

ISSN 1026-3470

Номер 4

Июль – Август 2024

ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Номер 4, 2024

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

Применение согласованных коэффициентов эллиптического преобразования Фурье для сравнения форм биологических структур (на примере прикрепительных органов моногеней)

А. М. Лях

429

БИОХИМИЯ

Оценка фармакологической эффективности липидного экстракта из туники морского гидробионта *Halocynthia aurantium* (Pallas, 1774)

Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко, В. Г. Спрыгин, Т. В. Момот, Е. С. Другова, Л. Н. Лесникова, В. Ю. Мерзляков

441

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Об использовании изотопных различий углерода фракций биомассы в растениях для изучения транспортных потоков и донорно-акцепторных отношений при разных световых режимах

А. А. Ивлев, В. А. Литвинский, Н. М. Пржевальский, Д. А. Товстыко, А. С. Шмаков, М. П. Ломакин, Н. Н. Слепцов, И. Г. Тараканов

451

ЗООЛОГИЯ

Морфология кожи пяти видов скальных ящериц рода *Darevskia* (Lacertidae, squamata)

О. Ф. Чернова, Э. А. Галоян, Ю. Ф. Ивлев

460

Тесты на покорность, смелость и любознательность у желтого суслика *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae) в природе

Н. А. Васильева, М. О. Маркина, Н. С. Васильев

477

Генетические последствия резкого снижения численности сайгака (*Saiga tatarica tatarica*) в популяции Северо-Западного Прикаспия: сравнение современных и музейных образцов по мтДНК и микросателлитным локусам

Н. В. Кашина, А. А. Луцкина, П. А. Сорокин, М. В. Холодова

488

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Кинетика пищевых волокон у дневной песчанки: значение изолирующих структур пищеварительного тракта и качества корма

Е. И. Наумова, Г. К. Жарова, Т. Ю. Чистова

501

ЭКОЛОГИЯ

Системно-экологическая оценка сезонной активности дегидрогеназы осушенных лесных почв междуречья Оби и Томи

Т. Т. Ефремова, С. П. Ефремов, А. Ф. Аврова

512

Динамика содержания фенольных соединений и запасных углеводов в семенах инвазионного вида <i>Acer negundo</i> и аборигенного вида <i>Acer tataricum</i> в связи с их конкурентоспособностью в биоценозах <i>М. В. Семенова, В. В. Кондратьева, А. Г. Куклина, Л. С. Олехнович, Т. В. Воронкова</i>	524
---	-----

Роль корневых систем <i>Pinus sylvestris</i> L. при формировании вторичных сосновых лесов на вырубках на Кольском Севере <i>В. Т. Ярмишко</i>	531
---	-----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Экспрессия генов пируваткиназы, малат- и октопиндегидрогеназы в жабрах средиземноморской мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819) в условиях гипоксии и реоксигенации <i>А. О. Лантушенко, А. С. Кохан, А. А. Солдатов, И. В. Дегтяр, А. Ю. Андреева</i>	541
---	-----

CONTENTS

No. 4, 2024

THEORETICAL AND EVOLUTIONARY BIOLOGY

Application of harmonized elliptic Fourier transform coefficients for comparing the shapes of biological structures (on the example of the attachment organs of monogenea)

A. M. Lyakh

429

BIOCHEMISTRY

Evaluation of the pharmacological efficiency of the lipid extract from the tunic of the marine hydrobiont *Halocynthia aurantium* (Pallas, 1774)

N. F. Kushnerova, S. E. Fomenko, V. G. Sprygin, T. V. Momot, E. S. Drugova, L. N. Lesnikova, V. Y. Merzlyakov

441

PLANT PHYSIOLOGY

On the use of isotopic differences of carbon fractions of biomass in plants to study transport flows and source - sink relations under different light conditions

A. A. Ivlev, V. A. Litvinsky, N. M. Przewalsky, D. A. Tovstyko, A. S. Shmakov, M. P. Lomakin, N. N. Sleptsov, I. G. Tarakanov

451

ZOOLOGY

Skin morphology of five species of rock lizards of the genus *Darevskia* (Lacertidae, Squamata)

O. F. Chernova, E. A. Galoyan, Yu. F. Ivlev

460

Measuring Docility, Boldness, and Exploration in the Free-Living Yellow Ground Squirrel *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae)

N. A. Vasilyeva, M. O. Markina, N. S. Vasiliev

477

Genetic consequences of the dramatic decline in the north-west pre-caspian saiga (*Saiga tatarica tatarica*) population: a comparison of modern and museum samples on mtDNA and microsatellite loci

N. V. Kashinina, A. A. Lushchekina, P. A. Sorokin, M. V. Kholodova

488

PHYSIOLOGY OF ANIMALS AND HUMAN

Kinetics of dietary fibers in a fat sand rat: importance of the digestive tract isolating structures and food quality

E. I. Naumova, G. K. Zharova, T. Yu. Chistova

501

ECOLOGY

Systematic-ecological estimation of seasonal activity of dehydrogenase in drained swamp soils of interstream of Ob and Tom

T. T. Efremova, S. P. Efremov, A. F. Avrova

512

Phenolic compounds and spare carbohydrates content dynamics in seeds of the invasive species <i>Acer negundo</i> and the native species <i>Acer tataricum</i> in connection with their competitiveness in biocenoses <i>M. V. Semenova, V. V. Kondrat'eva, A. G. Kuklina, L. S. Olekhovich, T. V. Voronkova</i>	524
--	-----

The role of root systems of <i>Pinus sylvestris</i> L. during the formation of secondary pine forests in deforestation in the Kola North <i>V. T. Yarmishko</i>	531
---	-----

SHORT COMMUNICATIONS

Expression of pyruvate kinase, malate and octopine dehydrogenase genes in the gills of the Mediterranean mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819) under conditions of hypoxia and reoxygenation <i>A. O. Lantushenko, A. S. Kohan, A. A. Soldatov, I. V. Degtyar, A. Yu. Andreeva</i>	541
---	-----

УДК 573.018: 517.982.43

ПРИМЕНЕНИЕ СОГЛАСОВАННЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ ЭЛЛИПТИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФУРЬЕ ДЛЯ СРАВНЕНИЯ ФОРМ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР (НА ПРИМЕРЕ ПРИКРЕПИТЕЛЬНЫХ ОРГАНОВ МОНОГЕНЕЙ)

© 2024 г. А. М. Лях

ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”,
”р-т Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия

E-mail: me@antonlyakh.ru

Поступила в редакцию 23.08.2023 г.

После доработки 18.02.2024 г.

Принята к публикации 19.02.2024 г.

Эллиптическое преобразование Фурье — распространенный метод описания формы объектов уникальной последовательностью коэффициентов, которые позволяют сравнить формы математическими методами. Однако сырые коэффициенты содержат лишние данные, не связанные с формой, что не обеспечивает корректное сравнение. По этой причине коэффициенты нормируют. Это убирает часть лишних данных, но оставляет информацию о зеркальной симметрии и порядке обхода контуров объектов, закодированные в знаках коэффициентов, которые также мешают сравнению форм. В работе описан алгоритм согласования нормированных коэффициентов, нивелирующий влияние упомянутой информации. На примере прикрепительных органов моногеней показаны преимущества использования согласованных коэффициентов для сравнения форм биологических структур.

Ключевые слова: анализ форм, контур объекта, морфометрия, геометрические признаки, зеркальная симметрия, алгоритм, кластерный анализ, танглемма, паразиты рыб, прикрепительные органы моногеней, плоские черви

DOI: 10.31857/S1026347024040015, **EDN:** VINVUJ

Математический анализ форм организмов и их частей активно используется в современных биологических и палеонтологических исследованиях. Анализ форм помогает оценить изменчивость, сравнить, кластеризовать, классифицировать и идентифицировать формы разнообразных объектов математическими методами (Loncaric, 1998; Фурман и др., 2003; Dryden, Mardia, 2012; Pappas *et al.*, 2014; Васильев и др., 2018; Mitteroecker, Schaefer, 2022). Процедуры сравнения составляют основу для многих методов анализа форм.

Для подготовки анализируемых данных форму описывают наборами чисел. Они служат *количественными признаками* формы, с той или иной степенью точности характеризующими ее особенности. Самые простые количественные признаки — это размеры. Другие наиболее известные признаки получают при помощи методов геометрической морфометрии (ГМ) и анализа контуров (АК).

ГМ описывает форму последовательностью точек (меток), расставленных в геометрически или биологически значимых местах (Васильев и др., 2018; Mitteroecker, Schaefer, 2022). Преобразованные

координаты меток служат признаками формы. АК представляет границу объекта последовательностью кривых, которые при объединении приближаются к его форме. В качестве признаков формы используют характеристики этих кривых (Kuhl, Giardina, 1982; Фурман и др. 2003; Vignon, 2011; Tuset *et al.*, 2020; Salili-James *et al.*, 2022).

Основное отличие методов ГМ от АК заключается в том, что методы АК позволяют описать границу объекта целиком, тогда как ГМ не учитывает участки границы, расположенные между метками. По данным АК можно с любой наперед заданной точностью восстановить форму объекта, а при использовании данных ГМ форма участков между метками остается не определенной. Поэтому считают, что признаки АК более точно отражают геометрические особенности формы объекта.

Распространенным методом АК является *эллиптическое преобразование Фурье* (ЭПФ). Оно описывает контур объекта суммой эллипсов, характеристики которых образуют уникальную последовательность коэффициентов (Kuhl, Giardina, 1982; Ferson *et al.*, 1985; Diaz *et al.*, 1989; Crampton, 1995).

Уникальность означает, что любые отличающиеся формы будут описаны отличающимся набором коэффициентов. По этой причине коэффициенты ЭПФ используют для математического сравнения форм.

Так, коэффициенты ЭПФ применяют для анализа форм объектов живой и неживой природы: от панцирей диатомовых микроводорослей (Wishkerman, Hamilton, 2018), листьев (McLellan, Endler, 1998; Neto *et al.*, 2006) и семян растений (Cervantes *et al.*, 2022), крыльев насекомых (Yang *et al.*, 2015), раковин моллюсков (Crampton, 1995; Tuset *et al.*, 2020), прикрепительных органов паразитических червей (Vignon, 2011; Lyakh *et al.*, 2017) и форм прочих организмов (Lishchenko, Jones, 2021), до форм песчинок (Suzuki *et al.*, 2015) и озер на полюсе спутника Сатурна — Титане (Dhingra *et al.*, 2019).

Следует учесть, что на коэффициенты ЭПФ влияют две группы факторов, определяемых геометрией объекта: первая влияет на значения коэффициентов, вторая — на их знаки. Если их не исключить, то даже одинаковые формы будут описывать разные наборы коэффициентов. Значит такие коэффициенты будут невозможно использовать для корректного сравнения форм. По этой причине вычисленные коэффициенты дополнительно преобразовывают.

Первая группа факторов включает угол поворота, положение и размеры контура, и положение точки, в которой начинается контур. Чтобы убрать влияние этих факторов, коэффициенты специальным образом нормируют (Kuhl, Giardina, 1982; Ferson *et al.*, 1985; Diaz *et al.*, 1989).

Тем не менее нормированные коэффициенты все еще содержат лишние данные, не связанные с формой. Так, закономерность чередования знаков коэффициентов кодирует взаимное расположение частей контура и направление обхода границы контура — по или против часовой стрелки. Это вторая группа факторов. Данные о них невозможно исключить из коэффициентов, но можно уравнивать их влияние на знаки коэффициенты всех анализируемых форм.

Для этого, например, можно использовать абсолютные значения коэффициентов, что уберет информацию о знаках (Crampton, 1995). При этом мы потеряем информацию о форме, так как форма, восстановленная из абсолютных значений коэффициентов, будет отличаться от исходной.

При втором способе изображения объектов располагают так, чтобы исключить зеркально-симметричные отличия между ними. После каждый объект обводят контуром в одном и том же направлении часовой стрелки, начиная построение примерно с одной точки. Тогда, после вычисления нормированных коэффициентов ЭПФ, последовательности чередования знаков коэффициентов в большинстве случаев совпадут. Однако у способа есть недостатки. Во-первых, необходимо потратить дополнительное время на согласованное размещение подобных сторон

объектов. Во-вторых, у объектов со сложными асимметричными формами трудно или даже невозможно определить подобные стороны. Это не позволит расположить их правильным образом, что, в итоге, сохранит в нормированных коэффициентах разницу в знаках.

Третий способ, сохраняющий формы, предполагает ручную корректировку знаков нормированных коэффициентов. Знаки коэффициентов меняют следующие действия с контуром: зеркальное отражение, инверсия порядка обхода и смещение точки начала контура в противоположную часть (Лях, 2019). При помощи этих операций контуры преобразуют до тех пор, пока несколько первых коэффициентов модифицированных контуров не приобретут одинаковые знаки. Это приведет к исчезновению отличий в порядке обхода границы и симметрии контуров. Такой методический прием улучшенной нормализации коэффициентов называется *согласованием коэффициентов*, а сами коэффициенты называются *согласованными* (англ., *harmonized*) (Лях, 2019). Недостаток подхода заключается в трудоемкости процедуры согласования, когда необходимо вручную модифицировать каждый анализируемый контур.

Порядок чередования знаков коэффициентов необходимо уравнивать перед проведением любого анализа. Из всех вышеописанных способов процедура согласования знаков коэффициентов является наилучшей, так как она сохраняет исходные формы и для нее не важно, как располагались и в каком направлении были обведены объекты. От единственного недостатка процедуры, связанного с трудоемким ручным преобразованием контуров, избавит алгоритм, автоматически выполняющий данную операцию. Такой алгоритм впервые описан в настоящей работе.

Цель работы заключалась в проверке эффективности использования согласованных коэффициентов ЭПФ для сравнения форм биологических структур.

В качестве объекта исследования выбраны прикрепительные органы плоских паразитических червей из класса Monogenea (Plathelminthes). Форма и размеры прикрепительных органов этих паразитов — крючков и соединительных пластинок — является важным диагностическим признаком, помогающим различать виды (Быховский, 1957). Для этого форму прикрепительных органов описывают наборами размеров, которые анализируют статистическими методами (Dmitrieva *et al.*, 2007; Герасев и др., 2010; Vignon, 2011). Так как разные исследователи используют несовпадающие схемы промеров, то это приводит к труднопоставимым наборам данных и затрудняет таксономическую идентификацию (Герасев и др., 2010; Vignon, 2011), что стимулирует поиск иных способов описания форм прикрепительных органов.

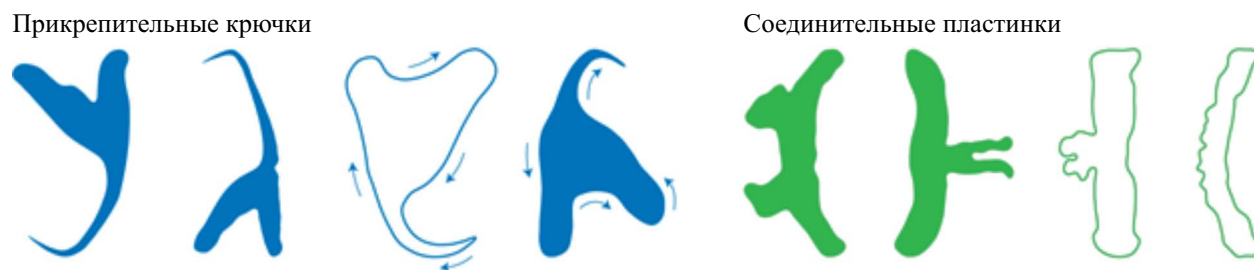


Рис. 1. Контуры прикрепительных органов моногеней. Заливкой обозначен порядок обхода вершин контуров (ориентация контуров): точки закрашенного контура идут против часовой стрелки, а незакрашенного — по часовой.

С другой стороны формы прикрепительных органов моногеней подходят для описания коэффициентами ЭПФ (Vignon, 2011; Lyakh *et al.*, 2017) и тестирования методики сравнения форм. Так, прикрепительный крючок паразитического червя имеет асимметричную форму с ясно выраженными сторонами, которые задают направление острия крючка (рис. 1). Это позволяет визуально оценить работу алгоритма согласования по однотипному расположению острий крючков, восстановленных из коэффициентов ЭПФ. Форма соединительной пластинки близка к моносимметричной — зеркально-симметричной относительно продольной оси (рис. 1). У такой формы можно выделить две противоположные стороны — с отростками или прогибом и без, однако две другие стороны отличить невозможно. Эта особенность не позволяет расположить пластинки одинаковым образом, так, чтобы положение их сторон не влияло на коэффициенты. Единственный способ добиться этого — использовать процедуру согласования коэффициентов.

Таким образом прикрепительные органы моногеней являются подходящим модельным объектом для апробации метода ЭПФ и проверки эффективности использования согласованных коэффициентов ЭПФ для сравнения форм биологических структур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили контуры прикрепительных крючков плоских паразитических червей рода *Ligophorus* Euzet & Seriano, 1977 из класса моногеней (*Monogenea*). Для работы использованы контуры 38 вентральных и 38 дорсальных прикрепительных крючков и 38 вентральных соединительных пластин особей 32 видов (рис. 2).

Контур построены по фотографиям прикрепительного аппарата червей из коллекции паразитов рыб Мирового океана ФИЦ ИнБЮМ (Дмитриева и др., 2016) и по иллюстрациям из паразитологических работ. Оцифровка крючков выполнена в векторном редакторе Inkscape, в котором контуры описаны последовательностью соединенных друг

с другом кривых Безье, дуг окружностей и отрезков прямых. Готовые контуры сохранены в формате масштабируемой векторной графики СВГ (SVG — Scalable Vector Graphics).

Во время построения контуров исследователи не придерживались никаких правил оцифровки: они не исправляли расположение изображенного объекта, произвольно выбирали точку начала контура и направление обводки. То есть вели себя естественным образом, как любой неспециалист, которого попросили обвести изображенные объекты.

В результате был создан набор контуров с нескорректированным влиянием второй группы факторов, влияющих на знаки коэффициентов. По этому набору с помощью компьютерного скрипта было сгенерировано два дополнительных набора с таким же нескорректированным влиянием второй группы факторов. Для этого каждый контур из исходного набора был случайным образом зеркально отражен относительно вертикальной или горизонтальной оси, либо у него было инвертировано направление обхода границы, после чего контур бы помещен в новый набор. Готовые наборы контуров использованы для вычисления коэффициентов ЭПФ и выявления отличий между разными типами коэффициентов.

Коэффициенты ЭПФ вычислены в программе «Эльфурье» (antonlyakh.ru/elfourier/). В качестве входных данных программа использовала СВГ файлы с контурами, а в качестве результата выдала текстовые файлы с нормированными и согласованными значениями коэффициентов. Программа вычислила нормированные коэффициенты по формулам из работ (Ferson *et al.*, 1985; Diaz *et al.*, 1989) и автоматически согласовала их при помощи разработанного алгоритма.

Алгоритм согласования коэффициентов создан путем логического анализа, формализации и математизации положений, высказанных в статьях (Lyakh *et al.*, 2017; Лях, 2019).

После проработки и реализации алгоритма, дальнейшие методические шаги были направлены на выявление различий в результатах сравнения наборов форм, описанных при помощи нормированных, согласованных и абсолютных значений



Рис. 2. Контуры прикрепительных органов видов рода *Ligophorus*, использованные в работе. Контуры выровнены по вертикали и подогнаны к одному размеру при помощи процедуры нормирования, а при помощи алгоритма согласования, описанного в статье, они геометрически согласованы друг с другом.

коэффициентов. Они были выполнены в среде R. Кластерный анализ выполнен с помощью функции `hclust` стандартной библиотеки `stats`, являющейся частью R. Построение дендрограмм и танглеграмм выполнено при помощи функций библиотеки `dendextend`.

Для каждого набора контуров были рассчитаны три типа коэффициентов, которые были кластеризованы методом иерархического кластерного анализа. После чего мы выяснили, чем результаты кластеризаций — дендрограммы — отличаются друг от друга.

Во-первых, мы определили, насколько каждый тип коэффициентов устойчив к изменению второй группы характеристик контуров. Для этого мы выявили различия между дендрограммами, построенными по одному и тому же типу коэффициентов, вычисленных по разным наборам контуров. Во-вторых, мы выявили различия между дендрограммами, построенными по разным типам коэффициентов.

Для визуального определения схожести дендрограмм использована *танглеграмма* (Scornavacca, 2011). Это схема, на которой две дендрограммы с одинаковым составом листьев противопоставлены друг другу, и между совпадающими листьями проведены отрезки. Чем больше отрезков соединяет листья на одинаковых ветках обоих деревьев, тем сильнее похожи эти деревья.

Для количественной оценки различий между дендрограммами использован *индекс гамма-ассоциации*

Бейкера (Baker, 1974). Индекс принимает значение от -1 до 1 , где 1 означает, что деревья идеально соответствуют друг другу, а -1 — что они абсолютно разные.

Полученные результаты легли в основу выводов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В процессе работы был написан алгоритм автоматического согласования коэффициентов ЭПФ. Он нацелен на исключение различий в знаках первых нормированных коэффициентов анализируемых контуров, что автоматически приводит к их согласованности. Для понимания работы алгоритма дадим некоторые пояснения.

