2004), *Peromyscus schmidlyi* (Bradley et al., 2004a), *Reithrodontomys bakeri* (Bradley et al., 2004b), *Lagidium boxi* (Spotorno et al., 2004) и *Thylamys cinderella* (Braun et al., 2005), которые были выделены и описаны лишь на основе данных о последовательностях ДНК. Известно и множество других примеров описания видов на основе использования иных генетических маркеров, в частности в родах *Sicista*, *Microtus*, *Sylviaemus* (см. Sokolov et al., 1981, 1986; Sokolov, Baskevich, 1988; Chelomina et al., 1998; Conroy, Cook, 2000; Hille et al., 2002).

Ситуация с белками *Dremomys*, с которой мы столкнулись, требует представить здесь формальное описание и реформирование *D. ornatus* в качестве независимого таксона в соответствии с его первоописанием, сделанным Томасом (Thomas, 1914).



**Рис. 6.** *Dremomys ornatus*. Взрослая самка. Провинция Каобанг, уезд Халанг (Hà Lang), близ Тханьят (Thanh Nhat). Внешний вид (фото А.Е. Балакирева), ZMMU S-191977 (череп, шкурка, тушка в этаноле), генетический ваучер ThN 17.

***Dremomys ornatus* (Thomas, 1914) –  
аннамская краснощекая белка**

**Голотип.** (British Museum of Natural History) BMNH 12.7.25.20, старая самка, череп, шкурка, отловлена 4 февраля 1910 г. мистером Н. Ори.

**Типовой локалитет.** Около Монгзе (Mongtze), провинция Юньнань, Китай, 23°22' N, 103°26' E).

**Описание.** Как указано у Томаса (Thomas, 1914: с. 26): “В целом напоминает *rufigenis*, но строение черепа как у *belfieldi*. Окраска почти в точности как *rufigenis*, но спина более светло-оливковая без каких-либо грязно или тускло-коричневых оттенков, крестец почти полностью или в значительной степени коричневый. Нижняя сторона как у *rufigenis*. Боковые стороны головы ярко-ржавые, ржавый цвет распространяется далее по бокам на верхнюю поверхность морды почти до уровня ушей. Пятна за ушами желтые (buffy). Череп отличается от такового *rufigenis*, но неотличим от *belfieldi*. Крупнее чем у *rufigenis*, морда очень длинная, узкая, сжатая с боков; носовые кости длинные, их задние оконечности направлены трансверсально. Лобные кости широкие, плоские с более трансверсально направленными задними отростками. Черепная коробка крупная. Скуловые дуги широкораспростерты. Задняя ступня, 44. Череп: наибольшая длина 58.2; кондило-резцовая длина 50.3; скуловая ширина 31.6; длина насалий 21.7; межглазничная ширина 16.7; ширина мозговой коробки 25; длина костного неба 24.2;  $r^4$  с тремя другими молярами 9.7”.



**Рис. 7.** *Dremomys rufigenis fuscus*. Взрослый самец. Провинция Ламдонг, уезд Баолок (Baو Loc), близ Баолам (Baو Lam), южный Вьетнам. Внешний вид (фото А.Е. Балакирева), ZMMU S-191975 (череп и шкурка), генетический ваучер BL 17.

**Диагноз.** “Отличается от *rufigenis* своим более крупным черепом и длинной мордой, а от *belfieldi* более яркой окраской” (Thomas, 1914). *D. ornatus* хорошо отличается от прочих *Dremomys* по митохондриальным (*Cyt b*, *COI*) или ядерным (*RAG1*, *IRBP*) генам. Уровень дивергенции от других линий видового уровня составляет  $d$  ТЗР 0.187–0.269 для *Cyt b* и 0.0418–0.047 для *COI*. Нуклеотидные последовательности, депонированные в GenBank (KX171244–KX171247; KX171258–KX171260; KX171264, а также KX171273–KX171276), могут быть использованы в качестве генетических ваучеров этого вида.

**Сравнение.** *D. ornatus* – криптический генетический вид, родственник *D. rufigenis*. Общий паттерн окраски довольно вариабельный и зависит от сезона и локальных особенностей популяций. Наиболее заметной чертой внешней морфологии является цвет пятен за ушами и текстура меха. Уши *D. ornatus* хорошо опушенные, с хорошо видными при взгляде сбоку желтыми пятнами за ними (рис. 6), в отличие от *D. rufigenis*, у которого они покрыты лишь редкими волосками, а пятна за ушами ярко белого цвета и заметны лишь при взгляде сзади и сверху (рис. 7). Череп (приложение 6–7) у *D. ornatus* обычно крупнее (ОНЛ до 58 мм и более), но ясных морфологических отличий, пригодных для уверенного различения его от *D. rufigenis* по морфологии черепа, на настоящий момент не выявлено.

**Распространение.** Генетически подтвержденные образцы *D. ornatus* известны из северного Вьетнама (провинции Хазянг, Каобанг и Шонла). Морфологические данные свидетельствуют, что этот вид распространен повсюду в северном Вьет-



**Рис. 8.** Сравнение паттернов окраски меха *D. pernyi*, *D. rufigenis* и *D. ornatus* из Вьетнама. а – брюшная сторона; б – спинная сторона. Слева на право: IEBR SL-767, *D. r. ornatus* особый паттерн окраски, провинция Шонла, уезд Моктяу (Moc Chau); IEBR СВ-55 и СВ-37 *D. pernyi*, провинция Каобанг, уезд Чунгкхань (Trung Khanh); IEBR SL-792, *D. r. ornatus* стандартный паттерн окраски, провинция Шонла, уезд Моктяу (Moc Chau); в – брюшная сторона. HUS M0163, *D. r. laomache* особый паттерн окраски, провинция Тханьхоа, уезд Танфук (Tan Phuc); г и д – брюшная и спинная сторона соответственно: HUS M2000, провинция Ниньбинь, уезд Кукфьонг (Cuc Phuong), *D. r. laomache* особый паттерн окраски.

наме, к северу распространен в китайских провинциях Юньнань и, вероятно, Гуаньси. На территории провинций Шонла и Йенбай *D. ornatus* контактирует с родственным видом *D. rufigenis*, представленным здесь формой *laomache*. Таким образом, южная граница его распространения лежит где-то между  $17^{\circ}30'$  и  $17^{\circ}45'$  с.ш. Генетических подтверждений симпатрии не имеется, однако присутствие особей с необычной окраской именно на территории контакта между видами оставляет возможность предполагать естественную гибридизацию между ними. Хвост таких особей по вентральной стороне окрашен очень светло, от беловато-желтого до полностью белого (рис. 8), тогда как у большинства популяций этих видов он имеет оранжево-красную окраску. Такие необычно окрашенные особи, которые составляют заметную часть популяции краснощеких белок в центральном Вьетнаме, даже побудили некоторых исследователей (Dao, 1969) причислять их к краснощекой белке Пирни *D. pernyi flavior*, что является явной ошибкой.

**Замечания о таксономическом составе *D. rufigenis sensu stricto*.** Судя по наблюдаемому уровню генетической обособленности, как центральная, так и южная линии должны быть отнесены к *D. rufigenis*, эти клады можно рассматривать в качестве отдель-

ных подвидов. В соответствии с действующим Кодексом зоологической номенклатуры (ICZN 1999) для них существует лишь два пригодных названия – *laomache* и *fuscus* (см. рис. 1, на котором указаны все типовые локалитеты для азиатских краснощеких белок в Индокитае).

Как указывал в первоописании Томаса (Thomas, 1921 с. 182–183), бледная окраска меха является главной характеристической чертой *D. r. laomache*: “Бледная, сильно седоватая раса *D. rufigenis*. Общие черты примерно те же, что и у истинного *rufigenis*, череп сходных пропорций, не особенно вытянут, пятна за ушами не особенно заметны, нижняя поверхность примерно той же степени серости. Однако дорзальная окраска светлее и серее, и значительно более крапчатая, желтые предтерминальные кольца на волосах имеют более 2 мм в длину, по сравнению со значительно менее 1 мм у *rufigenis* и прочих подвидов. Рыжая голова даже ярче чем у *rufigenis*. Заушные пятна небольшие или очень неясные, их волосы белые с желтыми окончаниями, более пространственно желтые чем у *rufigenis*... [Этот вид] реально отличить по палевой окраске и относительно крапчатой спине от любой иной расы, описываемой здесь. Его ближайший сосед в Аннаме, *D. r. fuscus*, является

темноокрашенной формой с примечательными белыми пятнами за ушами”.

В первоописании ни о каких иных морфологических признаках, кроме паттерна окраски, не сообщалось (Thomas, 1921), что находится в полном соответствии с результатами проделанного нами краниометрического анализа. Следует отметить, что под приведенное описание полностью подпадает паттерн окраски лаосского образца (ZIN 98317), отловленного в непосредственной близости от типового локалитета *D. r. laomache*. Большинство зверьков из центрального Вьетнама нельзя назвать совершенно палевыми, однако многие из них, действительно, окрашены заметно светлее, чем и южный *D. r. fuscus*, и северный *D. ornatus*. Таким образом, наличие светлоокрашенных особей является характерной чертой центральновьетнамской филогенетической линии (С), которую мы предлагаем относить к *D. r. laomache* Thomas, 1921. В свою очередь, южная линия (S-lineage) может быть ассоциирована с *D. r. fuscus*, чей подвидовой ранг в целом принимается, и генетическая привязка не вызывает вопросов.

Нет сомнений, что таксономический состав *D. rufigenis sensu stricto* требует дальнейшей ревизии. В отсутствие доступных образцов в настоящий момент сложно точно оценить границы распространения номинального подвида *D. r. rufigenis*, а также его отношения с морфологически отличными южно-малайскими популяциями (Endo *et al.*, 2003) и северным *D. lokriah*. Возможно, что первые могли бы быть отнесены к *D. r. belfieldi* Bonhote, 1908, описанному из Селангора, Малайзия.

**Распространение и формирование ареала.** Краснощекие белки жестко связаны с лесными экосистемами и их распространение ограничивается линией древостоя. Они не могут выходить за пределы этой границы или преодолевать широкие открытые пространства. Главным событием естественной истории, которое, вероятно, повлияло на их распространение, сегрегацию популяций и события видообразования — это регулярные дизъюнкции-воссоединения природных популяций, которые, в свою очередь, были связаны с осцилляциями территорий, покрытых тропическими лесами в позднем миоцене-голоцене (Hall, 1998).

В настоящее время древнейший ископаемый представитель рода, *D. primitivus* Qiu, 2002, известен из Люфенга (Lufeng) (Китай, провинция Юньнань) и датирован периодом 8–9 млн лет (Qiu, 2002). Согласно Хокинс с соавторами (Hawkins *et al.*, 2016), время существования ближайшего общего предка всех краснощеких белок оценивается в 5.97 млн лет назад (95% HPD 4.34–7.95),

а последнее событие видообразования датируется 2.9 млн лет (95% HPD 1.77–4.17, между *D. gularis* и одной из китайских линий *D. rufigenis s. lato*). Средний возраст современных видов оценивается в 4.4 млн лет (в интервале 5.97–2.9 млн). На основании этих оценок дивергенция между исходными южно-центральной (S-C группа) и северной (N-группа) вьетнамскими популяциями произошла ~2.41 млн лет назад (в промежутке 1.75–3.08 млн). Время разделения южной и центральной филогрупп оценивается в среднем в 1.80 млн лет (в интервале 1.3–2.31 млн). Эти временные оценки совпадают с двумя крупнейшими последними регрессиями уровня мирового океана (до 60–70 м ниже современного уровня моря), имевшими место в плейстоцене (Haq *et al.*, 1987). Этот факт поддерживает предположение о длительной изоляции исследуемых популяций и позволяет предполагать их видовой статус.

В ходе плейстоценовых оледенений граница леса располагалась на более низких высотах (Сох, Моог, 2000). Показано также значительное сокращение площади лесов в материковой Малайзии и на Палаване (Wurster *et al.*, 2010) во время последнего оледенения. На протяжении длительных отрезков времени в течение четвертичного периода большая часть территории региона была покрыта саваннами (Cranbrook, 2000; Gathorne-Hardy *et al.*, 2002).

Современные исследования в области биогеографии и палеоклиматов Зондского шельфа предполагают, что взаимодействие между климатом, колебаниями уровня моря и их воздействием на распространение флоры и фауны может быть значительно более сложным (van den Bergh *et al.*, 2001; Mercer, Roth, 2003; Meijaard, Groves, 2006). Многие острова на Зондском шельфе во время понижений уровня моря в плейстоцене (Mercer, Roth, 2003) соединялись друг с другом коридорами лесных экосистем (Anshari *et al.*, 2000; Kershaw *et al.*, 2001; Meijaard, 2003; Cannon *et al.*, 2009; Woodruff, 2010; Raes *et al.*, 2014; Leonard *et al.*, 2015). Сходным образом, непрерывный лесной покров существовал и в континентальном Индокитае на протяжении значительных периодов и в плиоцене, и плейстоцене (Meijaard, Groves, 2006). Это делало возможным прямой контакт, распространение и генетический обмен западно- и восточно-индокитайских популяций, который в настоящее время прерван обширными обезлесенными территориями в центральном Таиланде и западной Камбодже. Отсутствие сравнительно-генетических данных о малайских популяциях не позволяет прямо подтвердить это предположение. Тем не менее, основываясь на данных о персистенции

тропических лесов и данных по распространению ассоциированных с лесами видов фауны на островах Южно-Китайского моря и особенностях распространения других арбореальных видов в регионе (Meijaard *et al.*, 2003; Balakirev *et al.*, 2021), прямая связь южного Вьетнама с Малаккским полуостровом может быть более вероятна, чем с пенинсулярным Таиландом. Сложная палеоистория региона вылилась в значительный уровень биоразнообразия и сложную внутривидовую структуру, наблюдаемую у многих видов в Индокитае, южном Китае и на пространстве Зондской суши (de Bruyn *et al.*, 2014; Abramov *et al.*, 2014; Leonard *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2021). В течение жарких и аридных периодов лесопокрываемые территории сохранялись лишь на возвышенностях. Изолированные популяции *Dremomys*, по-видимому, существовали в этих лесных рефугиумах на протяжении исторически долгих периодов. Экологические барьеры, такие как упоминавшиеся выше саванноподобные территории, раз за разом появлялись в низменных областях, что нарушало генетический обмен между популяциями, населяющими изолированные горные леса, благоприятствуя таким образом их генетической диверсификации и событиям видообразования. Климат этого периода благоприятствовал существованию влажных горных лесов на плато Далат, Контум и в более северных районах вдоль хребта Аннамских гор, таких как плато Болавен, Фуан и Накай. Орография гор Юньнана и еще более сложна и в еще большей степени благоприятствует событиям видообразования. Возможно, что дальнейшие исследования *Dremomys* приведут к открытию новых видов этих белок в горах южного Китая и на Малайском полуострове, как это уже произошло для данного рода (Li *et al.*, 2008) и для родственных групп, таких как *Tamiops* (Chang *et al.*, 2011) и *Petaurista* (Li *et al.*, 2013).

Тектонические подвижки между ледниковыми периодами и в межледниковья, имевшие место в плейстоцене, а также продолжающийся подъем Гималаев приблизительно 2–3 млн лет назад (Zheng *et al.*, 2000), могли послужить главными факторами, ответственными за повышенный уровень генетического разнообразия и симпатрическое распространение ряда видов *Dremomys*, таких как *D. ornatus*, *D. gularis* и *D. pyrrhomerus* в южном Китае. Современные популяции *D. r. fuscus* и *D. r. laomache* также могли возникнуть в результате таких благоприятных взаимообменов. Как явствует из генетических данных и внешней морфологии, эти популяции вполне могут происходить от популяций западного Индокитая, а не китайских, с которыми они пришли в соприкосновение значительно позднее в результате вторичного кон-

такта в ходе недавнего расширения своего ареала. Подобные сценарии предполагались ранее для некоторых других арбореальных видов грызунов Юго-Восточной Азии (Balakirev *et al.*, 2012, 2021; Meschersky *et al.*, 2016; Balakirev, Rozhnov, 2019;).

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Вклад авторов:** Все авторы участвовали в сборе образцов, АЕБ провел генетический анализ и написал большую часть текста, АЕБ и АВА вместе провели морфологический анализ и подготовили иллюстрации; БСФ организовывал большую часть полевых экспедиций во Вьетнаме и осуществлял контакты с вьетнамскими музеями и другими организациями, ВВР редактировал текст, организовывал финансирование проекта и осуществлял общую координацию работы в России и во Вьетнаме.

**Благодарности.** Работа выполнена на базе Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра, Ханой, Вьетнам. Мы благодарны С.В. Крускопу (Зоомузей МГУ), О.В. Макаровой (ЗИН РАН), Ву Динь Тонгу (IEBR) и администрации Музея Ханойского университета за возможность работы с коллекциями. Мы благодарим также В.В. Сунцова и Г.В. Кузнецова, чьи сборы составили значительную часть исследованного морфологического материала. Мы благодарны сотрудникам Российско-Вьетнамского тропического центра Нгуен Данг Хою, Чан Куанг Тиену и Чан Хью Кою, которые приложили значительные усилия для организации экспедиций. Наконец, мы хотим выразить благодарность администрациям заповедников и национальных парков Кего (Ke Go) и Чумомрай (Chu Mom Ray) за их помощь в проведении наших исследований. Мы также очень благодарны Марсело Векслеру, Пьер-Анри Фабру за конструктивную критику ранних версий данной работы.

**Финансирование.** Работа частично выполнена при поддержке РФФ (грант 20-14-00036) и программы Зоологического института РАН (AAAA-A19-119082990107-3).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramov A.V., Balakirev A.E., Rozhnov V.V. An enigmatic pygmy dormouse: molecular and morphological evidence for the species taxonomic status of *Typhlomys chapensis* (Rodentia: Platacanthomyidae) // Zool. Studies. 2014. V. 53. P. 34.  
<https://doi.org/10.1186/s40555-014-0034-2>
- Anshari G., Kershaw A.P., van der Kaars S. A late Pleistocene and Holocene pollen and charcoal record from peat swamp forest, Lake Sentarum Wildlife Reserve, West Kalimantan, Indonesia // Palaeogeography Palaeoclimat and Palaeoecology. 2000. V. 171. P. 213–

228.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(01\)00246-2](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(01)00246-2)
- Baker R.J., Solari S., Hoffmann F.G.** A new Central American species from the *Carollia brevicauda* complex // Occasional Paper, Museum of Texas Technological University. 2002. V. 217. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.156831>
- Baker R.J., O'Neill M.B., McAliley L.R.** A new species of desert shrew, *Notiosorex*, based on nuclear and mitochondrial sequence data // Occasional Paper, Museum of Texas Technological University. 2003. V. 222. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.157011>
- Baker R.J., Fonseca R.M., Parish D.A., Phillips C.J., Hoffmann F.G.** New bat of the genus *Lophostoma* (Phyllostomidae: Phyllostominae) from northwestern Ecuador // Occasional Paper, Museum of Texas Technological University. 2004. V. 232. P. 1–16.
- Baker R.J., Bradley R.D.** Speciation in mammals and the genetic species concept // J. Mammalogy. 2006. V. 87. P. 643–662.  
<https://doi.org/10.1644/06-MAMM-F-038R2.1>
- Balakirev A.E., Abramov A.V., Rozhnov V.V.** Taxonomic revision of *Niviventer* (Rodentia, Muridae) from Vietnam: a morphological and molecular approach // Rus. J. Theriology. 2012. Vol. 10. P. 1–26.  
<https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.10.1.01>
- Balakirev A.E., Rozhnov V.V.** Taxonomic revision of beautiful squirrels (*Callosciurus*, Rodentia: Sciuridae) from the *Callosciurus erythraeus/finlaysonii* complex and their distribution in eastern Indochina // Raffles Bulletin of Zoology. 2019. V. 67. P. 459–489.  
<https://doi.org/10.26107/RBZ-2019-0037>
- Balakirev A.E., Abramov A.V., Rozhnov V.V.** Distribution pattern and phylogeography of tree rats *Chiromyscus* (Rodentia, Muridae) in eastern Indochina // Zoosystem. Evol. 2021. V. 97(1) P. 83–95.  
<https://doi.org/10.3897/zse.97.57490>
- Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular Biology and Evolution. 1999. V. 16. P. 37–48.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- van den Bergh G.D., de Vos J., Sondaar P.Y.** The late quaternary palaeogeography of mammal evolution in the Indonesian Archipelago // Palaeogeography Palaeoclimat and Palaeoecology. 2001. V. 171. P. 385–408.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(01\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(01)00255-3)
- Blanford W.T.** On some mammals from Tenasserim // J. Asian Soc. Bengal. 1878. V. 47. P. 150–167.
- Bonhote J.L.** On a collection of mammals made by Dr. Vassal in Annam // Proc. Zool. Soc. (London). 1907. V. 77. P. 3–11.
- Bonhote J.L.** Report on the mammals // J. Fed. Malay States Museums. 1908. V. 3. P. 1–11.
- Bradley R.D., Baker R.J.** A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals // J. Mammalogy. 2001. V. 82. P. 960–973.  
[https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082%3C0960:ATOTGS%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082%3C0960:ATOTGS%3E2.0.CO;2)
- Bradley R.D., Carroll D.S., Haynie M.L., Martinez R.M., Hamilton M.J., Kilpatrick C.W.** A new species of *Peromyscus* from western Mexico // J. Mammalogy. 2004a. V. 85. P. 184–193. <https://dx.doi.org/10.1644%2F06-MAMM-F-038R2.1>
- Bradley R.D., Mendez-Harclerode F., Hamilton M.J., Ceballos G.** A new species of *Reithrodontomys* from Guerrero, Mexico // Occasional Paper, Museum of Texas Technological University. 2004b. V. 231. P. 1–12.  
<https://www.jstor.org/stable/4094590>
- Braun J.K., van den Bussche R.A., Morton P.K., Mares M.A.** Phylogenetic and biogeographic relationships of mouse opossums *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) in southern South America // J. Mammalogy. 2005. V. 86. P. 147–159.  
[https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2005\)086<0147:PABROM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2005)086<0147:PABROM>2.0.CO;2)
- de Bruyn M., Stelbrink B., Morley R.J., Hall R., Carvalho G.R., Cannon C.H., van den Bergh G., Meijaard E., Metcalfe I., Boitani L., Maiorano L., Shoup R., von Rintelen T.** Borneo and Indochina are major evolutionary hotspots for Southeast Asian biodiversity // Systematic Biology. 2014. V. 63. P. 879–901.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syu047>
- Cao V.S.** Inventaire des rongeurs du Vietnam // Mammalia. 1984. V. 48. P. 391–395. [In French].  
<https://doi.org/10.1515/mamm.1984.48.3.391>
- Cannon C.H., Morley R.J., Bush A.B.G.** The current refugial rainforests of Sundaland are unrepresentative of their biogeographic past and highly vulnerable to disturbance // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 11188–11193.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0809865106>
- Chang S.-W., Oshida T., Endo H., Nguyen T.S., Dang N.C., Nguyen X.N., Jiang X., Li Z.-J., Lin L.-K.** Ancient hybridization and underestimated species diversity in Asian striped squirrels (genus *Tamiops*): inference from paternal, maternal and biparental markers // J. Zoology. 2011. V. 285. P. 128–138.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2011.00822.x>
- Chelomina G.N., Pavlenko M.V., Kartavtseva I.V., Boeskorov G.G., Lyapunova E.A., Vorontsov N.N.** Genetic differentiation of Caucasian wood mice: Comparison of isozymic, chromosomal and molecular divergence // Rus. J. Genetics. 1998. V. 34(2). P. 213–225.
- Conroy C.J., Cook J.A.** Molecular systematics of Holarctic rodent (*Microtus*: Muridae) // J. Mammalogy. 2000. V. 81. P. 344–359.  
[https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2000\)081%3C0344:MISOHR%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2000)081%3C0344:MISOHR%3E2.0.CO;2)
- Cox C.B., Moore P.D.** Biogeography: an ecological and evolutionary approach. 6th (edn.) Oxford: Blackwell Science Ltd. 2000.
- Corbet G.B., Hill J.E.** The mammals of the Indo-Malayan region: a systematic review. Oxford: Oxford Univ Press, 1992.
- Cranbrook E.** Northern Borneo environments of the past 40000 years: archaeozoological evidence // Sarawak Museum J. 2000. V. 55. P. 62–109.

- Dao V.T. Sur l'existence des deux formes de l'écureuil de Perny, *Dremomys pernyi pernyi* Milne-Edwards et *D. p. flavior* G. Allen au Nord-Vietnam // Zool. Abhandl Staat Museum Tierk Dresden. 1969. V. 30. P. 83–87 [in French].
- Dao V.T., Cao V.S. Six new Vietnamese rodents // Mammalia. 1990. V. 54. P. 233–238 [in French]. <https://doi.org/10.1515/mamm-1990-0207>
- Gannon W.L., Sikes R.S. American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild animals in research // J. Mammal. 2011. V. 92(1). P. 235–253. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>
- Gathorne-Hardy F.J., Syaukani, Davies R.G., Eggleton P., Jones D.T. Quaternary rainforest refugia in south-east Asia: using termites (Isoptera) as indicators // Biol. J. Linn. Soc. 2002. V. 75. P. 453–466. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00031.x>
- Ellerman J.R. The families and genera of living rodents. Vol.1. Rodents other than Muridae. London: Publ. House of British Museum (Nat Hist). 1940.
- Endo H., Kimura J., Oshida T., Stafford B.J., Rerkamnuaychoke W., Nishida T., Sasaki M., Hayashida A., Hayashi Y. Geographical variation of skull morphology and its functional significances in the red-cheeked squirrel // J. Veter. Med. Sci. 2003. V. 60. P. 1179–183. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.1179>
- Hall R. The plate tectonics of Cenozoic Southeast Asia and the distribution of land and sea // Hall R., Hollway J.D. (eds). Biogeography and geological evolution of SE Asia. Backhuys, Leiden: 1998. P. 99–131.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. // Nucleic Acids Symposium Serial. 1999. V. 41. P. 95–98. <https://doi.org/10.1021/bk-1999-0734.ch008>
- Haq B.U., Hardenbol J., Vail P.R. The chronology of fluctuating sea level since the Triassic // Science. 1987. V. 235. P. 1156–1167. <https://doi.org/10.1126/science.235.4793.1156>
- Hawkins M.T.R., Helgen K.M., Maldonado J.E., Rockwood L.L., Tsuchiya M.T.N., Leonard J.A. Phylogeny, biogeography and systematic revision of plain long-nosed squirrels (genus *Dremomys*, Nannosciurinae) // Mol. Phylogen. Evolution. 2016. V. 94. P. 752–764. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.023>
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Royal Soc. of London, Ser B. 2003. V. 270. P. 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hille A., Tarkhnishvili D., Meinig H., Hutterer R. Morphometric, biochemical and molecular traits in Caucasian wood mice (*Apodemus/Sylvaemus*), with remarks on species divergence // Acta Theriologica. 2002. V. 47. P. 389–416. <https://doi.org/10.1007/BF03192465>
- Hu Ting-Li, Cheng Feng, Xu Zhen, Chen Zhong-Zheng, Yu Lei, Ban Qian, Li Chun-Lin, Pan Tao, Zhang Bao-Wei. Molecular and morphological evidence for a new species of the genus *Typhlomys* (Rodentia: Platacanthomyidae) // Zool. Res. 2021. Vol. 42(1). P. 100–107. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.132>
- ICZN International Code of Zoological Nomenclature. 4th edn. International Trust for Zoological Nomenclature, London. 1999.
- Irwin D., Kocher T.D., Wilson A.S. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals // J. Mol. Evol. 1991. V. 32. P. 128–144. <https://doi.org/10.1007/BF02515385>
- Kershaw A.P., Penny D., Kaars van der S., Anshari G., Thammotherampillai A. Vegetation and climate in lowland Southeast Asia at the last glacial maximum // Metcalfe I., Smith J.M.B., Morwood M., Davidson I. (eds) Faunal and floral migration and evolution in SE Asia-Australasia. Lisse: Balkema Publishers. 2001. P. 227–236.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo S., Villablanca F., Wilson A. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6196–6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>
- Leonard J.A., den Tex R.-J., Hawkins M.T.R., Muñoz-Fuentes V., Thorington R., Maldonado J.E. Phylogeography of vertebrates on the Sunda Shelf: a multi-species comparison // J. Biogeography. 2015. V. 42. P. 871–879. <https://doi.org/10.1111/jbi.12465>
- Li S., Yu F., Yang S., Wang Y., Jiang X., McGuire P.M., Feng Q., Yang J. Molecular phylogeny of five species of *Dremomys* (Rodentia: Sciuridae), inferred from cytochrome *b* gene sequences // Zool. Scripta. 2008. V. 37. P. 349–354. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2008.00335>
- Li S., He K., Yu F.-H., Yang Q.-S. Molecular phylogeny and biogeography of *Petaurista* inferred from the cytochrome *b* gene, with implications for the taxonomic status of *P. caniceps*, *P. marica* and *P. sybilla* // PLoS ONE. 2013. V. 8. P. e70461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070461>
- Matocq M.D. Morphological and molecular analysis of a contact zone in the *Neotoma fuscipes* species complex // J. Mammalogy. 2002. V. 83. P. 866–883. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2002\)083%3C0866:MAMAOA%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083%3C0866:MAMAOA%3E2.0.CO;2)
- Meschersky I.G., Abramov A.V., Lebedev V.S., Chichkina A.N., Rozhnov V.V. Evidence of a complex phylogeographic structure in the Indomalayan pencil-tailed tree mouse *Chiropodomys gliroides* (Rodentia: Muridae) in eastern Indochina // Bioch. System. Ecology. 2016. V. 65. P. 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.015>
- Meijaard E. Mammals of south-east Asian islands and their Late Pleistocene environments // J. Biogeography. 2003. V. 30. P. 1245–1257. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00890.x>
- Meijaard E., Groves C.P. The geography of mammals and rivers in mainland Southeast Asia // Lehman S.M.,