Коэффициенты ЭПФ принято объединять в четверки, называемые *гармониками*. Гармоники нумеруют, начиная с нуля. Коэффициенты, принадлежащие i -ой гармонике, принято обозначать первыми буквами латинского алфавита: $H_i = \{a_i, b_i, c_i, d_i\}$. Таким образом последовательность коэффициентов ЭПФ, описывающих замкнутый контур, представляет собой бесконечную последовательность гармоник:

$$\{H_0 = \{a_0, b_0, c_0, d_0\}, H_1 = \{a_1, b_1, c_1, d_1\},$$

$$H_2 = \{a_2, b_2, c_2, d_2\}, \dots\}$$

Нулевая гармоника H_0 содержит координаты центра объекта, поэтому в анализе она не участвует. Первая гармоника H_1 задает главный эллипс, который очень грубо повторяет форму объекта, но положение его главных осей помогает нормировать коэффициенты. Прочие гармоники содержат сведения о все более и более мелких деталях формы.

После нормирования значения коэффициентов по абсолютной величине не превышают единицы. При этом с увеличением номера гармоники значения коэффициентов, относящихся к ней, стремятся к нулю. Из-за этого разница между коэффициентами первых и, к примеру, тридцатых гармоник достигает нескольких порядков (рис. 3). По этой причине обычно анализируют только коэффициенты первых гармоник, так как они имеют наибольший вес.

Количество анализируемых гармоник подбирают так, чтобы форма контура, восстановленного из этих гармоник, была идентична исходной форме. Тогда считается, что набор гармоник правильно описывает анализируемую форму. Для того, чтобы по гармоникам вновь построить контур, используют обратное ЭПФ. Точность восстановления формы растет вместе с числом использованных гармоник. Необходимое число гармоник оценивают по формулам (Stampton, 1995). Обычно достаточно 20–50 гармоник.

Стандартная процедура нормирования меняет значения коэффициентов так, что это приводит к повороту восстановленных контуров в вертикальное или горизонтальное положение. При этом коэффициенты первой гармоники принимают особые значения: два коэффициента становятся равными нулю, один — единице, еще один

по абсолютной величине не превышает единицы (табл. 1).

Алгоритм согласования исключает разницу в знаках нормированных коэффициентов, соответствующих первым двум гармоникам, так как именно они сильнее всего влияют на результаты математического сравнения форм. Знаки коэффициентов нельзя менять произвольно, иначе это приведет к искажению формы восстановленного контура. Знаки можно менять только по определенным правилам.

Алгоритм считает, что нормированные коэффициенты двух или более контуров согласованы, если у них совпадают знаки двух идентичных, не равных нулю компонент первых гармоник (b_1 и c_1 при вертикальном, a_1 и d_1 при горизонтальном выравнивании контуров), и, как минимум, двух первых компонент вторых гармоник (a_2 и b_2) (табл. 2) (Лях, 2019).

Работа алгоритма основана на применении к нормированным контурам геометрических преобразований (операторов) так, как это делает человек, согласующий контуры (Лях, 2019). Только алгоритм подбирает необходимые операторы автоматически. Операторы — это: O_1 и O_2 — зеркальное отражение относительно вертикальной и горизонтальной оси, O_3 — инверсия направления обхода, O_4 — сдвиг начальной точки в противоположную часть контура. Эти операторы не меняют форму контура, а влияют на знаки коэффициентов (рис. 4 а, д). Верно и обратное: для имитации действия оператора достаточно по соответствующему правилу поменять знаки коэффициентов.

Использование для согласования коэффициентов только одного правила бывает недостаточным.

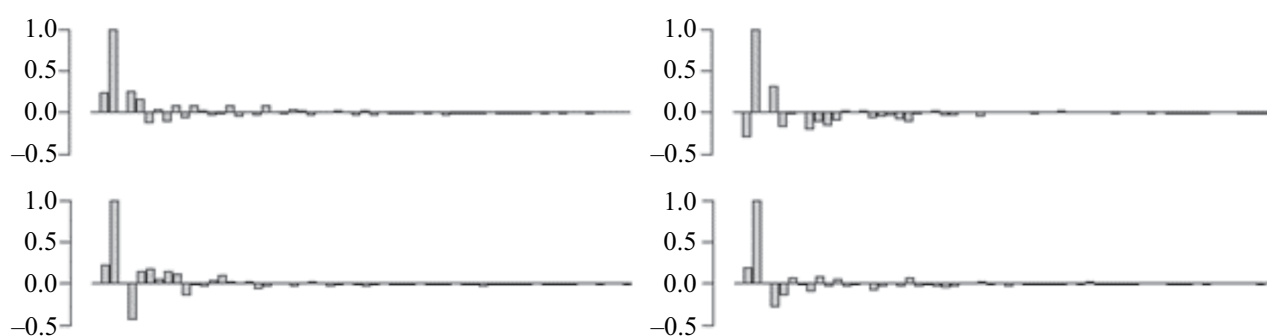


Рис. 3. Значения 60 коэффициентов первых 15 гармоник, описывающих форму четырех прикрепительных крючков. Видно, что с увеличением номера гармоники значения нормированных коэффициентов ЭПФ быстро убывают.

Таблица 1. Значение нормированных коэффициентов первой гармоники

Горизонтально выровненные контуры				Вертикально выровненные контуры			
$a_1 = 1$	$b_1 = 0$	$c_1 = 0$	$ d_1 \leq 1$	$a_1 = 0$	$ b_1 \leq 1$	$c_1 = 1$	$d_1 = 0$

Поэтому правила комбинируют друг с другом. Обозначим символом $\oplus$ комбинацию правил, символом $\times$ положительный коэффициент, а символом $\cdot$ отрицательный или нулевой коэффициент. Тогда комбинация $\oplus$ будет действовать следующим образом:

$\cdot \oplus \cdot = \cdot; \times \oplus \cdot = \times; \cdot \oplus \times = \times; \times \oplus \times = \cdot$

То есть знак итогового коэффициента меняется, когда только один из комбинируемых коэффициентов положительный.

Из четырех операторов согласования ($\emptyset$, $\bullet$, $\times$ и $\cdot$) можно составить 16 уникальных комбинаций, включая нейтральную. Каждой комбинации соответствует единственное правило замены знаков (рис. 4). Все прочие способы изменения знаков коэффициентов повлияют на коэффициенты так, что восстановленный контур изменит форму.

Для согласования коэффициентов двух контуров необходимо подобрать подходящее правило замены знаков. Для этого следует найти *знаковую разность* первых двух гармоник контуров. Она равна

Таблица 2. Соответствие между знаками коэффициентов двух первых гармоник согласованных контуров

Гармоника	H_1		H_2
Выравнивание	вертикальное	горизонтальное	оба случая
Соответствие знаков коэффициентов	—	$[a_1^i] \equiv [a_1^k]$	$[a_2^i] \equiv [a_2^k]$
	$[b_1^i] \equiv [b_1^k]$	—	$[b_2^i] \equiv [b_2^k]$
	$[c_1^i] \equiv [c_1^k]$	—	$[c_2^i] \stackrel{?}{\equiv} [c_2^k]$
	—	$[d_1^i] \equiv [d_1^k]$	$[d_2^i] \stackrel{?}{\equiv} [d_2^k]$

Примечание. Индексы i и k обозначают коэффициенты разных контуров; $[\cdot]$ возвращает знак числа: -1 для отрицательных, 0 или 1 для положительных чисел; $\equiv$ означает совпадение знаков; $\stackrel{?}{\equiv}$ означает “может быть равен, а может и нет”.

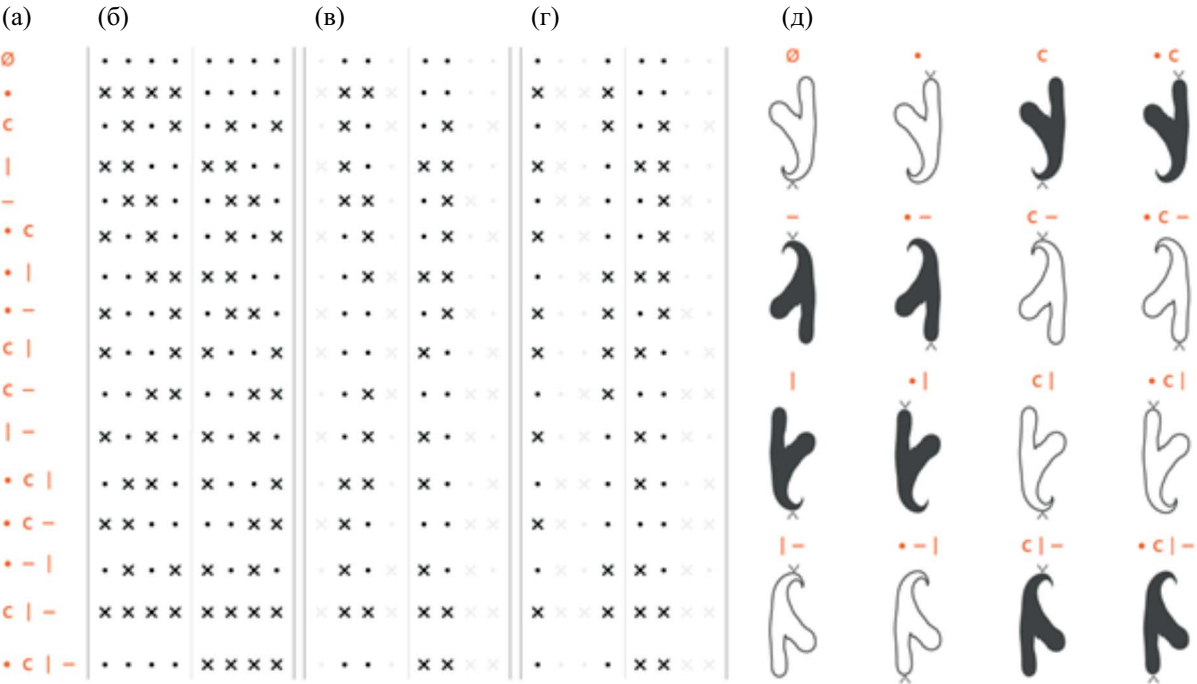


Рис. 4. Правила замены знаков и действие операторов согласования: а — $\emptyset$ — нулевой оператор, не влияющий на контур, $\bullet$ — оператор сдвига начальной точки контура в противоположную часть, $\times$ — оператор инверсии направления обхода, $-$ и $|$ — операторы зеркального отражения относительно горизонтальной и вертикальной осей; б — правила замены знаков коэффициентов; правило записано для первых двух гармоник (восьми коэффициентов), но его следует применить для каждой пары гармоник, начиная с первой; в записи использованы следующие обозначения: $\times$ — инверсия знака, $\cdot$ — знак остается прежним; в, г — маски для поиска операторов, соответствующих знаковой разности согласуемых контуров, при вертикальном (в) и горизонтальном (г) выравнивании контуров; д — результат действия операторов на контуры.

комбинации $\oplus$ символьного представления знаков коэффициентов этих гармоник.

Пусть, например, заданы первые восемь коэффициентов двух контуров A и B , которые выровнены по вертикали (см. табл. 1):

$$A = \{0,00; 0,34; 0,23; 0,00 \mid -0,67; 0,54; 0,77; -0,01\},$$

$$B = \{0,00; -0,17; 0,82; 0,00 \mid 0,42; -0,37; 0,68; -0,03\}.$$

Чтобы найти знаковую разность C , переведем коэффициенты в символьную запись и сложим с помощью $\oplus$. Получим $C = A \oplus B$:

$$A = \{\cdot \times \times \cdot \mid \cdot \times \times \cdot\}$$

$$B = \{\cdot \cdot \times \cdot \mid \times \cdot \times \cdot\}$$

$$C = \{\cdot \times \cdot \cdot \mid \times \times \cdot \cdot\}$$

Знаковая разность служит шаблоном для поиска правила замены знаков, которое согласует контуры. Так как мы согласуем знаки только двух (ненулевых) коэффициентов первой и двух второй гармоники, то в полученной знаковой разности значимыми будут только четыре позиции (отмечены *): у вертикально выровненных контуров — это $\{_ \cdot \cdot _ \mid \cdot \cdot _ _ \}$, у горизонтально выровненных — $\{\cdot _ _ \cdot \mid \cdot \cdot _ _ \}$ (рис. 4 в, г). Тогда, для поиска правила замены знаков следует подобрать такое правило, у которого знаки (символы), стоящие в значимых позициях, будут соответствовать символам в полученной знаковой разности.

Если вернуться к примеру выше, то при вертикальном выравнивании контуров в найденной знаковой разности C значимые знаки будут следующими (подчеркивание $_$ означает незначимый знак коэффициента):

$$C = \{_ \times \cdot _ \mid \times \times _ _ \}$$

Такому шаблону соответствует единственное правило замены знаков — это оператор зеркально-го отражения относительно вертикальной оси O :

$$C \equiv \{\times \times \cdot \cdot \mid \times \times \cdot \cdot\} \equiv O_{\mid}$$

Когда мы применим это правило к контуру B — оно согласует знаки коэффициентов его первых двух гармоник со знаками гармоник контура A :

$$A = \{0,00; 0,34; 0,23; 0,00 \mid -0,67; 0,54; 0,77; -0,01\},$$

$$B \oplus C = \{0,00; 0,17; 0,82; 0,00 \mid -0,42; 0,37; 0,68; -0,03\}.$$

Контур, восстановленный из согласованных коэффициентов $B \oplus C$, будет зеркально отражен по вертикали.

Согласование нескольких контуров выполняется аналогично. Сначала мы выбираем один из контуров и принимаем знаки его коэффициентов за образец. Далее вычисляем знаковые разности между образцом и коэффициентами остальных контуров и для каждого контура подбираем соответствующее правило замены знаков. В конце применяем это правило к знакам коэффициентов согласуемого контура.

Описанный алгоритм позволяет согласовывать контуры без участия человека.

Сравнение форм прикрепительных органов моногеней, описанных разными типами коэффициентов. Напомним, что каждая разновидность прикрепительных органов моногеней — дорсальные крючки, вентральные крючки и вентральные пластинки — была представлена тремя наборами контуров, которые совпадали формами, но отличались порядком обхода границы и расположением сторон: расположением острий крючков и отростков или вогнутостей пластинок (наборы A , B , C на рис. 5). Для каждого набора были вычислены нормированные коэффициенты ЭПФ и абсолютные и согласованные значения коэффициентов.

В результате получилось, что значения в трех группах нормированных коэффициентов отличались друг от друга. Это показало попарное сравнение дендрограмм, построенных в процессе иерархической кластеризации групп коэффициентов. При сравнении дендрограмм индекс гамма-ассоциации Бейкера был близок к нулю, что говорит о несоответствии дендрограмм. Об этом же сигнализируют танглеграммы (рис. 5). Это значит, что нормирование коэффициентов приводит к неустойчивым, нестабильным результатам, зависящим от начальных характеристик контуров. Таким образом, *нормированные коэффициенты нельзя использовать для корректного сравнения форм.*

Алгоритм согласования коэффициентов привел к противоположному результату. Для каждой разновидности прикрепительных структур три группы согласованных значений коэффициентов совпали друг с другом. Контуры прикрепительных крючков, восстановленные из согласованных коэффициентов, совпали геометрически как по расположению и направлению острия, так и по направлению обхода границы. Расположение сторон контуров соединительных пластинок также совпало за исключением двух случаев (рис. 6). По видимому такое исключительное расположение пластинок лучше выражает их геометрические особенности в числовом виде. Таким образом предложенный алгоритм согласования стабильно выдавал один и тот же набор коэффициентов, не зависящий ни от расположения сторон, ни от порядка обхода обрабатываемых контуров.

Сравнение дендрограмм, построенных по абсолютным и согласованным значениям коэффициентов, показало, что они отличаются друг от друга.

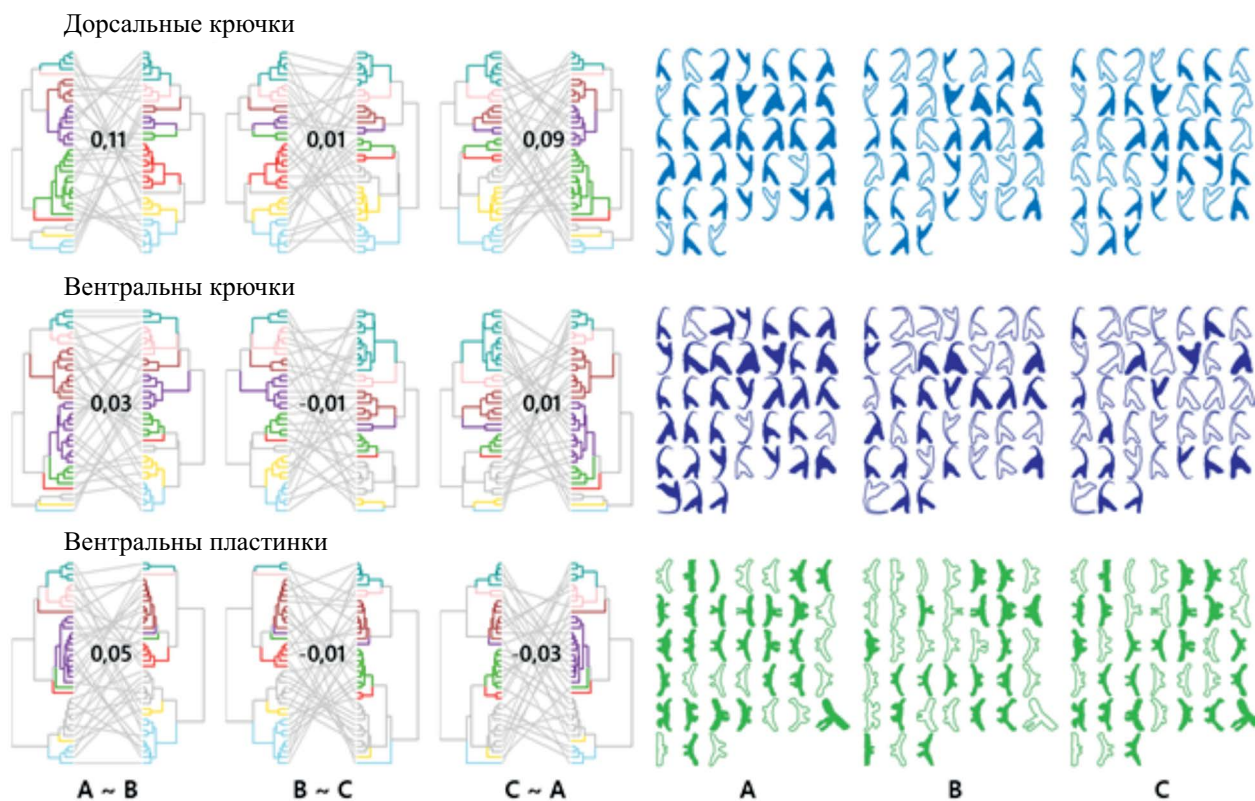


Рис. 5. Сравнение при помощи танглеграмм и индекса гамма-ассоциации Бейкера (число в середине танглеграммы) дендрограмм, построенных по нормированным коэффициентам ЭПФ трех наборов контуров – А, В и С.

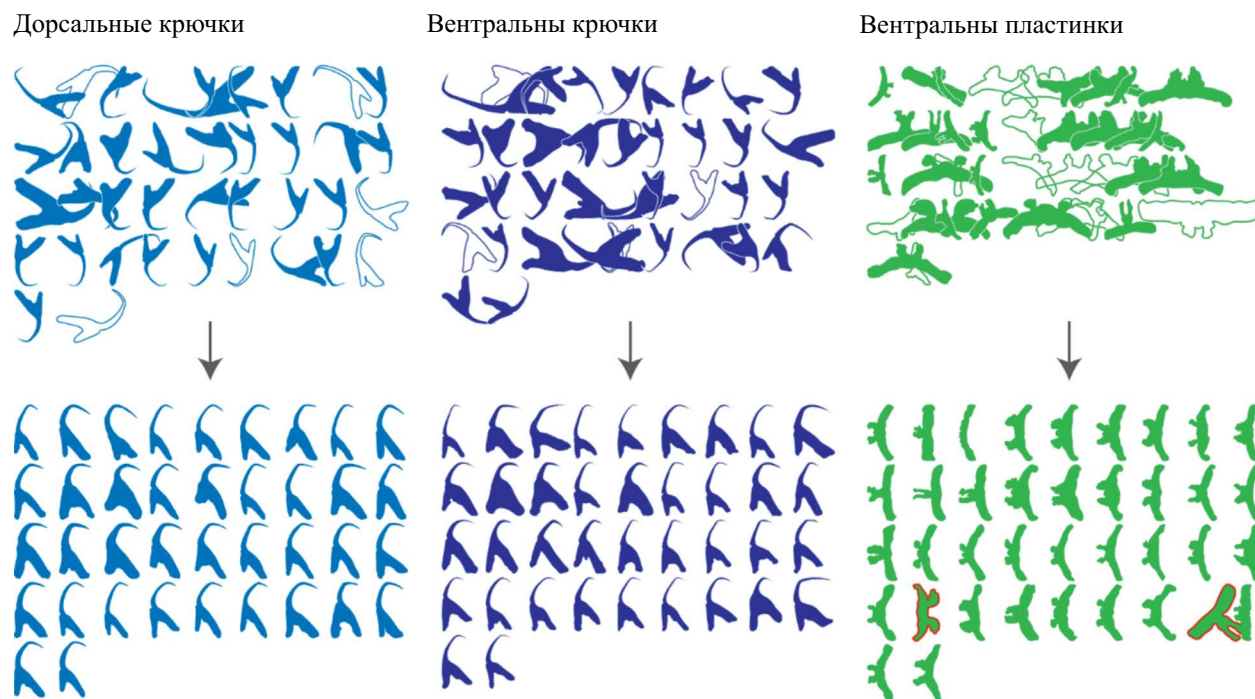


Рис. 6. Алгоритм согласования автоматически преобразовал хаотично расположенные контуры в упорядоченные. В редких случаях положение некоторых контуров (обведены красным) отличалось от остальных, однако это не мешало использовать их числовые описания для сравнения форм.