- Fleagle J.G. (eds) Primate biogeography. N.Y.: Springer. 2006. P. 305–329.
- Mercer J.M., Roth V.L. The effects of Cenozoic global change on squirrel phylogeny // *Science*. 2003. V. 299. P. 1568–1572.  
<https://doi.org/10.1126/science.1079705>
- Moore J.C., Tate G.H.H. A study of the diurnal squirrels, Sciurinae, of the Indian and Indochinese subregions. *Fieldiana: Zoology*. V. 48. 1965. 351 p.
- Osgood W.H. Mammals of the Kelley-Roosevelts and Delacour Asiatic expeditions // *Fields Mus. Nat. History. Zool. Ser.* 1932. V. 18. P. 193–339.
- Oshida T., Lin L.K., Masuda R., Yoshida M.C. Phylogenetic relationships among Asian species of *Petaurista* (Rodentia, Sciuridae), inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences // *Zool. Science*. 2000. V. 17. P. 123–128.  
<https://doi.org/10.2108/zsj.17.123>
- Oshida T., Lee J.K., Lin L.K., Chen Y.J. Phylogeography of the Pallas's squirrel in Taiwan: geographical isolation in an arboreal small mammal // *J. Mammalogy*. 2006. V. 87. P. 247–254.  
<https://doi.org/10.1644/05-MAMM-A.-123R1.1>
- Page R.D.M. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers // *Bioinformatics*. 1996. V. 12. P. 357–358.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357>
- Piaggio A.J., Valdez E.W., Bogan M.A., Spicer G.S. Systematics of *Myotis occultus* (Chiroptera: Vespertilionidae) inferred from sequences of two mitochondrial genes // *J. Mammalogy*. 2002. V. 83. P. 386–395.  
[https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2002\)083%3C0386:SOMOCV%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083%3C0386:SOMOCV%3E2.0.CO;2)
- Pocock R.I. The classification of Sciuridae // *Proc. Zool. Soc. of London*. 1923. V. 1. P. 209–246.
- Polzin T., Daneschmand S.V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs // *Oper. Res. Letters*. 2003. V. 31. P. 12–20.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-6377\(02\)00185-2](https://doi.org/10.1016/S0167-6377(02)00185-2)
- Qiu Zhu-Ding. Sciurids from the later Miocene Lufeng Hominoid Locality, Yunnan // *Vertebrata Palasiatica*. 2002. Vol. 40. P. 177–193. [in Chinese]
- Raes N., Cannon C.H., Hijmans R.J., Piessens T., Saw L.G., van Welzen P.C., Slik J.W.F. Historical distribution of Sundaland's dipterocarp rainforests Quaternary glacial maxima // *Pros. Nat. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 16790–16795.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1403053111>
- Roca A.L., Georgiadis N., Pecon-Slatery J., O'Brien S.J. Genetic evidence for two species of elephant in Africa // *Science*. 2001. Vol. 293. P. 1473–1477.  
<https://doi.org/10.1126/science.1059936>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratories. 1989.
- Sokolov V.E., Baskevich M.I. A new species of birch mouse *Sicista armenica* sp. n. (Rodentia, Dipodidae) from the Lesser Caucasus // *Zool. Zh.* 1988. V. 67. P. 300–304 [in Russian].
- Sokolov V.E., Baskevich M.I., Kovalskaya Y.M. Revision of birch mice of the Caucasus: sibling species *Sicista caucasica* (Vinogradov, 1925) and *S. kluchorica* sp. n. (Rodentia, Dipodidae) // *Zool. Zh.* 1981. V. 60. P. 1386–1393 [in Russian].
- Sokolov V.E., Baskevich M.I., Kovalskaya Y.M. *Sicista kazbegica* sp. n. (Rodentia, Dipodidae) from the upper reaches of the Terek River basin // *Zool. Zh.* 1986. V. 65. P. 949–951 [in Russian].
- Solari S., Baker R.J. Mitochondrial DNA sequence, karyotypic, and morphological variation in the *Carollia castanea* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae) with description of a new species // *Occas. Paper, Museum of Texas Technol. Univ.* 2006. V. 254. P. 1–16.  
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.156889>
- Spotorno A.E., Valladares J.P., Marin J.C., Palma R.E., C. Zuleta A.R. Molecular divergence and phylogenetic relationships of chinchillids (Rodentia: Chinchillidae) // *J. Mammal.* 2004. V. 85. P. 384–388.  
<https://doi.org/10.1644/BRB-119>
- Stanhope M.J., Czelusniak J., Si J.-S., Nickerson J., Goodman M. A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly // *Mol. Phylogen. Evol.* 1992. V. 1. P. 148–160.  
[https://doi.org/10.1016/1055-7903\(92\)90026-D](https://doi.org/10.1016/1055-7903(92)90026-D)
- Steppan S.J., Storz B.J., Hoffmann R.S. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia, Rodentia) and the evolution of arboreality from *c-myc* and *RAG1* // *Mol. Phylogen. Evol.* 2004. V. 30. P. 703–719.  
[https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00204-5)
- Suzuki H., Tsuchiya K., Takezaki N. A molecular phylogenetic framework for the Ryukyu endemic rodents *Tokudaia osimensis* and *Diplothrix legata* // *Mol. Phylog. Evol.* 2000. V. 15. P. 15–24.  
<https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0732>
- Tajima F. Simple methods for testing molecular clock hypothesis // *Genetics*. 1993. V. 135. P. 599–607.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Pros. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 11030–11035.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis, version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725–2729.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thomas O. Scientific results of the mammal survey. No.7. // *J. Bombay Nat. History Soc.* 1914. V. 23. P. 23–31.
- Thomas O. A new monkey and a new squirrel from the Middle Mekong, on the eastern frontier of Siam // *Ann. Magazine Nat. History*. 1921. V. 7. P. 181–183.
- Thomas O., Wroughton R.C. Scientific results from the mammal survey. No. XII. On the squirrels obtained by

- Messrs. Shortridge and Macmillan on the Chindwin River, Upper Burma // *J. Bombay Nat. History Soc.* 1916. V 24. P. 224–239.
- Thorington R.W., Hoffmann R.S. Family Sciuridae // Wilson D.E., Reeder D.M. (eds). *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*, 3rd edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2005. P. 754–818.
- Thorington R.W., Koprowski J.L., Steele M.A., Whatton J.F. *Squirrels of the world*. Baltimore: Johns Hopkins Univ Press. 2012. 459 p.
- Woodruff D.S. Biogeography and conservation in Southeast Asia: how 2.7 million years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity // *Biodiver. Conserv.* 2010. V. 19. P. 919–941. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9783-3>
- Wurster C.M., Bird M.I., Bull I.D., Creed F., Bryant C., Dunggait J.A., Paz V. Forest contraction in north equatorial southeast Asia during the last glacial period // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. P. 15508–15511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005507107>
- Zheng H., Powell C.M., An Z., Zhou J., Dong G. Pliocene uplift of the northern Tibetan Plateau // *Geology.* 2000. V. 28. P. 715–718. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2000\)28<715:PUOTNT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2000)28<715:PUOTNT>2.0.CO;2)

## Natural Diversity and Phylogeny of Asian Red-Cheeked Squirrels (Rodentia, Sciuridae, *Dremomys*) in Eastern Indochina

A. E. Balakirev<sup>1, 2, #</sup>, A. V. Abramov<sup>2, 3</sup>, Bui Xuan Phuong<sup>2</sup>, and V. V. Rozhnov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow 119071 Russia*

<sup>2</sup>*Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Test Center, 63 Nguyen Van Huyen, Nghia Do, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab. 1, Saint Petersburg 199034 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: alexbalakirev@mail.ru*

Based on new molecular data for mitochondrial (*Cyt b*) and nuclear (*IRBP*, *RAG1*) genes, as well as an extensive analysis of morphological material, we accessed actual species taxonomy and relationships among Asian red-cheeked squirrels *Dremomys* distributed in eastern Indochina and southern China. Phylogenetic analyses demonstrated that Asian red-cheeked squirrels, which are currently attributed to *D. rufigenis*, are not homogenic but instead consisted of two independent species-level clades – northern and south-central. The latter clade was additionally subdivided into two highly divergent clades based on *Cyt b* gene phylogeny. In spite of multidimensional statistics approach applied (PCA) only minor cranial differences were found between populations of study what lay a basis to treat it as cryptic species. Based on our findings, red-cheeked squirrels inhabit northern Vietnam and southern China, which are usually attributed to *D. rufigenis*, should be treated as distinct genetic species *D. ornatus* (Thomas, 1914). In ones turn, based on its peculiar external morphology we can attribute the specimens from southern and central Vietnam to *D. rufigenis* proper and treat them as *D. rufigenis fuscus* (Bonhote, 1907) and *D. r. laomache* (Bonhote, 1921) respectively.

**Keywords:** red-cheeked squirrels, *Dremomys*, South-East Asia, molecular phylogeny, morphology, taxonomy, cryptic species

УДК 57.081

## МЕТАГЕНОМИКА – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В ЭКОЛОГИИ

© 2022 г. М. В. Вечерский<sup>\*, @</sup>, М. В. Семенов<sup>\*\*</sup>, А. А. Лисенкова<sup>\*\*\*, \*\*\*\*</sup>, А. А. Степаньков<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт проблем экологии и эволюции им А. Н. Северцова РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

<sup>\*\*</sup>Почвенный институт им. В. В. Докучаева, Пыжевский пер., 7, Москва, 119017 Россия

<sup>\*\*\*</sup>Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 117971 Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

<sup>@</sup>E-mail: [vecherskomy@mail.ru](mailto:vecherskomy@mail.ru)

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 24.07.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

В работе обсуждаются перспективы применения метагеномных технологий в экологических исследованиях. Описаны успехи в изучении таксономического состава сообществ водных и сухопутных биотопов. Приводятся примеры выявления трофических и форических связей в экосистемах. Подробно показаны возможности метагеномики в исследовании сообществ, образованных прокариотами, и таких трудных для изучения субстратов, как почва и кишечник животных. Описана роль реликтовой ДНК в метагеноме и возможности изучения сообществ древних организмов. Особое внимание уделено критике метагеномных технологий, связанной с низкой воспроизводимостью результатов. Приводятся типичные методические ошибки в сфере биоинформатики, которые приводят к грубому искажению получаемых данных.

*Ключевые слова:* метагеномика, секвенирование нового поколения, биоинформатика, реликтовая ДНК

**DOI:** 10.31857/S1026347022010152

Развитие технологии секвенирования ДНК позволило перейти от изучения генома конкретного организма к изучению метагенома – всей совокупности геномов сообщества. Метагеном представляет собой набор геномов всех организмов, находящихся в образце среды, а также внеклеточную ДНК. В качестве объекта исследования могут выступать метагеномы почвы, водоемов, физиологического материала (содержимого кишечника, гноя, зубных бляшек), промышленных ферментов (Borbón-García *et al.*, 2017; Chai *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2019). Существует два подхода к определению метагеномики. В строгом значении под метагеномикой подразумевается анализ совокупности геномов сообщества организмов (Riesenfeld *et al.*, 2004). При более широкой трактовке термина объектом изучения метагеномики становятся не только геномы, но и отдельные гены в составе геномов. При анализе отдельных генов наибольшее значение приобретают филогенетически значимые участки, используемые для таксономической идентификации членов сообщества (Ranjan *et al.*, 2016). Например, для получения таксономического состава прокариот исследуют совокупность генов 16S рРНК, грибов – последовательности ITS, животных – 18S рРНК или фрагмент митохондриального гена *COI*. Этот

метод называется метабаркодингом (по аналогии с баркодингом для отдельных видов). Реже изучают разнообразие функциональных генов, например: целлюлаз, нитрогеназ, цитохромов, факторов антибиотикорезистентности (Ngara, Zhang, 2018). Данные, полученные в результате метагеномного анализа, носят преимущественно качественный характер, однако при правильно поставленном эксперименте дают возможность делать и осторожные количественные выводы. Метагеномные исследования позволяют получать информацию о таксономическом составе, трофической структуре и даже форических отношениях в сообществе. Во всех случаях исследователю не требуется наблюдать и идентифицировать отдельных представителей сообщества. Более того, в образце даже не обязательно должны быть представлены живые организмы. Достаточно наличия их фрагментов или внеклеточной ДНК.

Методически метагеномные технологии делятся на две большие группы – ампликонные и “shot-gun” (Ma *et al.*, 2014). В первом случае метагеном образца является лишь матрицей для амплификации одного из генов путем полимеразной цепной реакции (ПЦР). Само секвенирование осуществляется на полученных продуктах ПЦР, а не на исходной метагеномной ДНК-матрице. Для ампли-

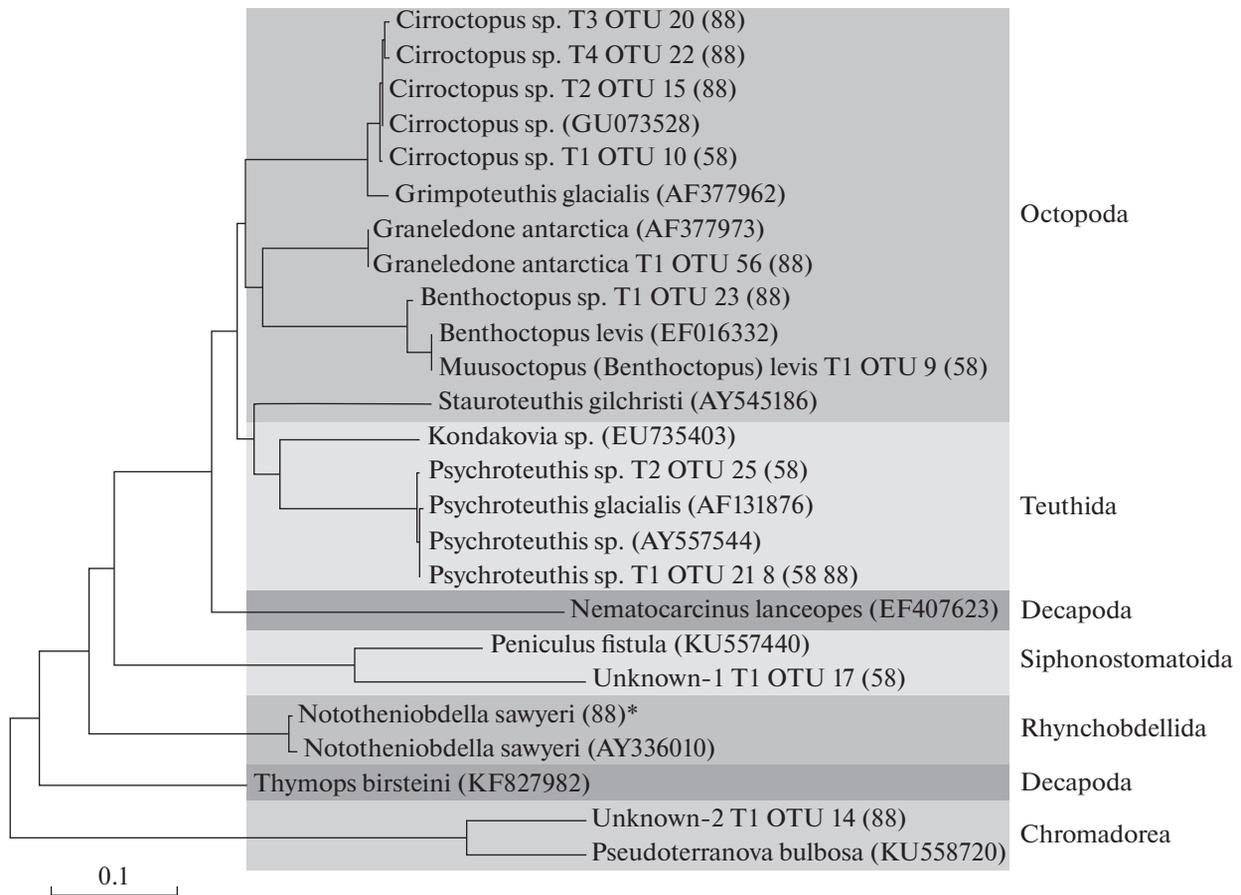


Рис. 1. Метагеномный анализ содержимого желудка антарктического клыкача, *Dissostichus mawsoni* (по Yoon *et al.*, 2017).

фикации требуется использование праймеров, фланкирующих целевой участок нуклеотидной последовательности. Несовершенство существующих праймеров приводит к неполному анализу сообщества, а ПЦР формирует большое количество артефактов. Однако этот метод относительно недорогой и сравнительно быстрый. Напротив, при “shot-gun” секвенировании анализируется весь метагеном. В этом случае не происходит ошибок, связанных с выбором праймеров и несовершенством ПЦР. Однако это метод более трудоемок и дорог. Кроме того, если объект характеризуется очень высоким генетическим разнообразием (например, ДНК почвы), то “shot-gun” секвенирование сталкивается с проблемой полноты прочтения метагенома.

**Метагеномный анализ при изучении экологии сообществ.** Одной из важных задач экологии сообществ является изучение трофических взаимодействий между видами. При невозможности прямого наблюдения за процессом питания приходится опираться на содержимое пищеварительной системы. Однако сохранность останков не всегда позволяет определить жертву по морфоло-

гическим признакам. При этом генетические маркеры в содержимом пищеварительного тракта сохраняются достаточно хорошо (Rompranon *et al.*, 2012). Например, было показано (Yoon *et al.*, 2017), что в рацион крупнейшей южнополярной рыбы – антарктического клыкача (*Dissostichus mawsoni*) – входят минимум 16 видов жертв из класса головоногих. Кроме того, у него в желудке присутствуют 4 вида многоклеточных паразитов, относящихся к разным типам (рис. 1).

Анализ экзогенной ДНК позволяет проводить количественную оценку состава сообществ в водной среде. Из животного организма может выделяться экзогенная ДНК в составе слущивающихся покровов, эпителиальных слизей и кала. Экзогенная ДНК деградирует во внешней среде, но при достаточной численности организма ее количество может поддерживаться на технически определяемом уровне. В метагеноме образцов морской воды удалось установить количество копий митохондриальной ДНК китовой акулы и сопоставить его с численностью китовой акулы (Sigsgaard *et al.*, 2016). В тех же образцах определяли количество копий митохондриальной ДНК малого восточно-

го тунца, икрой которого питается китовая акула. Оказалось, что “копийность” мтДНК (число копий в образце) хорошо отражает реальное соотношение численностей соответствующих рыб (рис. 2).

Метагеномные методики применяются в отношении не только животных, но и растений. Стало возможным изучение состава опыляемых растений по метагеному пыльцы на покровах насекомого-опылителя. Так, было показано (Lucas *et al.*, 2018), что муха-журчалка опыляет цветки семнадцати видов растений (рис. 3). Были установлены ее пищевые предпочтения для разных биотопов в разные сезоны года.

Метагеномные исследования также позволяют более точно установить состав симбиотических ассоциаций, в том числе хорошо изученных лишайников. Оказалось, что значительная часть биомассы аскомицетовых лишайников представлена, помимо мицелиального и бактериального компонентов, дрожжевым компонентом (Spribille *et al.*, 2016). Пока не ясно, какую функцию выполняют эти базидиомицетовые дрожжи в составе лишайника, но очевидно, что их клетки составляют значительную долю этого организма.

Таким образом, анализ рибосомальных генов позволяет получать информацию о таксономическом составе и разнообразии изучаемого сообщества. Однако эти гены составляют менее десятой доли процента от размера метагенома. Оставшаяся часть также может быть высокоинформативной. Наиболее интересны в этом отношении работы по изучению функциональных генов, вовлеченных в различные биохимические пути. Примером такой работы может служить изучение биохимических путей синтеза бутирата кишечным микробиомом. Известно, что бутират является ключевым питательным веществом для клеток толстого кишечника (Vital *et al.*, 2017). Дефицит бутирата приводит к деградации толстого кишечника, нарушению водно-электролитного баланса и повышению риска развития рака. Поэтому активно проводится изучение изменений в микробиоме, вызывающих дефицит бутирата. Однако только по таксономическому составу микробиома практически невозможно предсказать фактический выход бутирата. Более информативна в этом отношении количественная оценка встречаемости функциональных генов, вовлеченных в этот биосинтез. Анализ результатов полногеномного секвенирования позволил установить ключевые пути метаболизма бутирата у кишечных бактерий, а также связать отдельные метаболические пути с конкретными таксонами микроорганизмов (Vital *et al.*, 2017).

Одно из ключевых общебиологических открытий последних лет было сделано именно с помощью полногеномного “shot-gun” секвенирования метагенома прокариотных сообществ глубоководных гидротермальных источников (Zaremba-

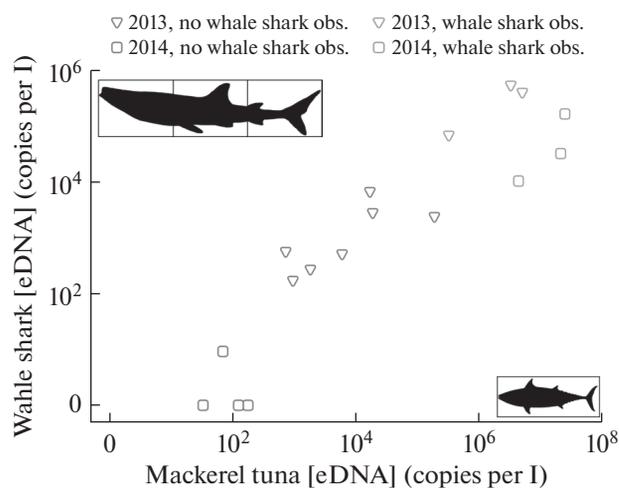


Рис. 2. Количество экзогенной ДНК китовой акулы и малого восточного тунца в пробах морской воды (по Sigsgaard *et al.*, 2016).

Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Метагеномный анализ выявил наличие генов, специфичных для эукариот и не встречающихся у прокариот. В частности, были обнаружены специфические варианты белков цитоскелета. Тем не менее, оказалось, что эти гены принадлежат не эукариотам, а эндемичным археям, образующим отдельный филум — надтип Asgard, асгардархеи. Последующий биоинформационный анализ показал, что Asgard археи демонстрируют признаки как прокариот, так и эукариот. Весьма вероятно, что именно представители Asgard осуществили успешный эндосимбиоз с *Proteobacteria* (будущими митохондриями) и сформировали первый эукариотический организм порядка двух миллиардов лет назад. Из ныне живущих Asgard архей ближе всего к эукариотам находится таксон Heimdallarchaeota (рис. 4). Столь позднее открытие этих уникальных организмов связано с невозможностью культивирования Asgard архей и труднодоступностью их местообитаний. Это блестящее подтверждение теории симбиогенеза смогло произойти только благодаря метагеномике. Однако нельзя утверждать, что теперь подобные работы будут выходить регулярно. Изучение Asgard архей обошлось в астрономическую сумму, значительно превосходящую годовой бюджет рядового российского НИИ. Кроме того, как и любое метагеномное исследование, данная работа оперирует не целыми организмами, а только характеризует набор генов в среде. Поэтому неизбежно возникает критика, связанная с принадлежностью анализируемых генов к конкретным видам. Есть вероятность существования тесных ассоциаций видов, разделяющих некую общую совокупность генов. Нельзя недооценивать и вклад внеклеточной ДНК, в том числе эукариотической, а также деградированной.

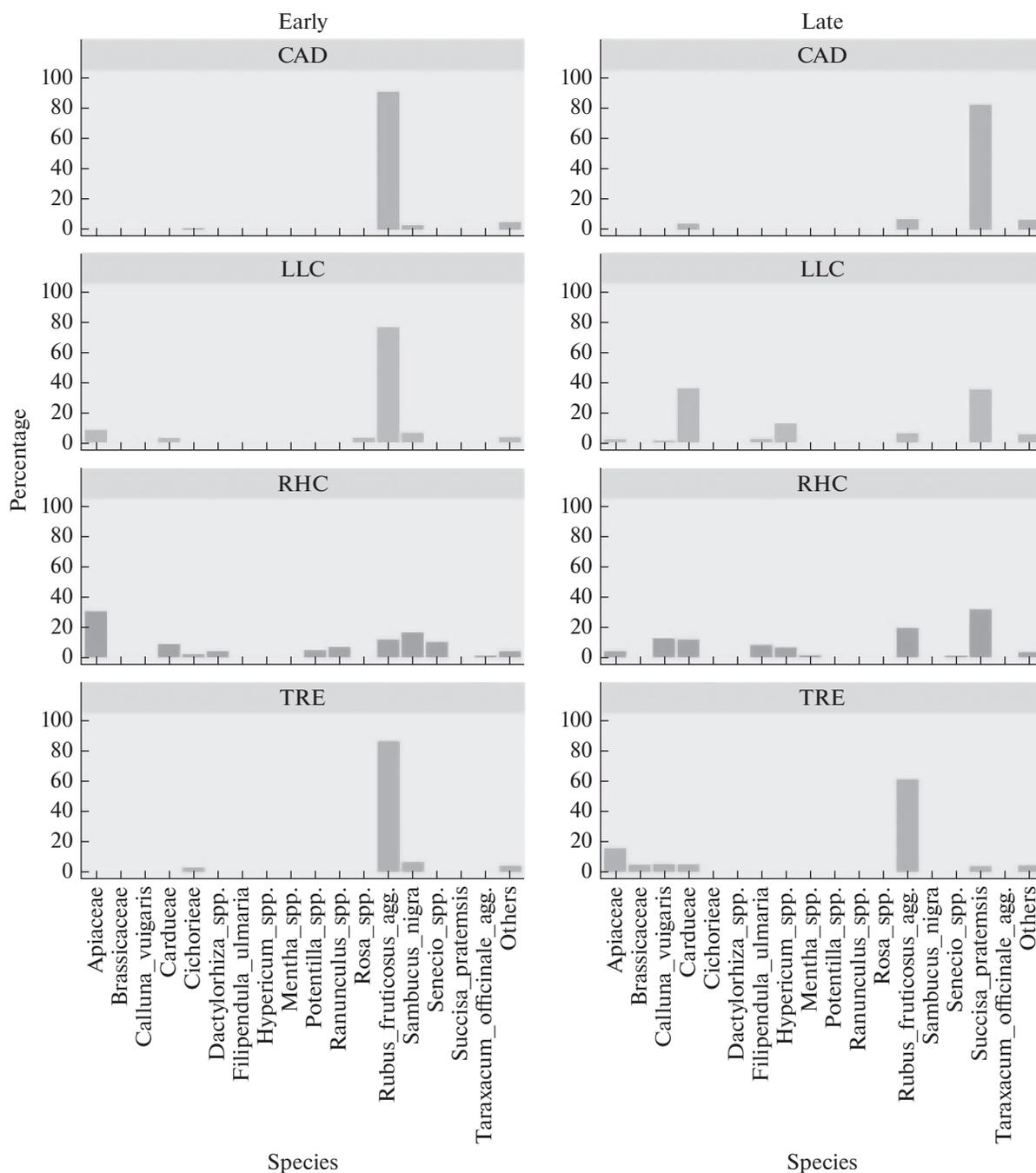


Рис. 3. Таксономический состав пыльцы на покровах мухи-журчалки в начале и конце лета в разных биотопах на западе Гренландии (по Lucas *et al.*, 2018).

**Метагеномный анализ почв.** Одним из сложнейших объектов для экологических исследований является почва (Lombard *et al.*, 2011). С точки зрения метагеномики можно выделить три большие группы особенностей почвы как объекта изучения и возникающих при этом методических проблем: 1) неоднородность почвенного покрова, неравномерное размещение микроорганизмов в почвенных агрегатах и возникающая в связи с

этим проблема отбора почвенных образцов; 2) адсорбция клеток на почвенных частицах, ингибирование амплификации присутствующими в почве гуминовыми веществами и проблема экстракции и очистки ДНК; 3) очень высокое разнообразие сообществ, их разный физиологический статус и наличие внеклеточной ДНК.

Большая часть почвенного метагенома представлена прокариотической ДНК. Поэтому поч-

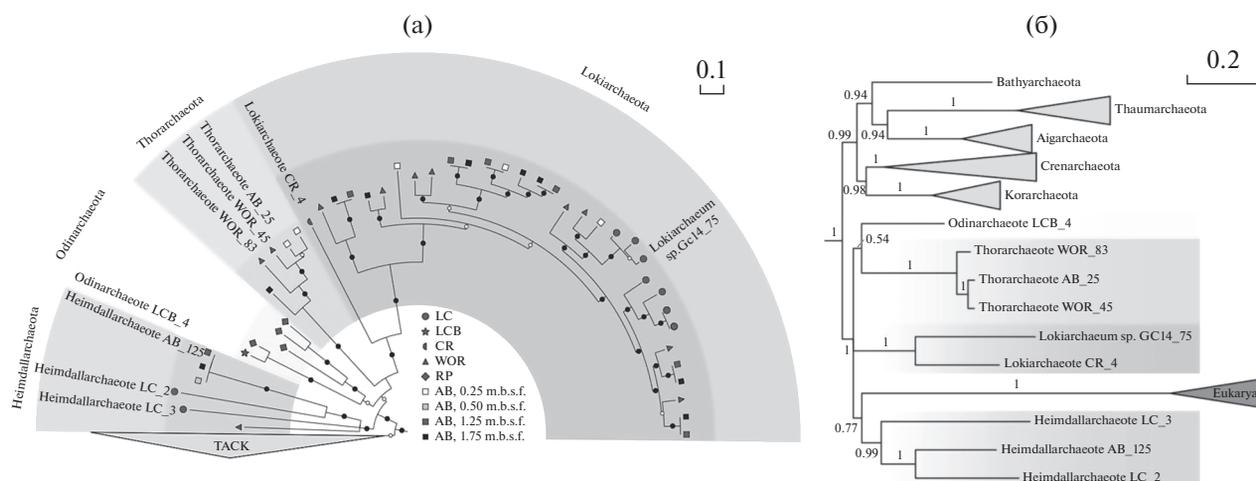


Рис. 4. Филогенетическое дерево современных прокариот Asgard архей с указанием предположительного места отделения ветви эукариот (по Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017).

венная метагеномика чаще всего направлена на изучение таксономической и функционально-генетической структуры почвенных микробных сообществ. Результатом высокопроизводительного секвенирования почвенной ДНК является список таксонов с их относительной представленностью в составе сообщества, с помощью которого можно получить множество показателей биологического состояния почв: 1) таксономическая структура сообщества; 2) количественное соотношение отдельных таксонов и альфа-разнообразие; 3) степень различий между сообществами разных почв (бета-разнообразие); 4) состав и доля индикаторных таксонов в составе сообщества; 5) сложность и характер межвидовых сетей (networks); 6) состав сообществ, связанных с определенным процессом (анализ функциональных генов). Также по результатам анализа функциональных генов можно выявлять корреляции отдельных таксонов или сообществ в целом с отдельными почвенно-экологическими условиями.

Метагеномике принадлежит значительная роль в изучении экологии и распространения малоисследованных таксонов микроорганизмов в почвах. Наиболее яркими примерами могут служить филумы Thaumarchaeota и Verrucomicrobia, представители которых очень трудно культивируются в лаборатории. До сих пор всего три вида Thaumarchaeota выделены в чистую культуру. С помощью РТ-ПЦР и метабаркодинга было показано, что Thaumarchaeota являются самыми распространенными археями в почве и вообще на Земле, и, по всей видимости, являются основными окислителями почвенного аммония (нитрификаторами) (Pester *et al.*, 2011). По сравнению с нитрифицирующими бактериями Thaumarchaeota хорошо адаптированы к низким концентрациям аммония, что дает им преимущество в олиготрофных условиях сре-

ды, характерных для почв (Valentine, 2007). Доля Thaumarchaeota составляет, в среднем, 5–15% от всего прокариотного сообщества.

Подобно археям Thaumarchaeota, подавляющее число видов веррукомикробий в настоящее время также не удалось выделить в чистую культуру. Тем не менее, с помощью метабаркодинга было показано, что наряду с бактериями Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria, данный филум является одним из основных доминантов в составе прокариотных сообществ, доля которого варьирует в диапазоне от 5 до 15%, а в черноземах — до 25% и выше (Semenov *et al.*, 2018). Вопрос о факторах, ответственных за распределение Verrucomicrobia в почвах до сих пор остается открытым. Долгое время считалось, что Verrucomicrobia — олиготрофы, способные расти в условиях низкой доступности углерода (Rocha *et al.*, 2010; Senechkin *et al.*, 2010; Eilers *et al.*, 2012). Тем не менее, с помощью метабаркодинга было показано, что основная численность Verrucomicrobia приурочена к верхним горизонтам почв, более обеспеченным органическим веществом (Semenov *et al.*, 2018). Метагеномный анализ выявил связь между пространственным распределением Verrucomicrobia и потоком углерода (Fierer *et al.*, 2012), что ставит под сомнение гипотезу относительно их олиготрофности. Кроме того, численность Verrucomicrobia падает при распашке, а также остро реагирует на снижение содержания органического вещества почвы (Navarrete *et al.*, 2015; Semenov *et al.*, 2018).

Помимо таксономического разнообразия, с помощью метагеномного анализа можно получать информацию о функциональных возможностях микробиома почвы. Для этого формируется иерархическая структура, в которой идентифицируемые гены обитающих в почве организмов собираются в функциональные subsystemы по принципу един-

ства выполняемой функции. В состав такого метагенома входят функциональные subsystemы генов, ответственные за метаболизм белков, жиров и углеводов, вирулентность, дыхание, отклик на стресс и т.д. На более низком иерархическом уровне возможен анализ доли генов, ответственных за процессы цикла углерода и азота (например, нитрификацию), синтез или разложение определенных соединений.

Сравнение функциональных профилей метагеномов почв арктических и песчаных пустынь показало, что по соотношению subsystem генов разница между почвами столь контрастных экосистем незначительна. Сообщества песчаных пустынь характеризуются более высокой долей генов, связанных с осморегуляцией и переходом в покоящееся состояние, а также метаболизмом углеводов и ароматических соединений. В метагеноме арктических пустынь, по сравнению с песчаными, выявлено большее количество генов, ассоциированных с круговоротом питательных веществ и катаболизмом соединений, которые связаны с растениями (Fierer *et al.*, 2012). Вместе с тем, метагеномный анализ успешно выявляет различия, возникающие в почвах разных типов землепользования. По сравнению с естественными экосистемами, чернозем под пашней демонстрирует более низкое разнообразие архей и грибов, а также функциональных показателей (Gorbacheva *et al.*, 2018). В ряду “тропический лес – экосистема после вырубki леса – пашня и пастбище” показано, что сельскохозяйственные и пастбищные почвы характеризуются более низкой численностью микроорганизмов, при этом обладая самым высоким таксономическим и функциональным разнообразием, что является важным атрибутом для поддержания функционирования экосистемы после вырубki леса (Mendes *et al.*, 2015). С другой стороны, экосистемное равновесие в нативной лесной экосистеме поддерживается на основе более низкого разнообразия, но более высокой численности микроорганизмов. Еще в одном исследовании показано, что обработка почвы и севооборот существенно сказываются на subsystemах функциональных генов в составе полного метагенома (Souza *et al.*, 2015). В почве при вспашке с оборачиванием пласта оказалось больше микроорганизмов, связанных с разложением растительных остатков и циклами углерода и азота, а также эукариот. При минимальной обработке почвы более высокой численностью характеризуются азотфиксирующие ризобии и археи. Стоит отметить, что в данной работе не удалось аннотировать почти половину метагеномных последовательностей, а на бактерии приходилось основная часть всех прочтений. Суммарный вклад архей и эукариот в аннотированную часть изученного метагенома составил лишь 0.5% (Souza *et al.*, 2015).

Также микробные сообщества почв сильно реагируют на другие агрогенные воздействия, например, внесение удобрений. Использование азотных удобрений увеличивает численность копипотрофов – Proteobacteria и Firmicutes, и уменьшает долю олиготрофов Acidobacteria, Nitrospirae и Chloroflexi. Особенно сильно негативное влияние сказывается на порядке Rhizobiales, включающих в себя множество ассоциативных азотфиксаторов. Внесение фосфорных удобрений повышает численность Armatimonadetes и Chlorobi (Ling *et al.*, 2017).

**Метагеномный анализ древней ДНК.** Метагеномика может изучать генетический материал не только живых организмов, но и давно умерших. Древнюю ДНК экстрагируют из образцов, возраст которых исчисляется столетиями и тысячелетиями. С биохимической точки зрения древняя ДНК характеризуется крайне малыми размерами фрагментов, длина которых в большинстве случаев не превышает 100–150 пар оснований, хотя, конечно, известны случаи лучшей сохранности данного типа ДНК. Помимо этого, древняя ДНК имеет большое количество специфических постмортальных мутаций. Древняя ДНК сохраняется во многих органах и тканях, способных противостоять времени и воздействию внешней среды. Самыми популярными объектами исследования являются кости, зубы и волосы, так как они лучше всего сохраняются при большом диапазоне условий. Защитой для зубов от грубых механических воздействий с течением времени служит эмаль сверху и кости челюсти снизу. Различные типы ДНК (ядерная, митохондриальная, в случае растений – хлоропластная) имеют также различные свойства и сохраняются в разной степени в тех или иных частях органов и тканей. В случае зубов ядерная ДНК сохраняется наилучшим образом в клетках цементного слоя, инкапсулированная в его минеральной матрице, тогда как в пульпе и дентине источником ядерной ДНК являются мягкие ткани, наиболее подверженные разложению в начале постмортального периода. Многокопийная мтДНК, напротив, наилучшим образом сохраняется в дентине, в особенности в области корней зуба (Higgins *et al.*, 2015). Волосы, благодаря гидрофобной структуре кератина, обладают значительной устойчивостью как к контаминации экзогенной ДНК, так и к воздействию воды (Gilbert *et al.*, 2006). Правда, из-за особенностей развития волос, основным сохраняющимся типом ДНК является мтДНК, которая в большом количестве (имеется в виду копияность) может быть найдена в стержне волоса на всем его протяжении. Ядерная же ДНК сохраняется хорошо только в корне живого волоса и в ближайших к нему нескольких сантиметрах стержня, однако уже в выпавших волосах зачастую ядерная ДНК вообще не детектируется (Andréasson *et al.*, 2006).

Мягкие ткани также могут сохраняться, если для этого имеются благоприятные условия — к примеру, вечная мерзлота. Благодаря низким температурам, приводящим как к лучшей сохранности клеточных компонентов и ДНК, так и к низкой активности микроорганизмов и клеточным ферментам, именно биологический материал из вечной мерзлоты характеризуется самой высокой устойчивостью по сравнению с другими видами палеодНК. Помимо этого, вечная мерзлота открыла науке путь и к другим объектам: грибам (Bellemain *et al.*, 2013), бактериям (Willerslev *et al.*, 2004) и древним человеческим популяциям (Green *et al.*, 2006; Noonan *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2015). Древняя ДНК находит свое применение и в областях биологии, связанных с медициной. Чтобы проследить эволюцию и распространение чумной палочки, были отсеквенированы геномы штаммов чумной палочки *Yersinia pestis* возрастом от 2800 до 4000 лет и построены филогенетические деревья. В ходе исследования выяснилось, что ~3000 лет назад в геноме *Y. pestis* появился ген *Yersinia murin toxin (ymt)*, который кодирует фосфолипазу Д, защищающую чумную палочку в кишечнике артропод (в данном случае блох), и таким образом авторы смогли довольно точно предсказать время, когда блохи стали вектором распространения чумы. Другие авторы исследовали образцы плейстоценовых и голоценовых отложений из вечной мерзлоты Сибири, а также образцы пещерных и береговых отложений Новой Зеландии (Willerslev *et al.*, 2003). ДНК экстрагировали из образцов весом ~2 г и затем проводили амплификацию с использованием праймеров на гены хлоропластов растений и мтДНК животных, в результате чего удалось выделить ДНК растений возрастом 300000–400000 лет и позвоночных животных 20000–30000 лет. Благодаря этому удалось оценить видовое разнообразие в каждой местности, а также проследить его динамику для растений на протяжении обширных временных периодов.

**Проблема воспроизводимости и интерпретации метагеномных данных.** Эффективность и высокая производительность метагеномного анализа обусловила резкий рост числа работ в этой области. Однако неаккуратность в проработке метагеномных методик приводит к невоспроизводимости результатов, от которой не застрахованы работы самого высокого уровня. Наибольшее количество противоречий в полученных результатах приходится на долю исследований микробиома кишечника человека (Poussin *et al.*, 2018). Причем в подавляющем числе случаев под микробиомом кишечника человека авторы понимают микробиом кала человека. Интерес к этому объекту объясняется публикацией серии сообщений об исключительном влиянии микробиома кишечника на физиологию организма в целом. В разное время указывалось, что микробиота человека влияет на развитие сахарного

диабета и ожирения, онкологических и аутоиммунных заболеваний, психологию человека посредством синтеза нейромедиаторов и, конечно, “иммунитет” (Yan, Charles, 2017; Malan-Muller *et al.*, 2018; Dicks *et al.*, 2018). Логика исследователей основывалась на корреляции между параметрами метагенома и частотой развития патологии. Хотя очевидно, что никакая корреляция не гарантирует прямой взаимосвязи. Например, есть хорошая корреляция между возрастом респондента и его микробиотой. Но до сих пор не появилась статья, где бы старение человека объяснялось активностью его бактерий. Кроме того, наблюдаемые различия вполне могут объясняться высокой микробиологической гетерогенностью образцов кала. Эта гетерогенность, а также многочисленные методические допущения приводят к невоспроизводимости метагеномных результатов. Так, в журнале “Cell” был поставлен вопрос о наследуемости микробиома человека, как органа, предположительно имеющего широчайшие функции (Goodrich *et al.*, 2014). После проведения близнецового эксперимента с помощью метагеномных технологий оказалось, что состав микробиома наследуется генетически. Однако совсем скоро в журнале “Nature” были опубликованы прямо противоположные данные (Rothschild *et al.*, 2018). Подобное расхождение в результатах, опубликованных в журналах с импакт-фактором свыше 30, может объясняться как раз невозможностью буквального трактования метагеномных данных. Причины низкой воспроизводимости метагеномных данных кроются на всех этапах постановки эксперимента (Ноорен *et al.*, 2017).

**Этап выбора биологического образца.** Образцы для метагеномных исследований характеризуются высокой гетерогенностью. Если речь идет о микробиоме, то его состав в образце зависит от микроструктуры объекта, наличия анаэробных зон, присутствия микроскопических слепых полостей, дистанции до активных зон, например: корневых волосков, стенки кишечника, копролитов дождевых червей. Очень сложно выполнить рандомизацию, учитывающую все эти факторы. Иногда рандомизацию выполнять просто нецелесообразно, поскольку различия микробиома в двух ближайших микролокусах (например: поверхность стенки кишечника и просвет кишечника) так велики, что их в принципе не следует рассматривать вместе. Также нельзя забывать о скорости изменений микробиома. Например, разница в отборе проб в один час может радикально изменить характер микробиома. Представление о микробиоме, как о неизменной и постоянной во времени системе совершенно не соответствует действительности. Ненамного проще ситуация с метагеномом сообществ животных. Разные части тела животного содержат разное количество ДНК. Кроме того, ДНК в разных частях животного де-

градирует с разной скоростью. Оптимальная ее сохранность достигается в пульпе зуба, наилучшая – в слущенном эпителии. Поэтому различия в представленности генов двух животных в среде, могут быть связаны как с различной численностью животных, так и с различиями в механизмах попадания и депонирования их ДНК в среде. К сожалению, многие исследователи, находящиеся под впечатлением от технической новизны метода, слишком формально выполняют методические протоколы, которые подкупают своей простотой. Но протоколы разрабатывают специалисты, знакомые со спецификой каждого конкретного типа образцов. А ошибка в выборе биологического образца для метагеномного анализа заранее вызывает искажение результатов, которое нельзя скомпенсировать на более поздних этапах эксперимента.

**Этап выделения суммарной ДНК.** Данный этап работы высоко формализован. Ошибка может возникнуть только при сравнении результатов, полученных с помощью разных методов выделения ДНК. Внутри одного метода достигается достаточно хорошая воспроизводимость.

**Этап амплификации.** В метагеномных работах, выполненных по “shot-gun” методике, этот этап и связанные с ним ошибки отсутствуют. В ампликонных работах возникает необходимость множественной амплификации целевого фрагмента ДНК с помощью ПЦР. На этом этапе помимо копирования целевых фрагментов происходит появление фрагментов-артефактов (например, химер), которые изначально отсутствовали в образце. При неудачном ПЦР доля артефактов может превышать 50%. Кроме того, для ПЦР необходимо подобрать праймеры – специальные молекулы ДНК, которые отмечают начало и конец целевого фрагмента. У разных организмов эти участки немного отличаются. Даже наиболее универсальные праймеры хорошо подходят для амплификации требуемых участков ДНК одних организмов и не подходят для других. Поэтому на практике используется “коктейль” из десятков праймеров, которые потенциально должны подойти ко всем организмам. Но чем больше параллельно используется праймеров, тем выше количество артефактов ПЦР. Объективно отличить артефакт от целевого фрагмента невозможно. Контроль над появлением артефактов осуществляется на этапе биоинформатической обработки исключительно косвенными методами.

**Этап секвенирования.** Секвенирование может осуществляться на одной из нескольких аппаратных платформ. Наиболее популярные: Illumina, Pacific Bioscience, IonTorrent. Сам процесс секвенирования предусматривает ошибки. Наиболее высокий уровень аппаратных ошибок у платформы IonTorrent, но она является наиболее привле-

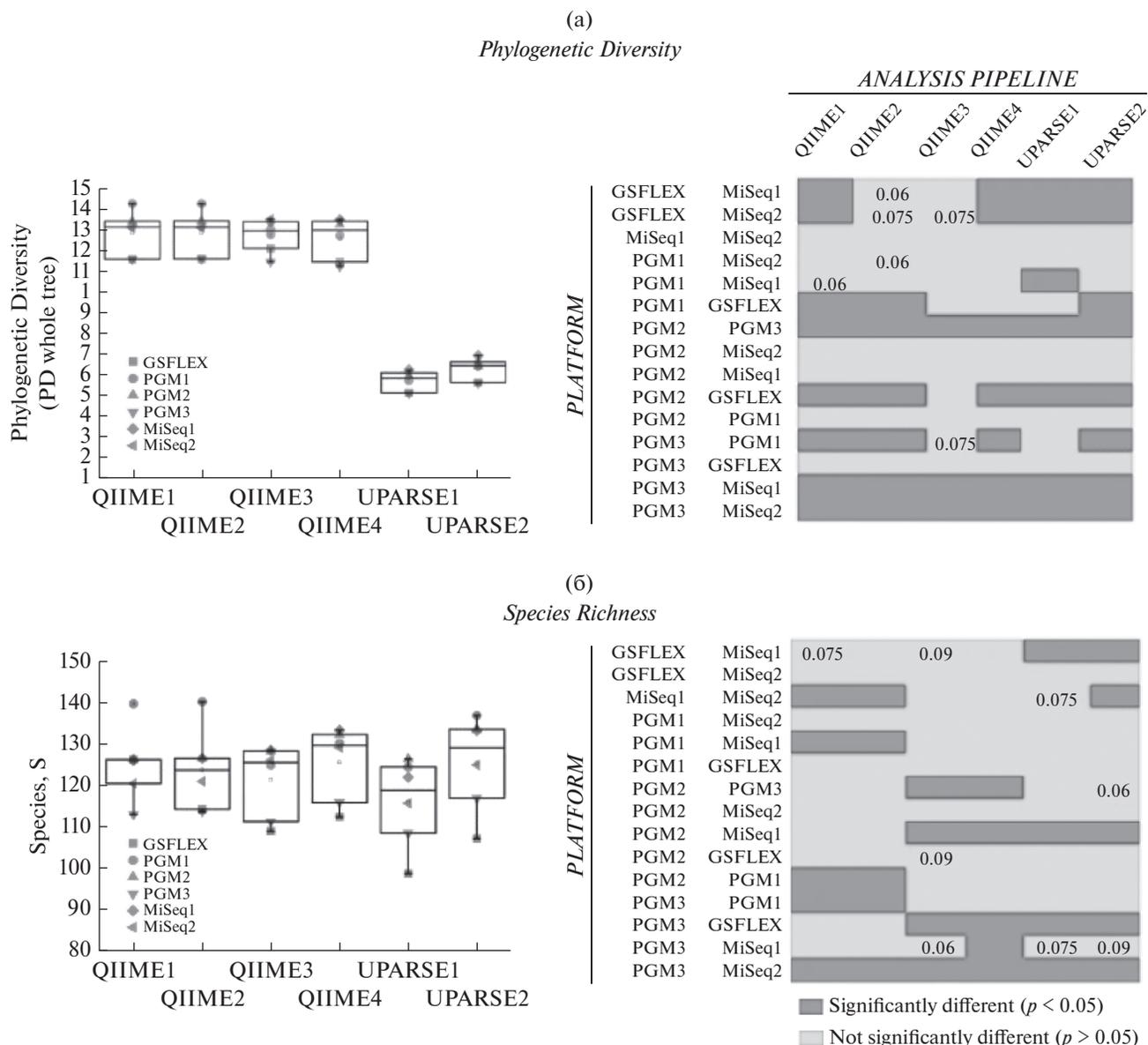
кательной по стоимости. Результаты, полученные на разных платформах, характеризуется невысокой воспроизводимостью по отношению друг к другу (Allali *et al.*, 2017). Ключевым способом повышения воспроизводимости на аппаратном уровне является увеличение глубины секвенирования, измеряемой в количестве прочтений на образец (Zaheer *et al.*, 2018). Если для работы по микробиому в начале 2010-х гг. можно было ограничиться 10000 прочтений, то теперь требования выросли до 50000 и даже 120000 прочтений на образец. При постановке работы необходимо стремиться к тому, чтобы все сиквенсы эксперимента были получены на одной и той же платформе. Причем это актуально и при сравнении собственных результатов с литературными данными.

**Этап биоинформатической обработки данных.** Результат работы секвенатора представляет собой перечень нуклеотидных последовательностей, которые находились в образце и были фланкированы праймерами, а также набор всех артефактов секвенирования. Как правило, каждый реально существующий целевой фрагмент длиной 200–400 п.н. в результате ошибок отображается как группа фрагментов, все члены которой отличаются друг от друга на несколько нуклеотидов. Поэтому неверно воспринимать каждый вариант фрагмента, как фактически существующий в среде. Это приведет к ложному многократному увеличению биоразнообразия сообщества. Для борьбы с этим (а также для учета внутривидового полиморфизма) применяется кластеризация сиквенсов в операционные таксономические единицы – ОТЕ. Можно выделить три основные группы кластеризующих алгоритмов:

1. Динамические *de novo* алгоритмы. Подходят для кластеризации сиквенсов при анализе новых, ранее не изучавшихся сообществ, включающих редкие и отсутствующие в базах данных таксоны. Не могут быть реализованы на бытовых компьютерах, требуют наличия высокопроизводительных процессоров.

2. “Жадные” *de novo* алгоритмы. Подходят для кластеризации сиквенсов при анализе новых, ранее не изучавшихся сообществ, включающих редкие и отсутствующие в базах данных виды. Могут быть реализованы на любом компьютере. Но дают ложное завышение разнообразия, искажают количественную представленность кластеров.

3. Референсные алгоритмы. Подходят для кластеризации сиквенсов при анализе хорошо известных сообществ, все члены которых были ранее проанализированы по отдельности, и сиквенсы депонированы в базу данных. Могут быть реализованы на любом компьютере. Дают минимальное искажение результатов. Плохо работают при низком пороге идентичности (см. ниже).



**Рис. 5.** Воспроизводимость результатов метагеномного анализа образца с помощью разных аппаратных платформ для секвенирования (по вертикали), и различных математических пакетов обработки данных (по горизонтали) (по Allali *et al.*, 2017). (а) Филогенетическое разнообразие. (б) Видовое богатство.

4. Без кластеризации. Метод, привлекающий все большее внимание благодаря наиболее высокой разрешающей способности. Требуется большого личного участия оператора и поэтому не может быть реализован на поточной основе.

Очевидно, что кластеризация серьезно снижает разрешающую способность метода, поэтому исследователь должен задать порог идентичности (в % отличий нуклеотидной последовательности) в пределах которого будет формироваться ОТЕ. При большом количестве артефактов порог идентичности увеличивают, при высоком качестве сиквенсов — уменьшают. Стандартный порог для

баркодирования по рибосомальным генам — 97%, что соответствует уровню род/вид. Очень важно, что при работе с неуниверсальными узкоспециализированными праймерами необходимо поднять порог идентичности, иначе это обесценит высокую разрешающую способность праймера. В редких случаях его могут поднимать до 100%, т.е. отказываться от кластеризации. При работе с очень разнообразными или низкокачественными метагеномными данными при использовании высокоуниверсальных праймеров порог уменьшают вплоть до 93% (уровень отряда—семейства). При работе с функциональными генами (целлюлазы, токсины и т.д.) порог обычно также уменьшают

до 93–95% (Ngara, Zhang, 2018). Неудачный выбор алгоритма кластеризации и порога идентичности может сильно навредить работе. Принципиально важно, чтобы все сравнения проводили только между результатами, полученными с помощью одного и того же метода кластеризации (Clooney *et al.*, 2016). Это актуально и при сравнении с литературными данными. В работе Allali *et al.*, 2017 было наглядно продемонстрировано, что анализ одного и того же образца с помощью разных математических пакетов и/или разных платформ секвенирования ведет к невоспроизводимости данных (рис. 5). Стоит только отметить, что основным “инструментом” контроля является исключение всех нуклеотидных последовательностей, встречающихся в единственном экземпляре (синглтонов). Еще одним подходом является перенос внимания на таксоны более высокого уровня. Небольшие ошибки в нуклеотидной последовательности фрагмента могут “перевести” его в другой род организмов, но маловероятно – в другое семейство или отряд (порядок).

Ошибки, возникающие на перечисленных этапах метагеномного исследования, могут неоправданно увеличивать биоразнообразие анализируемого сообщества организмов и обуславливать ложные корреляции. Наиболее эффективный способ борьбы с подобными ошибками – контрольное исследование образцов без использования технологий метагеномики. Как правило, высокорейтинговые журналы требуют, чтобы вывод любой работы был подтвержден как минимум двумя экспериментами, основанными на разных методических принципах. Например, увеличение экспрессии гена (показанное методом секвенирования тотальной РНК) должно быть подтверждено увеличением количества целевого метаболита (показанным методом ГХ-МС). Этот же принцип должен соблюдаться и для метагеномных исследований, однако в подавляющем большинстве метагеномных работ этого не происходит. Поэтому любые рассуждения о составе и функциях микробиома, вытекающие только из метагеномных данных, являются в значительной мере спекулятивными. Вероятно, дальнейшее развитие метагеномных исследований будет заключаться в контроле параметров фенотипа, поскольку любые геномные данные лишь косвенно связаны с фактическим фенотипом. Более детальную информацию дают: *метатранскриптом* – совокупность всей матричной РНК в пробе, *метатранспромеом* – совокупность всех белков и, наконец, *мета-метаболом*, характеризующий все органические вещества, включая малые молекулы. Данные подходы иногда называются “омиксными” технологиями – от общего английского окончания для всех четырех терминов: *metagenomics*, *metatranscriptomics*, *metaproteomics*, *metametabolomics*. Сочетание омиксных технологий будет служить внутренним контролем для любого исследова-

ния. Например, наличие характерных изоформ белков будет подтверждать наличие конкретного вида при метабаркодинге. Наличие определенного метаболита будет подтверждать обнаружение соответствующего функционального гена. Без этого, метагеномика будет оставаться многообещающим, но пока недостаточно надежным методом.

**Финансирование.** Раздел статьи “Метагеномный анализ почв” подготовлен при финансовой поддержке РФФИ (проект 19-04-00315); раздел статьи “Метагеномный анализ древней ДНК” подготовлен при поддержке РФФИ (проект 18-34-00895).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность акад. РАН В.В. Рожнову и О.Л. Макаровой за помощь при подготовке статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allali I., Arnold J.W., Roach J., Cadenas M.B., Butz N., Hassan H.M., Koci M., Ballou A., Mendoza M., Ali R., Azcarate-Peril M.A. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome // BMC Microbiol. 2017. V. 17(1). P. 194.
- Andréasson H., Nilsson M., Budowle B., Lundberg H., Allen M. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials // Forensic Sci. Int. 2006. V. 164(1). P. 56–64.
- Bellemain E., Davey M.L., Kausrud H., Epp L.S., Boessenkool S. Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost // Environ. Microbiol. 2013. V. 15(4). P. 1176–1189.
- Borbón-García A., Reyes A., Vives-Flórez M., Caballero S. Captivity shapes the gut microbiota of Andean Bears: insights into health surveillance // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 1316.
- Chai Z.Y., He Z.L., Deng Y.Y., Yang Y.F., Tang Y.Z. Cultivation of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* enhanced biodiversity in a eukaryotic plankton community as revealed via metagenomic analyses // Mol. Ecol. 2018. V. 27(4). P. 1081–1093.
- Clooney A.G., Fouhy F., Sleator R.D., O'Driscoll A., Stanton C., Cotter P.D., Claesson M.J. Comparing apples and oranges?: next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. PLOS ONE. 2016. V. 11(2). e0148028.
- da Rocha U.N., Andreote F.D., de Azevedo J.L., van Elsas J.D., van Overbeek L.S. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere // J. Soils Sediments. 2010. V. 10. P. 326–339.
- Dicks L.M.T., Geldenhuys J., Mikkelsen L.S., Brandsborg E., Marcotte H. Our gut microbiota: a long walk to homeostasis // Benef. Microbes. 2018. V. 9(1). P. 3–20.
- Eilers K.G., Debenport S., Anderson S., Fierer N. Digging deeper to find unique microbial communities: the strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil // Soil Biol. Biochem. 2012. V. 50. P. 58–65.