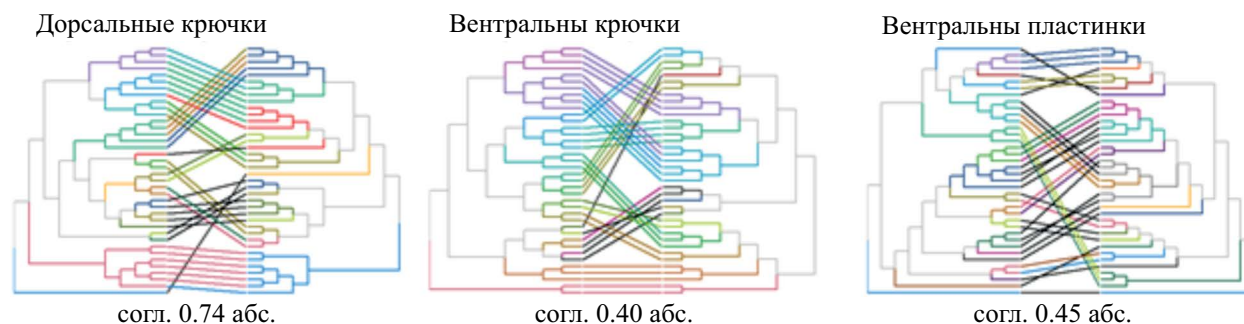


Рис. 7. Сравнение дендрограмм, построенных по согласованным (согл.) и абсолютным (абс.) значениям коэффициентов; числа показывают значения индекса гамма-ассоциации Бейкера.

Наибольшее сходство было между дендрограммами, построенным для дорсальных крючков ($\gamma_{da} = 0.74$), а сходство между двумя другими разновидностями дендрограмм было средним: у вентральных крючков $\gamma_{va} = 0.40$, у вентральных пластинок $\gamma_{vb} = 0.45$ (рис. 7). Очевидно, что результаты кластеризаций согласованных и абсолютных значений коэффициентов не могут быть идентичными, так как среди согласованных коэффициентов встречаются отрицательные значения, отсутствующие у абсолютных значений. Следовательно, *абсолютные значения коэффициентов не могут заменить согласованные коэффициенты*.

Сопоставление дендрограмм по расположению одинаковых видов моногеней показало, что при усечении деревьев на уровне 19 кластеров (половина от количества листьев) абсолютные значения коэффициентов немного лучше улавливали схожесть прикрепительных структур представителей одного вида: из пяти групп моногеней одинаковых видов дендрограммы абсолютных значений в среднем правильно объединили в кластеры 3–4 группы экземпляров видов, а дендрограммы согласованных значений — 2–3. Однако этот вывод нельзя считать окончательным, так как объем проверочных данных был мал: только 5 из 32 видов моногеней были представлены двумя или тремя экземплярами. Для более точного вывода необходимо проанализировать большее число экземпляров каждого вида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом мы не можем сказать, какая из дендрограмм лучше передает морфологическую схожесть прикрепительных структур. Для этого необходимо располагать идеальной кластеризацией, с которой мы могли бы сравнить полученные результаты. К сожалению, такую идеальную кластеризацию построить невозможно. Это вызвано как техническими причинами — разнообразием методов

кластеризации (Henning, 2022) и разнообразием метрик для сравнения форм (Shen *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2016), из которых невозможно выбрать наилучшую, — так и биологическими причинами — широкой изменчивостью форм структур представителей одного вида, вследствие которой формы видов образуют непрерывные перекрывающиеся спектры.

Однако согласованные коэффициенты сохраняют формы анализируемых объектов неизменными и уравнивают геометрические особенности данных форм, тогда как абсолютные значения коэффициентов искажают оригинальные формы. Вследствие этой особенности согласованные коэффициенты можно использовать для манипуляций с формами. Например, для построения *средних форм объектов из одной группы*. Для этого необходимо найти средние значения коэффициентов группы и восстановить из них среднюю форму (рис. 8).

При помощи этого способа мы можем построить средние формы для кластеров дендрограммы (рис. 9). Такая иерархия форм будет служить для идентификации видов моногеней по форе прикрепительных структур, так как она обеспечивает эффективный поиск форм на основе их сходства с запрашиваемой формой (Srivastava *et al.*, 2005).

Помимо этого средние формы могут использоваться в качестве типовых форм групп объектов, подобных типовым экземплярам видов. Типовые формы можно использовать для выявления характерных (обычных) и аномальных (необычных) форм и последующего анализа причин, приведших к их появлению.

Перечисленные задачи можно решить только при наличии корректных исходных данных. Правильное осреднение форм возможно только при геометрической схожести контуров, которую обеспечивают согласованные коэффициенты ЭПФ. Предложенный в работе алгоритм автоматически выполняет согласование коэффициентов и геометрии контуров. Это позволяет использовать алгоритм в качестве модуля автоматизированной

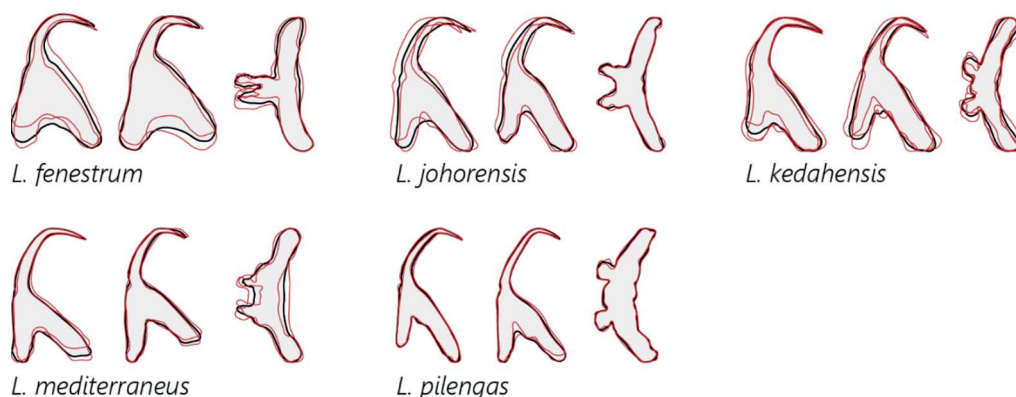


Рис. 8. Средние формы (черные) прикрепительных структур представителей пяти видов рода *Ligophorus* (темно-красные), построенные при помощи осреднения значений согласованных коэффициентов ЭПФ.

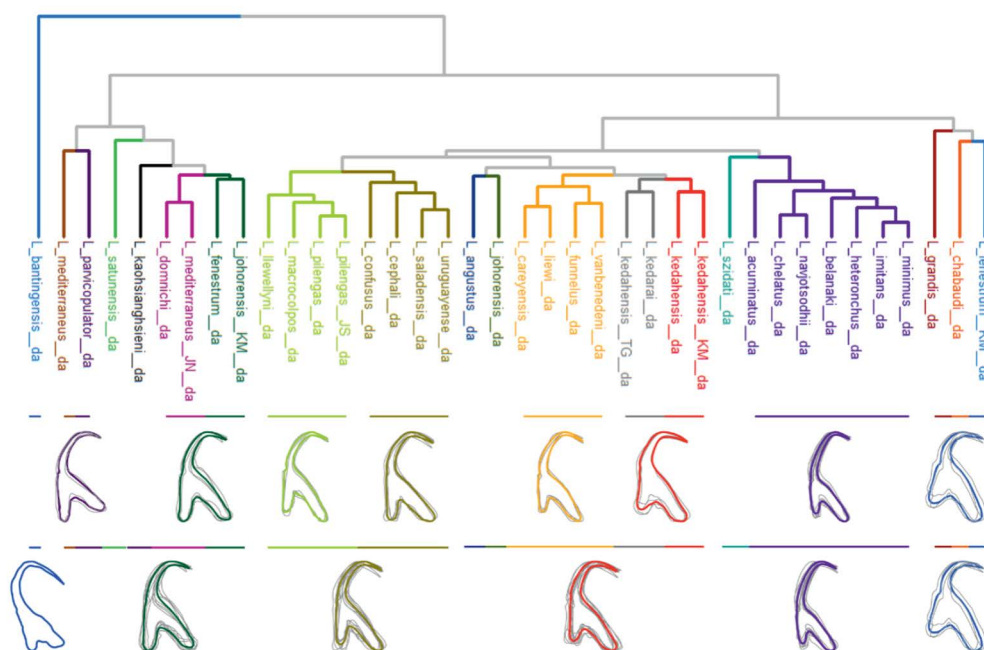


Рис. 9. Дерево средних форм прикрепительных крючков моногеней, которое может служить для идентификации форм. Показаны только два уровня дерева. На первом уровне иерархии средние формы построены при помощи осреднения согласованных коэффициентов ЭПФ, принадлежащих одному кластеру; на втором уровне — при помощи осреднения коэффициентов, принадлежащих соседним кластерам.

системы анализа, распознавания и идентификации форм биологических структур.

Финансирование. Данное исследование было проведено в рамках проекта Государственное задание Федерального исследовательского центра Институт биологии южных морей им. Ковалевского, Россия Академии наук, «Биоразнообразие как основа устойчивое функционирование морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения» (госзадание № 124022400148-4).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит руководителя отдела экологической паразитологии ФИЦ ИнБЮМ Дмитриеву Е.В. за разрешение использовать контуры прикрепительных структур моногеней в представленной работе. Также автор благодарит рецензента за ценные замечания, которые помогли раскрыть смысл и улучшить читаемость работы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Быховский Б. Е. Моногенетические сосальщики, их система и филогения. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 510 с.
- Васильев А. Г., Васильева И. А., Шкурихин А. О. Геометрическая морфометрия: от теории к практике. М.: КМК. 2018. 471 с.
- Герасев П. И., Дмитриева Е. В., Пугачев О. Н. Методы изучения моногеней (Plathelminthes, Monogenea) на примере паразитов кефалей (Mugilidae) // Зоол.ж. 2010. Т. 89. № 3. С. 1—15.
- Дмитриева Е. В., Лях А. М., Корнийчук Ю. М., Полякова Т. А., Попюк М. П. Электронная коллекция паразитов рыб Мирового океана Института морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского // Морской биологический журнал. 2016. Т. 1. № 3. С. 27—31.
https://doi.org/10.21072/mbj.01.3.04
- Лях А. М. Анализ биологических форм на основе согласованных коэффициентов эллиптического преобразования Фурье // Наука Юга России. 2019. Т. 15. № 4. С. 63—70.
- Фурман Я. А., Кревецкий А. В., Передерев А. К., Рожениц А. А., Хафизов Р. Г., Егошина И. Л., Леухин А. Н. Введение в контурный анализ; приложения к обработке изображений и сигналов / Под ред. Я. А. Фурмана. 2 изд., испр. М.: Физматлит. 2003. 592 с.
- Bai X., Donoser M., Liu H., Latecki L. J. Efficient shape representation, matching, ranking, and its applications // Pattern Recog. Lett. 2016. V. 83. № 3. P. 241—430.
https://doi.org/10.1016/j.patrec.2016.08.007
- Baker F. B. Stability of two hierarchical grouping techniques case 1: Sensitivity to data errors // J. Am. Stat. Assoc. 1974. V. 69. № 346. P. 440—445.
https://doi.org/10.1080/01621459.1974.10482971
- Cervantes E., Rodriguez-Lorenzo J. L., Pozo del D. G., Martin-Gomez J. J., Janousek B., Tocino A., Juan A. Seed silhouettes as geometric objects: new applications of elliptic Fourier transform to seed morphology // Horticulturae. 2022. V. 8. № 10. 974.
https://doi.org/10.3390/horticulturae8100974
- Crampton J. S. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations // Lethaia. 1995. V. 28. P. 179—186.
https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1995.tb01611.x

- Diaz G., Zuccarelli A., Pelligra I., Ghiani A. Elliptic Fourier analysis of cell and nuclear shapes // Comput. Biomed. Res. 1989. V. 22. № 5. P. 405—414.
https://doi.org/10.1016/0010-4809(89)90034-7
- Dhingra R. D., Barnes J. W., Hedman M. M., Radebaugh J. Using elliptical Fourier descriptor analysis (EFDA) to quantify Titan lake morphology // The Astronomical Journal. 2019. V. 158. № 6. P. 1—13.
https://doi.org/10.3847/1538-3881/ab4907
- Dmitrieva E. V., Gerasev P. I., Pron'kina N. V. *Ligophorus llewellyni* n. sp. (Monogenea: Ancyrocephalidae) from the redlip mullet *Liza haematocheilus* (Temminck & Schlegel) introduced into the Black Sea from the Far East // Syst. Parasitol. 2007. V. 67. P. 51—64.
https://doi.org/10.1007/s11230-006-9072-4
- Dryden I. L., Mardia K. V. Statistical shape analysis, with application in R. John Wiley & Sons, Ltd., 2012. 510 p.
- Ferson S., Rohlf J., Koehn R. Measuring shape variation of two-dimensional outlines // Syst. Biol. 1985. V. 34. № 1. P. 59—68.
https://doi.org/10.2307/2413345
- Henning C. An empirical comparison and characterization of nine popular clustering methods // Adv. Data Anal. Classi. 2022. V. 16. P. 201—209.
https://doi.org/10.1007/s11634-021-00478-z
- Kuhl F. P., Giardina C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour // Comp. Graph. Image Proc. 1982. V. 18. № 3. 236—258.
https://doi.org/10.1016/0146-664X(82)90034-X
- Lishchenko F., Jones J. B. Application of shape analyses to recording structures of marine organisms for stock discrimination and taxonomic purposes // Front. Mar. Sci. 2021. V. 8. № 667183. P. 1—26.
https://doi.org/10.3389/fmars.2021.667183
- Loncaric A. A survey of shape analysis techniques // Pattern Recogn. 1998. V. 31. №. 8. P. 983—1001.
https://doi.org/10.1016/S0031-2023(97)00122-2
- Lyakh A., Dmitrieva E., Popuyuk M. P., Shikhat O., Melnik A. A geometric morphometric approach to the analysis of the shape variability of the haptor attachment structures of *Ligophorus* species (Platyhelminthes: Monogenea) // Ecologica Montenegrina. 2017. V. 14. P. 92—101.
https://doi.org/10.37828/em.2017.14.10
- McLellan T., Endler J. A. The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects // Syst. Biol. 1998. V. 47. № 2. P. 264—281.
https://doi.org/10.1080/106351598260914
- Mitteroecker P., Schaefer K. Thirty years of geometric morphometrics: Achievements, challenges, and the ongoing quest for biological meaningfulness // American Journal of Biological Anthropology. 2022. V. 178. № S74. P. 181—210.
https://doi.org/10.1002/ajpa.24531
- Neto J. C., Mever G. E., Jones D. D., Samal A. K. Plant species identification using Elliptic Fourier leaf shape analysis // Comput. Electr. Agr. 2006. V. 50. № 2. P. 121—134.
https://doi.org/10.1016/j.compag.2005.09.004

- Pappas J. L., Kocielek J. P., Stoermer E. F.* Quantitative morphometric methods in diatom research // *Nova Hedwigia*, Beiheft. 2014. V. 143. P. 281–306.
- Salili-James A., Mackay A., Rodriguez-Alvarez E., Rodrigues-Perez D., Mannack T., Rawlings T. A., Palmer R. A., Todd J., Riutta T. E., Macinnis-Ng. C., Han Z., Davies M., Thorpe Z., Marsland S., Leroi A. M.* Classifying organisms and artefacts by their outline shapes // *J. R. Soc. Interface*. 2022. V. 19. № 195. P. 1–12. <https://doi.org/10.1098/rsif.2022.0493>
- Scornavacca C., Zickmann F., Huson D. H.* Tanglegrams for rooted phylogenetic trees and networks // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. i248–i256. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr210>
- Shen W., Wang Y., Bai X., Wang H., Latecki L. J.* Shape clustering: Common structure discovery // *Pattern Recogn.* 2013. V. 46. P. 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2012.07.023>
- Srivastava A., Joshi S. H., Mio W., Liu X.* Statistical shape analysis: clustering, learning, and testing // *IEEE T. Pattern Anal.* 2005. V. 27. № 4. P. 590–602. <https://doi.org/10.1109/tpami.2005.86>
- Suzuki K., Fujiwara H., Ohta T.* The evaluation of macroscopic and microscopic textures of sand grains using elliptic Fourier and principal component analysis: Implications for the discrimination of sedimentary environments // *Sedimentology*. 2015. V. 62. № 4. P. 1184–1197. <https://doi.org/10.1111/sed.12183>
- Tuset V. M., Galimany E., Farres A., Marco-Herrero E., Otero-Ferrer J. L., Lombarte A., Ramon M.* Recognising mollusc shell contours with enlarged spines: Wavelet vs Elliptic Fourier analyses // *Zoology*. 2020. V. 140. 125778. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2020.125778>
- Vignon M.* Putting in shape – towards a unified approach for the taxonomic description of monogenean haptor hard parts // *Syst. Parasitol.* 2011. V. 79. P. 161–174. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9303-1>
- Wishkerman A., Hamilton P. B.* Shape outline extraction software (DiaOutline) for elliptic Fourier analysis application in morphometric studies // *Appl. Plant Sci.* 2018. V. 6. № 12. e01204. <https://doi.org/10.1002%2Faps3.1204>
- Yang H.-P., Ma C.-S., Wen H., Zhan Q.-B., Wang X.-L.* (2015) A tool for developing an automatic insect identification system based on wing outlines // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 12786. <https://doi.org/10.1038/srep12786>

Application of harmonized elliptic Fourier transform coefficients for comparing the shapes of biological structures (on the example of the attachment organs of monogenea)

© 2024 A. M. Lyakh

*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS,
Nakhimov av., 2, Sevastopol, 299011 Russia
E-mail: me@antonlyakh.ru*

Elliptic Fourier transform is a common method of describing the shape of objects by an unique sequence of coefficients that allow comparing the shapes by mathematical methods. However, raw coefficients contain unnecessary data unrelated to the shape, which does not provide a correct comparison. For this reason the coefficients are normalised. This removes some of the superfluous data, but leaves information about mirror symmetry and the order in which the contour vertices are declared, that are encoded in the signs of the coefficients. This also interfere with shape comparison. The paper describes an algorithm for harmonizing the coefficients, leveling the influence of the mentioned information. On the example of attachment organs of monogeneas, the advantages of using harmonized coefficients for comparing the shapes of biological structures are shown.

Keywords: shape analysis, object outlines, morphometry, geometric features, mirror symmetry, algorithm, cluster analysis, tanglegram, parasites, fish parasites, monogenean attachment organs, flatworms.

УДК 577.121+615.324

ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИПИДНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ТУНИКИ МОРСКОГО ГИДРОБИОНТА *HALOCYNTHIA AURANTIUM* (PALLAS, 1774)

© 2024 г. Н. Ф. Кушнерова* @, С. Е. Фоменко*, В. Г. Спрыгин*,
Т. В. Момот**, Е. С. Другова*, Л. Н. Лесникова*, В. Ю. Мерзляков*

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

**Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ
(Сеченовский Университет), ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Москва, 119991 Россия

@E-mail: natasha50@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принята к публикации 03.11.2023 г.

Изучены тератогенный и эмбриотоксический эффекты экстракта из туники асцидии *Halocynthia aurantium*, а также его применение в условиях, переохлаждения, перегревания, мышечной нагрузки, введении гексенала и вертикальной фиксации за дорсальную шейную складку. Стресс-вертикальная фиксация крыс сопровождалась увеличением в плазме крови уровня общих липидов, общего холестерина, коэффициента холестерин/фосфолипиды и снижением общих фосфолипидов, а также изменением количественных характеристик классов нейтральных и фосфолипидов. Проведена коррекция полученных изменений липидным экстрактом асцидии и коммерческим препаратом сравнения Омега-3. Липидный экстракт *H. aurantium* показал более высокую эффективность в восстановлении липидного состава плазмы крови при стрессе по сравнению с препаратом Омега-3 за счет более широкого спектра нейтральных и фосфолипидных классов, полиненасыщенных жирных кислот семейств n-3 и n-6. Туника асцидии может использоваться как сырье для получения препаратов со стресспротекторными и липидкорректирующими свойствами.