- Fierer N., Leff J.W., Adams B.J., Nielsen U.N., Bates S.T., Lauber C.L., Owens S., Gilbert J., Wall D., Caporaso J.G. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes // PNAS. 2012. V. 109(52). P. 21390–21395.
- Fu Q., Hajdinjak M., Moldovan O.T., Constantin S., Mallick S. et al. An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor // Nature. 2015. V. 524(7564). P. 216–219.
- Gilbert M.T.P., Menez L., Janaway R.C., Tobin D.J., Cooper A., Wilson A.S. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA // Forensic Sci. Int. 2006. V. 156(2–3). P. 208–212.
- Goodrich J.K., Waters J.L., Poole A.C., Sutter J.L., Koren O., Blekhman R., Beaumont M., Van Treuren W., Knight R., Bell J.T., Spector T.D., Clark A.G., Ley R.E. Human genetics shape the gut microbiome // Cell. 2014. V. 159(4). P. 789–799.
- Gorbacheva M.A., Melnikova N.V., Chechetkin V.R., Kravatsky Y.V., Tchurikov N.A. DNA sequencing and metagenomics of cultivated and uncultivated chernozems in Russia // Geoderma Regional. 2018. V. 14. e00180.
- Green R.E., Krause J., Ptak S.E., Briggs A.W., Ronan M.T., Simons J.F. et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA // Nature. 2006. V. 444. P. 330.
- Higgins D., Rohrlach A.B., Kaidonis J., Townsend G., Austin J.J. Differential nuclear and mitochondrial DNA preservation in post-mortem teeth with implications for forensic and ancient DNA studies // PLoS One. 2015. V. 10(5). e0126935.
- Hoopen P., Finn R.D., Bongo L.A., Corre E., Fosso F., Meyer F., Mitchell A., Pelletier E., Pesole G., Santamaria M., Willassen N.P. The metagenomic data life-cycle: standards and best practices // Gigascience. 2017. V. 6(8). P. 1–11.
- Ling N., Chen D., Guo H., Wei J., Bai Y., Shen Q., Hu S. Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe // Geoderma. 2017. V. 292. P. 25–33.
- Lombard N., Prestat E., van Elsas J.D., Simonet P. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics // FEMS Microbiol. Ecol. 2011. V. 78(1). P. 31–49.
- Lucas A., Bodger O., Brosi B.J., Ford C.R., Forman D.W., Greig C., Hegarty M., Neyland P.J., de Vere N. Generalisation and specialisation in hoverfly (Syrphidae) grassland pollen transport networks revealed by DNA metabarcoding // J. Anim. Ecol. 2018. V. 87(4). P. 1008–1021.
- Ma J., Prince A., Aagaard K.M. Use of whole genome shotgun metagenomics: a practical guide for the microbiome-minded physician scientist // Semin. Reprod. Med. 2014. V. 32. P. 5–13.
- Malan-Muller S., Valles-Colomer M., Raes J., Lowry C.A., Seedat S., Hemmings S.M.J. The gut microbiome and mental health: implications for anxiety- and trauma-related disorders // OMICS. 2018. V. 22(2). P. 90–107.
- Mendes L.W., Tsai S.M., Navarrete A.A., De Hollander M., van Veen J.A., Kuramae E.E. Soil-borne microbiome: linking diversity to function // Microb. Ecol. 2015. V. 70. P. 255–265.
- Navarrete A.A., Soares T., Rossetto R., van Veen J.A., Tsai S.M., Kuramae E.E. Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility // Antonie van Leeuwenhoek. 2015. V. 108(3). P. 741–752.
- Ngara T.R., Zhang H. Recent advances in function-based metagenomic screening // Genom. Prot. Bioinform. 2018. V. 16(6). P. 405–415.
- Noonan J.P., Coop G., Kudaravalli S., Smith D., Krause J. et al. Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA // Science. 2006. V. 314(5802). P. 1113–1118.
- Pester M., Schleper C., Wagner M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology // Curr. Opin. Microbiol. 2011. V. 14(3). P. 300–306.
- Pompanon F., Deagle B.E., Symondson W.O., Brown D.S., Jarman S.N., Taberlet P. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing // Mol. Ecol. 2012. V. 21(8). P. 1931–1950.
- Poussin C., Sierro N., Boué S., Battey J., Scotti E., Belcastro V., Peitsch M.C., Ivanov N.V., Hoeng J. Interrogating the microbiome: experimental and computational considerations in support of study reproducibility // Drug Discov. Today. 2018. V. 23(9). P. 1644–1657.
- Ranjan R., Rani A., Metwally A., McGee H.S., Perkins D.L. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016. V. 469(4). P. 967–77.
- Rothschild D., Weissbrod O., Barkan E., Kurilshikov A., Korem T., Zeevi D., Costea P.I., Godneva A., Kalka I.N., Bar N., Shilo S., Lador D., Vila A.V., Zmora N., Pevsner-Fischer M., Israeli D., Kosower N., Malka G., Wolf B.C., Avnit-Sagi T., Lotan-Pompan M., Weinberger A., Halpern Z., Carmi S., Fu J., Wijmenga C., Zhernakova A., Elinav E., Segal E. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota // Nature. 2018. V. 555(7695). P. 210–215.
- Riesenfeld C.S., Schloss P.D., Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 525–552.
- Semenov M., Blagodatskaya E., Stepanov A., Kuzyakov Y. DNA-based determination of soil microbial biomass in alkaline and carbonaceous soils of semi-arid climate // J. Arid Environ. 2018. V. 150. P. 54–61.
- Senechkin I.V., Speksnijder A.G.C.L., Semenov A.M., van Bruggen A.H.C., van Overbeek L.S. Isolation and partial characterization of bacterial strains on low organic carbon medium from soils fertilized with different organic amendments // Microb. Ecol. 2010. V. 60. P. 829–839.
- Sigsgaard E.E., Nielsen I.B., Bach S.S., Lorenzen E.D., Robinson D.P., Knudsen S.W., Pedersen M.W., Jaidah M.A., Orlando L., Willerslev E., Møller P.R., Thomsen P.F. Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA // Nat. Ecol. Evol. 2016. V. 1(1). P. 4.
- Souza R.C., Hungria M., Cantao M.E., Vasconcelos A.T.R., Nogueira M.A., Vicente V.A. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes // Appl. Soil Ecol. 2015. V. 86. P. 106–112.
- Sprubille T., Tuovinen V., Resl P., Vanderpool D., Wolinski H., Aime M.C., Schneider K., Stabentheiner E., Toome-Heller M., Thor G., Mayrhofer H., Johannesson H., Mc-

- Cutcheon J.P.* Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens // *Science*. 2016. V. 353. P. 488–492.
- Valentine D.L.* Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the archaea // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5(4). P. 316–323.
- Vital M., Karch A., Pieper D.H.* Colonic butyrate-producing communities in humans: an overview using omics data // *Systems*. 2017. V. 2(6).
- Willerslev E., Hansen A.J., Binladen J., Brand T.B., Gilbert M.T. et al.* Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene Sediments // *Science*. 2003. V. 300(5620). P. 791–795.
- Willerslev E., Hansen A.J., Rønn R., Brand T.B., Barnes I. et al.* Long-term persistence of bacterial DNA // *Curr. Biol.* 2004. V. 14(1). P. 9–10.
- Wilson J.J., Brandon-Mong G.J., Gan H.M., Sing K.W.* High-throughput terrestrial biodiversity assessments: mitochondrial metabarcoding, metagenomics or meta-transcriptomics? // *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.* 2019. V. 30(1). P. 60–67.
- Yan J., Charles J.F.* Gut microbiome and bone: to build, destroy, or both? // *Curr. Osteoporos Rep.* 2017. V. 15(4). P. 376–384.
- Yoon T.H., Kang H.E., Lee S.R., Lee J.B., Baeck G.W., Park H., Kim H.W.* Metabarcoding analysis of the stomach contents of the Antarctic Toothfish (*Dissostichus mawsoni*) collected in the Antarctic Ocean // *Peer J.* 2017. V. 5. P. e3977.
- Zaheer R., Noyes N., Polo R.O., Cook S.R., Marinier E., Van Domselaar G., Belk K.E., Morley P.S., McAllister T.A.* Impact of sequencing depth on the characterization of the microbiome and resistome // *Sci. Rep.* 2018. V. 8(1). P. 5890.
- Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Bäckström D., Juzokaite L., Vancaester E., Seitz K.W., Anantharaman K., Starnawski P., Kjeldsen K.U., Stott M.B., Nunoura T., Banfield J.F., Schramm A., Baker B.J., Spang A., Ertema T.J.* Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature*. 2017. V. 541(7637). P. 353–358.

## Metagenomics – A New Direction in Ecology

M. V. Vecherskii<sup>1, #</sup>, M. V. Semenov<sup>2</sup>, A. A. Lisenkova<sup>3, 4</sup>, and A. A. Stepankov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskij prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>Dokuchaev Soil Science Institute, Pyzhyovskiy lane, 7, Moscow, 119017 Russia

<sup>3</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Gubkina, 3, Moscow, 117971 Russia

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1, bldg 12, Moscow, 119991 Russia

#e-mail: vecherskomy@mail.ru

The paper discusses the prospects for the application of metagenomic technologies in ecological studies. It describes advantages in investigating the taxonomic composition of aquatic and terrestrial biotopes, as well as the examples of trophic and phoric relationships found in ecosystems using metagenomic approach. The abilities of metagenomics to study prokaryotic communities in complicated environments such as soils or animal intestines are shown. The review highlights the role of relic DNA in metagenome as well as the possible study of ancient organisms. Particular attention is paid to the criticism of metagenomic technologies related to the low reproducibility of the sequencing data. Common methodological mistakes in bioinformatics processing of metagenomic data leading to misleading results are considered.

*Keywords:* metagenomics, NGS, bioinformatics, relic DNA

УДК 581.55;574.9

## РАСТИТЕЛЬНОСТЬ И ПОЧВЫ ТУНДРОВЫХ ЛАНДШАФТОВ ПУР-ТАЗОВСКОГО МЕЖДУРЕЧЬЯ

© 2022 г. Е. А. Заров\*, Л. Л. Голубятников\*\*, @, Е. Д. Лапшина\*, С. В. Лойко\*\*\*

\*Югорский государственный университет, ул. Чехова, 16, Ханты-Мансийск, 628012 Россия

\*\*Институт физики атмосферы им. А.М. Обухова РАН, Пыжевский пер., 3, Москва, 119017 Россия

\*\*\*Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия

@E-mail: golub@ifaran.ru

Поступила в редакцию 16.12.2019 г.

После доработки 23.03.2020 г.

Принята к публикации 23.06.2020 г.

На основе материалов экспедиционных исследований и данных дистанционного зондирования проведен анализ ландшафтного разнообразия тундровой территории Пур-Тазовского междуречья. Для микроландшафтов изучаемого региона приведены описания видового состава растительного покрова и рельефа поверхности, определено проективное покрытие видов растений, дана характеристика почв, указаны глубины сезонного оттаивания почвы. Для болотных микроландшафтов установлены диапазоны значений уровня болотных вод, водородного показателя pH и электропроводности этих вод.

**Ключевые слова:** растительный покров, почвы, ландшафты, микроландшафты, космические снимки, тундровые экосистемы, Пур-Тазовское междуречье

**DOI:** 10.31857/S1026347022010188

В арктических и субарктических широтах наиболее ощутимо проявляются современные климатические изменения (Bindoff *et al.*, 2013), которые активизируют негативные криогенные процессы в зоне многолетнемерзлых грунтов (Кизяков, Лейбман, 2016). Обширные районы тундровой территории Западной Сибири подвергаются значительной антропогенной нагрузке, связанной как с интенсивной разработкой месторождений углеводородного сырья, так и с расширяющимися оленеводческими хозяйствами (Деттер, 2017; Callaghan *et al.*, 2019). Для анализа отклика тундровых экосистем Западной Сибири на климатические и антропогенные воздействия необходимо их комплексное исследование. Однако в результате суровых климатических условий, высокой заболоченности, отсутствия развитой транспортной инфраструктуры многие тундровые регионы до настоящего времени остаются слабо изученными. В ряде работ представлены результаты исследований фитоценологических, структурных особенностей растительного покрова (Мельцер, 1984; Телятников, 2003; Магомедова и др., 2006) и термостатических процессов (Павлов, 2008; Московченко и др., 2017) характерных для северных территорий Западной Сибири, сделаны описания отдельных почвенных разрезов этого региона (Хренов, 2011; Gentsch *et al.*, 2015), определены

типы болот и дана их общая характеристика (Лисс и др., 2001; Гидрология ..., 2009). Палинологические данные, полученные на основе проб из кернов геологоразведочных скважин, позволили оценить изменения климатических условий и растительности за период формирования отложений (мощностью до 400 м) на севере Западной Сибири (Волкова, 1999; Peteet *et al.*, 1998). В ряде публикаций анализируется степень антропогенного воздействия на природные ландшафты северных регионов Западной Сибири (Корниенко, Якубсон, 2011; Соромотин, Бродт, 2018).

В тундровых экосистемах криолитозоны растительный покров существенно влияет на термический режим подстилающих многолетнемерзлых пород (Тыртиков, 1980; Павлов, 2008). По этой причине отклик динамики сезонно-талого слоя и температуры многолетнемерзлых пород криолитозоны на изменения климата в значительной мере зависит как от типа и состояния растительного покрова, так и от характеристик многолетнемерзлых пород рассматриваемых экосистем. Исследования (Хименков, Власов, 2007; Павлов, Малкова, 2010) показали, что в зависимости от ландшафтных условий тренды климатических изменений и тренды изменений параметров сезонно-талого слоя и многолетнемерзлых пород могут не совпадать. Для анализа тенденций

изменений характеристик почвенно-грунтовой толщи криолитозоны под воздействием естественных и техногенных причин необходимы исследования современного ландшафтного разнообразия этой зоны, характеристик растительного и почвенного покровов.

В настоящей работе на основе данных полевых исследований и дистанционного зондирования Земли из космоса проанализировано пространственное распределение ландшафтов тундровой территории Пур-Тазовского междуречья, выделены микроландшафты, в границах которых сохраняется однородный растительный покров, однотипный микрорельеф поверхности и однообразный почвенный покров. Для микроландшафтов составлены описания растительного покрова и рельефа поверхности, дана характеристика почвенного покрова, приведены глубины сезонного оттаивания почвы, физико-химические свойства болотных вод (кислотно-щелочные условия, электропроводность).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тундровые экосистемы Пур-Тазовского междуречья расположены в области сплошного распространения многолетнемерзлых пород (Павлов, 2008) и относятся к подзоне южной тундры Западной Сибири (Лисс и др., 2001). Рассматриваемая территория (рисунок) занимает около 7 тыс. км<sup>2</sup>, что составляет ~12% территории Пур-Тазовского междуречья. Согласно типологической карте болот (Романова и др., 1977), для изучаемого региона характерны полигональные и плоскобугристые олиготрофные болота, заболоченность его территории составляет 15%. Климат региона резко континентальный. Проведенный нами анализ данных наблюдений метеостанции п. Тазовский (сайт [www.tr5.ru](http://www.tr5.ru)) за период 2005–2017 гг. показал, что для рассматриваемого региона характерна отрицательная среднегодовая температура воздуха (–6.5°C), самый холодный месяц – январь (среднемесячная температура воздуха –25.4°C), самый теплый месяц – июль (среднемесячная температура воздуха +15.4°C), годовая сумма положительных температур составляет 1320°C, за год, в среднем, выпадает 570 мм осадков, большая часть которых (55%) приходится на летне-осенний сезон, вегетационный период продолжается около 100 дней. Исследуемая территория является зоной избыточного увлажнения, которое обусловлено низкой испаряемостью (240 мм в год).

Для анализа пространственного распределения тундровых ландшафтов использован подход совместного использования космических снимков разных пространственных разрешений (Golubyatnikov *et al.*, 2015) и данных полевых исследований на ключевом участке Ярнето (67°22'–67°25' с.ш., 78°29'–78°41' в.д.) изучаемого региона. В данном

исследовании были использованы снимки со спутников Landsat-8 (среднее пространственное разрешение 30 м/пиксел) и WorldView-2 (сверхвысокое пространственное разрешение 2 м/пиксел). Снимок с Landsat-8 охватывал исследуемую территорию Пур-Тазовского междуречья, снимок с WorldView-2 – территорию ключевого участка. Дешифрирование снимков проводили с помощью геоинформационных программ QuantumGIS и GRASS. Сопоставление выделенных ландшафтов на снимке Landsat-8 с типами микроландшафтов на снимке WorldView-2 позволило определить доли рассматриваемых микроландшафтов в каждом ландшафте.

На территории ключевого участка Ярнето (площадь ~40 км<sup>2</sup>) в 2013–2017 гг. были проведены полевые исследования, во время которых идентифицированы ландшафты и микроландшафты, выделенные в результате дешифрирования космических снимков, составлены описания растительного и почвенного покровов. Геоботанические исследования выполняли по стандартной методике (Полевая геоботаника, 1964). В однотипных микроландшафтах, расположенных в разных частях ключевого участка, с 8-кратной повторностью закладывали пробные площадки размером 5 × 5 м, на которых составлены описания растительности, проведен глазомерный учет проективного покрытия видов растений, выполнены замеры глубины сезонно-талого слоя, уровня болотных вод, показателей кислотности и электропроводности болотных вод. Рядом с площадками закладывали шурфы для описания почвенного покрова. Названия почв приведены в соответствии с классификацией почв России (Классификация ..., 2004) и международной классификацией почвенных ресурсов (IUSS ..., 2015). Глубину сезонно-талого слоя в каждом микроландшафте измеряли градуированным металлическим шупом в конце июля. Уровень болотных вод в заболоченных микроландшафтах определяли с помощью рулетки. Кислотность и электропроводность воды измеряли портативным рН-кондуктометром Hanna 98129 ("Hanna Instruments", США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дешифрирование снимка со спутника Landsat-8 позволило выделить на исследуемой территории Пур-Тазовского междуречья 10 категорий наземной поверхности (табл. 1): 6 типов ключевых ландшафтов, озера, песчаные отложения, речные поймы и инфраструктурные сооружения (поселки, дороги и т.п.). Точность проведенного дешифрирования составила 92%. Согласно проведенному анализу спутникового снимка среднего пространственного разрешения, тундровые ландшафты на плосковершинных возвышениях занимают ~72% исследуемой территории междуре-

**Таблица 1.** Площади категорий наземной поверхности тундровой территории Пур-Тазовского междуречья

Категории наземной поверхности	$S$ , тыс. км <sup>2</sup>	$Q_{\text{reg}}$ , %	$Q_{\text{reg}}^*$ , %	$Q_{\text{key}}$ , %	$Q_{\text{key}}^*$ , %
Водная поверхность	0.13	1.9	7.3	2.8	9.8
Плакоры	3.82	55.9	29.3	48.2	27.7
Склоны с зарослями кустарников	1.11	16.2	27.7	7.4	21.2
Хасыреи	0.49	7.1	4.9	8.0	5.2
Травяно-сфагновые мочажины	0.38	5.6	9.6	23.5	17.1
Осоковые топи	0.21	3.1	2.1	3.8	2.8
Полигонально-трещиноватые комплексы	0.15	2.3	11.2	6.3	16.2
Речные поймы	0.37	5.4	5.4	—	—
Песчаные отложения	0.06	0.9	0.9	—	—
Инфраструктурные сооружения	0.11	1.6	1.6	—	—

Примечание.  $S$  – площадь;  $Q_{\text{reg}}$ ,  $Q_{\text{reg}}^*$  – доли площадей на рассматриваемой территории междуречья;  $Q_{\text{key}}$ ,  $Q_{\text{key}}^*$  – доли площадей на ключевом участке. Расчет  $S$ ,  $Q_{\text{reg}}$ ,  $Q_{\text{key}}$  выполнен на основе спутникового снимка среднего пространственного разрешения Landsat-8. Расчет  $Q_{\text{key}}^*$  выполнен на основе спутникового снимка сверхвысокого пространственного разрешения WorldView-2. Расчет  $Q_{\text{reg}}^*$  выполнен на основе спутниковых снимков Landsat-8 и WorldView-2.

чья. На ландшафты в депрессиях приходится 20% площади рассматриваемой территории. Поймы рек, наносы песка, инфраструктурные сооружения занимают ~8% площади региона (эти территории в данном исследовании не рассматриваются). На основе дешифрированного снимка составлена карта расположения выделенных категорий наземной поверхности для тундровой территории Пур-Тазовского междуречья. На рисунке представлена агрегированная карта–схема полученной карты.

Озера играют существенную роль в углеродном балансе территорий, оказывая влияние на климат региона (Schilder *et al.*, 2013; Голубятников, Маммарелла, 2018). Поэтому в данной работе эти природные объекты выделены в отдельную категорию, которая названа водной поверхностью. Озера региона имеют преимущественно термокарстовое происхождение (Земцов, 1976; Кравцова, Родионова, 2016), небольшую глубину (обычно 1–2 м, редко до 3.5 м) и площадь от 1500 м<sup>2</sup> до 2 км<sup>2</sup>. Берега озер в основном пологие, но могут быть в виде уступов высотой 2–4 м. Донные отложения в большинстве озер представлены торфо-минеральными отложениями, состоят из чередования минеральных слоев разного гранулометрического состава и мощности и прослоек переотложенного торфа. В ряде озер наблюдаются иловые и сапропелевые отложения.

**Тундровые ландшафты междуречья.** Значительную часть рассматриваемой территории междуречья занимают плосковершинные возвышения с минеральными почвами – *плакоры*. В напочвенном покрове этого ландшафта преобладают лишайники,

распространены также травянистые сообщества (злаки, осоки, ситники), сфагновые мхи, вересковые кустарнички, карликовые березки и ивы. Наиболее возвышенные участки заняты зарослями ольховника. На границе с лесотундровой зоной наблюдаются отдельные деревья лиственницы и на незначительных по площади участках встречаются лиственничные редколесья.

Многочисленные склоны, которыми изрезаны плакорные массивы, покрыты *кустарниковыми сообществами*. На нижних частях склонов около русел водотоков формируются ивняки. На верхних частях склонов распространены кустарниковые заросли с доминированием карликовой березки. Наибольшей высоты кустарники достигают в узких канавообразных эрозионных понижениях. В напочвенном покрове склонов доминируют мхи, часто встречаются виды из группы разнотравья и вейник. Наиболее густая сеть склонов сосредоточена между поймами рек Большая Хэйха и Юредейха в южной части рассматриваемого междуречья и на территории, прилегающей к пойме р. Пур.

*Полигонально-трещиноватые комплексы* имеют сложную структуру чередования возвышенных полигонов и канавообразных трещин, отделяющих полигоны. Поверхность полигонов обычно мелкокочковатая, иногда ровная. Полигоны имеют четырех-, пяти-, шести- и семиугольные формы с размером сторон 5–14 м. Ширина трещин составляет от 1 до 3 м. При пересечении трещин образуются достаточно широкие участки с мочажинами. Растительность полигонов состоит из лишайников, сфагновых мхов, вересковых кустарничков и карликовых березок. В трещинах растительность

представлена влаголюбивыми травяно-моховыми сообществами из сфагновых мхов, осоки, пушицы с единичными экземплярами андромеды. Мощност торфяной залежи на полигонах обычно 1.5–2 м, иногда превышает 3 м. Этот тип ландшафта наиболее распространен на юго-восточной части Пур-Тазовского междуречья, а также на территориях прилегающих к пойме р. Таз в районе водосборов рек Вэсакояха, Лукьяха, Сямботаяха.

В ложбинах исследуемого региона выделены два типа болотных ландшафтов. Значительную часть заболоченных ложбин занимают олиготрофные и олиготрофно-мезотрофные *травяно-сфагновые мочажины*. Сфагновые мхи на мочажинах образуют сплошной покров. Повсеместно распространены осоки и пушицы. *Осоковые топи* формируются на участках болот с застойным увлажнением. Уровень болотных вод в этом ландшафте находится у поверхности торфяной залежи, многие участки покрыты водой. Растительность представлена в основном осоками. Сфагновые мхи и вересковые кустарнички произрастают только на редких кочках. Травяно-сфагновые мочажины и осоковые топи характерны для территорий, прилегающих к пойме р. Таз и ее притоков. Значительные территории заняты этими болотными ландшафтами как на юго-восточной части междуречья, так и на побережье Тазовской губы. Встречаются указанные ландшафты и вдоль поймы р. Пур.

Котловины спущенных термокарстовых озер (*хасырей*) представляют типичный ландшафт тундровой территории Пур-Тазовского междуречья (Лойко и др., 2018). После спуска озера в понижениях его дна может сохраняться вода, образуя мелкие озера. В котловине наряду с высокопродуктивными травянистыми сообществами распространяются сфагновые мхи, пушицы, осоки. На этой начальной стадии развития хасырей в котловине формируются мочажины, наблюдается мерзлотное пучение, приводящее к образованию небольших возвышений (20–40 см высотой), на которых со сфагновыми мхами произрастают лишайники и вересковые кустарнички. Подобный этап развития хасырей в тундре Европейского северо-востока России описан в (Каверин и др., 2014). Избыточное увлажнение территории, процессы термокарста и мерзлотного пучения способствуют формированию в котловинах спущенных озер мерзлых бугров пучения высотой до 3 м, мочажин разной степени обводненности и мелких озерков, т.е. переходу начальной стадии хасырей в развитую форму. На буграх пучения растут карликовые березки, зеленые мхи и лишайники. Растительность мочажин, окружающих бугры пучения, состоит в основном из осоки и олиготрофных видов мхов. Котловины спущенных озер распространены повсеместно на изучаемой территории. Значительные территории хасырей занимают севернее р. Вэсакояха, в центрально-западной части

междуречья ограниченной реками Пур, Вэсакояха, Лукьяха и юго-западной части междуречья между реками Пур, Лукьяха и Надосаляхадыта.

**Описание микроландшафтов.** Тундровые ландшафты Пур-Тазовского междуречья были проанализированы на основе высокодетального изображения со спутника WorldView-2 ключевого участка Ярнето и данных полевых исследований. Этот анализ позволил выделить на рассматриваемой территории 20 микроландшафтов и вычислить площадь каждого микроландшафта (табл. 2).

Водная поверхность подразделена на три микроландшафта: более глубокую часть озер, лишенную надводной растительности (*глубоководье*), мелководную часть с разреженным надводным растительным покровом или без него (*мелководье*) и *внутриболотные озера*. Воды исследованных озер и озерков междуречья имеют реакцию рН от кислой до слабокислой (значения рН изменяются в диапазоне от 3.5 до 6.3). Такие значения водородного показателя рН озерных вод являются типичными для южнотундровых озер (Гидрология ..., 2009; Голубятников, Казанцев, 2013) Величины удельной электропроводности озерных вод варьируют в пределах 5–38 мкСм/см. Низкие значения этого параметра указывают на бедный минеральный состав озерной воды в исследованных водоемах.

*Лишайниковые сообщества* произрастают на супесчаных почвах, наиболее дренированных плакоров. Лишайники *Cladonia stellaris*, *C. rangiferina*, *Alectoria ochroleuchia*, *Cetraria cucullata*, *C. nivalis* образуют практически сплошной покров (90–100% покрытия). Кустарничковый ярус высотой 5–15 см (10–20% покрытия) состоит из *Ledum palustre*, *Vaccinium uliginosum*, *Arctous alpina*, *Betula nana*, *Salix* spp. Травянистые сообщества из злаков (*Poa arctica*, *Calamagrostis* spp.), *Carex arctosibirica*, *Juncus* spp. образуют разреженные куртины. Почвы представляют собой тундровые подбугры мерзлотные супесчаные криотурбированные (Dystric Arenosols, Gelic, Protosodic, Protostagnic).

*Кустарничково-лишайниковые сообщества* занимают плоские вершины плакоров. Для микро-рельефа характерны пятна выдавленного минерального грунта (пятна-медальоны). По краям этих пятен растут кустарнички *Arctous alpina*, *Empetrum hermaphroditum*. Лишайники *Cladonia stellaris*, *C. rangiferina*, *Alectoria ochroleuchia*, *Cetraria cucullata*, *C. nivalis* образуют сплошной покров. Кустарничковый ярус высотой 15–20 см (45% покрытия) образован *Ledum palustre* с участием *Betula nana*, редкими кустиками *Salix glauca*, *S. physocarpa*, *Vaccinium uliginosum*. На возвышениях встречаются заросли ольховника (*Duschekia fruticosa*). На участках микроландшафта с ослабленным дренажом наблюдаются отдельные куртины из *Eriophorum scheuchzerii*, *E. vaginatum*. Почвы пред-

Таблица 2. Характеристики тундровых микроландшафтов Пур-Тазовского междуречья

Тип микроландшафта	$Q_{key}$ , %	$Q_{reg}$ , %	УБВ, см	СТС, см	pH	ЕС, мкСм/см
Глубоководье	2.7	2.1	–	–	4.1–6.3	5–34
Мелководье	1.5	1.7	–	–	3.5–6.1	9–31
Внутриболотные озера	5.6	3.5	–	–	3.9–4.7	8–38
Лишайниковые сообщества на плакорах	1.7	1.9	–	>70	–	–
Кустарничково-лишайниковые сообщества на плакорах	15.0	16.9	–	>35	–	–
Кустарничково-пушицево-лишайниковые сообщества на плакорах	11.0	10.5	–	23–29	–	–
Кустарничково-зеленомошные сообщества на склонах	13.3	16.8	–	30–50	–	–
Заросли ерника на склонах	7.9	10.9	–	32–50	–	–
Лишайниково-мохово-кустарничковые сообщества на полигонах болот	7.3	6.2	–	28–30	–	–
Лишайниково-кустарничковые сообщества на полигонах болот	1.6	1.1	–	25–28	–	–
Мохово-кустарничковые сообщества на полигонах болот	6.3	3.3	12–22	29–33	3.2–3.5	49–64
Морозобойные трещины между полигонами	1.0	0.7	3–17	31–45	3.8–4.2	21–43
Осоково-кустарничково-сфагновые мочажины	1.2	0.5	17–24	25–28	4.3–4.9	22–39
Осоково-пушицево-сфагновые мочажины	2.9	1.0	10–25	24–31	3.4–4.9	28–52
Обводненные осоково-пушицево-сфагновые мочажины	13.1	8.1	3–8	35–48	3.8–4.4	16–21
Осоково-сфагновые топи	0.2	0.1	8–10	35–40	4.2–4.5	14–20
Кустарничково-осоково-моховые топи	0.4	0.3	0–10	29–46	4.3–4.7	8–30
Осоково-пушицевые топи	2.1	1.7	–10...2	48–55	4.2–5.1	6–8
Обводненные сфагновые мочажины на хасырее	3.2	2.1	5–12	31–42	3.8–4.2	23–33
Кустарничково-моховые сообщества на буграх пучения	2.0	2.8	–	15–36	–	–

Примечание.  $Q_{key}$  – доля площади на ключевом участке;  $Q_{reg}$  – доля площади на рассматриваемой территории междуречья; УБВ – уровень болотных вод; СТС – сезонно-талый слой; pH/ЕС – кислотность/электропроводность болотных и озерных вод.

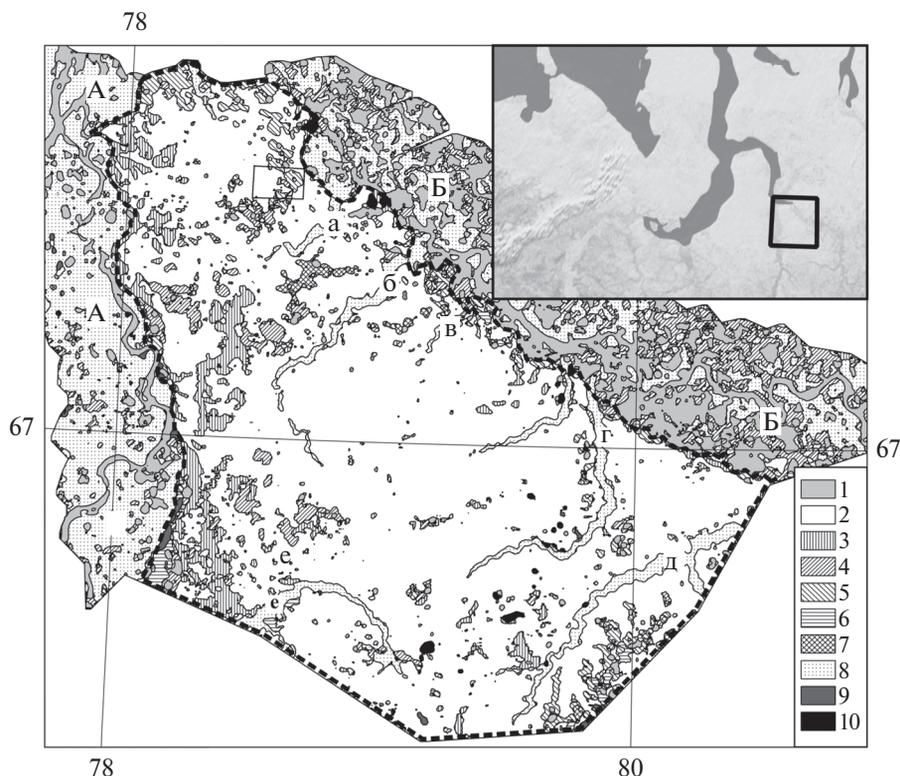
ставлены глеевыми потечно-гумусовыми и подбурами супесчаными в пределах пятен (Reduc-taquic Turbic Cryosols (Loamic, Thixotropic), Dys-tric Arenosols).

Плакорные кустарничково-пушицево-лишайниковые сообщества встречается на слабодренированных участках, прилегающих к озерам или обводненным мочажинам. Микроландшафт имеет кочковатый рельеф, который образован пушицевыми кочками высотой 20–30 см (50% площади). Травяной ярус состоит преимущественно из *Eriophorum vaginatum* (смятость 60–70%) и *Rubus chamaemorus* (10% покрытия). Кустарничковый ярус (40% покрытия) представлен *Ledum palustre* с участием *Betula nana*. Пространство между кочек покрыто лишайниками *Cladonia stellaris*, *C. rangiferina*, *Cetraria cucullata* (75–80% покрытия) с примесью

мхов *Sphagnum fuscum*, *Sph. lenense*, *Sph. balticum*, *Polytrichum strictum*, *Dicranum* spp. (15–20% покрытия). Для данного микроландшафта характерен торфяно-глеевый мерзлотный криотурбированный (Histic Reductaquic Turbic Cryosols (Loamic, Thixotropic)).

Из описаний растительного покрова центральной части Тазовского п-ва, приведенных в работе (Кобелева, 2012), следует, что растительные сообщества тундровых плакоров Пур-Тазовского междуречья характерны и для тундровых плакоров Тазовского полуострова.

Кустарничково-зеленомошные сообщества занимают пологие склоны плакоров. Кустарники *Betula nana* (75% покрытия) и *Salix glauca* (5–15% покрытия) образуют густые заросли высотой до 60 см. Под их пологом единично встречаются *Ledum pa-*



**Рис. 1.** Карта-схема района исследований. Пунктирной линией околнута тундровая территория Пур-Тазовского междуречья. Территория ключевого участка Ярнето выделена тонкой сплошной линией. Категории наземной поверхности: 1 – водная поверхность, 2 – плакоры, 3 – склоны с зарослями кустарников, 4 – хасыреи, 5 – травяно-сфагновые мочажины, 6 – осоковые топи, 7 – полигонально-трещиноватые комплексы, 8 – речные поймы (А – р. Пур, Б – р. Таз, а – р. Вэсакояха, б – р. Лукыяха, в – р. Сямботаяха, г – р. Большая Хэйха, д – р. Юредейяха, е – р. Надосалыадыта), 9 – песчаные отложения, 10 – инфраструктурные сооружения.

*lustre* и *Vaccinium uliginosum*. В напочвенном покрове доминируют зеленые мхи *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi* (до 45% покрытия), встречаются лишайники *Cladonia arbuscula*, *C. stellaris*, *C. rangiferina*. Почвы данного микроландшафта представлены торфяно-криоземами глееватыми мерзлотными суглинистыми (Reductaquic Turbic Cryosols (Siltic, Thixotropic), Reductaquic Cryosols (Loamic, Thixotropic)).

Заросли ерника (карликовой березки) занимают крутые склоны плакоров. Ерник с примесью *Salix glauca*, *S. saxatilis* образует заросли высотой до 2.5 м (75–90% покрытия). Травяно-кустарниковый ярус, разреженный (до 20% покрытия), состоит преимущественно из *Ledum palustre*, *Vaccinium vitisidaea*, *Equisetum palustre*, *Rubus arcticus*, *R. chamaemorus*. Поверхность почвы на 90–100% покрыта мхами *Sphagnum girgensohnii*, *Anlacomnium palustris*, *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi*, *Polytrichum strictum*. Почвы такие же, как в предыдущем микроландшафте.

В отличие от растительных сообществ на склонах плакоров южной тундры Тазовского п-ва (Валеева, Московченко, 2009), в рассматриваемом

регионе в травяно-кустарниковом ярусе доминируют *Ledum palustre*, *Vaccinium vitisidaea*, *Equisetum palustre*, *Rubus arcticus*, *R. chamaemorus*.

Лишайниково-кустарниковые сообщества на полигонах болот занимают пограничные зоны полигонально-трещиноватых комплексов. Микро рельеф мелкокочковатый, кочки (высотой 10–15 см) занимают 40–50% площади микроландшафта. Кустарниковый ярус сосредоточен на кочках и состоит из *Ledum palustre* (30% покрытия) с незначительной примесью кустиков *Betula nana* (до 5% покрытия). Мхи *Sphagnum fuscum*, *Sph. capillifolium* встречаются на кочках редкими пятнами (2–3% покрытия). Травяной ярус представлен *Rubus chamaemorus* (до 30% покрытия). Пространство между кочками занято кустистыми лишайниками *Cladonia stellaris*, *C. stygia* с участием *C. rangiferina*, *C. amaurocraea*, *Cetraria cucullata*. Для микроландшафта характерны торфяно-олиготрофные мерзлотные почвы, иногда остаточного-эутрофные (Dystric Epifibric Cryic Histosols, Dystric Hemic Cryic Histosols, Murshic Hemic Epicryic Histosols).

Лишайниково-мохово-кустарниковые сообщества на полигонах болот встречаются в центральных

частях полигонально-трещиноватых комплексов. Для этого микроландшафта характерен мелко-кочковатый рельеф. Кочки занимают 35–40% площади микроландшафта. Лишайники *Cladonia stellaris* и *C. stygia* образуют сплошной покров между кочками. Растительность кочек представлена мхами *Sphagnum fuscum*, *Sph. capillifolium* (10–20% покрытия), лишайниками *Cladonia stellaris*, *C. stygia* (до 15% покрытия), травяно-кустарничковыми сообществами из *Rubus chamaemorus* (до 20% покрытия), *Ledum palustre* (60% покрытия), кустиками *Betula nana* (до 25% покрытия). Почвы такие же, как в предшествующем микроландшафте.

*Мохово-кустарничковые сообщества на полигонах болот* встречаются на краевых участках полигонов, которые подвержены водно-тепловой эрозии. Моховой покров (90–100% покрытия) состоит преимущественно из *Sphagnum fuscum*, встречаются *Sph. balticum*, *Sph. lenense*. Лишайники *Cladonia stellaris* и *C. stygia* распределены редкими пятнами (5–10% покрытия). Травяной ярус сомкнутостью 10–30% состоит из *Rubus chamaemorus*. Разреженный кустарничковый ярус (5–20% покрытия) представлен *Andromeda polifolia*, *Ledum palustre*, *Betula nana*. Почвы – торфяные олиготрофные мерзлотные (Dystric Epifibric Endohemic Cryic Histosols).

*Морозобойные трещины между полигонами* представляют собой небольшие траншеи (шириной 1–3 м), образовавшиеся в результате морозобойного растрескивания. Мхи *Sphagnum balticum*, *Sph. lindbergii*, *Sph. jensenii*, *Sph. majus* образуют сплошной покров. Проективное покрытие *Carex rotundata* и *Eriophorum russeolum* составляет 20–35%. Изредка встречаются кустики *Betula nana*, *Andromeda polifolia*. Почвы – торфяные олиготрофные мерзлотные (Dystric Epifibric Cryic Histosols), глубже 50–70 см, как правило, залегает ледяная жила.

*Осоково-кустарничково-сфагновые мочажины* формируются по границам полигонально-трещиноватых комплексов в зонах стока с этих болот. В растительном покрове доминирует *Carex rotundata* (50% покрытия). Низкий уровень болотных вод способствует произрастанию зарослей из *Betula nana* (до 50% покрытия), *Salix glauca*, *Andromeda polifolia*, *Chamaedaphne calyculata*, *Vaccinium myrtillus* (до 15% покрытия). Мхи *Sphagnum obtusum*, *Sph. balticum* образуют сплошной покров. Для данного микроландшафта характерны торфяные олиготрофные мерзлотные почвы (Dystric Fibric Cryic Histosols).

*Осоково-пушицево-сфагновые мочажины* встречаются как в пограничной зоне между полигонально-трещиноватым комплексом и ложбиной, так и между буграми пучения в развитом хасырее. Рельеф сформирован небольшими (около 10 см

высотой) кочками, покрывающими до 50% поверхности микроландшафта. Мхи *Sphagnum balticum*, *Sph. obtusum*, *Sph. riparium* образуют сплошной покров. Травяной ярус (85% покрытия) представлен *Carex rotundata*, *Eriophorum russeolum*. Единично встречаются *Betula nana*, *Salix glauca*, *Andromeda polifolia*, *Ledum palustre*. Почвы такие же, как в предшествующем микроландшафте.

*Обводненные осоково-пушицево-сфагновые мочажины* являются характерным микроландшафтом заболоченных участков центральной части ложбин. В травяном покрове (30–55% покрытия) доминируют *Eriophorum russeolum*, *Carex rotundata*. Единично встречается *Andromeda polifolia*. Мхи образуют сплошной покров, в котором преобладают *Sphagnum balticum*, *Sph. lindbergii*, *Sph. jensenii*, *Sph. majus*. Небольшие участки микроландшафта покрыты водой. Почвы – торфяные олиготрофные мерзлотные (Dystric Fibric Cryic Histosols).

В ложбинах на участках с застойным увлажнением представлены три типа микроландшафтов. В травяном ярусе *осоково-сфагновых топей* доминирует *Carex chordorrhiza*, присутствуют *C. limosa*, *Eriophorum russeolum* (50% покрытия). Мох *Sphagnum obtusum* образует сплошной покров. Участки с открытой водой занимают 5–10% площади микроландшафта. Почвы – торфяные олиготрофные мерзлотные (Dystric Fibric Cryic Histosols). В *кустарничково-осоково-моховых топях* высокий травяной покров (20% покрытия) образуют *Carex chordorrhiza*, *C. limosa*, *C. rotundata*, *Eriophorum russeolum*, *E. angustifolium*. Болотные воды находятся выше поверхности топи на 10–20% площади микроландшафта. Низкорослый кустарничковый ярус состоит из *Andromeda polifolia* (10–70% покрытия). Единично встречается *Betula nana*. Напочвенный покров (60% покрытия) образуют сфагновые (*Sphagnum obtusum*), зеленые (*Warnstorfia exannulata*, *Polytrichum jensenii*) и печеночные (*Scapania paludicola*) мхи. Почвы – торфяные олиготрофные мерзлотные (Dystric Epifibric Histosols). Растительный покров *осоково-пушицевых топей* образован *Carex chordorrhiza* и *Eriophorum russeolum* (40–70% покрытия). Значительная часть территории микроландшафта находится под водой. Почвы – аллювиальные торфяно-глеевые (Dystric Gleyic Histic Fluvisols). Следует отметить, что в описаниях растительного покрова южнотундровых топей Тазовского п-ва, приведенных в (Валеева, Московченко, 2009), зеленые и печеночные мхи отсутствуют.

*Обводненные сфагновые мочажины* характерны для хасыреев в начальной стадии их развития. Небольшие участки микроландшафта находятся под водой. Мхи *Sphagnum balticum*, *Sph. lindbergii*, *Sph. jensenii*, *Sph. majus* образуют сплошной покров на участках свободных от воды. В травяном ярусе (15% покрытия) преобладают *Carex rotundata*, *C. limosa*, *Eriophorum russeolum*. На небольших участках вдоль

слабо выраженных водотоков и у озерков в моховом покрове преобладают *Sphagnum obtusum*, *Sph. riparium*, *Sph. squarrosum*, травяной ярус образуют *Carex aquatilis*, *C. chordorrhiza*, *Eriophorum angustifolium*, *E. russeolum*, единично встречается *Comarum palustre*. Почвы представлены торфяно-глебеземами мерзлотными на озерном аллювии (Histic Reductaquic Histosols).

Кустарничково-моховые сообщества занимают поверхность больших (высотой 2–3 м) бугров пучения исследуемой территории. Кустарниковый ярус сомкнутостью 75–90% образуют густые заросли (высотой более 1.5 м) *Betula nana* с незначительным участием *Salix glauca*. Моховой покров (80–100% покрытия) состоит из *Sphagnum fuscum*, *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi*, *Aulacomnium palustre*, *Polytrichum strictum*, *P. commune*. Лишайники (*Cladonia stellaris*, *C. rangiferina*) встречаются редкими пятнами. Почвы представлены криоземами (Folic Cryosols (Loamic, Thixotropic), Cryosols (Loamic, Thixotropic)).

Уровень болотных вод в микроландшафтах изучаемого региона наблюдается на разных глубинах (табл. 2). В топях вода может находиться на поверхности торфяной залежи. В мочажинных микроландшафтах расположенных по границам полигональных болот наблюдается наиболее низкий уровень болотных вод (24–25 см). Болотные воды изучаемого региона имеют кислую реакцию рН (от 3.2 до 5.1) и низкие значения электропроводности от 6–8 до 52–64 мкСм/см.

Измерения глубин сезонно-талого слоя в микроландшафтах на территории ключевого участка (табл. 2) показали, что наибольшая глубина оттаивания грунта (более 70 см) характерна для хорошо дренированных участков плакоров с лишайниковыми сообществами. На слабодренированных участках плакоров с кустарничково-пушицево-лишайниковыми сообществами мощность сезонно-талого слоя не превышает 30 см. Максимальная глубина оттаивания торфяной залежи болотных полигонов характерна для микроландшафтов с мохово-кустарничковыми сообществами (29–33 см). Сезонно-талый слой морозобойных трещин, разделяющих полигоны, составляет 31–45 см. В микроландшафтах болотных топей глубина оттаивания грунта наблюдается в диапазоне от 29 до 55 см. Для болотных мочажин сезонно-талый слой составляет 24–31 см, в обводненных мочажинах его глубина возрастает до 42–48 см. Глубина оттаивания почвы в микроландшафтах хасыреев изменяется от 15 до 42 см.

**Сопоставление ландшафтов с микроландшафтами.** На территории ключевого участка Ярнето присутствуют все типы ландшафтов тундровой территории Пур-Тазовского междуречья, которые были выделены с помощью спутникового снимка среднего пространственного разрешения Land-

sat-8. По данным о площадях микроландшафтов, полученных на основе снимка сверхвысокого пространственного разрешения WorldView-2, определены значения площадей всех рассматриваемых ландшафтов на ключевом участке. Данные о долях площадей, занимаемых рассматриваемыми ландшафтами на ключевом участке, согласно спутниковым снимкам Landsat-8 и WorldView-2 приведены в табл. 1.

Анализ спутниковых снимков среднего (Landsat-8) и сверхвысокого (WorldView-2) пространственных разрешений территории ключевого участка показал, что использование высокодетального космического снимка существенно увеличивает точность площадных оценок исследуемых объектов. Следует отметить, что пространственное разрешение снимка Landsat-8 не позволяет выделить небольшие по площади природные объекты, такие как внутриводные озера, малые полигоны и мочажины, морозобойные трещины и другие. Сопоставление используемых спутниковых снимков показало, что в границы ландшафтов, выделенных по снимку Landsat-8 на ключевом участке, частично включены микроландшафты, которые не характерны для этих ландшафтов. Например, только 47% территории плакоров на снимке Landsat-8 занимают плакорные микроландшафты, 27% этой территории занимают микроландшафты склонов плакоров, 23% площади относится к болотным микроландшафтам, 3% – к водоемам и буграм пучения. Из данных спутникового снимка WorldView-2 следует, что на ключевом участке площади, занимаемые склонами с зарослями кустарников и полигонально-трещиноватыми комплексами, превышают площади этих ландшафтов на снимке Landsat-8 в 2.9 и 2.6 раза соответственно. Согласно данным снимка WorldView-2, на ключевом участке площади плакоров, травяно-сфагновых мочажин, осоковых топей на 26–42% меньше площадей этих ландшафтов на снимке Landsat-8.

На основе сопоставления данных космических снимков среднего и сверхвысокого разрешений территории ключевого участка были определены доли площадей рассматриваемых микроландшафтов в границах каждого ландшафта, выделенного по снимку среднего разрешения. Учитывая полученные результаты, вычислены площади каждого микроландшафта на исследуемой территории Пур-Тазовского междуречья (табл. 2). Эти данные позволили оценить площади различных групп микроландшафтов и уточнить площади ландшафтов (табл. 1), рассчитанные на основе спутникового снимка Landsat-8 для тундровой территории междуречья. Согласно полученным оценкам, ~35% площади болот исследуемого региона занимают обводненные мочажинные микроландшафты. Полигонально-трещиноватые комплексы составляют значительную часть болотных массивов рассматриваемой территории (~31% площади болот).

Озера и озёрки занимают 7% площади изучаемой территории Пур-Тазовского междуречья. Из полученных оценок следует, что до 44% площади озёр приходится на их мелководную зону. Микроландшафты на плакорах и их склонах занимают 57% площади тундровой территории Пур-Тазовского междуречья. Большие бугры пучения (высотой более 2 м) достаточно редки на рассматриваемой территории (занимают не более 3% площади).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные полевых исследований и снимки с космических аппаратов Landsat-8 и WorldView-2 позволили провести анализ пространственного распределения ландшафтов тундровой территории Пур-Тазовского междуречья. Проведенное исследование показало, что использование данных со спутника сверхвысокого разрешения существенно увеличивает точность площадных оценок исследуемых наземных объектов по сравнению с данными, получаемыми со спутника среднего разрешения. Результаты исследования показали, что заболоченные микроландшафты занимают 36% площади тундровой территории Пур-Тазовского междуречья. Согласно полученным оценкам, растительные сообщества на супесчаных и суглинистых почвах плакоров занимают значительную долю площади (46%) исследуемого региона.

На хорошо дренированных плосковершинных возвышениях с минеральными почвами исследуемой территории произрастают лишайниковые и кустарничково-лишайниковые сообщества. Слабодренированные участки плакоров заняты кустарничково-пушицево-лишайниковыми сообществами. На склонах плакоров наблюдаются заросли из кустарников: высотой до 60 см кустарничково-зеленомошные сообщества и высокие (до 2.5 м) заросли ерника. На полигонах полигонально-трещиноватых комплексов представлены такие микроландшафты как лишайниково-мохово-кустарничковые сообщества, лишайниково-кустарничковые сообщества и мохово-кустарничковые сообщества. Морозобойные трещины, разделяющие полигоны, образуют отдельный микроландшафт. В болотном ландшафте травяно-сфагновых мочажин выделены три микроландшафта: осоково-кустарничково-сфагновые мочажины, осоково-пушицево-сфагновые мочажины, обводненные осоково-пушицево-сфагновые мочажины. Осоковые топи подразделяется на такие микроландшафты, как осоково-сфагновые топи, кустарничково-осоково-моховые топи, осоково-пушицевые топи. Для начальной стадии развития хасыреев характерны обводненные сфагновые мочажины. В хасыреях на развитой стадии выделяются два микроландшафта: кустарничково-моховые сообщества на буграх пучения и осоково-пушицево-сфагновые мочажины.

Микроландшафты характеризуются различными глубинами сезонно-талого слоя. Наибольшая глубина оттаивания грунта наблюдается под лишайниковыми сообществами на плакорах (более 70 см). Среди болотных микроландшафтов наибольшая глубина сезонно-талого слоя (40–55 см) характерна для обводненных мочажин и топей. Торфяная залежь полигонов оттаивает на 25–33 см. На буграх пучения сезонно-талый слой наблюдается в диапазоне от 15 до 36 см.

Криогенные и термокарстовые процессы в многолетнемерзлых породах рассматриваемой территории Пур-Тазовского междуречья приводят к формированию разнообразных форм микрорельефа, которые оказывают существенное влияние на формирование растительного покрова с ярко выраженной неоднородной горизонтальной структурой. Полученные результаты о составе и структуре растительности и талого почвенного слоя ландшафтов региона могут быть использованы для оценки экологического потенциала изучаемой территории и выявления тенденций развития тундровой растительности в условиях естественной динамики.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-05-00193а), крупного проекта КП19-278 “Новые вызовы климатической системы Земли” по проведению фундаментальных научных исследований по приоритетным направлениям, определяемым президиумом РАН и в рамках госзадания (AAAA–A18–118032090072–9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Валеева Э.И., Московченко Д.В.* Зональные особенности растительного покрова Тазовского полуострова и его техногенная трансформация // Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. 2009. № 9. С. 174–190.
- Волкова В.С.* Палиностратиграфия четвертичных отложений полуостровов Ямал и Тазовский (проблемы плиоцена) // Геология и геофизика. 1999. № 40. С. 1119–1134.
- Гидрология заболоченных территорий зоны многолетней мерзлоты Западной Сибири / Ред. Новиков С.М. СПб.: ВВМ, 2009. 536 с.
- Голубятников Л.Л., Казанцев В.С.* Вклад тундровых озёр Западной Сибири в метановый бюджет атмосферы // Изв. РАН. Физика атмосферы и океана. 2013. Т. 49. № 4. С. 430–438.
- Голубятников Л.Л., Маммарелла И.* Потоки метана в атмосферу из озёр Фенноскандии // Изв. РАН. Физика атмосферы и океана. 2018. Т. 54. № 6. С. 672–683.
- Деттер Г.Ф.* Экономика северного оленеводства Ямала: проблемы и возможности // Науч. вестник ЯНАО. 2017. № 4(97). С. 4–16.

- Земцов А.А.* Геоморфология Западно-Сибирской равнины (Северная и Центральная части). Томск: Изд-во ТГУ, 1976. 344 с.
- Каверин Д.А., Пастухов А.В., Какунов Н.Б., Калмыков А.В.* Особенности формирования почв в котловине осушенного озера Опытное (Европейский северо-восток России) // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2014. Т. 16. № 5. С. 43–50.
- Кизяков А.И., Лейбман М.О.* Рельефообразующие криогенные процессы: обзор литературы за 2010–2015 годы // Криосфера Земли. 2016. Т. 20. № 4. С. 45–58.
- Классификация и диагностика почв России / Составители: Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
- Кобелева Н.В.* Крупномасштабное эколого-фитоценологическое картографирование на основе аэроснимков и ГИС-технологий (на примере центральной части Тазовского полуострова) // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2012. Т. 14. № 1. С. 1607–1617.
- Корниенко С.Г., Якубсон К.И.* Исследование трансформации растительности в районах Тазовского полуострова по данным космической съемки // Арктика: экология и экономика. 2011. № 4. С. 46–57.
- Кравцова В.И., Родионова Т.В.* Исследование динамики площади и количества термокарстовых озер в различных районах криолитозоны России по космическим снимкам // Криосфера Земли. 2016. Т. 20. № 1. С. 81–89.
- Лисс О.Л., Абрамова Л.И., Аветов Н.А., Березина Н.А., Инишева Л.И., Курнишкова Т.В., Служа З.А., Толпышева Т.Ю., Шведчикова Н.К.* Болотные системы Западной Сибири и их природоохранное значение. Тула: Гриф и К°, 2001. 584 с.
- Лойко С.В., Кузьмина Д.М., Климова Н.В.* Ландшафтная характеристика котловин осушенных термокарстовых озер южной тундры Западной Сибири // Науч. вестник ЯНАО. 2018. № 4. С. 13–17.
- Магомедова М.А., Морозова Л.М., Эктова С.Н., Ребристая О.В., Чернядьева И.В., Потемкин А.Д., Князев М.С.* Полуостров Ямал: растительный покров. Тюмень: Сити-пресс, 2006. 360 с.
- Мельцер Л.И.* Зональное деление растительности тундр Западно-Сибирской равнины // Растительность Западной Сибири и ее картографирование. Новосибирск: Наука, 1984. С. 7–19.
- Московченко Д.В., Арефьев С.П., Глазунов В.А., Тигеев А.А.* Изменение состояния растительности и геоэкологических условий Тазовского полуострова (восточная часть) за период 1988–2016 гг. // Криосфера Земли. 2017. Т. 13. № 6. С. 3–13.
- Павлов А.В.* Мониторинг криолитозоны. Новосибирск: Гео, 2008. 229 с.
- Павлов А.В., Малкова Г.В.* Динамика криолитозоны России в условиях современных изменений климата XX–XXI веков // Изв. РАН. Сер. геогр. 2010. № 5. С. 44–51.
- Полевая геоботаника. Т. 3 / Ред. Лавренко Е.М., Корчагин А.А. М., Л.: Наука, 1964. 530 с.
- Романова Е.А., Быбина Р.Т., Голицына Е.Ф., Иванова Г.М., Усова Л.И., Трушников Л.Г.* Типологическая карта болот Западно-Сибирской равнины. М-б 1 : 2500000. Л.: ГУГК, 1977. 1 л.
- Соромотин А.В., Бродт Л.В.* Мониторинг растительного покрова при освоении нефтегазовых месторождений по данным многозональной съемки Landsat // Вестник ТюмГУ. 2018. Т. 4. № 1. С. 37–49.
- Телятников М.Ю.* Растительность типичных тундр полуострова Ямал. Новосибирск: Наука, 2003. 122 с.
- Тыртиков А.П.* Влияние растительного покрова на температуру грунтов на севере Западной Сибири // Природные условия Западной Сибири. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. С. 112–118.
- Хименков А.Н., Власов А.Н.* Влияние неоднородностей природной среды на динамику криолитозоны // Криосфера Земли. 2007. Т. 11. № 1. С. 21–28.
- Хренов В.Я.* Почвы криолитозоны Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 2011. 211 с.
- Bindoff N.L., Stott P.A., AchutaRao K.M., Allen M. R., Gillett N., Gutzler D., Hansingo K., Hegerl G., Hu Y., Jain S., Mokhov I.I., Overland J., Perlwitz J., Sebbari R., Zhang X.* Detection and Attribution of Climate Change: from Global to Regional // Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. P. 867–952.
- Callaghan T.V., Kulikova O., Rakhmanova L., Jørgensen E.T., Labba N., Kuhmanen L.-A., Kirpotin S., Shadyko O., Burgess H., Rautio A., Hindshaw R.S., Golubyatnikov L.L., Marshall G.J., Lobanov A., Soromotin A., Sokolov A., Sokolova N., Filant P., Johansson M.* Improving dialogue among researchers, local and indigenous peoples and decision makers to address issues of climate change in the North // Ambio. 2020. V. 49. P. 1161–1178.
- Golubyatnikov L.L., Zarov E.A., Kazantsev V.S., Filippov I.V., Gavrilov G.O.* Analysis of landscape structure in the tundra zone for western Siberia based on satellite data // Izv. Atmos. Ocean. Phys. 2015. V. 51. № 9. P. 969–978.
- Gentsch N., Mikutta R., Alves R.J.E., Barta J., Capek P., Gittelet A., Hugelius G., Kuhry P., Lashchinskiy N., Palmtag J., Richter A., Šantrůcková H., Schneckner J., Shibistova O., Urich T., Wild B., Guggenberger G.* Storage and transformation of organic matter fractions in cryoturbated permafrost soils across the Siberian Arctic // Biogeosciences. 2015. V. 12. P. 4525–4542.
- IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps // World Soil Resources Reports. 2015. № 106. 192 p.
- Peteet D., Andreev A., Bardeen W., Mistretta F.* Long-term Arctic peatland dynamics, vegetation and climate history of the Pur-Taz region, western Siberia // Boreas. 1998. V. 27. P. 115–126.
- Schilder J., Bastviken D., van Hardenbroek M., Kankaala P., Rinta P., Stötter T., Heiri O.* Spatial heterogeneity and lake morphology affect diffusive greenhouse gas emission estimates of lakes // Geophys. Res. Lett. 2013. V. 40. P. 5752–5756.