Ключевые слова: *Halocynthia aurantium*, липидный экстракт, переохлаждение, перегревание, мышечная нагрузка, эмбриотоксичность, тератогенность, стресс, плазма крови, липиды

DOI: 10.31857/S1026347024040022, **EDN:** VJDMO

Морские гидробионты являются перспективными сырьевыми источниками для фармацевтической промышленности. Изучение биологической активности субстанций, выделенных из морских гидробионтов, связано с нахождением в них липидных структур, в частности фосфолипидов, содержащих жирные кислоты, которые входят в семейства n-3 и n-6. На Дальнем Востоке РФ интенсивно изучаются препараты, получаемые из трепанга, кукумарии, двусторчатых моллюсков, морских звезд, панциря креветки и прочих гидробионтов. Так, в исследованиях Т.П. Новгородцевой и соавт. (Новгородцева и др. 2010) отмечалось присутствие в гепатопанкреасе камчатского краба жирных кислот семейства n-3 и 1-О-алкил-диацилглицерина, которые способствуют нормализации параметров иммунной, антиоксидантной, липидтранспортной и гепатобилиарной систем при высокожировой нагрузке. А.А. Артюков и соавт. (Артюков и др., 2012)

установили, что выделенный из панциря морского ежа *Scaphechinus mirabilis* пигмент нафтохиновой природы (фармакологическая субстанция Эхинохром А) способствовал восстановлению липидного и углеводного обмена у больных диабетом 2 типа, обладал высокими антиоксидантными свойствами и может быть использован как средство для лечения и профилактики ишемической болезни сердца. В работе Н.М. Саниной и соавт. (Sanina et al., 2012) было доказано, что комплекс кукумариозида из морского гидробионта *Cuscutaria japonica* с холестерином и моногалактозилдиацилглицерином в соотношении 3 : 2 : 6 может служить носителем субъединичных антигенов и являться высокоэффективным адъювантом. В исследовании (Hou et al., 2018) отмечалось, что спинохромы морских ежей обладают антиоксидантной, цитотоксической, кардиопротекторной активностью. Также была показана (Klimovich et al., 2018) эффективность смеси

оксигенированных каротиноидов (астаксантин, лютеин и зеаксантин) из морской звезды *Patiria pectinifera* при моделировании кожного канцерогенеза, аллергических и воспалительных патологий. Известны работы по изучению влияния экстрактов из морских водорослей Японского моря (*Saccharina* (= *Laminaria*) *japonica*, *Ulva lactuca*, *Sargassum pallidum*, *Ahnfelthia tobuchiensis*) в условиях экспериментальных моделей физического и химического стресса на лабораторных животных (крысы, мыши) (Фоменко и др., 2019; Кушнерова и др., 2022; Спрыгин и др., 2022).

Большой научный интерес вызывают гидробионты, которые в пищу не используются, в частности асцидия пурпурная — *Halocynthia aurantium*., по зоологической систематике относящаяся к типу хордовых (Chordata), подтипу оболочников (Tunicata), классу асцидий (Ascidiaceae), отряду складчатожабренных асцидий (Stolidobranchiata) (Явнов, 2010). Они распространены в дальневосточных и арктических морях на глубине от 4 до 400 метров. В заливе Петра Великого Японского моря присутствуют особи длиной от 6.5 до 27.5 см и массой от 52 до 950 г. Кожно-мускульный мешок (туника) имеет толщину от 2.4 до 5.0 мм (Матросова, Лескова, 2016). Асцидию часто находят в прилове рыбы. Перспективным направлением может быть ее разведение путем марикультуры (Bullard et al., 2013). В тунике асцидии присутствует широкий спектр биологически активных веществ: липидные структуры, белки, углеводы и др. Водно-спиртовый экстракт из туники в эксперименте на лабораторных животных (крысы) способствовал восстановлению лейкоцитарной формулы при лучевом поражении (Пономарева, 2018), экспериментальном стрессе (Фоменко и др., 2012). Биологически активные вещества из морских гидробионтов способствуют поддержанию репродуктивного здоровья (Hoang et al., 2022), обладают противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами (Jo et al., 2010; Кривошапко, Попов, 2011), являются источниками аминокислот (Tabakaeva, Tabakaev, 2017) и стимуляторами иммунной системы (Моторя и др., 2009; Jang et al., 2022). В то же время данные о липидном экстракте, как о препарате с фармакологическими свойствами, выделенном из туники асцидии пурпурной, ограничены. Показана противовоспалительная активность жирных кислот из туники *H. aurantium*, которые подавляли воспаление, а производство PGE2 дозозависимо увеличивалось от их концентрации (Monmai et al., 2018). Туника может быть важным сырьевым источником для получения эйкозапентаеновой и докозагексаеновой жирных кислот, которые являются предшественниками противовоспалительных эйкозаноидов и докозаноидов и могут регулировать противовоспалительную активность (Lee et al., 2016). Такой многокомпонентный состав липидного экстракта, выделенного из туники

асцидии обусловил провести исследование спектра его фармакологических эффектов.

Цель работы — исследование липидного состава экстракта из туники асцидии пурпурной и изучение его некоторых фармакологических эффектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*) собирали в летний период в б. Западная, о-в Попова, зал. Петра Великого (Японское море). Для исследования использовали 50 единиц особей. Тунику отделяли от внутренностей и подошвы, промывали водопроводной водой и сушили при температуре, не превышающей 50°C. Высушенную тунику измельчали на лабораторной мельнице до размеров 0.5–1.0 мм и экстрагировали смесью хлороформ : метанол (2 : 1 по объему) (Bligh, Dyer, 1959). Для получения величины общих липидов использовали весовой метод. Стандартизацию липидного экстракта проводили по значению общих липидов и дозу вводимого препарата рассчитывали в мг общих липидов на 1 кг массы животного (Новгородцева, 2010). Острую токсичность липидного экстракта (ЛД₅₀) определяли по методу Кербера (Миронов, 2012). Все исследования проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 150 ± 5 г. Эксперименты по исследованию липидного экстракта асцидии в условиях беременности — на беспородных белых крысах-самках массой 150 ± 3 г. Животные были получены из питомника филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА России. Исследования на животных выполнены в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил лабораторной практики” и требованиями ГОСТ Р 53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”. До начала эксперимента в течение 7 сут животных адаптировали в виварии: ежедневно осматривали внешнее состояние и в эксперимент брали животных без нарушений в состоянии здоровья. Далее крыс делили на экспериментальные группы. В режиме свободного доступа животных кормили ежедневно в назначенное время, а питьевую воду они получали без ограничений.

Исследование эмбриотоксического и тератогенного действия проводили в соответствии с руководством (Фисенко, 2000). В эксперимент отбирали половозрелых крыс-самок с правильным эстральным циклом, у которых в течение 1–2 недель исследовали вагинальные мазки. К этим крысам подсаживали самцов для спаривания. День обнаружения сперматозоидов во влагалище считали первым днем беременности. Разделили 20 беременных крыс-самок на 2 группы по 10 животных в каждой. Крысам 1-й группы (контроль) в течение 20 сут беременности

внутрижелудочно вводили физиологический раствор в дозе 1 г/кг массы животного. Животным 2-й группы в период беременности вводили внутрижелудочно липидный экстракт асцидии в дозе 1 г/кг массы животного. Крыс обеих групп декапитировали через 20 сут беременности (физиологическая беременность). Животных вскрывали и производили осмотр яичников, матки и плодов. Количество живых плодов, их масса и краниокаудальный размер характеризовало показатель эмбриотоксичности. Число плодов с пороками развития характеризовало тератогенную активность. Визуально учитывали пороки развития (глаза, конечности, хвост, передняя брюшная стенка).

Стрессовое воздействие, такое как бег по бесконечному канату, повышение или понижение температуры, интоксикация гексеналом исследовали по руководству А.Н. Миронова (Миронов, 2012). Животные при каждом стрессовом воздействии были разделены на 2 группы по 10 животных в каждой. Первая группа (контроль) — внутрижелудочно вводили физиологический раствор, вторая группа — внутрижелудочно вводили липидный экстракт асцидии в дозе 1 г/кг массы. Через 60 мин после введения физраствора или липидного экстракта, животных подвергали стрессовому испытанию.

Время бега мышей по бесконечному канату до полной усталости определяло актопротекторное действие. В камере термостата ТС-80-У4.2 исследовали устойчивость животных к перегреванию ($+42^{\circ}\text{C}$). Начинали измерение ректальной температуры за 1 час до начала перегревания и через 120 мин нахождения в термостате. Замеры ректальной температуры проводили медицинским термометром Литтл Доктор LD-300. От начала перегревания и до момента гибели животных оценивали продолжительность их жизни. В термостатированном рефрижераторе при температуре -8°C в течение 120 мин отмечали устойчивость крыс к переохлаждению. За 1 ч до охлаждения и через 120 мин нахождения в холодильной камере проводили измерение ректальной температуры. При внутрибрюшинном введении гексенала (гексеналовая интоксикация) в дозе 50 мг/кг оценивали продолжительность сна от его начала и до выхода животных из бокового положения (Миронов, 2012).

Следующий этап экспериментального исследования состоял в изучении воздействия липидного экстракта асцидии и препарата сравнения Омега-3 на показатели липидного обмена плазмы крови крыс в условиях стресс-вертикальной фиксации. Стресс моделировали путем фиксации животных за дорсальную шейную складку на 24 ч (Кушнерова и др., 2005). Препараты вводили внутрижелудочно через зонд непосредственно перед вертикальной фиксацией и через 6 ч после первого введения. В 1 г препарата “Омега-3” (Now Foods, USA) содержится 350 мг насыщенных жирных кислот,

350 мг моноеновых жирных кислот, 300 мг Омега-3 жирных кислот, представленных эйкозапентаеновой кислотой — 180 мг и докозагексаеновой кислотой — 120 мг. В исследовании были выделены четыре группы по 10 животных в каждой: первая группа — контроль (интактные); вторая группа — стресс (вертикальная фиксация); третья группа — стресс + липидный экстракт асцидии; четвертая группа — стресс + препарат Омега 3.

Для получения плазмы крови использовали общепринятый метод центрифугирования. Затем из плазмы крови выделяли экстракты общих липидов (Folch et al., 1957), в которых определяли величины отдельных классов фосфолипидов и нейтральных липидов. Содержание общих липидов, общих фосфолипидов, общего холестерина в плазме крови определяли с помощью диагностических наборов “Ольвекс диагностикум” (Россия). Анализ фосфолипидного состава липидного экстракта плазмы крови крыс проводили с помощью двумерной микротонкослойной хроматографии (МТСХ) на стеклянных пластинках 6х6 см с силикагелем марки “КСК” (Svetashev, Vaskovsky, 1972). Фосфолипиды делились на классы в системе растворителей (Vaskovsky, Terekhova, 1979), для проявления фосфолипидных классов на пластинке применяли молибденово-кислый реактив (Vaskovsky et al., 1975). Специфическое обнаружение классов фосфолипидов, в состав которых входила аминокислотная группа (фосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин), обнаруживали 0.2% раствором нингидрина в ацетоне (Rouser et al., 1967), холиновая группа (фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин) — реактив Драгендорфа (Кейтс, 1975), гидроксильная группа (фосфатидилинозит) — периодатный реактив Шиффа (Кейтс, 1975). Величины индивидуальных классов фосфолипидов определяли спектрофотометрически с помощью универсального молибдатного реактива (Vaskovsky et al., 1975). Классы нейтральных липидов разделяли методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле (Amenta, 1964). Для идентификации пятен липидов использовали очищенные препараты отечественного производства (Реахим, Россия). Расчет величин отдельных классов нейтральных и фосфолипидов выражали в процентах от их общей суммы, соответственно.

Состав и величины жирных кислот в липидном экстракте из туники асцидии исследовали методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). При переэтерификации липидов получали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) (Carreau, Dubacq, 1978) и очищали их с помощью МТСХ. Исследование МЭЖК проводили на газовом хроматографе “ЛХМ-2000” (ОАО “Хроматограф”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP-5-MS с 5% фенилметилсилоксаном

(30 м × 0.25 мм, “Agilent”, США). Газ-носитель – гелий, температура инжектора 180°C, скорость потока 50 мл/мин. МЭЖК идентифицировали путем сравнения времени удерживания с известными стандартами по значениям углеродных чисел (Christie, 1988). Результаты рассчитывали в процентах от суммы жирных кислот.

По окончании каждого эксперимента животных декапитировали под легким эфирным наркозом с соблюдением “Правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 1986). Дизайн эксперимента был одобрен Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 19 от 12 апреля 2022 г.).

Полученные данные обрабатывали по статистической программе Instat 3.0 (Graph Pad. Software Inc. USA, 2005) со встроенной процедурой проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Статистическую значимость различий при межгрупповых сравнениях определяли с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни и параметрического t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Липидный экстракт из туники асцидии представляет собой маслообразную массу желто-коричневого цвета. В табл. 1 представлен липидный состав экстракта. Количество общих липидов составляло 35.48 ± 0.70 мг/г сухой ткани, что включало 49.0% (17.38 ± 0.26 мг/г сухой ткани) нейтральных липидов и 51.0% (18.1 ± 0.21 мг/г сухой ткани) фосфолипидов. В ряду нейтральных классов липидов по количеству преобладали триацилглицерины, воска и свободные жирные кислоты (от 17 до 23%). В состав липидного экстракта туники входит 8 классов фосфолипидов, что соответствует известным в литературе данным (Kostetsky et al., 2012). Отмечается высокий уровень фосфатидилхолина (ФХ), а значения фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС) и дифосфатидилглицерина (ДФГ) находились в интервале от 10% до 12%. Эти классы фосфолипидов необходимы в метаболических реакциях организма. В общих липидах экстракта насыщенные жирные кислоты составляли 46.9%, ненасыщенные жирные кислоты – 53.1%, что согласуется с литературными данными (Sanina et al., 2001). Из индивидуальных ЖК по величинам преобладали пальмитиновая (16 : 0), стеариновая (18 : 0) и α -линоленовая (18 : 3 n-3) кислоты. В экстракте отмечается достаточно большое количество полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК): кислоты семейства n-3 составляли 32.59%, что в 3 раза превышало содержание ПНЖК семейства n-6 (9.92%).

Таблица 1. Количественный состав нейтральных липидов, фосфолипидов и жирных кислот в общих липидах туники асцидии пурпурной ($M \pm m$, в % от общей суммы)

Биохимические параметры	Показатели
Нейтральные липиды, % от суммы всех классов	
Диацилглицерины	9.10 ± 0.92
Триацилглицерины	26.97 ± 1.45
Холестерин	4.35 ± 0.70
Свободные жирные кислоты	16.98 ± 1.20
Метилловые эфиры жирных кислот	7.26 ± 0.95
Жирные альдегиды	4.74 ± 1.10
Эфиры холестерина	6.71 ± 0.12
Воска	23.89 ± 2.60
Фосфолипиды, % от суммы всех классов	
Фосфатидилхолин	50.80 ± 1.34
Лизофосфатидилхолин	3.00 ± 0.12
Сфингомиелин	6.11 ± 0.40
Фосфатидилэтаноламин	10.53 ± 0.74
Лизофосфатидилэтаноламин	2.94 ± 0.08
Фосфатидилинозит	4.79 ± 0.52
Фосфатидилсерин	11.73 ± 2.41
Дифосфатидилглицерин	10.10 ± 1.95
Жирные кислоты, % от суммы всех жирных кислот	
12 : 0 (лауриновая)	1.10 ± 0.01
14 : 0 (миристиновая)	4.63 ± 0.99
16 : 0 (пальмитиновая)	23.80 ± 2.10
18 : 0 (стеариновая)	17.37 ± 2.00
16 : 1 n-9 (пальмитолеиновая)	5.70 ± 1.30
18 : 1 n-9 (олеиновая)	4.89 ± 0.40
18 : 2 n-6 (линолевая)	1.13 ± 0.10
20 : 3 n-6 (эйкозатриеновая)	1.20 ± 0.40
20 : 4 n-6 (арахидоновая)	4.69 ± 0.55
22 : 4 n-6 (докозатетраеновая)	2.90 ± 0.60
18 : 3 n-3 (α -линоленовая)	15.85 ± 0.20
20 : 5 n-3 (эйкозапентаеновая)	10.98 ± 0.55
22 : 6 n-3 (докозагексаеновая)	5.76 ± 0.54

На основании полученных результатов следует, что липидный экстракт из туники асцидии является источником биологически активных веществ и, в перспективе, может быть использован для получения эффективных лекарственных препаратов и биологически активных добавок.

При исследовании острой токсичности экстракта было определено, что она составляет 2350 мг/кг, поэтому данная субстанция может относиться к 4 классу токсичности (как малоопасная).

Результаты исследования по влиянию липидного экстракта асцидий на организм при физиологической беременности и стрессовом воздействии представлены в табл. 2, 3.

Таблица 2. Тестирование липидного экстракта асцидии при физиологической беременности и стрессовом воздействии ($M \pm m$)

Показатели	1 группа Контроль (физраствор)	2 группа Липидный экстракт асцидии
Количество плодов на 20-й день беременности (%): живых	84.0 $\pm$ 2.0	91.0 $\pm$ 2.31
с уродствами	16.0 $\pm$ 2.2	9.0 $\pm$ 1.71
Средняя масса живых плодов (г)	2.4 $\pm$ 0.02	2.8 $\pm$ 0.053
Средний краниокаудальный размер плодов (см)	3.1 $\pm$ 0.02	3.2 $\pm$ 0.031
Пол плодов:		
самцы	48 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2
самки	52 $\pm$ 3	56 $\pm$ 3
Величина снижения ректальной температуры при переохлаждении (-8°C , 120 мин, град)	-2.12 ± 0.07	-1.82 ± 0.033
Величина прироста ректальной температуры при перегревании ($+42^{\circ}\text{C}$, 120 мин, град)	$+3.93 \pm 0.10$	$+3.82 \pm 0.15$
Величина продолжительности жизни при перегревании ($+42^{\circ}\text{C}$, мин)	127.31 $\pm$ 2.70	136.79 $\pm$ 2.751
Величина мышечной работы на бесконечном канате (мин)	27.24 $\pm$ 1.13	40.17 $\pm$ 1.523
Гексеналовый сон (мин)	25.74 $\pm$ 1.66	11.33 $\pm$ 1.723

Примечание: по сравнению с контролем ¹ – $p < 0.05$; ² – $p < 0.01$; ³ – $p < 0.001$.

Исследование эмбриотоксического и тератогенного эффектов

Введение липидного экстракта асцидии сопровождалось статистически достоверным ростом относительно контроля количества живых плодов на 8% ($p < 0.05$) (табл. 2). Средняя масса живых плодов была на 17% ($p < 0.001$) больше, чем в контроле. Средний краниокаудальный размер плодов у этой группы животных также был больше на 3% ($p < 0.05$). Количество плодов в зависимости от пола статистически достоверно не различалось, но тенденция к большему рождению самок, чем самцов, прослеживалась. При введении липидного экстракта асцидии также отмечалось снижение количества плодов с уродствами по сравнению с контролем в среднем на 44% ($p < 0.05$). Аномалии развития плодов были в виде крипторхизма и неполного окостенения грудины.

Переохлаждение. У животных обеих групп (контроль и опыт) под действием переохлаждения понижалась ректальная температура. При введении экстракта асцидии отмечалось сдерживание падения ректальной температуры на 14% ($p < 0.001$).

Перегревание. При нахождении в камере термостата у крыс обеих групп повысилась ректальная температура. Однако различия между группами были статистически недостоверные.

Время продолжительности жизни при перегревании. При введении липидного экстракта асцидии

отмечалось увеличение продолжительности жизни крыс в среднем на 7.4% ($p < 0.05$) по сравнению с таковой у контрольных животных.

Мышечная нагрузка. На установке бесконечный канат время бега животных после введения липидного экстракта асцидии увеличилось в среднем на 47% ($p < 0.001$) по сравнению с контролем.

Инттоксикация гексеналом (гексеналовый сон). Длительность сна у крыс в группе с введением экстракта из туники асцидии уменьшилась на 56% ($p < 0.001$) по сравнению с таковой в контроле.