## **Vegetation and Soils of Tundra Landscapes in Pur-Taz Interfluvial Region**

**E. A. Zarov<sup>1</sup>, L. L. Golubyatnikov<sup>2, #</sup>, E. D. Lapshina<sup>1</sup>, and S. V. Loyko<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Yugra State University, Chekhov st., 16, Khanty-Mansiysk, 628012 Russia*

<sup>2</sup>*Obukhov Institute of Atmospheric Physics of the RAS, Pyzhevsky per., 3, Moscow, 119017 Russia*

<sup>3</sup>*Tomsk State University, Lenin prosp., 36, Tomsk, 634050 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: golub@ifaran.ru*

The tundra territory between the Pur and Taz Rivers are analyzed for the landscape diversity on the basis of remote sensing data and field material. For each land unit (microlandscape) the vegetation and microrelief are described, soil types and projective covers of plant species are defined, and depths of thawing layer are measured. For the waterlogged microlandscapes depths of water table, values of acidity (pH) and electrical conductivity (EC) of water are defined.

*Keywords:* vegetation, soils, landscapes, microlandscapes, satellite images, tundra ecosystems, Pur-Taz interfluvial region

УДК 591.111:599.323.4

## СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ДОМОВОЙ МЫШИ (*Mus musculus* L.) В УСЛОВИЯХ ГОР ЦЕНТРАЛЬНОГО КАВКАЗА

© 2022 г. М. М. Емкужева\*, @, Ф. А. Темботова\*, Э. Ж. Темботова\*

\*Институт экологии горных территорий им. А.К. Темботова РАН, ул. И. Арманд, 37а, Нальчик, 360051 Россия

@E-mail: emkugeva\_m@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2018 г.

После доработки 25.05.2021 г.

Принята к публикации 25.05.2021 г.

Исследована изменчивость функционирования кроветворной системы (эритропоэз костного мозга) и показателей крови домовой мыши (*Mus musculus* L.) в горах Центрального Кавказа (1800 м над ур. м.) в зависимости от сезона года. Выявлена выраженная сезонная динамика в деятельности костного мозга и периферической крови с выделением двух периодов: холодного (зима) и теплого (весна, лето, осень). Для вида наиболее энергозатратным года является зимний сезон, что проявляется в максимальной активности костного мозга, приводящей к повышению дыхательной функции крови. Наблюдаемое в этот период максимальное увеличение кислородной емкости крови, обусловливается выходом в периферическую кровь большого количества ретикулоцитов – молодых эритроцитов. При этом минимальные в годовом цикле размеры эритроцитов способствуют увеличению общей поглотительной поверхности для кислорода.

Ключевые слова: система крови, костный мозг (эритропоэз), показатели крови, ретикулоциты, сезон года, адаптация, Центральный Кавказ, *Mus musculus* L.

DOI: 10.31857/S1026347021060056

Сезонные изменения условий существования, которые обуславливают как климатические изменения, так и преобразования в кормовой базе животных – один из важнейших факторов эволюционной экологии грызунов. При этом оценка признаков системы крови, с одной стороны, может характеризовать реакцию организма на изменяющиеся условия среды обитания, с другой – характеризовать эти условия (Лохмиллер, Мошкин, 1999; Тарахтий, Давыдова, 2007). Особый интерес подобные исследования представляют в условиях горных территорий, где на сезонную цикличность накладывается пониженное парциальное давление кислорода. При адаптации горные популяции широко распространенных видов используют все механизмы компенсации кислородной недостаточности (Большаков, 1972). Так, домовая мышь (*Mus musculus* L.), относящаяся к группе настоящих синантропов (Кучерук, 1988), освоила широкий спектр природных и антропогенных ландшафтов Центрального Кавказа, в том числе и в высотном направлении (выше 2000 м над ур. м), причем в естественных биотопах выше 1500 м над ур. м. не встречается (Темботов, Шхашемишев, 1984 и наши данные). К числу лимитирующих факторов, определяющих возможность

существования зверьков в жилищах человека, по данным литературы, относятся низкие температуры на севере и высота над уровнем моря в горах (Домовая мышь, 1994). Приспособление вида к условиям среднегорий Центрального Кавказа обеспечивается высокой эритропоэтической активностью костного мозга, большим числом ретикулоцитов, поступающих в периферическую кровь, что сопровождается более высоким содержанием гемоглобина в крови, за счет более крупных по объему эритроцитов, без увеличения их количества, по сравнению с предгорьями. При этом изменения индекса сердца не выявлено. Данный показатель имеет высокие значения как в предгорьях, так и среднегорьях (Темботова и др., 2007а, 2007б; Емкужева, 2013). Г. Маклин и А. Ли (Maclean, Lee, 1973) показали зависимость состояния крови домовой мыши Австралии от сезона года, температуры среды и двигательной активности: концентрация гемоглобина, гематокрит и объем циркулирующей крови зимой существенно выше, чем летом. В предгорьях Центрального Кавказа у вида также выявлена сезонность в изменчивости показателей красной крови (Темботов и др., 2009). В горах Кавказа сезонная изменчивость системы крови домовой мыши не изучена.

**Таблица 1.** Результаты двухфакторного многомерного анализа

Эффекты	F	P	df
Пол	1.8	0.087	10
Сезон	12.0	0.000	30
Взаимодействие факторов	2.1	0.000	30

В этой связи цель работы – оценить количественно-качественные морфологические показатели кроветворной ткани и периферической крови домашней мыши (*M. musculus* L.) и их сезонную изменчивость в условиях среднегорий Центрального Кавказа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования, согласно типизации А.К. Темботова (Соколов, Темботов, 1989), проводили в условиях субальпийского пояса эльбрусского варианта Центрального Кавказа: пос. Эльбрус, высота местности – 1800 м над ур. м., GPS координаты – 43°15' с.ш., 42°38' в.д. В работе использовали 169 особей домашней мыши (*Mus musculus* L.) с охватом всех сезонов года: зима ♂♂ – 17, ♀♀ – 14; весна ♂♂ – 14, ♀♀ – 12; лето ♂♂ – 31, ♀♀ – 28; осень ♂♂ – 23, ♀♀ – 30. Животных отлавливали стандартным методом ловушко-линий (Карасева, Телицина, 1996) в домах и хоз. постройках местных жителей. Изучены взрослые особи, возраст которых определяли на основании комплекса признаков стертости зубов, массы тела, состояния генеративных органов. Беременные самки включены в анализ, поскольку при сравнении изученных параметров значимых различий между беременными и небеременными самками не выявлено. Домашняя мышь в условиях гор Центрального Кавказа размножается круглогодично, пик приходится на весенне-летний период и снижение – в осенне-зимний период. Доля беременных от общего числа самок составляет: зимой – 11.1%, весной – 58.3%, летом – 33.3%, осенью – 2.7%.

Исследование показателей системы крови проводили в течение суток после отлова. Костный мозг получали из бедренной кости (Тодоров, 1968). Препараты костного мозга готовили на предметных стеклах (Воробьев, 1985), и окрашивали комбинированным методом (по Май-Грюнвальд и Романовскому-Гимза). Морфологический анализ клеток костного мозга (соотношение клеток лейкоцитарного и эритробластного ряда, эритробластограмма) проводили с помощью микроскопа Микмед-5, окуляр – 10, объектив – 100 с масляной иммерсией (Берчану, 1985; Воробьев, 1985; Меньшиков, 2012). Ретикулоциты крови (RET) и их парциальный состав изучали по Е.Н. Мосягиной (1962) на микропрепаратах, окрашенных 1%-ным

раствором бриллиант-крезилблау в физиологическом растворе (рН 7.3). Расчет проводили на 10 тыс. эритроцитов. По степени зрелости различали 5 групп ретикулоцитов (RET 0, RET I, RET II, RET III, RET IV), по Л. Гейльмейеру (Тодоров, 1968). Концентрацию гемоглобина (HGB, г/л) определяли унифицированным гемоглобин-цианидным методом на гемоглобинометре фотометрическом Мини ГЕМ-540, гематокритное число – соотношение плазмы и форменных элементов (HCT, об. %) – микрометодом на гематокритной центрифуге СМ-70, подсчет количества эритроцитов (RBC, млн в 1 мкл) проводили в камере Горяева. Диаметр эритроцитов (микрометры) измерял прямым микрометрическим методом с помощью винтового окуляра-микрометра МАВ 1–16× на сухих окрашенных препаратах крови, с использованием микроскопа Микмед-5 с масляной иммерсией. Измеряли диаметр 100 различных эритроцитов, результаты распределяли по группам (по величине диаметра эритроцитов).

Рассчитывали среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН) в пикограммах (пг), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (МСНС) в г/л, средний объем эритроцита (MCV) в кубических микрометрах (мкм<sup>3</sup>), (Кост, 1975; Берчану, 1985; Воробьев, 1985; Иванова, 1995; Риган и др., 2000). Среднюю площадь эритроцита рассчитывали по Берчану (1985) и выражали в мкм<sup>2</sup>.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ “Statistica-10 for Windows”. Влияние факторов проанализировано многофакторным дисперсионным анализом. При оценке различий показателей использовали Tukey-тест. Для всех статистических тестов принят 5% уровень значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двухфакторный дисперсионный анализ (Factorial ANOVA) показал, что система крови домашней мыши в условиях среднегорья Центрального Кавказа претерпевает значительные сезонные изменения. Влияние пола животных незначимо (табл. 1).

**Система крови домашней мыши в зимний период (январь–февраль).** Активная часть паренхимы костного мозга у всех изученных домашних мышей в зимний период была густо заполнена кроветворными клетками. Эритроидные клетки на препаратах равномерно располагались между другими кроветворными элементами лейкоцитарного ряда. На каждое поле зрения их приходилось до 20–30, среди которых 2–7 клеток эритроидного ряда находились в стадии митоза. Жировые клетки встречались не в каждом поле зрения. В парциальном соотношении клеточных групп костного мозга эритроидные клетки составили 10% у самцов и

**Таблица 2.** Сезонная динамика параметров костного мозга домашней мыши (*Mus musculus*) в условиях среднегорий Центрального Кавказа

Параметры		Пол	Среднее значение				$p < 0.05$	
			зима (1)	весна (2)	лето (3)	осень (4)		
Эритробластный ряд в % ко всем ядерным клеткам костного мозга		♂	20.10	18.69	19.54	19.63	1-2, 2-3	
		♀	20.26	19.11	21.00	18.70	1-2, 2-3, 3-4	
Эритроблостограмма	Эритробласты, %	♂	3.64	2.87	2.00	3.17	1-2, 2-3, 3-4, 1-3,	
		♀	3.33	2.66	2.17	3.20	1-2, 2-3, 3-4, 1-3	
	Базофильные Нормобласты, %	♂	20.23	17.19	15.76	15.60	1-2, 2-3, 1-3	
		♀	19.31	16.38	15.45	17.52	1-2, 3-4, 1-3	
	Полихроматофильные нормобласты, %	♂	30.91	31.35	30.29	29.03	2-3, 3-4	
		♀	32.06	31.97	30.71	29.52	1-3, 1-4	
	Оксифильные нормобласты, %	♂	52.35	52.30	53.62	55.41	3-4	
		♀	52.80	51.21	52.68	56.96	3-4	
	Соотношение лейкопоз/эритропоз		♂	3.97 : 1	4.35 : 1	4.11 : 1	4.09	
			♀	3.94 : 1	4.23 : 1	3.76 : 1	4.34 : 1	

20.26% у самок, оставшиеся ~80% приходятся на лейкоцитарный ряд (табл. 2).

В эритрограмме выявлен сдвиг в левую сторону за счет молодых клеток (эритробластов и базофильных нормобластов). Содержание ретикулоцитов (молодых эритроцитов) в периферической крови высокое и составляет 40.2‰ у самцов и 39.3‰ у самок. В парциальном составе преимущественное содержание ретикулоцитов второй и третьей стадий. Число эритроцитов в 1 мкл крови у самцов – 8.975 млн и у самок – 8.870 млн, при этом они небольших размеров (5.45 и 5.51 мкм соответственно). Содержание гемоглобина, в среднем, высокое, у особей обоих полов (табл. 3). Также высока респираторная функция крови. Средняя площадь эритроцитов зимой составила 91.42 мкм<sup>2</sup> у самцов, у самок – 93.00 мкм<sup>2</sup>.

По системе крови в зимний период по полу различия отмечены по эритроблостограмме ( $p < 0.021$ ), ретикулоцитам I стадии ( $p < 0.015$ ) и диаметру эритроцитов ( $p < 0.015$ ).

Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови показал, что они нормохромные, и процесс их поступления интенсивен, о чем свидетельствует наличие 6–14 полихроматофильных эритроцитов в каждом поле зрения. В эритроцитах обнаружены также включения телец Хауелла-Жолли (у 47.37% изученных животных). Все это свидетельствует о высокой активности эритропоэза в зимний период.

**Система крови домашней мыши в весенний период (апрель–май).** В весенний период (как и зимой) на препаратах костного мозга на фоне зрелых

эритроцитов равномерно располагались кроветворные клетки. Эритроидные элементы встречались в каждом поле зрения в количестве до 10–20, 2–3 из которых на стадии митоза. Жировые клетки встречались реже, чем зимой. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности эритропоэза в весенний период, в сравнении с зимним, не только за счет уменьшения общего количества эритроидных клеток в костном мозге, но и за счет снижения доли более молодых форм – эритробластов и базофильных нормобластов – у обоих полов (табл. 2). При этом весной также происходят изменения в содержании ретикулоцитов в периферической крови при сравнении с зимними показателями. Так, общее количество ретикулоцитов весной уменьшается, снижаются клетки первой стадии (достоверно у самцов, на уровне тенденции – у самок), а ретикулоциты третьей (у самцов  $p < 0.001$ , у самок  $p < 0.0004$ ) и четвертой стадий ( $p < 0.005$  и  $p < 0.0001$  соответственно) – увеличиваются (табл. 3).

В периферической крови содержание гемоглобина, число эритроцитов, гематокритный показатель снижаются весной по отношению к зиме. Что касается диаметра эритроцитов, то этот показатель весной достоверно увеличивается у обоих полов (табл. 3). Средняя площадь эритроцитов увеличивается, и более значительно у самок. Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, средний объем эритроцитов и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах остаются на уровне зимних показателей (табл. 3). Респираторная функция весной снижается по отношению к

**Таблица 3.** Сезонная динамика параметров периферической крови домашней мыши (*Mus musculus* L.) в условиях среднегорий Центрального Кавказа

Параметры	Пол	Среднее значение				$p < 0.05$	
		зима (1)	весна (2)	лето (3)	осень (4)		
Общее количество ретикулоцитов (RET, ‰)	♂	39.98	31.82	39.53	37.84	1-2, 2-3	
	♀	39.34	36.10	39.80	39.32	1-2, 2-3	
Парциальный состав	RET 0 (‰)	♂	—	—	—	—	
		♀	—	—	—	—	
	RET I (‰)	♂	1.29	0.56	0.47	1.13	1-2, 2-3, 3-4, 1-3
		♀	0.75	0.69	0.46	0.76	3-4
	RET II (‰)	♂	17.12	4.22	7.76	5.19	1-2, 2-3, 1-3
		♀	16.49	4.42	7.47	5.45	1-2, 2-3, 1-3
	RET III (‰)	♂	13.63	17.41	16.53	16.29	1-2, 2-3, 1-3
		♀	13.88	20.18	16.33	17.67	1-2, 1-3
	RET IV (‰)	♂	7.56	9.42	8.96	10.06	1-2, 2-3, 1-3
		♀	7.97	12.20	9.10	9.63	1-2, 3-4, 1-3
	HGB, г/л	♂	170.94	161.43	159.37	160.39	1-2, 1-3
		♀	173.77	160.92	160.64	161.23	1-2, 2-3, 1-3
RBC, млн в 1 мкл	♂	8.975	8.510	8.129	8.102	1-3	
	♀	8.870	7.858	8.048	8.115	1-2	
HCT, об/‰	♂	55.47	53.08	51.29	52.35	1-2, 1-3	
	♀	54.54	52.82	51.13	52.52	1-3	
Диаметр эритроцитов, мкм	♂	5.45	5.56	5.90	5.67	1-2, 2-3, 3-4, 1-3	
	♀	5.51	5.64	5.83	5.68	1-2, 2-3, 3-4, 1-3	
MCH, пг	♂	19.38	19.33	19.77	19.54		
	♀	20.17	20.52	19.80	19.91		
MCV, мкм <sup>3</sup>	♂	61.68	61.91	64.87	65.38		
	♀	63.24	64.93	64.18	64.83		
MCHC, г/л	♂	31.01	31.27	31.05	30.65		
	♀	31.89	31.09	31.26	30.92		
F, усл. ед.	♂	45.75	41.35	44.88	41.22	1-2, 3-4	
	♀	47.73	40.50	43.30	42.82	1-2	
Средняя площадь эритроцитов, мкм <sup>2</sup>	♂	91.42	93.33	99.29	96.18	2-3, 3-4	
	♀	93.00	95.95	97.27	95.32	1-3	

зиме ( $p < 0.033$ , как у самок, так и у самцов). В дискриминантном анализе по показателям костного мозга в качестве различающих весенний и зимний сезоны признаков выступают базофильные нормобласты ( $F = 23.08$  при  $p < 0.033$  у самцов;  $F = 19.26$  при  $p < 0.004$  у самок). По периферической крови – общее количество ретикулоцитов ( $F = 114.89$  при  $p < 0.000$ ), ретикулоциты III стадии

( $F = 57.49$  при  $p < 0.000$ ) и диаметр эритроцитов ( $F = 19.59$  при  $p < 0.031$ ) у самцов, и ретикулоциты II стадии ( $F = 17.85$  при  $p < 0.001$ ) у самок. Качество различения во всех моделях высокое (83–90%).

Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови в весенний период свидетельствует, что поступающие клетки (эритроциты) из костного мозга нормохромные. Полихромато-

фильные эритроциты, которые встречались в каждом поле зрения, свидетельствуют о нормальном процессе обновления эритроцитов. В эритроцитах (как и зимой) обнаружены тельца Хауелла-Жолли, но в процентном содержании их значительно больше (весной — 79.31%). Половые различия по параметрам системы крови в данном сезоне слабо выражены.

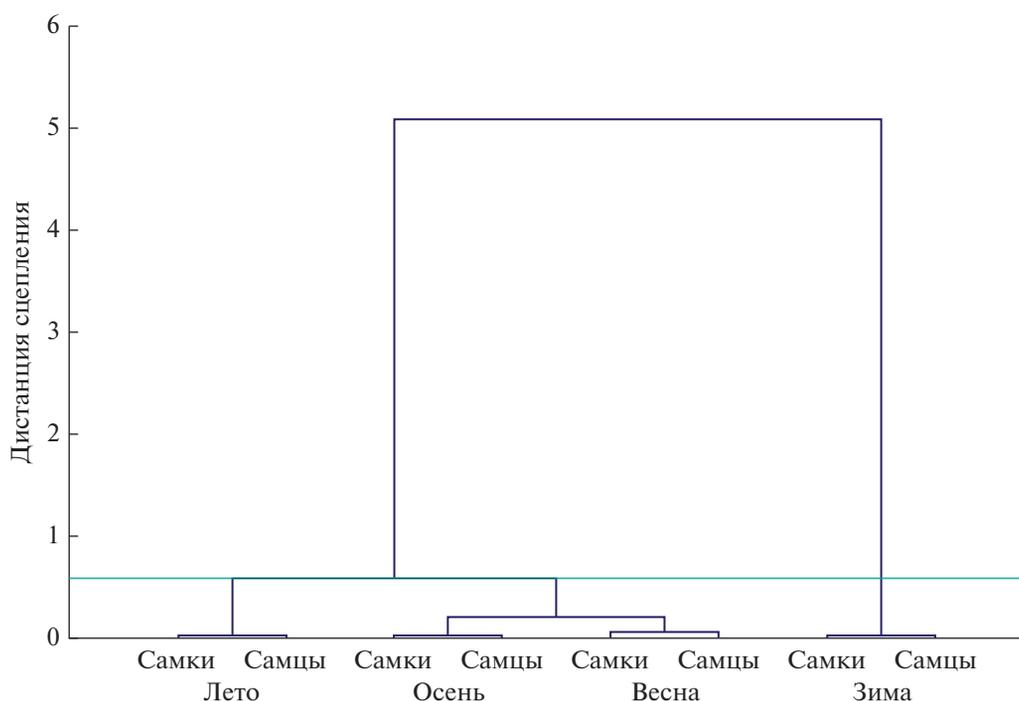
**Система крови доменной мыши в летний период (июль–август).** Морфологический анализ костного мозга летом показал равномерное распределение на препаратах кроветворных клеток. Эритроидные клетки встречались в количестве до 30 в каждом поле зрения. В стадии митоза встречались 2–5 клеток в поле зрения. В летний период в кроветворной системе доменной мыши происходят дальнейшие адаптивные преобразования в сравнении с весенним периодом. Летом активизируется эритропоэз костного мозга, повышается общее количество эритроидных клеток в костном мозге у обоих полов. Их количество составило 19.54% у самцов и 21.00% — у самок (табл. 2). В эритрограмме меняется соотношение эритроидных клеток. Снижается количество эритробластов (у обоих полов  $p < 0.000$ ), базофильных нормобластов (достоверно у самцов, у самок — на уровне тенденции). Численные данные по более зрелым формам — полихроматофильным и оксифильным нормобластам — очень близки с весенними показателями. Летом в периферическую кровь по результатам дисперсионного анализа поступает большее, по сравнению с весной, количество ретикулоцитов (табл. 3). Увеличивается и доля молодых стадий (вторая стадия), а третья и четвертая стадии по своим численным данным близки с весенними показателями (табл. 3). Эритроциты летом значительно увеличиваются в размерах у обоих полов, по сравнению с весной ( $p < 0.0003$ ), диаметр их составляет 5.90 мкм у самцов и 5.83 мкм у самок, площадь этих клеток летом достигает 99.29 мкм<sup>2</sup> у самцов и 97.27 мкм<sup>2</sup> у самок. Содержание гемоглобина в крови, число эритроцитов и гематокритный показатель остаются близкими весенним данным (табл. 3). Близки летние и весенние показатели по среднему содержанию гемоглобина, средней концентрации гемоглобина в эритроците и среднему объему эритроцитов. Респираторная функция крови у обоих полов имеет тенденцию к повышению по отношению к весенним данным. Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови показал, что они нормохромные, как и в предыдущие сезоны, процесс поступления молодых эритроцитов (полихроматофильных) увеличен. В эритроцитах, как и весной, обнаружены тельца Хауелла-Жолли у 57% изученных животных, что значительно меньше, чем в весенний период. Половые различия по изученным параметрам системы крови в данном сезоне не отмечены. В результате дискриминантного анализа различающимися при-

знаками между сезонами (весна–лето) по системе крови установлены: эритробласты ( $F = 26.06$  при  $p < 0.0002$  у самцов), общее количество ретикулоцитов (у самцов  $F = 14.39$  при  $p < 0.0004$  у самок  $F = 14.46$  при  $p < 0.003$ ), и ретикулоциты II стадии 14.46 при  $p < 0.0003$ , самок  $F = 13.26$  при  $p < 0.005$ ). Корректная дискриминация и качество моделей — 60–70%.

**Система крови доменной мыши в осенний период.** Осенью на препаратах костного мозга также наблюдалось равномерное распределение кроветворных клеток. Эритроидные клетки встречались в каждом поле зрения в количестве до 20–25, отмечены клетки в стадии митоза (1–3 в каждом поле зрения). По результатам дисперсионного анализа соотношение клеток эритроидного и лейкоцитарного ряда в костном мозге остается близким летним значениям у самцов, у самок отмечается понижение этих показателей ( $p = 0.000$ ). Меняется качественный состав эритрограммы: повышается содержание эритробластов, базофильных (достоверно лишь у самцов) и оксифильных нормобластов нормобластов. Осенью поступление ретикулоцитов в кровь у доменной мыши имеет тенденцию к снижению у обоих полов по сравнению с летними данными. Изменения наблюдаются и в парциальном составе ретикулоцитов: увеличиваются клетки первой стадии. В крови осенью содержание гемоглобина, число эритроцитов, гематокритный показатель близки к летним значениям. Значительные сезонные изменения в осенний период происходят в крови с диаметром и площадью эритроцитов у особей обоих полов. Осенью эти показатели достоверно снижаются ( $p < 0.0001$ ) по отношению к летним данным. Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови показал, что они нормохромные и процесс поступления молодых эритроцитов (полихроматофильных) не нарушен. Тельца Хауелла-Жолли в эритроцитах встречаются, но меньше, чем летом — 49.18%. Различия по полу в системе крови осенью отмечены по эритропоэтической активности. Дискриминирующими признаками по системе крови выступают эритробласты (у самцов 25.39 при  $p < 0.0001$ , у самок  $F = 25.51$  при  $p < 0.0004$ ) и диаметр эритроцитов (у самцов 9.43 при  $p < 0.0004$ , у самок  $F = 12.34$  при  $p < 0.010$ ) у обоих полов. Корректная дискриминация высока во всех случаях сравнения (82–91%).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У доменной мыши в условиях в среднегорий Центрального Кавказа система крови подвержена сезонной изменчивости. Анализ динамики кроветворения показал высокую активность эритропоэза во все сезоны года, при этом максимальные значения отмечаются зимой и летом, а в переходные сезоны — весной и осенью — более низкие.



**Рис. 1.** Дендрограмма сходства (Ward's method, 1-Pearson – r) между выборками *M. musculus* по показателям системы крови на основании дистанции Махаланобиса в разные сезоны года.

Сходный вектор изменчивости наблюдается и в динамике ретикулоцитов. Следует отметить, что сезонный ритм изменений проявляется не только в количественных характеристиках эритропоэза, но и в качественном составе клеток. Так, при высокой активности эритропоэза, в эритрограмме костного мозга в зимний период содержание эритробластов и базофильных нормобластов, а также количество клеток в стадии митоза достоверно выше, чем летом, что свидетельствует о более активном эритропоэзе костного мозга зимой. Это подтверждается данными по ретикулоцитам. При большом количестве ретикулоцитов в периферической крови, как и летом, увеличение в их парциальном составе I и II стадий (более молодых форм) также указывает на напряжение эритропоэза. Тем самым, в периферическую кровь доменной мыши поступает большое количество эритроцитов, но меньших размеров. Тренды сезонной изменчивости количества эритроцитов, гематокритной величины и концентрации гемоглобина в крови сходны: максимальные значения достигаются в зимний период и падение до минимальных – в летний. Респираторная функция крови, а соответственно, уровень потребления кислорода у доменной мыши также зимой высокие, кислородная емкость периферической крови в единице объема максимальна. Циркулирование в крови “мелких” эритроцитов в осенне-зимний период объяснимо с позиций общего физико-химического закона: чем больше площадь соприкосновения двух фаз,

тем выше скорость диффузии. Большое количество “мелких” эритроцитов в 1 мкл крови не препятствует прохождению крови через капиллярное ложе и увеличивает общую поглотительную поверхность для кислорода. Чем меньше абсолютные размеры эритроцитов, тем больше скорость поглощения кислорода гемоглобином при прохождении крови через легкие, что необходимо для нормального поддержания организма в холодное время года и согласуется с данными литературы (Holland, Forster, 1966; Тарахтий и др., 2009).

Кластерный анализ по показателям системы крови доменной мыши на основании дистанции Махаланобиса (рис. 1) подтверждает выше сказанное и, как видно из рисунка, наиболее обособленной является зимняя выборка, что справедливо для особей обоих полов.

Учитывая, что средняя предпочитаемая температура у доменной мыши, согласно данным В.А. Стальмаковой (1978), значительно выше, чем у ряда других грызунов, обитающих в естественных условиях (рыжая и обыкновенная полевки, лесная и желтогорлая мыши), также как и чувствительность к холоду (Калабухов, 1969), можно предположить, что зимний период для вида в изученных условиях среднегорий также является наиболее неблагоприятным и энергозатратным. Высокий эритропоэз с продукцией большого количества мелких эритроцитов в зимний период

года, когда температура среды значительно снижается, был выявлен в природе у ряда грызунов (Rewkieweir-Dziarska, 1975; Темботова и др., 1979, 1982; Темботова, Темботов, 1987, 1988; Темботов и др., 2009). Следует отметить, что степень активности эритропоэза в зимний период у разных видов разная, что, видимо, можно объяснить видо-специфичностью.

В летний период в периферическую кровь, в результате активного эритропоэза, из костного мозга поступает большое количество молодых эритроцитов (ретикулоцитов), что свидетельствует о значительном обновлении крови. Эти эритроциты качественно другие в сравнении с зимними: они более крупные по своим размерам (диаметр, средняя площадь), но концентрация и содержание гемоглобина в них поддерживаются на уровне зимних значений. Количество эритроцитов, содержание гемоглобина в 1 мкл крови и гематокритный показатель летом ниже, по сравнению с зимними данными, и достигают минимальных значений в годовом цикле (за редким исключением). Анализ гематокритной величины показывает увеличение плазмы крови (~5%) летом.

Наиболее стабильными в течение года из изученных показателей системы крови домовой мыши в среднегорьях Центрального Кавказа являются средний объем эритроцитов, концентрация и содержание гемоглобина в эритроцитах.

Обнаруженные в эритроцитах домовой мыши в условиях гор Центрального Кавказа тельца Хауелла-Жолли (у 70% особей весной, в другие сезоны — до 50%) являются мелкими остатками ядерного материала (Гольдберг, Гольдберг, 1975; Риган и др., 2000). Присутствие их, возможно, объясняется повышенной скоростью продуцирования эритроцитов в момент регенеративного ответа. Их наличие в эритроцитах также отмечено нами ранее у малой лесной мыши на высоте 2000 м над ур. м. и домовой мыши (700 м над ур. м.) на Центральном Кавказе (Темботов и др., 2005; Темботова и др., 2007а). Риган с соавт. (2000) связывают наличие телец Хауелла-Жолли с неспособностью макрофагов полностью удалять ядерный материал из эритроцитов.

Сравнение сезонной динамики показателей периферической крови домовой мыши в среднегорьях и предгорьях Центрального Кавказа показало, что механизм адаптации к сезонным изменениям сходный: увеличение кислородной емкости крови зимой. Однако в ее способах обеспечения, а соответственно и в трендах изменчивости показателей крови у вида на двух высотных уровнях имеются некоторые различия. Как и в среднегорьях, зимой максимальные в предгорьях значения отмечены по содержанию гемоглобина, количеству эритроцитов, гематокритной величины, минимальные — по диаметру эритроцитов (Темботов

и др., 2009). Стабильные в среднегорьях качественные характеристики содержания гемоглобина в эритроцитах (МСН, МСНС) претерпевают сезонные изменения: в зимний период увеличиваются, достигая максимальных в году значений. Следует отметить, что показатели красной крови (содержание гемоглобина, его концентрация и содержание в эритроците) в предгорьях даже зимой не достигают значений, характерных для среднегорий. Обитание домовой мыши в среднегорьях Кавказа вызывает напряжение со стороны эритрона и ускоренную регенерацию крови (Емкужева, 2013). Можно полагать, что обитание в горах требует высокого энергообмена в течение всего года.

\* \* \*

В функционировании системы крови синантропного вида — домовой мыши в условиях среднегорий (1800 м над ур. м.) Центрального Кавказа в течение годового цикла обнаружены следующие адаптивные преобразования.

У вида выявлена выраженная сезонная динамика деятельности костного мозга и состояния периферической крови. Годовой цикл делится на три периода: холодный (зима), теплый (лето) и межсезонье (весна, осень). Наиболее энергозатратным сезоном года для вида, как и у грызунов обитающих в естественной среде, является зимний период, что проявляется в максимальной активности костного мозга, приводящей к повышению респираторной функции крови и, соответственно, увеличению ее кислородной емкости. Как и у ряда других грызунов, активность работы костного мозга в зимний период сопровождается выработкой наибольшего числа эритроцитов с наименьшим их диаметром и высоким уровнем гемоглобина, что способствует более эффективному обеспечению организма кислородом. Летом состояние красной крови качественно иное, менее активный костный мозг вырабатывает наиболее крупные по диаметру эритроциты, но число их меньше.

В течение четырех месяцев с конца зимы к началу лета происходит значительное обновление эритроцитов в периферической крови, в результате эритродиереза большое число мелких эритроцитов замещается крупными, но в меньшем количестве. Осенью происходит обратный процесс.

Растянутый период размножения, охватывающий весь годовой цикл, практически не сказывается на состоянии системы крови. Установленные закономерности характерны для животных обоих полов.

В результате выявленных количественно-качественных сезонных изменений в кроветворении и периферической крови домовой мыши поддерживаются стабильные показатели количе-

ства гемоглобина в эритроцитах и в значительной степени обуславливает устойчивое функционирование организма в условиях гор Центрального Кавказа.

Из полученных данных можно заключить, что несмотря на круглогодичное обитание домовых мыши в жилищах человека в среднегорьях Центрального Кавказа система крови домовых мыши сохраняет сезонность.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берчану Шт.* Клиническая гематология. Бухарест: Медицинское изд-во, 1985. 1222 с.
- Большаков В.Н.* Пути приспособления мелких млекопитающих к горным условиям. М.: Наука, 1972. 199 с.
- Воробьев А.И.* Руководство по гематологии. М. 1985. Т. 1. 353 с.
- Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д.* Справочник по гематологии. Томск: Томский гос. ун-т. 1975. 278 с.
- Домовая мышь: Происхождение, распространение, систематика, поведение. М.: Наука, 1994. 267 с.
- Емкужева М.М.* Сравнительный анализ адаптивных реакций системы крови и интерьерных признаков дикоживущих и синантропных грызунов семейства MURIDAE к условиям гор центральной части Северного Кавказа // автореф. дис. канд. биол. наук; Саратов, 2013. 20 с.
- Иванова Н.Т.* Система крови. Материалы к сравнительной морфологии системы крови человека и животных. Ростов-на-Дону. 1995. 154 с.
- Калабухов Н.И.* Периодические (сезонные и годовые) изменения в организме грызунов, их причины и последствия. Л.: Наука, Ленингр. отд. 1969. 249 с.
- Карасева Е.В., Телицина А.Ю.* Методы изучения грызунов в полевых условиях: Учеты численности и мечение. М.: Наука, 1996. 227 с.
- Кост Е.А.* Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1975. 436 с.
- Кучерук В.В.* Грызуны – обитатели построек человека и населенных пунктов различных регионов СССР // Общая и региональная териология. Сб. науч. тр. М.: Наука, 1988. С. 165–237.
- Лохмиллер Р.П., Мошкин М.П.* Экологические факторы и адаптивная значимость изменчивости иммунитета мелких млекопитающих // Сиб. экол. журн. Т. 6. № 1. 1999. С. 37–58.
- Меньшиков В.В.* Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины. М.: Лабора, 2012. 367 с.
- Мосягина Е.Н.* Эритроцитарное равновесие в норме и патологии. М.: Медицина, 1962. 298 с.
- Обыкновенная полевка: виды-двойники. (*Microtus arvalis* Pallas, 1779 *M. rossiaemeridionalis*. Ognev, 1924), 1994. Отв. ред. Соколов В.Е., Башенина Н.В. М.: Наука, 431 с.
- Риган В., Сандерс Т., Деникола Д.* Атлас ветеринарной гематологии. М.: ООО “Аквариум ЛТД”, 2000. 136 с.
- Соколов В.Е., Темботов А.К.* Позвоночные Кавказа. Млекопитающие. Насекомоядные. М.: Наука, 1989. 547 с.
- Стальмакова В.А.* О некоторых физиологических особенностях домовых мыши – *Mus musculus* L. // Фауна и экология животных Таджикистана. Сб. Таджикистан, 1978. С. 81–91
- Тарахтий Э.А., Давыдова Ю.А.* Сезонная изменчивость показателей системы крови рыжей полевки (*Clethrionomus glareolus*) разного репродуктивного состояния // Изв. РАН. Сер. биол., № 1. 2007. С. 14–25.
- Тарахтий Э.А., Сумин М.Н., Давыдова Ю.А.* Изменчивость показателей “красной” крови системы рыжей полевки (*Clethrionomus glareolus*) в зависимости от сезона и репродуктивного состояния // Успехи совр. биологии. 2009. Т. 129. № 2. С. 191–197.
- Темботов А.К., Темботова Э.Ж., Берсекова З.А., Емкужева М.М.* Влияние градиента высоты местности на гематологические показатели одного из широко распространенных видов грызунов – малой лесной мыши (MURIDAE, RODENTIA) на Центральном Кавказе // Материалы междунар. конф. “Млекопитающие горных территорий”. М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. С. 169–174.
- Темботов А.К., Темботова Э.Ж., Темботова Ф.А., Емкужева М.М.* Изменчивость гематологических параметров домовых мыши (*MUS MUSCULUS* L.) в предгорьях Центрального Кавказа // Успехи совр. биологии. 2009. Т. 129. № 4. С. 370–378.
- Темботов А.К., Шхашамишев Х.Х.* Животный мир Кабардино-Балкарии. Нальчик: Эльбрус. 1984. 190 с.
- Темботова Э.Ж., Барагунова Е.А., Василенко В.Н.* Сезонные изменения эритроидного ростка костного мозга и диаметра эритроцитов лесной мыши в условиях лесостепного пояса Центрального Кавказа // Межвед. сб. науч. тр. “Проблемы горной экологии”. Нальчик. 1982. С. 106–111.
- Темботова Э.Ж., Василенко В.Н., Темботова Ф.А.* Сезонные изменения гематологических показателей у *Apodemus sylvaticus* в условиях равнины Кабардино-Балкарской АССР // Межвед. сб. науч. тр. Нальчик. “Фауна, экология и охрана животных Северного Кавказа”. Нальчик. 1979. Вып. 4. С. 119–129.
- Темботова Э.Ж., Емкужева М.М., Темботова Ф.А.* Эколого-физиологический анализ эритронов домовых мыши (*Mus musculus* L.) в условиях высотной поясности Центрального Кавказа // Материалы междунар. конф. “Млекопитающие горных территорий”. М.: Т-во научных изданий КМК, 2007а. С. 315–323.
- Темботова Э.Ж., Емкужева М.М., Темботова Ф.А.* Внутрипопуляционная изменчивость (сезонная, половая) морфофизиологических параметров домовых мыши (MURIDAE, RODENTIA) в предгорьях Центрального Кавказа // Горные экосистемы и их компоненты. Труды междунар. конф. М.: Т-во научных изданий КМК, 2007б. С. 121–126.
- Темботова Э.Ж., Темботов А.К.* Система крови полевой мыши и ее сезонные изменения в условиях лесостепного пояса КБАССР // Межвед. сб. науч. тр. “Фауна и экология млекопитающих Кавказа”. Нальчик. 1987. С. 144–162.

- Темботова Э.Ж., Темботов А.К. Система крови обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) и ее сезонные изменения в условиях предгорья КБАССР // Межвед. сб. науч. тр. "Вопросы горной экологии". Нальчик. 1988. С. 125–145.
- Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София: Медицина и физкультура. 1968. 874 с.
- Holland R.A., Forster R.E. Effect of size of red cells of the kinetics of their oxygen uptake in different species. *Federat. Proc.* V. 2. 1966. P. 727–742.
- Maclean G.S., Lee A.K. Effects of season, temperature and activity on some blood parameters of feral house mice *Mus musculus* // *J. Mam.*, 1973. V. 54. № 3. P. 660.
- Kostelecka-Myrcha A. Variation of morpho-physiological indexes of blood in *Clethrionomus glareolus* (Shreber, 1780) // *Acta teriologica*. 1967. V. XII. 13. P. 191–222.
- Rewkieweir-Dziarska A. Seasonal changes in hemoglobin and erythrocyte indexes in *Microtus arvalis* (Pallas, 1779) // *Bull. Acad. Polon Sci; Ser Sci: Biol.* 1975. V. 23. № 7. P. 481–486.

## The Seasonal Variability of the Blood System Indicators of the House Mouse (*Mus musculus* L.) in the Central Caucasus Mountains

M. M. Emkuzheva<sup>1, #</sup>, F. A. Tembotova<sup>1</sup>, and E. Zh. Tembotova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Tembotov Institute of Ecology of Mountain Territories of RAS, I. Armand st., 37a, Nalchik, 360051 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: emkugeva\_m@mail.ru*

The variability of the house mouse (*Mus musculus* L.) functioning of the hematopoietic system (erythropoiesis of the bone marrow) and blood parameters in the Central Caucasus mountains (1800 m above sea level) depending on the season investigated. A pronounced seasonal dynamics were revealed in the activity of the *M. musculus* bone marrow and peripheral blood with the allocation of two periods: cold (winter) and warm (spring, summer, autumn). The winter season is the most energy-consuming year for the species, which is manifested in the maximum activity of the bone marrow, leading to an increase in the respiratory function of the blood. The maximum increase in the oxygen capacity of the blood, observed during this period, is due to the release of a large number of reticulocytes – young erythrocytes – into the peripheral blood. At the same time, the minimum size of erythrocytes in the annual cycle contributes to an increase in the total absorption surface for oxygen.

**Keywords:** blood system, bone marrow (erythropoiesis) parameters blood, reticulocytes, season of the year, adaptation, Central Caucasus, *Mus musculus* L.

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.553.2:612.017

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И СОДЕРЖАНИЕ ИММУННЫХ  
КОМПЛЕКСОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНАХ ГОЛЬЦОВ  
БАССЕЙНА КРОНОЦКОГО ОЗЕРА

© 2022 г. И. И. Гордеев\*, \*\*, Д. В. Микряков\*\*\*, @, Н. И. Силкина\*\*\*,  
В. Р. Микряков\*\*\*\*, О. Ю. Бусарова\*\*\*\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

\*\*\*\*Дальневосточный государственный технический  
рыбохозяйственный университет (Владивосток), Владивосток, Россия

@E-mail: daniil@ibiw.ru

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.

После доработки 27.01.2021 г.

Принята к публикации 27.01.2021 г.

Исследован уровень содержания неспецифических иммунных комплексов, продуктов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в печени, почке и селезенке у носатого, белого, длинноголового, большеротого и малоротого гольцов из оз. Кроноцкое (п-ов Камчатка). Установлены межклеточные и межвидовые отличия исследуемых параметров. У разных гольцов значения показателей в каждом органе отличались, что предположительно связано с видовыми особенностями, образом жизни и структурно-функциональной организацией исследуемых тканей и органов. Полученные результаты могут быть использованы для мониторинга состояния здоровья популяции и сравнения с близкородственными видами.

**Ключевые слова:** Камчатка, оз. Кроноцкое, гольцы рода *Salvelinus*, почка, селезенка, печень, неспецифические иммунные комплексы, перекисное окисление липидов, антиокислительная активность

**DOI:** 10.31857/S1026347022010073

Кроноцкое озеро расположено в юго-восточной части п-ова Камчатка на территории Кроноцкого государственного природного биосферного заповедника. Площадь водоема – 246 км<sup>2</sup>, максимальная (средняя) глубина – 136 (58) м, притоки представлены двумя крупными разветвленными реками и рядом ручьев короче 10 км (Аракельянц, Ткаченко, 2012). Из озера вытекает одноименная река длиной 40 км, впадающая в Тихий океан. В силу большого падения высоты по руслу р. Кроноцкое, экосистема озера оказалась изолирована от заходов проходных рыб. Сложившиеся условия и заповедный статус территории делают озеро Кроноцкое уникальным местом для изучения эволюции изолированных популяций.

В настоящее время в бассейне озера симпатрично обитают полиморфная жилая нерка–кокани *Oncorhynchus nerka* (Walbaum, 1792) и не менее шести репродуктивно изолированных форм (видов) гольцов (Маркевич, Есин, 2018; Esin *et al.*, 2020), которые в процессе эволюции освоили разнообразные пищевые ниши и выработали раз-

личные адаптации, необходимые для эффективного потребления ресурсов. Длинноголовый, белый и носатые гольцы ведут мигрантный образ жизни: нерест происходит в притоках озера, а нагул – в самом озере. Длинноголовый голец *Salvelinus kronocius* (Viktorovsky, 1978) – хищник, населяет обширные открытые пространства озера; его основной объект питания – кокани. Белый голец *Salvelinus albus* (Glubokovsky, 1977) питается беспозвоночными в молодости, переходя на рыбную пищу по мере взросления. Носатый голец *Salvelinus schmidtii* (Viktorovsky, 1978) населяет мелководные прибрежные участки, питается рачками-бокоплавами или личинками насекомых. Помимо форм с мигрантной жизненной стратегией в озере обитают две осёдлые формы: малоротые и глубокотелые большеротые гольцы (Маркевич и др., 2017; Esin *et al.*, 2020). Большеротые гольцы – специализированные бентофаги, а малоротые имеют широкую пищевую нишу. Все формы (виды) гольцов бассейна оз. Кроноцкое отличаются друг от друга морфологически, возрастной структурой,

темпами роста, типом питания, а также степенью зараженности паразитами (Викторовский, 1978; Буторина и др., 2008; Павлов и др., 2013; Бусарова и др., 2016; Маркевич, Есин, 2018; Esin *et al.*, 2020).

То, что в одном водоеме обитают несколько близкородственных форм (видов) (Senchukova *et al.*, 2013), делает возможным проведение сравнительного анализа их иммунофизиологических показателей, различия в которых отражают как физиологическое состояние рыб, так и степень диссоциации этих форм (видов) в процессе симатрического видообразования. Ранее нами были установлены различия длинноголового, белого и носатых гольцов по содержанию иммунных комплексов, продуктов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в сыворотке крови и органах (Гордеев и др., 2017). На основе полученных данных было высказано предположение о зависимости физиологических показателей гольцов от образа жизни, типа питания и зараженности паразитами. В настоящей работе было продолжено исследование и проведен сравнительный анализ уровня окислительных процессов и иммунных комплексов в иммунокомпетентных органах у длинноголового, белого, носатого (морфотип N1g по Esin *et al.* (2020)), большеротого и малоротого гольцов, обитающих в оз. Кроноцкое.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелых рыб отлавливали с помощью жаберных сетей по всей акватории озера в июне – августе 2013 г. Исследовали 16 особей носатого (средняя масса  $383 \pm 39$  г, средняя длина  $300 \pm 17$  мм), 28 – белого ( $410 \pm 84$  г,  $311 \pm 25$  мм), 5 – длинноголового ( $875 \pm 139$  г,  $425 \pm 54$  мм), 15 – большеротого ( $139 \pm 12$  г,  $254 \pm 11$  мм) и 9 – малоротого ( $57 \pm 6$  г,  $182 \pm 5$  мм) гольцов. У отловленных рыб после вскрытия в стерильные пробирки отбирали образцы иммунокомпетентных органов (почка, селезенка и печень). Затем пробы замораживали в жидком азоте. В лабораторных условиях непосредственно перед анализом пробы размораживали при комнатной температуре. Для дальнейших исследований из тканей почки, селезенки и печени с помощью гомогенизатора готовили гомогенат с физиологическим раствором в соотношении 1 : 1.

В гомогенатах исследовали содержание неспецифических иммунных комплексов (ИК), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень антиокислительной защиты (АЗ). Выбор данных показателей обусловлен тем, что они отражают реакцию рыб на заражение паразитами, антропогенное загрязнение и изменение качества среды обитания (Микряков и др., 2001; Силкина, Микряков, 2005; Силкина и др., 2012).

Содержание ИК устанавливали спектрофотометрически при длине волны 450 нм методом селективной преципитации с 4%-ным полиэтиленгликолем мол. массой 6000 (Гриневиц, Алферов, 1981).

Интенсивности ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА устанавливали по количеству продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм (Андреева и др., 1988). Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции:  $1.56 \times 10^5 / (\text{M см})$  и выражали в наномолях на 1 г ткани.

Об общей антиокислительной активности судили по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985). Сущность метода заключается в том, что, чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле:  $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$ , где  $K_{\text{кон}}$  и  $K_{\text{оп}}$  – константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте;  $C$  – концентрация биологического материала в кювете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ Statistica v.6.0, с использованием t-теста. Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

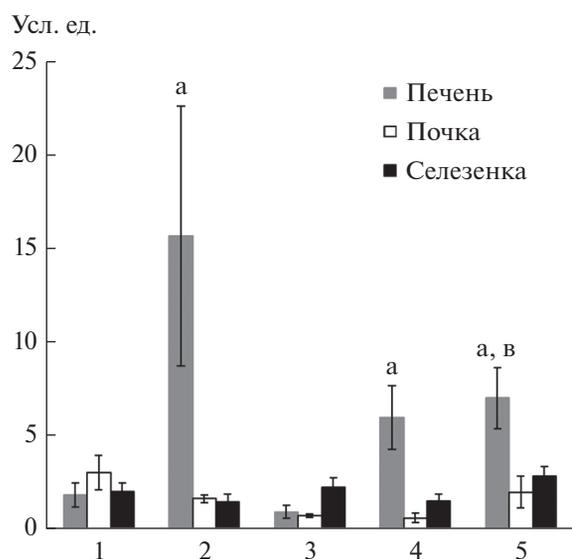
Сравнительный анализ содержания ИК, МДА и КОС в печени, почке и селезенке гольцов, обитающих в оз. Кроноцкое, выявил межтканевые и межвидовые различия данных показателей.

Анализ полученных данных показал различия содержания ИК в разных органах у исследуемых видов гольцов (рис. 1). Высокое содержание ИК обнаружено в печени носатого ( $15.65 \pm 6.93$  ус. ед.), большеротого ( $5.95 \pm 1.71$  ус. ед.) и малоротого гольца ( $6.98 \pm 1.63$  ус. ед.), а низкое – в почке большеротого ( $0.58 \pm 0.24$  ус. ед.), печени ( $0.9 \pm 0.34$  ус. ед.) и почке ( $0.7 \pm 0.1$  ус. ед.) длинноголового гольца. В органах белого гольца зафиксированы незначительные отличия уровня ИК. У 3-х видов гольцов наибольшее содержание ИК обнаружено в печени, у белого – в почке ( $3.0 \pm 0.9$  ус. ед.) и длинноголового – в селезенке ( $2.21 \pm 0.52$  ус. ед.). ИК – комплексы антиген-антитело и связанные с

ними компоненты комплемента, образующиеся в результате взаимодействия с низкомолекулярными чужеродными соединениями (гаптенами, растворимыми антигенами и аутоантигенами). Они играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунологического и биохимического гомеостаза. Клетки крови с помощью компонентов комплемента связывают растворимые ИК и доставляют к макрофагам иммунокомпетентных органов, тем самым обеспечивая клиренс крови от ИК. Нарушение этого механизма наблюдается при инфекционных, инвазионных, токсических и аутоиммунных болезнях. Избыток ИК подавляет функциональное состояние иммунной системы и может приводить к развитию патологии (Ройт и др., 2000). Содержание ИК наиболее повышено у носатого гольца, особенно по сравнению с белым и длинноголовым, что соотносится с данным предыдущего исследования (Гордеев и др., 2017). Однако на этот раз высокий показатель зафиксирован только в печени, тогда как ранее – во всех органах. У впервые исследованных форм (видов), большеротого и малоротого гольцов, уровень ИК, также выше, чем у белого и длинноголового.

Одним из чувствительных индикаторов, отражающим влияние неблагоприятных стресс-факторов на метаболические процессы и состояние здоровья рыб, которое выражается в нарушении баланса окислительно-восстановительных процессов, является изменение соотношения уровня ПОЛ и активности АЗ тканей. МДА – один из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Образование МДА происходит в результате свободно-радикального окисления полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран активными формами кислорода (АФК) – супероксидный и гидроксильный радикалы, синглетный кислород, пероксиды и многие другие соединения. Избыточное накопление АФК становится причиной разрушения сульфгидрильных антиоксидантов, модификации липидного слоя клеточных мембран, что негативно влияет на жизнедеятельность клеток, темп роста, развития целостного организма (Журавлев, Пантюшенко, 1989; Владимиров и др., 1991; Барабой и др., 1992; Fiho, 1996; Кольтовер, 2000; Зенков и др., 2001; Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991).

Максимальные значения МДА отмечены в почке ( $5.95 \pm 1.71$  нмоль/г) и селезенке большеротого ( $5.75 \pm 1.65$  нмоль/г) и печени ( $4.32 \pm 1.35$  нмоль/г) белого гольца (рис. 2). Минимальные значения зафиксированы в почке белого ( $1.98 \pm 0.18$  нмоль/г) и длинноголового ( $2.05 \pm 0.28$  нмоль/г), печени носатого ( $1.99 \pm 0.33$  нмоль/г) и большеротого ( $2.01 \pm 0.4$  нмоль/г) и селезенке малоротого ( $1.81 \pm 0.51$  нмоль/г) гольца. Сравнение содержания МДА у разных форм показало, что большие от-



**Рис. 1.** Содержание ИК в печени, почке и селезенке гольцов *Salvelinus* sp. Кроноцкого озера. Примечание. Здесь и на рис. 2 и 3: 1 – белый, 2 – носатый, 3 – длинноголовый, 4 – большеротый, 5 – малоротый голец; а – значимые различия от белых гольцов; б – значимые различия от носатых гольцов; в – значимые различия от длинноголовых гольцов; г – значимые различия от большеротых гольцов при  $p \leq 0.05$ .

клонения выявлены в почке и печени, а небольшие – в селезенке. Ранее значительное изменение показателя уровня ПОЛ у исследуемых форм (видов) было зафиксировано в почке, а в других тканях и органах – незначительное (Гордеев и др., 2017). На наш взгляд, полученные результаты указывают на наличие зависимости между окислительными процессами и особенностями структурно-функциональной организации исследуемых органов, а также содержанию гранулоцитов, наиболее интенсивно образующих АФК. Например, в почке, богатой гранулоцитами, процессы ПОЛ происходят более интенсивно, чем в печени и селезенке с низкой долей содержания этих клеток (Zapata *et al.*, 1996; Van Muiswinkel, Van der Wal, 2006; Грушко и др., 2009).

Следует отметить, что в стационарных условиях во всех клетках живого организма в небольших количествах постоянно образуются АФК. Они участвуют в процессах клеточного метаболизма и их негативное влияние на клетки и ткани нейтрализуется системой АЗ (антиоксидантными ферментами: супероксиддисмутазой, каталазой, глутатионпероксидазой, глутатион-S-трансферазой) и низкомолекулярными антиоксидантными соединениями (б-токоферолом, восстановленным глутатионом, фенольной формой коэнзима  $Q_{10}$ , в-каротином, аскорбиновой кислотой и др.). В отличие от МДА наибольшее колебание показателя КОС, фиксирующего уровень АЗ, отмечены

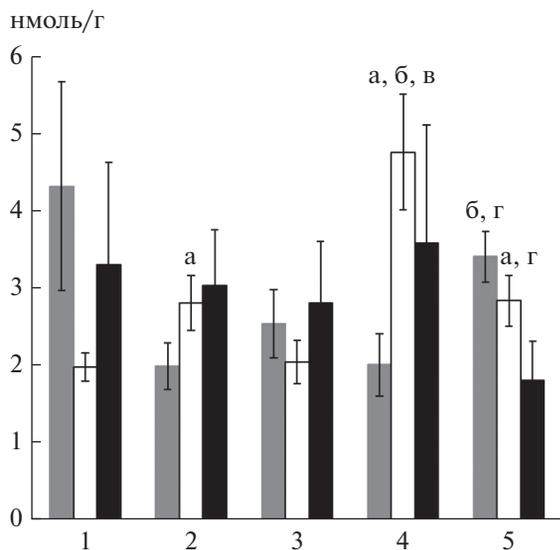


Рис. 2. Уровень МДА в печени, почке и селезенке гольцов *Salvelinus* sp. Кроноцкого озера.

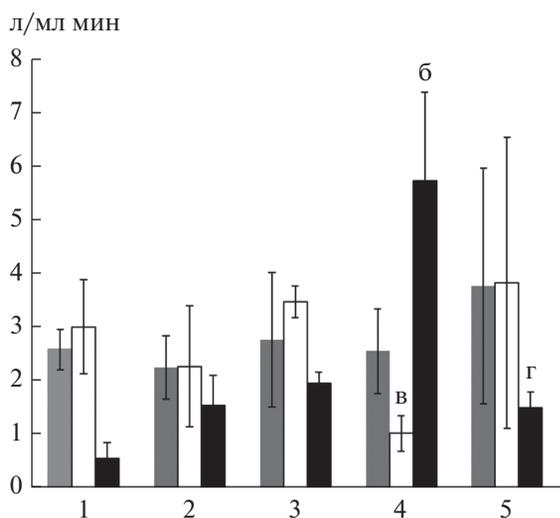


Рис. 3. Уровень КОС в печени, почке и селезенке гольцов *Salvelinus* sp. Кроноцкого озера.