Стресс-вертикальная фиксация. При исследовании биохимических показателей в плазме крови был отмечен рост количества общих липидов (ОЛ) на 39% ($p < 0.001$). Уровень общего холестерина был повышен в 1.4 раза ($p < 0.01$), а общих фосфолипидов снижен на 20% ($p < 0.001$) (табл. 3). Это обусловило увеличение в 1.8 раза ($p < 0.001$) значения соотношения холестерина/фосфолипиды. То есть, при стресс-вертикальной фиксации животных в плазме крови отмечалась выраженная дислипидемия. Значения индивидуальных классов нейтральных липидов достоверно отличались от контроля (табл. 3). Так, уровень триацилглицеринов (ТАГ) был повышен на 13% ($p < 0.001$). Значение свободных жирных кислот (СЖК) и холестерина (ХС) возросло в среднем на 15 и 19% ($p < 0.001$), соответственно. При этом отмечалось снижение величины эфиров холестерина (ЭХС) на 12% ($p < 0.001$). Под действием стресса происходит рассогласование значений фосфолипидных

Таблица 3. Биохимические показатели плазмы крови при воздействии стресса и его коррекции липидным экстрактом из туники асцидии и Омега 3 ($M \pm m$)

Показатели	1 группа Контроль	2 группа Стресс	3 группа Стресс + асцидия	4 группа Стресс + Омега 3
Общие липиды (г/л)	4.73 $\pm$ 0.13	6.58 $\pm$ 0.20 ³	4.68 $\pm$ 0.18 ^в	5.27 $\pm$ 0.151, ^{в, *}
Общие фосфолипиды (ммоль/л)	2.50 $\pm$ 0.05	2.00 $\pm$ 0.04 ³	2.57 $\pm$ 0.06 ^в	2.48 $\pm$ 0.04 ^в
Общий холестерин (ммоль/л)	2.90 $\pm$ 0.02	4.17 $\pm$ 0.04 ³	3.00 $\pm$ 0.05 ^в	3.36 $\pm$ 0.033, ^{в, ***}
Холестерин Фосфолипиды	1.16 $\pm$ 0.03	2.08 $\pm$ 0.02 ³	1.16 $\pm$ 0.03 ^в	1.35 $\pm$ 0.033, ^{в, ***}
Нейтральные липиды				
ТАГ	24.00 $\pm$ 0.28	27.11 $\pm$ 0.29 ³	23.80 $\pm$ 0.31 ^в	24.77 $\pm$ 0.26 ^{в, *}
СЖК	13.08 $\pm$ 0.25	15.00 $\pm$ 0.27 ³	13.20 $\pm$ 0.19 ^в	13.77 $\pm$ 0.17 ^{в, *}
ХС	15.00 $\pm$ 0.31	17.90 $\pm$ 0.30 ³	14.42 $\pm$ 0.18 ^в	15.61 $\pm$ 0.14 ^{в, ***}
ЭХС	18.11 $\pm$ 0.21	16.00 $\pm$ 0.20 ³	18.20 $\pm$ 0.21 ^в	17.47 $\pm$ 0.25 ^{в, *}
Остаточная фракция	29.81 $\pm$ 0.70	23.99 $\pm$ 0.44	30.38 $\pm$ 0.62	28.48 $\pm$ 0.49
Фосфолипиды				
ФХ	63.08 $\pm$ 0.70	57.86 $\pm$ 0.87 ³	63.65 $\pm$ 0.72 ^в	62.00 $\pm$ 0.69 ^в
ЛФХ	8.00 $\pm$ 0.20	10.20 $\pm$ 0.33 ³	7.88 $\pm$ 0.37 ^в	8.97 $\pm$ 0.16 ^{в, *}
СМ	8.92 $\pm$ 0.24	11.94 $\pm$ 0.24 ³	8.64 $\pm$ 0.11 ^в	9.38 $\pm$ 0.25 ^в
ФЭ	10.15 $\pm$ 0.63	8.37 $\pm$ 0.211	9.89 $\pm$ 0.14 ^в	9.66 $\pm$ 0.22 ^в
ЛФЭ	3.17 $\pm$ 0.14	4.95 $\pm$ 0.13 ³	2.92 $\pm$ 0.11 ^в	3.71 $\pm$ 0.11 ^{в, *}
ФИ+ФС	3.68 $\pm$ 0.13	4.45 $\pm$ 0.162	3.98 $\pm$ 0.13 ^а	3.84 $\pm$ 0.13 ^а
ДФГ	3.00 $\pm$ 0.05	2.23 $\pm$ 0.033	2.94 $\pm$ 0.07 ^в	2.44 $\pm$ 0.05 ^{в, *}

Примечание. Различия статистически достоверны при: 1, а, * – $p < 0.05$; 2, б, ** – $p < 0.01$; 3, в, *** – $p < 0.001$. Цифры – по сравнению с контролем; буквы – по сравнению со 2-й группой, звездочки – по сравнению с 3-й группой. ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ДФГ – дифосфатидилглицерин. Остаточная фракция – Воски+углеводороды+метиловые эфиры жирных кислот.

классов в плазме крови. Снижен уровень фосфатидилхолина (ФХ) на 8% ($p < 0.001$), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) – на 18% ($p < 0.05$) и дифосфатидилглицерина (ДФГ) – на 26% ($p < 0.001$). Следует отметить увеличение значения лизоформ фосфолипидов (ФЛ) – лизофосфатидилхолина (ЛФХ) – на 28% ($p < 0.001$) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) – на 56% ($p < 0.001$). На фоне роста количества лизоформ отмечалось увеличение отношения ЛФХ/ФХ с 0.13 в контроле до 0.18 при стрессе, а ЛФЭ/ФЭ с 0.31 в контроле до 0.59 при стрессе. Уровень сфингомиелина (СМ) увеличился на 34% ($p < 0.001$), а сумма метаболически активных фосфолипидов (фосфатидилинозит и фосфатидилсерин – ФИ + ФС) – на 21% ($p < 0.01$).

Введение липидного экстракта асцидии и препарата сравнения Омега-3 сопровождалось тенденцией к снятию состояния дислипидемии, но степень нормализующего эффекта различалась. Так, при введении липидного экстракта асцидии

количество общих липидов в плазме крови снизилось на 29% ($p < 0.001$), а при введении Омега-3 – на 20% ($p < 0.01$). Значение общих фосфолипидов возросло в среднем на 29% ($p < 0.001$) (3 группа) и на 24% ($p < 0.05$) (4 группа). Уровень холестерина снизился на 28% ($p < 0.001$) и 20% ($p < 0.001$), соответственно, что обусловило снижение величины соотношения ХС/ФЛ на 44% ($p < 0.001$) при введении липидного экстракта асцидии и на 35% ($p < 0.001$) при введении Омега-3.

Результаты сравнения величин классов нейтральных липидов в плазме крови 3-й и 4-й групп относительно 2-й группы (стресс) показали, что введение препаратов сопровождалось снижением уровня ТАГ на 12% (3 группа, $p < 0.001$) и на 9% (4 группа, $p < 0.001$), СЖК – на 12% и 8% ($p < 0.001$), ХС – на 20% и 13% ($p < 0.001$) соответственно. Значения ЭХС в плазме крови крыс обеих групп возросли в среднем на 14% и 9% ($p < 0.001$) соответственно. Достоверные различия отмечались при сравнении

значений классов фосфолипидов в 3-й и 4-й группах со 2-й группой. Так, количество ФХ выросло в обеих группах в среднем на 7–10% ($p < 0.01–0.001$) при одновременном снижении ЛФХ на 23% и 12% ($p < 0.01–0.001$), а соотношение величин ЛФХ/ФХ составляло 0.12 и 0.14 соответственно. Величина сфингомиелина снизилась на 28% при ведении экстракта асцидии и на 21% ($p < 0.001$) при введении Омега-3. Также отмечалось увеличение уровня ФЭ на 15–18% ($p < 0.001$). Одновременно отмечалось снижение количества ЛФЭ на 41% (3 группа) и 25% (4 группа) ($p < 0.001$), что обусловило снижение ЛФЭ/ФЭ до 0.3 и 0.38 соответственно. В ряду метаболически активных классов фосфолипидов обращает на себя внимание снижение величины суммарной фракции ФИ+ФС в среднем на 11–14% ($p < 0.05$), а также увеличение уровня ДФГ на 32% в 3-й группе ($p < 0.001$) и на 9% ($p < 0.001$) в 4-й группе.

Следует отметить, что при введении препарата сравнения Омега-3 отмечались статистически достоверные различия с контролем. Это проявилось в повышенном уровне общих липидов на 11% ($p < 0.05$), ХС и соотношения ХС/ФЛ – в среднем на 16% ($p < 0.001$). Среди фосфолипидных классов обращают на себя внимание достоверные отличия от контроля в значениях ЛФХ (увеличение на 14%, $p < 0.01$), ЛФЭ (увеличение на 27%, $p < 0.001$) и ДФГ (снижение на 17%, $p < 0.001$). Таким образом, введение липидного экстракта асцидии и препарата Омега-3 при стрессе имело общую тенденцию к восстановлению величин фосфолипидных классов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании полученных результатов следует, что у липидного экстракта асцидии отмечались низкие показатели острой токсичности, что дает возможность характеризовать его как безвредный препарат. Это обусловило отсутствие эмбриотоксического и тератогенного эффектов. Отмечалось большее количество живых плодов, их массы и размеров, чем в контрольной группе. Таким образом, фармакологический эффект липидного экстракта асцидии обусловлен участием липидных составляющих препарата в метаболических реакциях по поддержанию гомеостаза в материнском организме в период беременности. Исследования показали позитивный характер действия препарата в эмбриональный период. Предотвращение тератогенного эффекта обусловлено, по нашему мнению, присутствием в препарате основных структурных компонентов мембран (фосфолипидные классы) и метаболитов (нейтральные классы липидов) для построения органов и тканей растущего организма. Экспериментальные исследования по изучению фармакологических эффектов липидного экстракта из туники асцидии на моделях

перегревания, переохлаждения, мышечной нагрузки, гексеналовой интоксикации, входящих в стереотипный перечень факторов, используемых при изучении стресс-протекторных средств, показали ярко выраженное защитное действие препарата. По-видимому, биохимический механизм этого феномена обусловлен усилением энергетического обмена за счет присутствия энергетически богатых компонентов препарата (СЖК, ТАГ, ПНЖК). Присутствие в нем метаболически активных фосфолипидов (ФИ + ФС), а также ДФГ, необходимых для функционирования цепи переноса электронов в митохондриях, способствовало восстановлению метаболических путей получения энергии в цикле Кребса. В эксперименте с перегревом отмечается увеличение продолжительности жизни, которое обусловлено, по нашему мнению, сохранением метаболических реакций за счет входящих в экстракт метаболитов и ПНЖК семейства n-3 и n-6, являющихся биорегуляторами и предшественниками биологически активных эйкозаноидов. Кроме того известно, что ПНЖК n-3 и n-6 участвуют в индукции ферментов антиоксидантной системы глутатиона (глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) (Nieto et al., 1998), что необходимо при стрессе для защиты от радикального повреждения мембран.

При проведении гексеналовой пробы предварительное введение экстракта асцидии животным значительно сокращало сон, что свидетельствует о сохранении антитоксической функции печени.

У животных 2-й группы “стресс-вертикальная фиксация” отмечалось формирование дислипидемии. Исследование показателей нейтральных классов липидов в плазме крови показало выраженную гипертриглицеринемию и гиперхолестеринемию, а также увеличение СЖК и снижение ЭХС. Полученные результаты обусловлены усилением липолитических процессов в жировой ткани, что связано с повышенным выбросом катехоламинов из надпочечников (Солин и др., 2013). Также известно интенсивное использование гликогена печени, что активирует путь получения энергии при β -окислении СЖК. Это приводит к образованию избытка ацетил-КоА и синтезу ХС. Также блокируется путь образования ФЛ из ТАГ, что обусловлено угнетением реакции этерификации. В результате в печени формируется жировой гепатоз за счет накопления ТАГ, а в крови и печени уменьшен уровень ЭХС (Момот и др., 2016.). Снижение значений основных структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ) вызвано как ростом активности фосфолипаз, так и переокислением жирных кислот, входящих в их состав. В результате происходит рост значений СЖК и лизосоединений (ЛФХ и ЛФЭ). Увеличение количества СМ, относящегося к группе холиносодержащих классов фосфолипидов, по нашему мнению, является замещающим

механизмом при снижении значения ФХ. Тот факт, что уменьшились значения ФС + ФИ иДФГ, предполагает нарушение функционирования мембранозвязанных ферментов и транспортной функции.

Введение липидного экстракта асцидии и препарата сравнения Омега-3 имели общую тенденцию в нормализации липидного обмена. По-видимому, этот феномен обусловлен встраиванием в лизофосфолипиды ПНЖК Омега-3. Это привело к росту значений ФХ и ФЭ, снижение их лизосоединений, а также соотношения ЛФХ/ФХ и ЛФЭ/ФЭ. Следует отметить способность ПНЖК к этерификации холестерина и снижению активности фосфолипаз (Asztalos et al., 2016), что подтверждается увеличением значений ЭХС и общих фосфолипидов из ТАГ.

Эффективность липидного экстракта асцидии в наших экспериментах на животных имела преимущественные особенности перед коммерческим препаратом Омега 3. Известно, что выделенные из морских гидробионтов биологически активные субстанции в основном обусловлены присутствием в их составе n-3 ПНЖК. Так, в коммерческом препарате Омега-3, который промышленно производят из ценных пород рыб, присутствуют эйкозапентаеновая, докозагексаеновая и моноеновые жирные кислоты. В нашем исследовании в обоих препаратах содержание ПНЖК составляло 300 мг в 1 г общих липидов. В то же время, в липидном экстракте асцидии присутствует более широкий спектр липидных структур: 7 классов нейтральных липидов, являющихся метаболитами для биохимических реакций, 8 классов фосфолипидов и, наравне с моноеновыми жирными кислотами, входят ПНЖК семейства n-3, а также n-6. Это, по нашему мнению, может обеспечить более высокую биологическую активность экстракта, чем таковая у препарата Омега 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липидный экстракт, выделенный из туники асцидии *H. aurantium*, содержащий в своем составе нейтральные и фосфолипидные классы, ПНЖК n-3 и n-6, обладает липидкорректирующим и стресс-протекторным эффектом. Экстракт асцидии по своему биологическому эффекту соответствует коммерческому препарату Омега 3, но по эффекту восстановления биохимических показателей в плазме крови имел преимущества в возможности нормализовать состояние дислипидемии, сохранять метаболические реакции синтеза ФЛ из ТАГ и поддерживать количественные значения нейтральных и фосфолипидных классов в плазме крови. Туника асцидии может использоваться как сырьевой источник для выделения биологически активной субстанции (экстракт) липидной природы, обладающей защитными свойствами при стрессовом воздействии, а также при коррекции нарушений липидного обмена.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были одобрены Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 19 от 12 апреля 2022 г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ТОИ ДВО РАН по теме “Эколого-биогеохимические процессы в морских экосистемах: роль природных и антропогенных факторов”, (0211-2021-0014). Регистрационный номер: 121-21500052-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артюков А. А., Попов А. М., Цыбульский А. В., Кривошапко О. Н., Полякова Н. В. Фармакологическая активность эхинохрома А отдельно и в составе БАД «Тимарин» // Биомед. химия. 2012. Т. 58. № 3. С. 281–290.
<https://doi.org/10.18097/pbmc20125803281>
- Кеймс М. Техника липидологии. — Москва: Мир, 1975. 324 с.
- Кривошапко О. А., Попов А. М. Лечебные и профилактические свойства липидов и антиоксидантов, выделенных из морских гидробионтов // Вопр. питания. 2011. № 2. С. 4–8.
- Кушнерова Н. Ф., Спрыгин В. Г., Фоменко С. Е., Рахманин Ю. А. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // Гиг. и сан. 2005. № 5. С. 17–21.
- Кушнерова Н. Ф., Фоменко С. Е., Спрыгин В. Г., Другова Е. С., Момот Т. В., Лесникова Л. Н., Мерзляков В. Ю. Влияние липидного комплекса из морской зеленой водоросли *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753 на биохимические показатели плазмы крови и печени при экспериментальной дислипидемии // Биол. моря. 2022. Т. 48. № 2. С. 123–132.
<https://doi.org/10.31857/S0134347522020073>
- Матросова И. В., Лескова С. Е. Некоторые черты репродуктивной биологии асцидии пурпурной *Halocynthia aurantium* (Pallas) // Науч. труды Дальрыбвтуза. 2016. № 39. С. 1–2.
- Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012.

- Момот Т. В., Кушнерова Н. Ф., Рахманин Ю. А. Профилактика нарушения биохимических показателей в крови крыс при экспериментальном стрессе // Гиг. и сан. 2016. № 7. С. 678–681.
<https://doi.org/10.18821/0016-9900-2016-95-7-678-681>
- Моторя Е. С., Пивненко Т. Н., Гажя А. К., Иванушко Л. А., Воронцов В. Н., Санина Н. М. Исследование иммуномодулирующей и мембранотропной активностей каротиноидов из туники асцидии *Halocynthia aurantium* // Тихоокеан. мед.ж. 2009. № 3. С. 28–32.
- Новгородцева Т. П., Гвозденко Т. А., Касьянов С. П., Кнышова В. В., Караман Ю. К. Использование биологически активной добавки к пище на основе липидов морских гидробионтов в эксперименте на крысах // Вопр. питания. 2010. Т. 79. № 2. С. 24–27.
- Пономарева Т. И. Оценка эффективности экстракта *Halocynthia aurantium* при экспериментальном лучевом поражении // В мире науч. открытий. 2018. Т. 10. № 4. С. 245–257.
<https://doi.org/10.12731/wsd-2018-4-245-257>
- Солин А. В., Корозин В. И., Ляшев Ю. Д. Влияние регуляторных пептидов на стресс-индуцированные изменения липидного обмена у экспериментальных животных // Бюл. exper. биол. и мед. 2013. Т. 155. № 3. С. 299–301.
- Спрыгин В. Г., Кушнерова Н. Ф., Фоменко С. Е. Влияние липидного комплекса из морской красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // Изв. РАН. Сер. биол. 2022. № 1. С. 5–14.
<https://doi.org/10.31857/S1026347022010140>
- Фисенко В. П. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. 398 с.
- Фоменко С. Е., Кушнерова Н. Ф., Добряков Е. Ю. Влияние экстракта из туники морского гидробионта асцидии пурпурной на липидный обмен печени при остром стрессе // Экспер. и клин. фармакол. 2012. Т. 75. № 6. С. 36–39.
- Фоменко С. Е., Кушнерова Н. Ф., Спрыгин В. Г. Использование экстрактов бурой водоросли *Sargassum pallidum* для профилактики стресс-индуцированных нарушений углеводно-липидного обмена в эксперименте // Экспер. и клин. фармакол. 2019. Т. 82. № 8. С. 22–26.
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-8-22-26>
- Явнов С. В. Атлас иглокожих и асцидий /под ред. В. А. Ракова. Владивосток: Русский Остров. 2010. 176 с.
- Amenta J. S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. 1964. V. 5. № 2. P. 270–272.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40251-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40251-2)
- Asztalos I. B., Gleason J. A., Sever S., Gedik R., Asztalos B. F., Horvath K. V., Dansinger M. L., Lamon-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.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.07.010>
- Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canad. J. of Biochem. and Physiol. 1959. V. 37. № 8. P. 911–917.
<https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bullard, S. G., Davis, C. V., Shumway, S. E. Seasonal patterns of ascidian settlement at an aquaculture facility in the Damariscotte River, Maine // J. Shellfish Res. 2013. V. 32. P. 255264.
<http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0202>
- Carreau J. P., Dubacq 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.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(88\)90040-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(88)90040-4)
- 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.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(88\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(88)90040-4)
- Folch J., Less M., Sloane-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Hoang T. H., Liang Q., Luo X., Tang Y., Jian G., Qin J. G., Zhang W. Bioactives From Marine Animals: Potential Benefits for Human Reproductive Health // Front. Mar. Sci. 2022. V. 9. № 872775.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2022.872775>
- Hou Y., Vasileva E. A., Carne A., McConnell M., Bekhit A. E. A., Mishchenko N. P. Naphthoquinones of the spinochrome class: occurrence, isolation, biosynthesis and biomedical applications // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 32637–32650.
<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA04777D>
- Jang A. Y., Kim J. E., Park W. J., Monmai C., Rod-In W., You S. G., Lee T. N. Immune-modulation effect of *Halocynthia aurantium* tunic lipid on RAW264.7 cells // Food sci. biotechnol. 2022. V. 31. № 1. P. 101–110.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10068-021-01017-4>
- Jo J-E, Kim K-H, Yoon M-H, Kim N-Y, Lee C., Yook H-S. Quality characteristics and antioxidant activity research of *Halocynthia roretzi* and *Halocynthia aurantium* // J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2010. V. 39. № 10. P. 1481–1486.
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.10.1481>
- Klimovich A. A., Popov A. M., Styshova O. N., Artyukov A. A., Tsybulsky A. V. A comparative evaluation of the actions of different secondary metabolites of marine hydrobiota on the redox status of tumor and immune cells // Biophysics. 2018. V. 63. № 5. P. 763–768.
<http://dx.doi.org/10.1134/S000635091805010X>
- Kostetsky E. Y., Velansky P. V., Sanina N. M. Phospholipids of the organs and tissues of echinoderms and tunicates

- from peter the great bay (Sea of Japan) // Russ J Mar Biol. 2012. V. 38. № 1. P. 64–71.
<https://doi.org/10.1134/S1063074012010099>
- Lee J. M., Lee H. J., Kang S. B., Park W. J. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances // Nutrients. 2016. V. 8. № 1. P. 23.
<http://dx.doi.org/10.3390/nu8010023>
- Monmai C., Go S. H., Shin S., You S. G., Lee H., Kang S. B., Park W. J. Immune-enhancement and anti-inflammatory activities of fatty acids extracted from *Halocynthia aurantium* tunic in RAW264.7 cells // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 9. P. 309–323.
<https://doi.org/10.3390/md16090309>
- Nieto N., Fernandez M. I., Torres M. I., Rios A., Soares M. D. Dietary monounsaturated n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids affect cellular antioxidant defense system in rats with experimental ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid // Gil. Dig. Dis. Sci. 1998. V. 43. № 12. P. 2678–2687.
<https://doi.org/10.1023/a:1026655311878>
- Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids // Lipid Chromatographic Analysis. New York: Dekker, 1967. V. 1. P. 99–162.
- Sanina N. M., Kostetsky E. Y. Seasonal changes in thermotropic behavior of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in different organs of the ascidian *Halocynthia aurantium*. // Comp. Biochem. Physiol. 2001. Part B. V. 128. P. 295–305.
[https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(00\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(00)00328-6)
- Sanina, N.M., Kostetsky, E.Y., Shnyrov, V.L., Tsybul'sky, A.V., Novikova, O.D., Portniagina, O.Y., Vorobieva, N.S., Mazeika, A.N., Bogdanov, M. V. The influence of monogalactosyldiacylglycerols from different marine macrophytes on immunogenicity and conformation of prtein antigen of tubular immunostimulating complex // Biochimie. 2012. V. 94, № 4. P. 1048–1056.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.009>
- Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // J. Chromatogr. 1972. Vol. 67. № 2. P. 376–378.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)91245-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)91245-2)
- Tabakaeva O. V., Tabakaev A. V. Amino acids and related compounds of the ascidian *Halocynthia aurantium* from the Sea of Japan // Chem. Nat. Compd. 2017. V. 53. № 4. P. 722–725.
<https://doi.org/10.1007/s10600-017-2099-8>
- Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. Vasendin I. M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 1. P. 129–141.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8)
- Vaskovsky V. E., Terekhova T. A. HPTLC of Phospholipid Mixtures Containing Phosphatidylglycerol // J. Sep. Sci. 1979. V. 2. № 11. P. 671–672.
<http://dx.doi.org/10.1002/jhrc.1240021107>

Evaluation of the pharmacological efficiency of the lipid extract from the tunic of the marine hydrobiont *Halocynthia aurantium* (Pallas, 1774)

© 2024 N. F. Kushnerova*, S. E. Fomenko*, V. G. Sprygin*, T. V. Momot**,
E. S. Drugova*, L. N. Lesnikova*, V. Y. Merzlyakov*

*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute. FEB RAS, Vladivostok, 690041 Russia

**I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of MH RF, Moscow, 119991 Russia
 @E-mail: natasha50@mail.ru

It was studied effect of the lipid extract isolated from the tunic of the marine hydrobiont *Halocynthia aurantium*. It was evaluated its administration during hypothermia, hyperthermia, muscle load and the introduction of hexenal as well as its embryotoxic and teratogenic effects. The impact of stress (vertical fixation of rats by the dorsal neck fold) was accompanied by an increase in plasma levels of total lipids, total cholesterol, cholesterol/phospholipid ratios and a decrease in total phospholipids, as well as by a change in the quantitative characteristics of classes of neutral and phospholipid. It was carried out a correction of the developed changes by a lipid extract of ascidia and a commercial reference preparation “Omega-3”. The lipid extract of *H. aurantium* showed a higher efficiency in restoring the lipid composition of the blood plasma under stress impact compared to the preparation “Omega-3” due to a wider range of neutral and phospholipid classes, polyunsaturated fatty acids of the n-3 and n-6 families. The tunica of ascidian can be used as a raw material for obtaining preparations with stress-protector and lipid-correcting properties.

Keywords: *Halocynthia aurantium*, lipid extract, hypothermia, hyperthermia, muscle load, embryotoxicity, teratogenicity, stress, blood plasma, lipids

УДК 581.132.536.543:539

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИЗОТОПНЫХ РАЗЛИЧИЙ УГЛЕРОДА ФРАКЦИЙ БИОМАССЫ В РАСТЕНИЯХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСПОРТНЫХ ПОТОКОВ И ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫХ ОТНОШЕНИЙ ПРИ РАЗНЫХ СВЕТОВЫХ РЕЖИМАХ

© 2024 г. А. А. Ивлев*, В. А. Литвинский**, Н. М. Пржевальский***,
Д. А. Товстыко***, А. С. Шмаков***, М. П. Ломакин***,
Н. Н. Слепцов***, И. Г. Тараканов***

*Всероссийский научно-исследовательский геологический нефтяной институт (ВНИГНИ), Апрелевское отделение,
1-я ул. Кетрица, г. Апрелевка, Московская область, 143360 Россия

**Палеонтологический институт РАН имени А. А. Борисяка, Профсоюзная ул., Москва, 117647 Россия

***Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К. А. Тимирязева,
Тимирязевская ул., 49, Москва, 127434 Россия
@E-mail: aa.ivlev@list.ru

Поступила в редакцию 12.11.2023 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 21.02.2024 г.

Показано, что различия в изотопном составе углерода водорастворимой и водонерастворимой фракции биомассы листа растений, а также флоэмы эволюционно обусловлены, связаны с метаболическими реакциями при ассимиляции и фотодыхании и не зависят от режима освещенности и от спектральных диапазонов ФАР, используемых при освещении. Они являются причиной изотопных различий ассимиляционного и фотодыхательного углеродных фондов, питающих различные метаболические процессы. Благодаря строгой временной и пространственной организации метаболизма потоки углерода из фондов сохраняют изотопные различия, полностью не перемешиваясь. Отличия изотопного состава углерода водорастворимой фракции биомассы и углерода сока флоэмы от углерода водонерастворимой фракции невелики (1–3‰), но вполне устойчивы и легко фиксируются. Углерод водорастворимой фракции весьма близок по изотопному составу к углероду флоэмы и заметно обогащен изотопом ^{13}C относительно водонерастворимой фракции, что позволяет использовать его как маркер при изучении транспорта ассимилятов в растениях, особенно в период бутонизации и плодоношения. Показано, что причиной обогащенности автотрофных органов и тканей изотопом ^{12}C относительно углерода гетеротрофных частей растения является преимущественное участие в их образовании изотопнолегкого ассимиляционного фонда, тогда как в формировании гетеротрофных органов принимает участие изотопнотяжелый фотодыхательный фонд. Показано, что проявлением двух изотопноразличающихся фондов является обнаруженная связь изотопного состава углерода листьев с их возрастом.

Ключевые слова: фотосинтез, фракционирование изотопов углерода, ассимиляционный и фотодыхательные фонды, транспортные потоки, донорно-акцепторные отношения, световые режимы, спектральный состав света, водорастворимая и водонерастворимая фракции биомассы

DOI: 10.31857/S1026347024040039, **EDN:** VHZBBF

То, что фотосинтез сопровождается фракционированием изотопов углерода, известно очень давно (Murthy, Nier 1941; Wickman, 1952; Craig 1954). При этом углерод биомассы фотосинтезирующего организма (растения) обогащается изотопом ^{12}C относительно ассимилируемого из среды CO_2 . Позднее установили сложную природу процессов, связанных с метаболизмом углерода. Оказалось, что наряду с фотосинтезом, связанным с ассимиляцией CO_2 , идет

и противоположно направленный процесс фотодыхания (Чиков, 1996; Эдвардс, Уокер, 1986). Оба процесса происходят на свету. Выяснилось, что и фракционирование изотопов углерода происходит в обоих процессах, а знаки изотопных эффектов противоположные. Ассимиляция обогащает формирующуюся биомассу изотопом ^{12}C , фотодыхание — изотопом ^{13}C .

Был предложен возможный механизм образования двух изотопноразличающихся фондов углерода

на входе CO_2 в клетку (Ивлев, 2009; Ivlev, 2012). При ассимиляции поток CO_2 из среды в клетку, прежде чем он попадает в фотосинтетический цикл Кальвина — Бенсона, фиксируется в ключевой реакции на входе — карбоксилировании рибулозобисфосфата (РиБФ), катализируемого ферментом Рубиско. Важное свойство фермента в том, что он обладает двойственной функцией карбоксилазы и оксигеназы. Благодаря этому поток углерода попеременно направляется через цикл либо на синтез Г6Ф в карбоксилазную фазу работы Рубиско, образуя ассимиляционный фонд, либо образующийся Г6Ф идет дальше в гликолатный цикл, превращаясь в гликолат и другие продукты цикла. В конечном счете образуется фотодыхательный фонд углерода. Функционирование цикла происходит в оксигеназную фазу работы Рубиско.

Обогащенность углерода ассимиляционным фондом изотопом ^{12}C относительно углерода CO_2 среды возникает в результате изотопного эффекта в реакции карбоксилирования РиБФ в карбоксилазную фазу работы Рубиско. Обогащенность углерода фотодыхательного фонда относительно углерода ассимиляционного фонда изотопом ^{13}C возникает в результате изотопного эффекта при декарбоксилировании глицина на ферменте — глициндегидрогеназе.

Таким образом, изотопный эффект фотодыхания оказывается противоположным по знаку эффекту ассимиляции, снижая тем самым обогащение биомассы изотопом ^{12}C , достигнутое при ассимиляции. При последующем использовании благодаря строгой временной и пространственной организации метаболизма потоки углерода из фондов сохраняют изотопные различия, полностью не перемешиваясь. В итоге при фотосинтезе возникают два изотопноразличающихся потока углеродных субстратов (Ивлев, 2009; Ivlev, 2012). Такой механизм был назван осциляционным (Dubinsky *et al.*, 2010; Dubinsky, Ivlev, 2011).

Исследования изотопных распределений метаболитов и путей их биосинтеза в фотосинтезирующей клетке с целью поиска реакции, где возникает изотопный эффект углерода, привели к обнаружению третьего узла фракционирования изотопов углерода, находящегося в конце гликолитической цепи на пересечении центральных метаболических путей. Он связан с реакцией декарбоксилирования пирувата и ответственен за появление внутримолекулярной клеточной изотопной неоднородности (Ivlev, 2012). Была построена упрощенная модель фракционирования изотопов углерода в фотосинтезирующей клетке, которая, тем не менее, описывала основные черты распределения изотопов углерода в растениях (Ивлев, 2009; Ivlev, 2012).

В настоящей работе рассмотрена возможность использования упрощенной модели для изучения

транспортных потоков в растениях и донорно-акцепторных отношений при разных световых режимах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание растений проводили в климатических камерах (Urbangrower 150, China) при различных режимах освещения. Условия выращивания описаны в предыдущих статьях (Tarakanov *et al.*, 2022; Ивлев и др., 2023). Измерения изотопного состава углерода проб растительной биомассы проводили на изотопном масс-спектрометре (Delta V, Thermo). Методики измерения и пробоподготовки описаны в упомянутых выше работах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принципиально новым в исследовании фракционирования изотопов углерода в растениях стало открытие того, что оно происходит не только под влиянием света, но и под влиянием отдельных длин волн из оптически разных диапазонов. Наиболее сильное и разнонаправленное влияние оказывают монохроматический синий (452–477 нм) и красный (623–641 нм) свет. Радиация из синего диапазона смещает изотопный состав углерода биомассы в сторону обогащения изотопом ^{12}C . Радиация из красного диапазона смещает изотопный состав углерода биомассы в сторону обогащения изотопом ^{13}C (Tarakanov *et al.*, 2022; Ивлев и др. 2023). Следует подчеркнуть, что оптическое излучение этих диапазонов происходит одновременно и поглощается в наибольшей степени фотосинтетическими пигментами.

Имеющийся материал указывает на связь разных длин волн падающего света с генетическими характеристиками растения, с особенностями их роста и развития (Shimazaki *et al.*, 2007; Son, Oh, 2013; Chen *et al.*, 2017; Lanoue *et al.*, 2018).

Действие синего света, поскольку оно сопровождалось обогащением биомассы изотопом ^{12}C , относительно облучения контрольным «белым» светом, мы, в соответствии с осцилляционной моделью фотосинтеза, связали с усилением ассимиляционного потока. Сдвиг, наблюдаемый при облучении красным светом, сопровождаемый обогащением биомассы изотопом ^{13}C , мы приписали усилению фотодыхательного потока (Ивлев . Тараканов, 2013; Tarakanov *et al.*, 2022; Ивлев, и др., 2023). В настоящей работе мы сфокусировали основное внимание на первых двух узлах изотопного фракционирования в растениях, связанных с процессом фотосинтеза — ассимиляцией CO_2 и фотодыханием.

Факторы, определяющие изотопные различия водорастворимой и водонерастворимой фракций биомассы растений

Водонерастворимая фракция биомассы растений содержит компоненты, используемые в структурах скелета. Из литературы известно, что она состоит, в основном, из соединений нерастворимых или плохо растворимых в воде (жирных кислот и других липидных компонентов, лигнинов, отдельных белковых молекул, изопреноидов и др.) (Биогенез природных соединений, 1965). Относительно общего углерода биомассы водонерастворимая фракция обогащена «легким» изотопом углерода (Gessler *et al.*, 2008).

Водорастворимая фракция биомассы представлена растворимыми сахарами, органическими кислотами, а также рядом компонентов, синтезируемых при воздействии на растение стрессовых факторов (пролин, гликолевая кислота, глицин) (Калинкина, Русинов, 1981; Калинкина, Удельнова, 1990; 1991). Как было показано (Ивлев, 1993), все фотодыхательные субстраты обогащены ^{13}C по сравнению с субстратами ассимиляционного потока.

Изотопные различия упомянутых фракций проявляются также при транспорте ассимилятов. В монографии А.Л. Курсанова (1976) отмечается, что транспортный поток в растениях представлен потоком жидких метаболитов, свыше 10% которого составляют растворимые сахара. Следуя логике нашей модели, можно предположить, что транспортные агенты связаны с фотодыхательным фондом и должны быть обогащены ^{13}C относительно углерода биомассы.

Действительно, изучение сока флоэмы у томатов (*Solanum lycopersicon*), через которую идет транспортный поток фотоассимилятов (табл. 1) свидетельствует о том, что сок флоэмы на протяжении всего суточного периода изучения и при разных режимах освещенности (высокая и низкая плотность потока фотонов, ППФ) обнаруживает близкое сходство с изотопным составом водорастворимой фракции биомассы. Хотя отличия

изотопного состава углерода водорастворимой фракции биомассы и углерода сока флоэмы от углерода водонерастворимой фракции невелики (1–3‰), они вполне устойчивы и легко фиксируются.

Эти различия подтверждаются данными других авторов (Cernusak *et al.*, 2003; Gessler *et al.*, 2007; Gessler *et al.*, 2008). Как показано далее, изотопный состав водорастворимой фракции можно использовать в качестве маркера при изучении донорно-акцепторных отношений, особенно в период цветения и плодоношения. В табл. 1 и 2 сопоставлены полученные нами данные по изотопному составу углерода сока флоэмы и данные по изотопному составу углерода водорастворимой и водонерастворимой фракций биомассы донора (листа) и акцептора (плода) томата.

Как видно из табл. 1, значения величин $\delta^{13}\text{C}$ сока флоэмы во всех экспериментах близки к значениям величин $\delta^{13}\text{C}$ углерода водорастворимых фракций донора (листа) и акцептора (плода). Значения величин $\delta^{13}\text{C}$ сока флоэмы попадают в интервал от –29.7 до –31.8‰ в условиях высокого и низкого значений ППФ в период условного дня и ночи.

Из сопоставления табл. 1 с табл. 2 видно, что изотопный состав углерода сока флоэмы близок к изотопному составу углерода водорастворимой фракции как донора (листа), так и акцептора (плода). В то же время водонерастворимые фракции донора и акцептора заметно обогащены изотопом ^{12}C относительно углерода флоэмы и водорастворимых фракций. При этом водорастворимая фракция донора обогащена «легким» изотопом в большей степени, чем такая же фракция акцептора. Из этого можно заключить, что транспорт ассимилятов, в основном, происходит в виде метаболитов водорастворимой фракции. Однако вопрос о том, какая доля нерастворимой фракции, переходит в раствор, смешиваясь с компонентами растворимой фракции в процессе углеродного обмена на различных стадиях онтогенеза, остается открытым.

Близость изотопного состава углерода водорастворимых фракций и углерода сока флоэмы

Таблица 1. Изотопный состав углерода сока флоэмы в фазе образования плода томата (*Solanum lycopersicon*), линия 1, при различных световых режимах. Величины $\delta^{13}\text{C}$ сока флоэмы даны в виде относительных отклонений от стандарта в единицах VPDB (‰)

Световой режим. Фотопериод 24 ч комбинированный: 18 ч (свет с 00-00 до 18-00), высокая ППФ (день) C460+K640+K660+ДК730 + 6ч низкая ППФ (свет с 18-00 до 24-00, условная ночь).							
Отбор сока флоэмы в 12-00 после 12 ч с высокой ППФ		Отбор сока флоэмы в 18-00 после 18 ч с высокой ППФ		Отбор сока флоэмы в 24-00 после 6 ч с низкой ППФ (условная ночь)		Отбор сока флоэмы в 6-00 после 6 ч с высокой ППФ	
из черешка листа	из плодоножки	из черешка листа	из плодоножки	из черешка листа	из плодоножки	из черешка листа	из плодоножки
–30.7 ± 1.1	–31.76 ± 0.9	–29.68 ± 0.2	–30.74 ± 0.4	–30.61 ± 0.7	–30.84 ± 1.2	–29.79 ± 0.3	–30.83 ± 0.9

Таблица 2. Распределение изотопов углерода ¹³C между водорастворимой и водонерастворимой фракциями биомассы растений томата (*Solanum lycopersicon*), линия 1. В вариантах 2–4 основной фотопериод 18 ч удлиняется монохроматическим светом. Май 2020 г. Величины δ ¹³C сока флоэмы даны в виде относительных отклонений от стандарта в единицах VPDB (‰).

№	Вариант светового режима	Донор (лист)		Акцептор (плод)	
		Растворимая фракция	Нерастворимая фракция	Растворимая фракция	Нерастворимая фракция
1	24 ч C ₄₆₀ +K ₆₄₀ + K ₆₆₀ +ДК ₇₃₀	−29.26 ± 1.3	−32.37 ± 0.5	−29.19 ± 0.6	−32.11 ± 0.6
2	18 ч C ₄₆₀ +K ₆₄₀ + K ₆₆₀ +ДК ₇₃₀ + 6 ч C ₄₆₀	−29.18 ± 0.4	−30.12 ± 1.6	−28.91 ± 0.9	−30.5 ± 1.3
3	18 ч C ₄₆₀ +K ₆₄₀ + K ₆₆₀ +ДК ₇₃₀ + 6 ч K ₆₄₀	−29.98 ± 1	−30.36 ± 1.8	−29.84 ± 0.6	−31.08 ± 1.4
4	18 ч C ₄₆₀ +K ₆₄₀ + K ₆₆₀ +ДК ₇₃₀ + 6 ч K ₆₆₀	−30.98 ± 1.3	−31.59 ± 0.8	−30.31 ± 0.7	−31.56 ± 1.1
5	24 ч K ₆₆₀	−31.33 ± 0.2	−31.59 ± 0.8	−31.04 ± 0.7	−32.58 ± 0.7

Примечание. Растения томата в приведенных опытах выращивали при следующих световых режимах. 1 (контроль): фотопериод **24 ч** непрерывного освещения, высокий уровень облученности, спектральный состав C₄₆₀+K₆₄₀+K₆₆₀+ДК₇₃₀; 2 (режим комбинированный): фотопериод **18 ч**, высокий уровень облученности, спектральный состав C₄₆₀+K₆₄₀+K₆₆₀+ДК₇₃₀, + **6 ч**, низкий уровень облученности C₄₆₀ (условная ночь); 3(режим комбинированный): фотопериод: **18 ч**, высокий уровень облученности, спектральный состав C₄₆₀+K₆₄₀+K₆₆₀+ДК₇₃₀, + **6 ч** K₆₄₀, низкая облученность (условная ночь); 4(режим комбинированный): фотопериод 18 ч, высокий уровень облученности, спектральный состав C₄₆₀+K₆₄₀+K₆₆₀+ДК₇₃₀, + 6 ч K₆₆₀, низкая облученность (условная ночь); 5: фотопериод 24 ч непрерывного освещения красным светом K₆₆₀, высокая облученность.

указывает на то, что водорастворимая фракция донора в основном образуется за счет фотодыхательного фонда и является основой для создания транспортного потока ассимилятов.

Различие изотопного состава углерода водонерастворимых фракций донора и акцептора может быть следствием двух причин. Первая причина может быть связана с ранее упоминавшимся фракционированием изотопов углерода в третьем узле, т. е. в гликолитической цепи и сопряженном с ним темновом дыхании, которое происходит в автотрофных и гетеротрофных клетках (Ivlev, 2012; 2023). Вторая причина связана с углеродным обменом клетки, что предполагает изменение соотношения вкладов водорастворимой и водонерастворимой фракций в транспортный поток ассимилятов. Изменение соотношения может меняться на разных этапах онтогенеза за счет того, что углеродные структуры нерастворимой фракции биомассы могут переходить в раствор, и, попадая в транспортный поток, менять соотношение вкладов ассимиляционного и фотодыхательного фондов в транспортном потоке и, соответственно, изотопный состав углерода сока флоэмы. Однако, как отмечалось, в настоящий момент недостаточная изученность этих вопросов не позволяет дать на них определенный ответ.

Опираясь на полученные результаты, мы неожиданно получили разгадку феномена, который ранее заметили многие исследователи (Badeck *et al.*, 2005; Gessler *et al.*, 2007; Batheller *et al.*, 2008; Cernusak *et al.*, 2009). Феномен состоит в том, что гетеротрофные органы растения (корни, семена, плоды), хотя и немного (на 1–3 ‰), но всегда оказывались несколько “тяжелее” автотрофных органов (листа, стебля). С точки зрения изложенных представлений, наблюдаемая разница в изотопном составе углерода автотрофных и гетеротрофных органов и тканей обусловлена тем, что транспортный поток ассимилятов связан с фотодыхательным углеродным фондом, обогащенным изотопом ¹³C. Но при этом нельзя исключать возможность того, что в ходе углеродного обмена углерод нерастворимой фракции на некоторых этапах онтогенеза может растворяться, внося изменение в изотопный состав транспортного потока.

Чтобы убедиться в универсальности описанных донорно-акцепторных взаимоотношений в растениях, мы изучили еще два объекта — горчицу сарептскую *Brassica juncea* (L.) Coss в паре “лист-соцветие” в фазе бутонизации и аналогичную донорно-акцепторную пару для салата *Lactuca sativa* L сорта Афицион на той же стадии (табл. 3, 4).

Бросается в глаза, что, как и в томатах, водорастворимая фракция биомассы листа для горчицы и для салата, т. е. для донора и для акцептора, заметно «тяжелее» водонерастворимой фракции.

Для всех растений наблюдается сходная картина распределения ^{13}C между водорастворимой и водонерастворимой фракциями в паре «лист — соцветие» в фазе бутонизации, что подтверждает полученные ранее выводы.

Данные табл. 1–4 позволяют утверждать, что картина изотопных различий фракций биомассы общая для разных растений и связана с образованием изотопно различающихся фондов при фотосинтезе. Из этих таблиц видно, что разные режимы освещения отличаются друг от друга разным набором спектральных диапазонов оптического излучения. При этом картина распределения ^{13}C между фракциями не меняется. Она воспроизводится при разных режимах освещения как с участием, так и с исключением влияющих на изотопный состав углерода спектральных диапазонов

красного и синего света. Это приводит к выводу, что распределение изотопов связано с эволюционно обусловленным фракционированием изотопов углерода в растительной клетке, привязанным к углеродному метаболизму. Отдельные спектральные диапазоны фотосинтетически активной радиации являются частью этой сложной картины и служат для тонкой настройки внутриклеточного метаболизма.