в селезенке (рис. 3). В этом органе минимальные значения КОС характерны для белого гольца ( $0.57 \pm 0.29$  л/мл · мин), а максимальные — для большеротого ( $5.75 \pm 1.65$  л/мл · мин). Низкие значения КОС в исследуемых органах указывают на высокую активность АЗ.

Проведенное исследование показало высокий уровень межтканевых различий липидоперекислительных и антиокислительных процессов, происходящих в организме гольцов оз. Кроноцкое. Установленные различия показателей МДА и КОС, отражающие изменение окислительно-восстановительного баланса, видимо, обусловлены раз-

ным уровнем содержания антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных соединений, обеспечивающих динамическое равновесие в прооксидант-антиоксидантной системе.

Нарушение баланса в системе “прооксидант—антиоксидант” в сторону активации перекисеобразовательных процессов установлено у зараженных паразитами рыб (Силкина, Микряков, 2005; Силкина и др., 2012). Интенсивность уровня заражения также зависит от функционального состояния иммунной системы (Микряков и др., 2011; Микряков, Микряков, 2015). У носатого гольца отмечены пиковые значения ИК в печени. Возможно, это связано с высокой инвазией нематоды *Cystidicola farionis*, паразитирующей в плавательном пузыре, индекс обилия которой составляет 169 экз/рыбу, а также гиперинвазией трематодами рода *Crepidostomum* (индекс обилия = 3461.3) (Бусарова и др., 2016). Патогенность *C. farionis* проявляется в изменении функций плавательного пузыря (Willers *et al.*, 1991; Faisal *et al.*, 2010), что может приводить к элиминации слабых рыб (Gjaever *et al.*, 1991). Показатели ИК, МДА и КОС у других форм гольцов не позволяют однозначно соотносить их с показателями зараженности паразитами.

Таким образом, полученные нами различия в уровнях исследуемых показателей в печени, почке и селезенке у носатого, белого, длинноголового, большеротого и малоротого гольцов из оз. Кроноцкое, по-видимому, связаны с видовыми и экологическими особенностями рыб, такими как образ жизни, тип питания, локальный уровень зараженности паразитами и т.д. Дальнейшие исследования с большей выборкой помогут понять уровень физиологических различий между формами, а также могут быть использованы для мониторинга состояния здоровья популяции и сравнения с близкородственными видами.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Е.В. Есину (ИПЭЭ РАН, ФГБНУ “ВНИРО”) за помощь в подготовке рукописи и ценные замечания.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 121050500046-8.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
- Аракельянц А.Д., Ткаченко О.В. Гидрологические характеристики Кроноцкого озера в начале XXI века // Вестник МГУ. 2012. Сер. 5. География. № 6. С. 77–83.
- Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.

- Бусарова О.Ю., Кнудсен Р., Маркевич Г.Н. Паразитофауна гольцов (*Salvelinus*) озера Кроноцкого, Камчатка // Паразитология. 2016. Т. 50. № 6. С. 409–425.
- Буторина Т.Е., Шедько М.Б., Горювая О.Ю. Особенности экологии гольцов рода *Salvelinus* (Salmonidae) бассейна озера Кроноцкого (Камчатка) по паразитологическим данным // Вопр. ихтиологии. 2008. Т. 48. № 5. С. 652–667.
- Викторовский Р.М. Механизмы видообразования у гольцов Кроноцкого озера. М., 1978. 106 с.
- Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1991. Т. 29. С. 1–249.
- Гордеев И.И., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Микряков В.Р., Бусарова О.Ю. Содержание иммунных комплексов и уровень окислительных процессов в крови и органах гольцов оз. Кроноцкого (п-ов Камчатка) // Arctic Envir. Res. 2017. Т. 17. № 3. С. 204–211.
- Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
- Грушко М.П., Ложниченко О.В., Федорова Н.Н. Гемопоз у осетровых рыб. Астрахань, 2009. 190 с.
- Журавлев А.И., Пантюшенко В.Т. Свободнорадикальная биология. М.: Моск. Вет. Акад, 1989. 60 с.
- Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”, 2001. 343 с.
- Кольтовер В.К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк // Успехи геронтол. 2000. № 4. С. 33–40.
- Маркевич Г.Н., Есин Е.В. Речные дериваты эндемичных форм гольца *Salvelinus malma* (Salmonidae) оз. Кроноцкого (Россия, Камчатка) // Nature Cons. Res. Заповедная наука. 2018. Т. 3. № 3. С. 61–69.
- Маркевич Г.Н., Есин Е.В., Салтыкова Е.А., Бусарова О.Ю., Анисимова Л.А., Кузицин К.В. Новые эндемичные формы глубоководных гольцов рода *Salvelinus* (Salmoniformes: Salmonidae) озера Кроноцкого (Камчатка) // Биология моря. 2017. Т. 43. № 3. С. 188–194.
- Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Лапкин В.З. и др. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М., 2001. 126 с.
- Микряков В.Р., Микряков Д.В. Иммунологическая индикация здоровья рыб // Вопросы ихтиологии. 2015. Т. 55. № 1. С. 119–123.
- Микряков В.Р., Степанова М.А., Микряков Д.В. Зависимость интенсивности заражения синца *Abramis ballerus* дактилогеридами (*Dactylogyrus chranilowi*, Vuohonsky, 1931) от уровня антимикробных свойств сыворотки крови хозяина // Паразитология. 2011. № 45(1). С. 50–53.
- Павлов С.Д., Кузицин К.В., Груздева М.А. и др. Фенетическое разнообразие и пространственная структура гольцов (*Salvelinus*) озерно-речной системы Кроноцкая (Восточная Камчатка) // Вопр. ихтиологии. 2013. Т. 53. № 6. С. 645–670.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., 2000. 592 с.
- Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. № 3. С. 50–52.
- Силкина Н.И., Микряков В.Р. Особенности показателей перекисного окисления липидов у *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) и их хозяев — *Abramis brama* (L.) // Паразитология. 2005. Т. 39. Вып. 2. С. 117–123.
- Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Характер изменения некоторых иммунофизиологических показателей зараженных плероцеркоидами *Ligula intestinalis* лещей *Abramis brama* на разных стадиях развития паразита // Изв. РАН. Сер. биологическая. 2012. № 5. С. 567–571.
- Esin E.V., Vocharova E.S., Borisova E.A., Markevich G.N. Interaction among morphological, trophic and genetic groups in the rapidly radiating *Salvelinus* fishes from Lake Kronotskoe // Evolutionary Ecology. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10682-020-10048-y>
- Faisal M., Fayed W., Brenden T., Noor A., Ebener M., Wright G., Jones M. Widespread infection of lake whitefish *Coregonus clupeaformis* with the swimbladder nematode *Cystidicola farionis* in northern lakes Michigan and Huron // J. Great Lakes Res. 2010. V. 36. P. 121–134.
- Fiho W.D. Fish antioxidant defences — A comparative approach // Braz. J. Med. and Biol. Res. 1996. V. 29. № 12. P. 1735–1742.
- Gjaever A., Klemetsen A., Halvorsen O. Infection of *Cystidicola farionis* fisher (Nematoda: Spiruroidea) in the swim bladder of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), from Takvatn, north Norway // Nord. J. Freshwater Res. 1991. V. 66. P. 63–71.
- Muiswinkel W.B. van, Vervoorn-Van Der Wal B. The Immune System of Fish // Fish Diseases and Disorders. Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infections / Ed. by P.T.K. Woo. Canada: University of Guelph, 2006. P. 678–701.
- Senchukova A.L., Mugue, N.S., Pavlov, S.D., Mel'nikova, M.N. On the origin of charrs of the genus *Salvelinus* of the Kronotskoe Lake and their relationships with other charr populations of the Kamchatka peninsula // J. ichthyology. 2013. V. 53(10). P. 840–848.
- Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar. Biochem. Physiol. 1991. V. 100. № 1–2. P. 173–176.
- Willers W.B., Dubielzig R.R., Miller L. Histopathology of the swimbladder of the cisco due to the presence of the nematode *Cystidicola farionis* fisher // J. Aqua. Anim. Health. 1991. V. 3. P. 130–133.
- Zapata A.G., Chiba A., Varas A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish // The Fish Immune System. Pathogen and Environment / Ed by G. Iwama, T. Nakamishi. London: Academic Press, 1996. P. 1–62.

## Oxidation Processes and Immune Complexes Content in the Immunocompetent Organs of Charr in the Kronotskoye Lake Basin

I. I. Gordeev<sup>1, 2</sup>, D. V. Mikryakov<sup>3, #</sup>, N. I. Silkina<sup>3</sup>, V. R. Mikryakov<sup>3</sup>, and O. Yu. Busarova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia

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

<sup>3</sup>Papanin Institute for the Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl oblast, 152742 Russia

<sup>4</sup>Far-Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, Russia

#e-mail: daniil@ibiw.ru

The level of the content of non-specific immune complexes, products of lipid *Salvelinus schmidtii*, *S. kronocius*, *S. albus*, and other charrs from Kronotskoye Lake (Kamchatka Peninsula) was studied. The interstitial and interspecific differences of the studied parameters were found. In different charrs, the values of each organ differed, which is presumably related to the species lifecycle, as well as structural and functional organization of the studied tissues and organs. The results obtained can be used to monitor the health status of the population and for comparison with closely related species.

**Keywords:** Kamchatka, Kronotskoye Lake, charrs of the genus *Salvelinus*, kidney, spleen, liver, nonspecific immune complexes, lipid peroxidation, antioxidant activity

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 599.323.45(470.54)

**ЖЕЛТОГОРЛАЯ МЫШЬ (*Apodemus flavicollis* Muridae) – НОВЫЙ ВИД  
В ФАУНЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИЛЬМЕНСКОГО ЗАПОВЕДНИКА  
(ЧЕЛЯБИНСКАЯ ОБЛ., ЮЖНЫЙ УРАЛ)**

© 2022 г. Г. В. Оленев\*, @, О. Р. Гизулина\*, Е. Б. Григоркина\*

\*Институт экологии растений и животных УрО РАН, ул. 8 Марта, 202, Екатеринбург, 620144 Россия

@E-mail: olenev@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 28.01.2021 г.

После доработки 28.01.2021 г.

Принята к публикации 20.02.2021 г.

Представлены новые сведения по распространению желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834) на восток. Впервые (с 1975 г.) вид зарегистрирован в северной части Ильменского заповедника (Челябинская обл., Южный Урал). Приведены основные экстерьерные и краниометрические характеристики особей. Регулярные мониторинговые исследования позволяют предположить, что инвазия *A. flavicollis* в аборигенное биотическое сообщество произошла не ранее зимне-весеннего периода и не позже июня 2020. Вероятность антропогенного влияния в условиях заповедного режима практически исключена. Мы полагаем, что возможной причиной инвазии являются климатические изменения (глобальное потепление). Место находки желтогорлой мыши в Ильменском заповеднике (55°17'04.6" с.ш., 60°14'45.1" в.д.) является самой восточной точкой современного ареала вида.

**Ключевые слова:** желтогорлая мышь (*Apodemus flavicollis*), новый вид, Ильменский заповедник (Южный Урал)

**DOI:** 10.31857/S1026347022010103

Ареал желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834) на востоке простирается до Урала, где образует широкий язык, захватывая Оренбургскую область и территорию Башкирии (Аргиропуло, 1931, 1940; Виноградов, Громов, 1952; Марвин, 1979 и др.) (рис. 1). Известно, что *A. flavicollis* – обитатель хвойно-широколиственных и широколиственных лесов Европы с произрастанием семенных видов (Виноградов, Громов, 1952; Павлинин, Шварц, 1957; Попов, 1960; Большаков и др., 1986; Смирнов и др., 1990; Wilson, Reeder, 2005).

На палеонтологическом материале установлено, что желтогорлая мышь проникла в Предуралье в послеледниковую эпоху не позднее среднего голоцена, когда распространение широколиственных лесов на этой территории достигло своего максимума (Хотинский и др., 1966). На Среднем Урале *A. flavicollis* обитала ~600–900 лет назад (Смирнов и др., 1992; Смирнов, 1995; Изварин, 2010). В Башкирском Приуралье ископаемые останки известны со времен раннего плейстоцена (Громов, Ербаева, 1995).

На современном материале показано, что на Среднем Урале желтогорлая мышь населяет хвойно-широколиственные леса его юго-западной части (Изварин и др., 2013). В 1990-х гг.

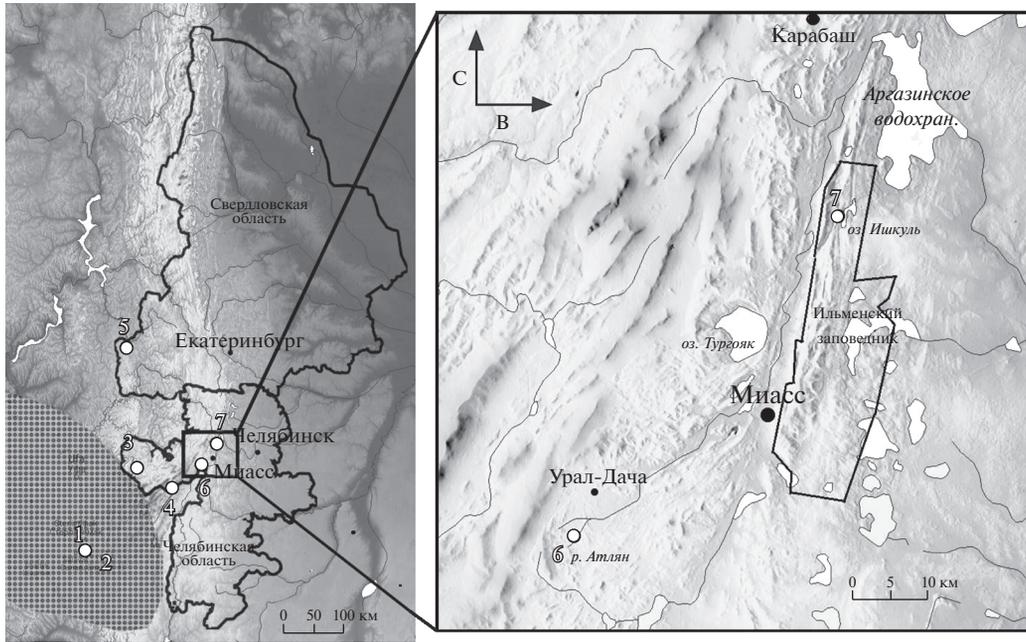
*A. flavicollis* была обнаружена в хвойно-широколиственных лесах на юге Пермской обл. (Демидов, Демидова, 1990). На Южном Урале *A. flavicollis* обитает в широколиственных лесах на западных склонах Уральского хребта и в лесостепной Предуральской части Западной Башкирии. В горах Южного Урала *A. flavicollis* найдена на горном хребте Ирмель (рис. 1). С 2014 г. по настоящее время самой восточной точкой для исследуемого вида считались верховья р. Аглян (Киселева, 2015).

Цель работы – представить новые данные по распространению желтогорлой мыши на восток и описать основные экстерьерные и краниометрические характеристики особей.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для данного сообщения послужили результаты полевых исследований авторов, проведенных в 2020 г. в северной части Ильменского заповедника (Челябинская обл., Южный Урал) (рис. 1). Район работ относится к полосе сосново-березовых лесов предлесостепья Южного Урала (Горчаковский, 1968).

Многолетние мониторинговые исследования (46 лет) основных ценологических показателей (структурно-видовой состав сообщества, числен-



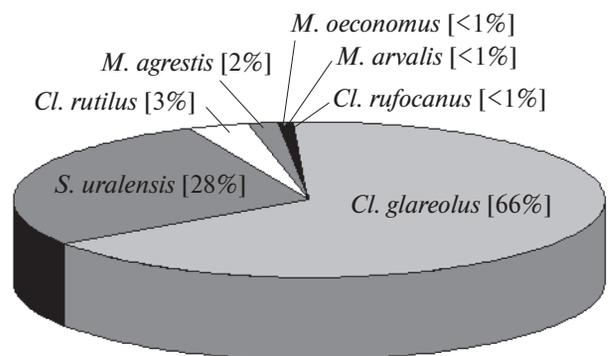
**Рис. 1.** Карта-схема районов исследований желтогорлой мыши на Среднем и Южном Урале. Ранее известная граница ареала (юго-восточный язык) *A. flavicollis* (Amori *et al.*, 2016) – заштрихована. На выделенном фрагменте карты – Ильменский заповедник с районом работ. Точки обнаружения *A. flavicollis*: 1 – окрестности п. Кинзебулатово (53°25' с.ш., 56°11' в.д.); 2 – окрестности Нугушского водохранилища (53°05' с.ш., 56°26' в.д.); 3 – окрестности Игнатьевской пещеры (54°53' с.ш., 57°46' в.д.); 4 – г. Иремель (54°32'00" с.ш., 58°50'20" в.д., 80-е гг. XX в.); 5 – Нижнеиргинская дубрава (56°56' с.ш., 57°26' в.д., 2011 г.); 6 – р. Атлян (54°56'09.2" с.ш., 59°44'25.7" в.д., 2014 г.); 7 – оз. Б. Ишкуль, Ильменский заповедник (55°17'04.6" с.ш., 60°14'45.1" в.д., 2020 г.).

ность) проводятся нами с 1975 г. на стационарных площадках, расположенных западнее оз. Большой Ишкуль. Площадки находятся в двух типах биотопов, условно названных сухие и влажные (Оленев, 2004). Сухие биотопы распространены на восточном склоне Ильменского хребта и представлены смешанным сосново-березовым лесом с островками мертвopoкpовного липняка, с отдельными экземплярами осины, с подлеском из рябины и шиповника. В травянистом ярусе доминирует папоротник, распространены костяника, земляника, медуница и др. Влажные биотопы находятся в сильно увлажненной заросшей пойме лесного ручья с зарослями черемухи, ольхи, смородины, хмеля. В травянистом ярусе доминирующими видами являются страусопер, лабазник, крапива, будра, гравилат и др.

Отловы мелких млекопитающих проводили с июля по октябрь (4 отловочные сессии) давилками крючковыми методом безвозвратного изъятия. Обработка материала проведена методом морфофизиологических индикаторов (Шварц и др., 1968). В ходе исследований отработано 139 ловушко-суток, отловлено 79 особей. Функциональный статус особей оценен по состоянию генеративной системы.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Видовой состав аборигенного сообщества цикломорфных млекопитающих за весь период исследований представлен на рис. 2. Список фауны насчитывает семь широко распространенных видов мышевидных грызунов, относящихся к двум семействам: Cricetidae и Muridae. Семейство Cricetidae представлено лесными полевками: рыжей (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780), красной (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779), красно-серой (*Cle-*



**Рис. 2.** Видовой состав аборигенного сообщества цикломорфных млекопитающих (1978–2019 г., усредненные значения).

**Таблица 1.** Видовой состав мышевидных грызунов в Ильменском заповеднике в 2020 г.

Вид	Количество особей	Доля вида в уловах, %
<i>Cl. glareolus</i>	47	59.5
<i>Cl. rutilus</i>	3	3.8
<i>S. uralensis</i>	24	30.4
<i>A. flavicollis</i>	5	6.3
Всего:	79	100

*thrionomys rufocanus* Sundevall, 1847) и серыми полевками: обыкновенной (*Microtus arvalis* Pallas, 1778), пашенной (*Microtus agrestis* Linnaeus, 1761) и полевкой-экономкой (*Microtus oeconomus* Pallas, 1776). Семейство Muridae представлено единственным видом – малой лесной мышью (*Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811), доля которого существенно возросла в последние десятилетия (Оленев, Григоркина, 2016).

Длительность наших непрерывных систематических наблюдений (рис. 2), позволяет с уверенностью утверждать об отсутствии *A. flavicollis* в аборигенном сообществе. В 2020 г., наряду с рыжей, красной полевками и малой лесной мышью, в уловах впервые зарегистрирована желтогорлая мышь (табл. 1). В ходе исследований в обоих типах биотопов отловлено 5 животных, экстерьерные и краниометрические характеристики которых приведены в табл. 2. При оценке репродук-

тивных показателей оказалось, что три особи активно участвовали в размножении (у самок отмечены подсосные и плацентарные пятна, а также факт повторной беременности). Две особи, отловленные в октябре, не созрели и не участвовали в процессах репродукции.

Причины наблюдаемого явления традиционно вызывают интерес. Отметим, что возможное антропогенное влияние в условиях заповедного режима (вырубки, распахка, пожары, а также другие виды человеческой активности) практически исключено. В настоящей работе мы не обсуждаем экологическую составляющую явления, предпосылки для инвазии. Однако имеются основания отнести их не столько к кормовому фактору, сколько к изменениям климатического характера (глобальное потепление), которые приводят к исчезновению одних видов и появлению других, ранее не обитавших на той или иной территории. Основанием для подобного заключения служит тот факт, что *A. flavicollis*, как правило, регистрируется в широколиственных лесах с произрастанием семенных видов (дуб, орешник, клен, ильм, вяз, липа и т.п.). При этом определяющее значение имеет семенное обилие (Angelstam *et al.*, 1987). В районе наших исследований подобные виды отсутствуют за исключением липы мелколистной, плодоносящей далеко не каждый год.

**Таблица 2.** Основные характеристики особей *A. flavicollis* (2020 г.)

Особь	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Дата отлова	16.07.2020	16.07.2020	27.08.2020	01.10.2020	03.10.2020
Вес тела, г	27.5	44.3	42.8	29.6	35.4
Пол	♀	♂	♀	♀	♂
Тимус, мг	Отсутствует	Отсутствует	Точечный	13	15
Pl	25	26	28	26	27
Ca	110	120	117	106	113
LCb	25.2	28.3	28.8	25.8	27.8
Nas	9.6	11.5	11.5	11.8	11.8
LM1–3	4.3	4.4	4.8	4.5	4.4
Lm1–3	4.6	4.4	4.8	4.5	4.5
Dia	6.8	7.9	7.5	8.3	7.9
Генеративные показатели	Подсосные пятна, эмбрионы	Вес семенника 650 мг	Подсосные пятна, плацентарные пятна	Матка нитевидная	Вес семенника 24 мг
Функциональное состояние	размножавшаяся	половозрелый	размножавшаяся	неполовозрелая	неполовозрелый

Примечание. Pl – длина ступни, Ca – длина хвоста, LCb – кондилобазальная длина, Nas – длина носовых костей, LM1–3 – длина верхнего зубного ряда, Lm1–3 – длина нижнего зубного ряда, Dia – длина диастемы верхней челюсти.

\* \* \*

Таким образом, на территории Ильменского заповедника летом 2020 г. впервые был обнаружен новый вид мелких млекопитающих – желтогорлая мышь. Место регистрации *A. flavicollis* (55°17'04.6" с.ш., 60°14'45.1" в.д.) однозначно является самой восточной точкой современного распространения вида. Выявленный локалитет удален от ближайшего его местонахождения (верховья р. Атлян) на 50 км по прямой, что на 40 км севернее и на 33 км восточнее (рис. 1). Мы впервые имеем дело с уникальным случаем, когда можно определить время инвазии вида с точностью до сезона. Периодичность регулярных отловов позволяет предположить, что проникновение *A. flavicollis* в аборигенное биотическое сообщество произошло не ранее зимне-весеннего периода и не позднее июня 2020 г.

Говорить о натурализации вида преждевременно. Возможно, что в 2020 г. мы столкнулись со случайной инвазией чужеродного вида, и в ближайшие годы он встречаться не будет. В любом случае, сам факт появления желтогорлой мыши, никогда не регистрировавшейся на данной территории, независимо от будущей судьбы вселенцев, несомненно, заслуживает внимания и дальнейшего исследования.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, а также частично поддержана РФФИ (грант 20-04-00164).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аргиропуло А.И.* Определитель грызунов Уральской области и соседних районов. М.–Л.: Сельхозгиз, 1931. 88 с.
- Аргиропуло А.И.* Млекопитающие: сем. Muridae – Мыши. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1940. 170 с.
- Большаков В.Н., Балахонов В.С., Бененсон И.Е., Бердюгин К.И., Садыков О.Ф. и др.* Мелкие млекопитающие Уральских гор (экология млекопитающих Урала). Свердловск: Уральский научный центр АН СССР, 1986. 104 с.
- Виноградов Б.С., Громов И.М.* Грызуны фауны СССР, Определители по фауне СССР. Л.: Издание ЗИН, 1952. Т. 48. 298 с.
- Горчаковский П.Л.* Растительность Урала // Урал и Приуралье. М. 1968. С. 211–262.
- Громов И.М., Ербаева М.А.* Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН РАН, 1995. 522 с.
- Демидов В.В., Демидова М.И.* Современное состояние фауны мелких млекопитающих Пермской области. Пермь: Пермский гос. ун-т, 1990. 35 с.
- Изварин Е.П.* Грот Нижнеиргинский – новое местонахождение голоценовых остатков мелких млекопитающих в Красноуфимской островной лесостепи // Динамика экосистем в голоцене. Материалы второй рос. науч. конф. Екатеринбург, Челябинск: Рифей, 2010. С. 91–93.
- Изварин Е.П., Зыков С.В., Фоминых М.А.* Желтогорлая мышь (*Sylvaemus flavicollis*, Muridae) – новый вид в фауне млекопитающих Свердловской области // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 3. С. 371–374.
- Киселёва Н.В.* Новое местонахождение желтогорлой мыши на Южном Урале // Фауна Урала и Сибири. 2015. № 1. С. 141–147.
- Марвин М.Я.* Обзор географического распространения млекопитающих Урала // Млекопитающие Уральских гор. Свердловск, 1979. С. 45–47.
- Оленев Г.В.* Функционально-онтогенетический подход в изучении популяций цикломорфных млекопитающих. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Екатеринбург. ИЭРиЖ РАН, 2004. 47 с.
- Оленев Г.В., Григоркина Е.Б.* Эволюционно-экологический анализ стратегий адаптации популяций грызунов в экстремальных условиях // Экология. 2016. № 5. С. 375–381.
- Павлинин В.Н., Шварц С.С.* К вопросу о границах распространения некоторых видов грызунов на Урале // Труды Инта биологии. Грызуны Урала. 1957. Вып. 8. С. 89–92.
- Попов В.А.* Млекопитающие Волжско-Камского края. Насекомоядные, рукокрылые, грызуны. Казань: АН СССР, Казанский филиал, 1960. 468 с.
- Смирнов Н.Г.* Материалы к изучению исторической динамики разнообразия грызунов таежных районов Среднего Урала // Материалы по истории современной биоты Среднего Урала. Сб. науч. трудов. Екатеринбург: Екатеринбург, 1995. С. 24–57.
- Смирнов Н.Г., Большаков В.Н., Косинцев П.А., Панова Н.К., Коробейников Ю.И. и др.* Историческая экология животных гор Южного Урала. Свердловск: УрО АН СССР, 1990. 248 с.
- Смирнов Н.Г., Ерохин Н.Г., Быкова Г.В., Лобанова А.В., Корона О.М. и др.* Грот Сухореченский – памятник истории природы и культуры в Красноуфимской лесостепи // История современной фауны Южного Урала. Сб. науч. трудов. Свердловск: УрО РАН, 1992. С. 20–44.
- Хотинский Н.А., Девириц А.Л., Маркова Н.Г.* Абсолютная хронология голоцена Среднего Урала // Докл. АН СССР. 1966. Т. 171. № 5. С. 1164–1166.
- Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н.* Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск. 1968. 387 с.
- Amori G., Hutterer R., Kryštufek B., Yigit N., Mitsain G., Palomo L.J.* *Apodemus flavicollis* (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species, 2016. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T1892A22423256.en>.
- Angelstam P., Hansson L., Pehrsson S.* Distribution borders of field mice *Apodemus*: the importance of seed abundance and landscape composition // Oikos. 1987. V. 50. № 1. P. 123–130.
- Wilson D.E., Reeder D.M.* Mammal Species of the World, Taxonomic and Geographic Reference, Third Edition. MD, Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2005. 2142 p.

**Yellow-Necked Mouse (*Apodemus flavicollis* Muridae) – A New Species  
in the Mammal Fauna of the Il'men Reserve (Chelyabinsk Oblast, Southern Ural)**

**G. V. Olenev<sup>1, #</sup>, O. R. Gisullina<sup>1</sup>, and E. B. Grigorkina<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Animal and Plant Ecology, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia*  
*#e-mail: olenev@ipae.ura.ru*

New data of the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834) distribution to the east are submitted. This species has been recorded in northern part of Il'men Reserve (Chelyabinsk oblast, Southern Ural) for the first time (since 1975). The main external and craniometrical characteristics of individuals are given. Regular monitoring investigations allow assuming that *A. flavicollis* invasion in the native biotic community has taken place not earlier the winter-spring period and not later June 2020. The possibility of technogenic influence (pollution) in Reserve is practically excluded. We believe that the possible reason of invasion is climatic changes (global warming). Place of *A. flavicollis* finding in Il'men Reserve (55°17'04.6" N, 60°14'45.1" E) is the most east point of a modern area of this species.

*Keywords:* yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*), new species, Il'men Reserve (Southern Ural)