Вышеизложенное позволяет по-новому рассмотреть данные, полученные Лерман и соавт. (Lerman *et al.*, 1974). Еще в 1974 г., авторы, изучая изотопный состав углерода растения *Bryophyllum daigremontianum* Berger, относящегося к САМ-типу, пытались объяснить наблюдаемые в природе колебания изотопного состава его углерода от -28‰ , характерного для C_3 -растений, до -12‰ , характерного для C_4 -растений. Авторы связали эти колебания со способностью листьев САМ-растений в ходе развития менять ассимиляцию с C_3 -типа на САМ-тип. В результате проведенного ими исследования

Таблица 3. Донорно-акцепторные взаимодействия «лист-соцветие» в растениях горчицы сарептской в фазу бутонизации при разных вариантах световых режимов (опыт с исключением отдельных спектральных диапазонов ФАР). Изотопный состав фракций ($\delta^{13}\text{C}$) дан в единицах VPDB

Вариант светового режима	Донор (лист)		Акцептор (соцветие)		Время начала бутонизации дни
	водорастворимая фракция биомассы	водонерастворимая фракция биомассы	водорастворимая фракция биомассы	водонерастворимая фракция биомассы	
С+БК+К+ДК (контр.)	-30.96 ± 1.47	-34.73 ± 0.32	-31.09 ± 0.20	-33.22 ± 0.35	24 ± 3
С+БК+ ДК (-К)	-32.26 ± 1.35	-35.50 ± 1.69	-31.92 ± 1.21	-33.85 ± 1.79	25 ± 1
С+БК+К+ (-ДК)	-32.56 ± 0.77	-33.61 ± 0.83	-32.10 ± 0.90	-32.30 ± 0.49	42 ± 6
БК+К+ДК (-С)	-32.26 ± 0.47	-32.10 ± 0.77	-30.03 ± 0.62	-30.57 ± 0.57	37 ± 2
С	-35.20 ± 0.29	-36.99 ± 0.33	-34.18 ± 0.87	-35.40 ± 0.96	45 ± 4

Примечание. С — синий свет; БК — ближний красный; К — красный; ДК — дальний красный. (С+БК+К+ДК) — в контрольном варианте представлен синий и красный всех диапазонов

Таблица 4. Донорно-акцепторные взаимодействия «лист-соцветие» в растениях салата сорта Афицион в фазу бутонизации при разных вариантах световых режимов. Изотопный состав фракций $\delta^{13}\text{C}$ дан в единицах VPDB

№	Вариант светового режима	Донор		Акцептор	
		Растворимый	Нерастворимый	Растворимый	Нерастворимый
1	24 ч С460+К640+К660+ДК730	-31.34 ± 0.7	-34.41 ± 1.5	-30.98 ± 0.5	-32.29 ± 0.6
2	18 ч + 6 ч С ₄₆₀	-31.46 ± 0.5	-34.49 ± 0.9	-31.05 ± 0.4	—

Примечание. Растения салата выращивали на следующих световых режимах: 1 — фотопериод 24 ч, спектральный состав С460+К640+К660+ДК730 (непрерывный свет, высокий уровень облученности); 2 — фотопериод 24 ч, комбинированный: 18 ч С460+К640+К660+ДК730, высокий уровень облученности + 6 ч С460, низкая облученность (условная ночь).

была обнаружена связь изотопного состава углерода листьев *B. daigremontianum* Berger с их возрастом. Суть этой связи можно понять из следующего. Изучаемые растения *B. daigremontianum* обладают парами противоположно направленных листьев, расположенных вдоль стебля. По высоте авторы выделили 5 ярусов. Причем на самом верхнем ярусе расположены наиболее молодые листья, а на самом нижнем ярусе — самые старые. Листья на верхних ярусах (более молодые) были обогащены изотопом ^{12}C относительно листьев на нижних ярусах (более старых). Но особенно интересно оказалось то, что изотопный состав фракций листа отражает те же возрастные изотопные различия, что и сами листья, из которых извлекались фракции. При этом изотопный состав углерода водорастворимой фракции листа всегда проявлял обогащенность изотопом ^{13}C относительно углерода водонерастворимой фракции (величины $\delta^{13}\text{C}$ колебались от -10.5 до -13.5‰). Величины $\delta^{13}\text{C}$ водонерастворимой фракции оказались в пределах от -19.0 до -16.5‰ . То есть картина распределения ^{13}C вполне укладывалась в рамки представления о двух изотопно различающихся фондах субстратов, возникающих при фотосинтезе.

С точки зрения рассматриваемой модели, изотопные различия листьев на разных ярусах объясняются тем, что образование новых молодых листьев связано как с участием ассимиляционного фонда, так и с притоком ассимилатов из более старых листьев, т. е. с участием фотодыхательного фонда. Последовательное обогащение изотопом ^{12}C более молодых листьев означает, что приток углерода из изотопнотяжелого фотодыхательного фонда более старых листьев нижнего яруса на верхний ярус с более молодыми листьями становится меньше, т. е. обусловлено различиями в возрасте листьев.

Полученная авторами (Lerman *et al.*, 1974) картина наблюдаемых изотопных различий рассматриваемых фракций при описании связи изотопного состава углерода биомассы с возрастом листа согласуется с описанной нами ранее картиной распределения изотопа ^{13}C при транспорте ассимилатов при бутонизации. Химический состав фракций тоже в целом согласуется с распределением в них растворимых и нерастворимых компонентов, который предполагался из анализа литературных данных.

Действительно, Лернер и соавт. (Lerman *et al.*, 1974) прямым изучением химического состава установили, что водонерастворимая фракция листа состоит в основном из крахмала и гемицеллюлозы с небольшой примесью протеинов. При этом крахмал оказался устойчиво (приблизительно на 2‰) «тяжелее» гемицеллюлозы, что свидетельствует о постфотосинтетическом фракционировании изотопов углерода на путях синтеза гемицеллюлозы и крахмала.

Водорастворимая фракция состоит, в основном, из малата, других органических кислот, а также из небольшого количества растворимых сахаров и других метаболитов. При этом реальное различие фракций составило от 2 до 8‰ . Разброс значений $\delta^{13}\text{C}$, по крайней мере, частично обусловлен разницей в возрасте листьев, из которых извлекались фракции.

Важно отметить, что, углерод ассимилирующих органов (листа) (Lerman *et al.*, 1974) имел более низкие значения $\delta^{13}\text{C}$, чем углерод гетеротрофных органов (семена и коробочка). Работа Саранга с соавт. (Saranga *et al.*, 1999), в которой изучалась связь изотопного состава углерода органов и фракций биомассы хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) в ходе онтогенеза, дает еще одно подтверждение сказанному. Авторы подтвердили, что автотрофные органы (лист и стебель) характеризуются более низкими значениями $\delta^{13}\text{C}$, по сравнению с гетеротрофными (коробочка и стебель). Они также установили, что низкие значения $\delta^{13}\text{C}$ в листьях сохранялись на стадиях пика цветения и развития коробочек и значительно увеличивались на стадии созревания коробочек, что косвенно указывало на связь изотопного состава с транспортом ассимилатов.

Универсальный характер сделанных представлений подтверждается результатами работы Монти с соавт. (Monti *et al.*, 2006), которые изучали столь распространенную культуру как сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.). Работы проводились в течение 3 лет, 2000–2002 гг., с целью изучения изменений рассматриваемых изотопных характеристик в зависимости от фазы роста и водного режима. Результаты показали, что распределение изотопа ^{13}C может заметно меняться с течением времени и между органами. Подтверждены значительные изотопные различия между ассимилирующими и гетеротрофными органами. Листья имели самые высокие значения обогащения ^{12}C (в среднем -21.2‰) относительно ассимилируемого CO_2 , а корень — самые низкие (-18.8‰). Кроме того, корень показал относительно низкую дисперсию $\delta^{13}\text{C}$, на которую слабо влияют водный режим и время.

В заключение упомянем факторы, которые сильно влияют на распределение изотопа ^{13}C между органами и фракциями биомассы. К ним относятся параметры среды, влияющие на стрессоустойчивость растений: влагодоступность, соленость. Однако это большая и важная тема заслуживает отдельного рассмотрения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для анализа донорно-акцепторных взаимодействий в растениях при транспорте ассимилатов использованы изотопные различия углерода водорастворимой и водонерастворимой фракций

биомассы. Физический смысл этого параметра установлен на основании предложенной ранее концепции фракционирования изотопов углерода в фотосинтезирующей клетке и вытекает из осцилляционного характера фотосинтеза, приводящего к образованию двух изотопноразличающихся углеродных фондов при ассимиляции CO_2 — ассимиляционного и фотодыхательного. Первый обогащен изотопом ^{12}C , второй — ^{13}C .

Показано, что этот параметр мало зависит от режима освещения и от спектральных диапазонов ФАР, используемых при освещении, и является эволюционно обусловленным. Углерод водорастворимой фракции весьма близок по изотопному составу к углероду флоэмы и заметно обогащен изотопом ^{13}C относительно водонерастворимой фракции, что позволяет использовать его как маркер при изучении транспорта ассимилятов в растениях.

Наблюдаемая обогащенность изотопом ^{13}C углерода флоэмы позволяет предположить, что в период бутонизации, формирования плода активируется фотодыхание и основная часть ассимилируемого углерода идет на образование фотодыхательного фонда.

Показано, что причиной обогащенности автотрофных органов и тканей изотопом ^{12}C относительно углерода гетеротрофных частей растения является преимущественное участие в их образовании изотопнолегкого ассимиляционного фонда, тогда как в формировании гетеротрофных органов принимает участие изотопно тяжелый фотодыхательный фонд.

Другим проявлением образования двух изотопноразличающихся фондов является обнаруженная связь изотопного состава углерода листьев с их возрастом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-317 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биогенез природных соединений /Под ред. Гиномана Л. М. М.: Мир 1965. 712 с.
- Ивлев А. А. О потоках «легкого» и «тяжелого» углерода при сопряжении фотосинтеза и фотодыхания. // 1993. Физиология растений. Т. 40. С. 872–880.
- Ивлев А. А. Изотопное фракционирование и клеточные механизмы углеродного метаболизма в фотосинтезирующей клетке. М.: РГАУ — МСХА. 2009. 74 с.
- Ивлев А. А. Тараканов И. Г. Интерпретация суточных вариаций изотопных характеристик углерода растений в рамках осцилляционной концепции фотосинтеза на примере клещевины (*Ricinus communis* L.). // Известия ТСХА. 2013. Вып. 1. С. 36–46.
<https://doi.org/10.1134/S1062359023601726>
- Ивлев А. А., Товстыко, Д. А., М. П. Ломакин, А. С. Шмаков, Н. Н. Слепцов, В. А. Литвинский, Н. М. Пржевальский, И. Г. Тараканов. О влиянии длин волн разных диапазонов фотосинтетически активной радиации на изотопный состав углерода биомассы растений и ее фракций (на примере салата (*lactuca sativa* L.) сорта Афицион) // Изв. РАН. Серия биол. 2023, № 5. С. 1–8.
<https://doi.org/10.0.124.113/S1026347022600534>
- Калинкина Л. Г., Удельнова Т. М. Влияние фотодыхания на фракционирование стабильных изотопов углерода у морской хлореллы // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 96–104.
- Калинкина Л. Г., Удельнова Т. М. Механизм вовлечения гликолатного пути в накопление свободного пролина у морской водоросли в условиях засоления // 1991. Физиология растений. Т. 38. С. 948–958.
- Калинкина Л. Г., Русинов Н. Г. Влияние NaCl на оксигеназную активность рибулозодифосфаткарбоксилазы, на активность гликолатдегидрогеназы и выделение гликолевой кислоты // Физиология растений. 1981. Т. 28. С. 5–13.
- Курсанов А. А. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука. 1976. 644 с.
- Чиков В. И. Фотодыхание // Соросовский образовательный журнал 1996. № 11. С. 2–8.
- Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C_3 и C_4 — растений: механизмы и регуляция. М.: Мир. 1986. 589 с.
- Badeck Franz-W., Tcherkez G., Nogue S. Clément P., Ghashghaie J. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs — a widespread phenomenon // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005. V. 19. С. 1381–1391.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1912>
- Batheller C., Badeck F.-W., Couzi Ph., Harscoet S., Mauve C. Divergence in $\delta^{13}\text{C}$ of dark respired CO_2 and bulk organic matter occurs during transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* plants // New Phytologist. 2008. V. 177. P. 406–418.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02246.x>

- Craig H.* Carbon-13 in plants and relationships between carbon-13 and carbon-14 variations in nature // *J. Geology*. 1954. V. 62. № 2. P. 53–92.
- Cernusak L. A., Tcherkez G., Keitel C., Cornwell W. K., Santiago L. S., Knohl A., Barbour M. M., Williams D. G., Reich P. B., Ellsworth D. S., Dawson T. E., Griffiths H. G., Farquhar G. D., Wright I. J.* Why are non-photosynthetic tissues generally ^{13}C enriched compared with leaves in C3 plants? Review and synthesis of current hypotheses // *Funct. Plant Biol.* 2009. V. 36. P. 199–213. <https://doi.org/10.1071/FP08216>
- Cernusak L. A., Arthur D. J., Pate J. S. & Farquhar G. D.* Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus* // *Plant Physiology*. 2003. V. 131 P. 1544–1554. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016303>
- Chen X. L., Yang Q. C., Song W. P., Wan, L. C., Guo W. Z., Xue X. Z.* Growth and nutritional properties of lettuce affected by different alternating intervals of red and blue LED irradiation. // *Sci. Hortic.* 2017. V. 223. P. 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.037>
- Dubinsky A. Yu., Ivlev A. A.* Computational analysis of the possibility of the oscillatory dynamics in the processes of CO_2 assimilation and photorespiration // *Biosystems*. 2011. V. 103 P. 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2010.11.003>
- Dubinsky A. Yu., Ivlev A. A., Igamberdiev A. U.* Theoretical Analysis of the Possibility of Existence of Oscillations in Photosynthesis // *Biophysics*. 2010. V. 55. № 1. P. 55–58. <https://doi.org/10.1134/S0006350910010094>
- Gessler A., Keitel C., Kodama N., Weston Ch, Winters A. J., Keith H., Grice K., Leuning R., Farquhar G. D.* $\delta^{13}\text{C}$ of organic matter transported from the leaves to the roots in *Eucalyptus delegatensis*: short-term variations and relation to respired CO_2 // *Funct. Plant Biology*. 2007. V. 34. P. 692–706. <https://doi.org/10.1071/FP07064>
- Gessler A., Tcherkez G., Peuke A. D., Ghashghaie J. G., Farquhar G. D.* Experimental evidence for diel variations of the carbon isotope composition in leaf, stem and phloem sap organic matter in *Ricinus communis* // *Plant, Cell Environ.* 2008. V. 31 P. 941–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01806.x>
- Ivlev A. A.* Oscillatory nature of metabolism and carbon isotope distribution in photosynthesizing cells Oscillatory nature of metabolism and carbon isotope distribution in photosynthesizing cells // *Photosynthesis – fundamental aspects* / ed. Najafpour M. M. Intech Publishers. Croatia. 2012. P. 341–366. <https://doi.org/10.5772/26219>
- Lerman J. C., Deleens E., A. Nato, A. Moyse.* Variations in the Carbon isotope Composition of a Plant with Crassulacean Acid Metabolism // *Plant Physiology*. 1974. V. 53. P. 581–584. <https://doi.org/10.1104/pp.53.4.581>
- Lanoue J., Leonardos E. D., Grodzinski B.* Effects of light quality and intensity on diurnal patterns and rates of photo-assimilate translocation and transpiration in tomato leaves. *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 756–762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00756>
- Monti A., Amaducci M. T., Pritoni G., Venturi G.* Variation in carbon isotope discrimination during growth and at different organs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Field Crops Research*. 2006. V. 98. Iss. 2.3. P. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.01.002>
- Murthy B. F., Nier A. O.* Variations in the relative abundances in the carbon isotopes // *Phys. Rev.* 1941. V. 59. P. 771–772. <https://doi.org/10.1021/ja01872a047>
- Saranga Y., Flash I., Pateresson A. H., Yakir D.* Carbon isotope ratio in cotton varies with growth stage and plant organ // *Plant Science*. 1999. V. 142. P. 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00004-7)
- Shimazaki K., Doi M., Assmann S. M., Kinoshita T.* Light regulation of stomatal movement // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007. V. 58. P. 219–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>
- Son K. H., Oh M. M.* Leaf shape, growth, and antioxidant phenolic compounds of two lettuce cultivars grown under various combinations of blue and red light-emitting diodes // *Hort. Sci.* 2013. V. 48. P. 988–995. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.8.988>
- Tarakanov I. G., Tovstyko D. A., Lomakin M. P., Shmakov A. S., Sleptsov N. N., Shmarev A. N., Litvinskiy V. A., Ivlev A. A.* Effects of light spectral quality on the photosynthetic activity, biomass production, and carbon isotope fractionation in lettuce plants // *Plants*. 2022. V. 11. P. 441. <https://doi.org/10.3390/plants11030441>
- Wickman F. E.* Variations in the relative abundance of carbon isotope in plants // *Geochim. et Cosm. Acta*. 1952. V. 2. P. 243–254. <https://doi.org/10.1038/1691051a0>

On the use of isotopic differences of carbon fractions of biomass in plants to study transport flows and source-sink relations under different light conditions

© 2024 A. A. Ivlev*,[@], V. A. Litvinsky**, N. M. Przewalsky***, D. A. Tovstyko***,
A. S. Shmakov***, M. P. Lomakin***, N. N. Sleptsov***, I. G. Tarakanov***

**All-Russian Scientific Research Geological Petroleum Institute (VNIGNI), Moscow. April branch.
Aprelevka, 1st St. Ketritsa, Moscow region, 143360 Russia*

***A. A. Borisyak Paleontological Institute of the Russian Academy of Sciences, Profsoyuznaya Street,
Moscow, 117647 Russia*

****Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Timiryazevskaya str., 49, Moscow, 127434 Russia*

[@]E-mail: aa.ivlev@list.ru

It is shown that the differences in the isotopic composition of carbon in the water-soluble and water-insoluble fractions of plant leaf biomass, as well as phloem, are evolutionarily determined. They associated with metabolic reactions during assimilation and photorespiration and do not depend on the illumination mode and on the spectral ranges of headlights used in illumination. The above isotopic shifts are the cause of isotopic differences in assimilatory and photorespiratory carbon stocks that feed various metabolic processes. Due to the strict temporal and spatial organization of metabolism, carbon fluxes from the funds retain isotopic differences without complete mixing. The differences in the isotopic composition of carbon of the water-soluble fraction of biomass and carbon of phloem juice from carbon of the water-insoluble fraction are small (1–3%), but they are quite stable and easily fixed. The carbon of the water-soluble fraction is very close in isotopic composition to the carbon of the phloem and is noticeably enriched with the isotope ^{13}C relative to the water-insoluble fraction, which makes it possible to use it as a marker in the study of assimilate transport in plants, especially during budding and fruiting. It is shown that the reason for the enrichment of autotrophic organs and tissues with isotope ^{12}C relative to carbon of heterotrophic parts of the plant is the predominant participation in their formation of an isotopically light assimilation fund, whereas an isotopically heavy photorespiratory fund takes part in the formation of heterotrophic organs. It is shown that the manifestation of the formation of two isotopically different funds is the discovered relationship of the carbon isotope composition of leaves with their age.

Keywords: photosynthesis, fractionation of carbon isotopes, assimilation and photorespiratory funds, transport flows, source-sink relationships, light regimes, spectral composition of light, water-soluble and water-insoluble fractions of biomass.

УДК 591.4+591.8+598.112

МОРФОЛОГИЯ КОЖИ ПЯТИ ВИДОВ СКАЛЬНЫХ ЯЩЕРИЦ РОДА *DAREVSKIA* (LACERTIDAE, SQUAMATA)

© 2024 г. О. Ф. Чернова*[@], Э. А. Галоян*, Ю. Ф. Ивлев*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук,
Россия, 119071 Москва, Ленинский проспект, 33

^{@E-mail:} olga.chernova.moscow@gmail.com

Поступила в редакцию 16.08.2023 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 06.02.2024 г.

Впервые описана микроструктура бугорчатых дорсальных чешуй и брюшных щитков туловища у разновозрастных особей скальных ящериц (*Darevskia raddei*, *D. nairensis*, *D. valentini*, *D. dahli*, *D. armeniaca*). Толщина кожи у наиболее ксерофильного вида (*D. raddei*) меньше таковой у гигрофильных видов. На чешуе скальных ящериц имеются единичные или парные продольные незамкнутые сбоку кожные складки, которые тянутся по внутренней стороне чешуи до ее дистального края. Мелкие складки присутствуют и в выстилке межчешуйного кармана. Они состоят из кожи и подкожной клетчатки. Крупная складка способна полностью перегораживать полость межчешуйного кармана, объем которого может изменяться при сокращении пучков подкожной мускулатуры, достигающих оснований чешуй. На чешуях бугорчатой кожи мелкие складки также присутствуют. У мезофильных ящериц (*Zootoca vivipara*) сходные образования возникают на более поздних стадиях постнатального онтогенеза, чем у скальных ящериц. Обсуждается вероятное функциональное значение описанных кожных структур.

Ключевые слова: скальные ящерицы, чешуя, гистология, межвидовые различия, адаптация

DOI: 10.31857/S1026347024040049, **EDN:** VHYVAS

Скальные ящерицы относятся к семейству настоящих ящериц (Lacertidae) и обитают на территории Кавказа, Ирана и Турции в биотопах с многочисленными выходами горных пород. Этот род разделен на семь надвидовых комплексов (*raddei*, *rudis*, *saxicola*, *caucasica*, *chlorogaster*, *defilippii* и *steineri*) (Arribas, 1999; Ahmadzadeh *et al.*, 2013) и включает 34 вида, среди которых семь размножаются партеногенетически (Ahmadzadeh *et al.*, 2013). Последние возникли в результате гибридизации обоеполых видов (Даревский, 1967; Даревский и др., 2000; Николаев и др., 2021). Это небольшие ящерицы с длиной тела 50–85 мм и с примерно в два раза более длинным хвостом. Тело обычно уплощенное, голова заостренной формы и у большинства видов сплюснута в вертикальной плоскости, что позволяет ящерицам прятаться в узких щелях между камнями и в скалах (рис. 1а). У скальных ящериц сравнительно длинные конечности с пальцами, снабженными острыми когтями. Пальцы покрыты крупными незначительно перекрывающимися щитками. Эти ящерицы могут легко и быстро передвигаться по отвесным скальным поверхностям (Даревский, 1967). Фолидоз изученных ящериц типичный: неперекрывающиеся мелкие

чешуи-бугорки покрывают дорсальную поверхность тела, а крупные щитки, перекрывающиеся в разной степени, присутствуют на брюшке.

Влажность считается одним из важных факторов, определяющих возможности существования скальных ящериц. Сезонные миграции этих рептилий связаны с изменениями режима влажности, а при недостатке влаги в летние месяцы у скальных ящериц отмечена эстивация (летняя спячка) (Даревский, 1967). Биофизические модели, описывающие воздействие микроклимата на ключевые аспекты жизнедеятельности эктотермных организмов, позволяют предполагать, что у ящериц, обитающих в умеренных климатических зонах, с повышением температуры именно проблема поддержания водного баланса может стать основным фактором, ограничивающим их жизнедеятельность и распространение (Mi *et al.*, 2022). Соответственно, у таких видов, к которым допустимо отнести всю группу скальных ящериц, помимо летней спячки можно ожидать наличия более специализированных морфофункциональных адаптаций к продолжительному, хотя и временному, дефициту влаги. Приспособления к такому дефициту можно разделить на две категории: (1) предотвращение потерь воды

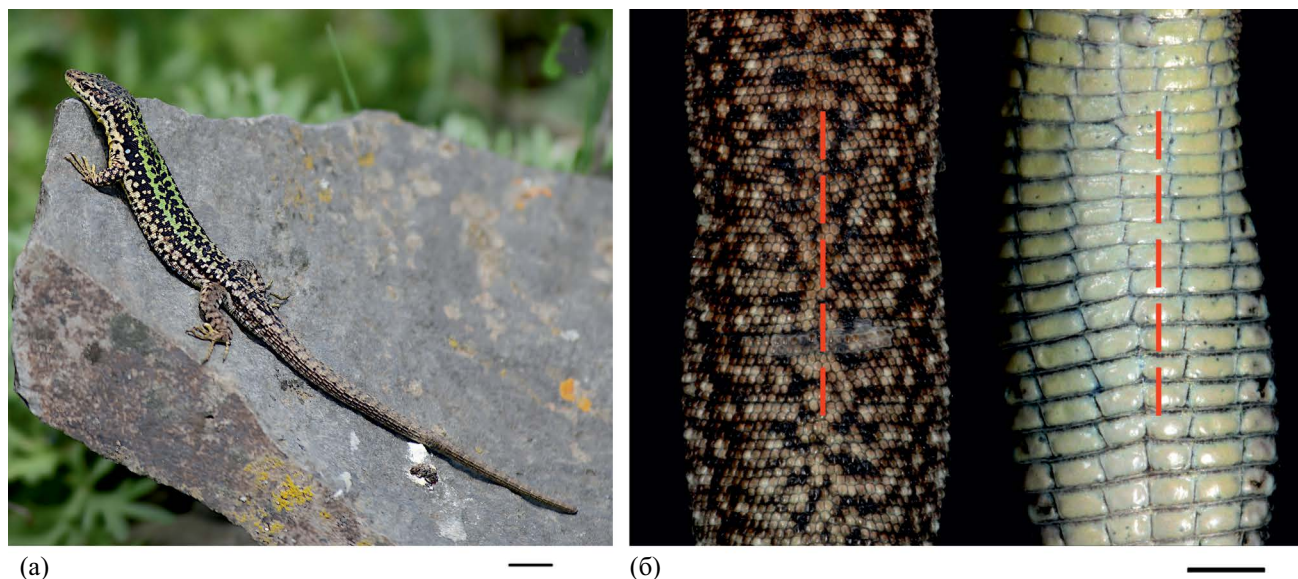


Рис. 1. Взрослая особь *Darevskia valentini* в естественной среде обитания (а) и внешний вид кожного покрова ювенильной особи *D. valentini* (б), слева — дорсальная сторона, справа — вентральная сторона, красной штриховой линией обозначены места взятия проб на гистологию (сагиттальные срезы). Масштаб 2 мм.

из организма и (2) способность использовать любые доступные источники влаги.

Роль барьера от потерь воды из организма могут выполнять кератинизированные и липидосодержащие слои эпидермиса рептилий (Landmann, 1986; Соколов и др., 1994, 1997; Alibardi, Thompson, 1999; Alibardi, 2002, 2003).

Немногочисленность отечественных исследований по микроанатомии кожного покрова Squamata является причиной неустоявшейся русскоязычной терминология, в связи с чем, мы приводим синонимы названий основных структур на английском языке и, при наличии, их латинских наименований. Основные особенности эпидермиса и его ороговевающих структур у представителей разных таксонов чешуйчатых рептилий хорошо изучены (Maderson, 1964, 1965, fig. 1, 1970, 1985; Flaxman, 1972; Landmann, 1986; Ananjeva *et al.*, 1991; Соколов и др., 1994, 1997; Alibardi, 1996, 1997, 2002, 2003, 2009, 2022; Chang *et al.*, 2009; Dhouailly, 2009; Ruthland *et al.*, 2019, fig. 1; Kandagel *et al.*, 2021; Akat *et al.*, 2022). Для эпидермиса взрослых особей Squamata характерна вертикальная анизоморфия. В период между линиями в эпидермисе формируется не менее шести разнородных клеточных популяций — производных физиологически активных клеток герминативного слоя (germinal layer, *stratum basale*, *stratum germinativum*), располагающихся на базальной мембране. Эти клеточные популяции могут быть однослойными или многослойными, однако в литературе они традиционно именуются как “cell layers” (Maderson, 1985). Поверхностный роговой слой (*stratum corneum*) объединяет “надкожицу” (“Oberhäutchen”, нем.),

нижележащий β -слой (β -layer), получивший название благодаря присутствию роговых белков класса CBPs (corneous β -proteins), промежуточный слой (mesos layer) и лежащий под ним “ α -слой” (α -layer) с присутствием α -кератиновых белков класса IFs (intermediate filaments). Принадлежность β - и α -типов белков к разным семействам (filament protein families) обоснована на уровне молекулярной биологии (Calvarezi *et al.*, 2016; Alibardi, 2016). β -слой развит только на внешней поверхности чешуи, но отсутствует на внутренней поверхности и в межчешуйных участках кожи, в то время как надкожица покрывает всю поверхность кожи Squamata (Maderson, Licht, 1967; Carver, Sawyer, 1987; Swadźba, Rupik, 2010). Надкожица и β -слой в зрелом состоянии не отделимы друг от друга и, если отслаиваются, то вместе. Артефактическое (по видимому результату) расщепление β - и α -слоев в виде целого пласта происходит по механически слабому промежуточному слою (Irish *et al.*, 1988). Под α -слоем обычно залегает двух- или многорядный “лакунарный слой” (lacunar layer, lacunar tissue), а еще глубже — “светлый слой” (clear or granulated layer).

Дерма (*dermis*, *corium*) выполняет поддерживающую эпидермис функцию, дифференцируется на верхнюю рыхлую (*stratum spongiosum*) и нижнюю плотную (*stratum compactum*), состоит из пучков коллагеновых волокон, ориентация и толщина которых зависят от ее расположения на теле. В нижней дерме волокна идут в продольном и вертикальном направлениях, а в верхней они проходят в различных направлениях. Слои переходят друг в друга без резких границ. В плотной дерме присутствуют

многочисленные кровеносные сосуды, нервы, меланофоры, механорецепторы и остеодермы (osteoderms). Рыхлая дерма содержит хроматофоры, которые подразделяются на несколько типов в зависимости от структуры и пигмента — меланофоров, ксантофоров и иридофоров (Maderon, 1964; Alibardi, 2003; Chang *et al.*, 2009; Rutland *et al.*, 2019).

В подкожной клетчатке (subcutis, *hypoderm*, *hypodermis*) располагаются фибробласты, жировые клетки и макрофаги. У Squamata крупные жировые отложения в этом слое отсутствуют, за редким исключением (Rutland *et al.*, 2019).

В этом аспекте изучены некоторые представители семейства Lacertidae: *Lacerta muralis* (наст. *Podarcis muralis Laurenti 1768*) (Breyer, 1929), *Lacerta sicula* (наст. *Podarcis siculus Rafinesque 1810*) и *Eremias guttulata* (наст. *Mesalina guttulata Lichtenstein 1823*) (Landmann, 1975). У всех Squamata микроанатомическое строение эпидермиса в целом сходно, но отдельные его слои могут отличаться по толщине у разных таксонов, что не всегда можно связать с экологическими особенностями видов. Структурные компоненты дермы, такие как мышечные волокна, сосуды и нервы, а также структуры подкожной клетчатки изучены слабее, и различия между видами не вполне оценены.

Считается, что барьер от потерь влаги через кожные покровы рептилий обеспечивают упомянутые выше промежуточный слой и α -слой, в которых отмечается повышенное содержание липидов, находящихся либо во внутриклеточных гранулах, либо образующих свободные липидные пласты, как в промежуточном слое (Maderon, 1985; Landmann, 1986; Alibardi, Toni, 2006). Степень кератинизации эпидермиса влияет на его водонепроницаемость существенно меньше, чем липиды (Roberts, Lillywhite, 1980). Тем не менее, нельзя исключить вероятность того, что сильно ороговевшие слои эпидермиса (надкожица и β -слой), механически защищая его более глубокие слои, также могут создавать определенное препятствие для транспирации влаги через покровы (Rutland *et al.*, 2019).

Известно, что структура чешуйчатой кожи некоторых ящериц из засушливых местообитаний может способствовать пассивному захвату и сохранению воды в случае кратковременного доступа к ее источникам (Sherbrooke *et al.*, 2007; Comans *et al.*, 2015, 2016). Считается, что в “захвате” воды определенную роль играет так называемый “шарнирный эпидермис” (“scale hinges”, “петлистый эпидермис”, “эпидермальные петли”), который присутствует в области межчешуйного кармана (hinge region). По всей видимости, шарнирный эпидермис широко распространен у Squamata и детально описан у целого ряда видов этого отряда рептилий (Гражданкин, 1974; Mittal, Singh, 1987; Mohammed, 1987; Kandagel *et al.*, 2021). В тонком сильно складчатом шарнирном эпидермисе часто отсутствует β -слой,

однако светлый и промежуточный слои хорошо различимы. Надкожица истонченная и часто отслаивается.

К особенностям шарнирного эпидермиса, позволяющим использовать его для захвата и транспорта влаги, относят своеобразные полужамкнутые складки — извитые щелевые структуры, так называемые “островки” (“island structures” по: Sherbrooke *et al.*, 2007), которые участвуют в быстром распространении воды вдоль поверхности кожи посредством капиллярных сил (Sherbrooke *et al.*, 2007; Yenmiş *et al.*, 2016). Наличие выраженных складок такого типа у видов, регулярно сталкивающихся с недостатком влаги, может свидетельствовать о существовании капиллярного транспорта воды поверхности кожи у этих рептилий.

В настоящее время детали морфологической организации эпидермиса скальных ящериц и в целом кожного покрова этих рептилий не известны. Соответственно, не ясно, как и в какой степени кожный покров скальных ящериц способен выполнять роль барьера от потерь воды организмом. Имеющиеся в научной литературе описания структуры чешуйчатого покрова у представителей данной группы предприняты, в первую очередь, для уточнения систематики и филогенетических отношений рода *Darevskia* (Даревский, 1967; Gabelaia *et al.*, 2017; Galoyan *et al.*, 2020) и не позволяют обоснованно судить об адаптивных особенностях кожи этих ящериц.

В настоящей работе приводится морфологическое описание кожного покрова скальных ящериц, изученное с использованием стандартных гистологических методов с главной целью — проверить, обладает ли их чешуйчатый покров особенностями, которые можно рассматривать как приспособления (в первую очередь, морфологические) к сохранению влаги в организме или к ее захвату из окружающей среды. Свидетельствами наличия таких приспособлений у более ксерофильных видов могут считаться: (1) увеличение толщины кожи (как абсолютной, так и относительно размеров тела); (2) суммарное увеличение толщины эпидермиса с надкожицей относительно общей толщины кожи; (3) вероятное повышенное содержание липидов в эпидермальных слоях; (4) наличие структурных особенностей в организации чешуйчатого покрова (шарнирного эпидермиса), аналогичных тем, что используются другими представителями Squamata для захвата и транспорта воды на поверхности тела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были исследованы образцы кожного покрова пяти видов скальных ящериц: армянской ящерицы *D. armeniaca* Mahely 1909, ящерицы

Даля *D. dahli* Darevsky 1957, нарийской ящерицы *D. nairensis* Darevsky 1967, азербайджанской ящерицы или ящерицы Радде *D. raddei* Boettger 1892 и ящерицы Валентина *D. valentini* Boettger 1892. Эти виды встречаются в биотопах с разным режимом влажности. Наиболее ксерофильным из указанных видов считается *D. raddei* (в период активности животных в природе ежемесячно выпадает в среднем 22 мм осадков, см. Дополнительные материалы на сайте ИПЭЭ РАН: https://sev-in.ru/sites/default/files/2023-08/Supplementary_to_Skin_morphology_of_rock_lizards.pdf). Кроме того, для сравнения был исследован филогенетически близкий скальным ящерицам вид, но обитающий в биотопах, в которых проблема доступа к воде менее актуальна – живородящая ящерица (*Zootoca* [= *Lacerta*] *vivipara* Lichtenstein 1823). Среднемесячное количество осадков в период активности живородящих ящериц, в тех регионах, где были отловлены исследованные особи, составляет примерно 70 мм.

Для гистологического исследования были взяты образцы кожи с дорсальной и вентральной поверхностей туловища у трех ювенильных особей *D. valentini* (рис. 16), взрослых особей *D. armeniaca*, *D. dahli*, *D. nairensis*, *D. raddei*, содержащихся в террариуме Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН). Аналогичные участки кожи изучили у ювенильной особи *Z. vivipara*, отловленной 07.08.2022 г. в Одинцовском р-не Московской области, и у двух взрослых особей этого же вида, полученных из спиртовой коллекции Научно-исследовательского зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (табл. 1). Все изученные особи были без признаков линьки, их эпидермис находился на стадии покоя.

Отбор проб кожи у живых ящериц выполнен в соответствии с правилами проведения научных

исследований с использованием экспериментальных животных, одобренными комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН.

Образцы кожи фиксировали в 4% стабилизированном формальдегиде в фосфатном буфере, заливали в парафин, получали срезы толщиной 10–15 мкм, окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином (Соколов и др., 1988) с использованием полуавтоматического специализированного гистологического оборудования ТРС-15, заливочной станции TES-99, микротомы Medite M530 (Medite, Германия). Замороженные срезы толщиной 5–7 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1900, окрашивали Суданом III и гематоксилином Эрлиха. Препараты фотографировали и изучали при помощи цифрового флуоресцентного микроскопа Keyence Biorevo BZ-9000 (Keyence Corporation, США). Кадрирование, яркость и контраст микрофотографий редактировали в программе “Adobe Photoshop Element 11” (США).

Полученные изображения микроструктуры кожи анализировали в программах “ATLAS” (Tescan, Чехия) и “ImageJ” (Abramoff *et al.*, 2004). Описательная статистика морфометрических данных сформирована с помощью программы “STATISTICA 10” (StatSoft, США). Измеряли абсолютную толщину слоев кожи и ее структур, а также вычисляли относительную толщину слоев кожи при нормировании по длине тела.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий план строения кожи скальных ящериц

Покровы спины и брюшка имеют обычное для ящериц строение без заметных признаков линьки, их эпидермис находится на стадии покоя

Таблица 1. Перечень изученного материала

№	Вид, пол, возраст	Масса, г	Длина, мм		Коллекционный номер, хранилище
			тела (SVL)	хвоста	
1	<i>Darevskia armeniaca</i> , партеносамка, <i>ad.</i> , 6 мес.	1.28	34	64	1050, ИПЭЭ РАН
2	<i>D. dahli</i> , партеносамка, <i>ad.</i> , 8.5 мес.	1.10	36	67	1045, ИПЭЭ РАН
3	<i>D. nairensis</i> , пол не определен, <i>ad.</i> , 9 мес.	≈1.2	56	99	1213+4, ИПЭЭ РАН
4	<i>D. raddei</i> , пол не определен, <i>ad.</i> , 9 мес.	3.86	57	89	1253+401, ИПЭЭ РАН
5	<i>D. valentini</i> , пол не определен, <i>juv.</i> , 4–5 дн.	≈0.4	24	43	ИПЭЭ РАН
6	<i>D. valentini</i> , пол не определен, <i>juv.</i> , 4–5 дн.	≈0.4	24	43	ИПЭЭ РАН
7	<i>D. valentini</i> , пол не определен, <i>juv.</i> , 4–5 дн.	≈0.4	24	43	ИПЭЭ РАН
8	<i>Zootoca (Lacerta) vivipara</i> , пол не определен, <i>juv.</i> , ≈ 3 нед.	0.52	29	38	Звенигородская биостанция МГУ
9	<i>Z. vivipara</i> , <i>самец</i> , <i>ad.</i>	—	46	64	ID 1066, Зоомузей МГУ
10	<i>Z. vivipara</i> , <i>самка</i> , <i>ad.</i>	—	61	58	ID 12103, Зоомузей МГУ

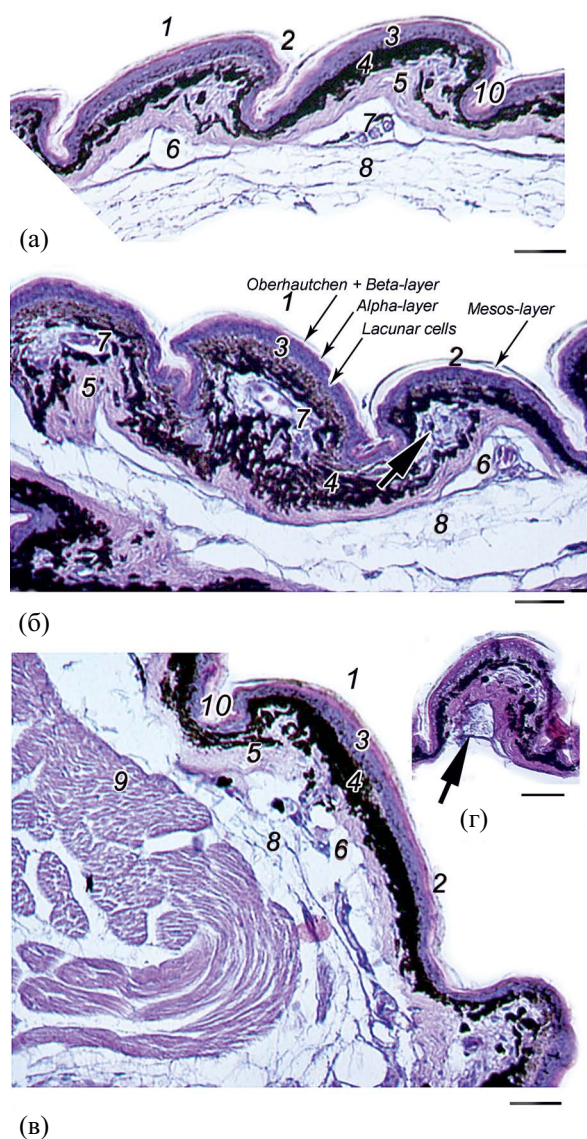


Рис. 2. Микроструктура бугорчатых дорсальных чешуй у взрослых особей *Darevskia armeniaca* (а), *D. nairensis* (б) и *D. dahli* (в) на сагитальных срезах: 1 – чешуйка, 2 – Oberhäutchen – надкожица и β-слой, 3 – эпидермис, 4 – слой меланофоров, 5 – дерма, 6 – лакуна подкожной клетчатки, 7 – кровеносный сосуд с эритроцитами, 8 – подкожная клетчатка, 9 – поперечнополосатая мускулатура, 10 – полость межчешуйного кармана. Стрелками обозначены остеодермы. Здесь и на рисунках 3–6 срез кожи на стадии покоя эпидермиса. Окраска гематокисин-эозином. Микрофото. Масштаб 20 мкм.

(рис. 2, 3, 4, 5). Надкожица и β-слой хорошо различимы и во многих местах отслаиваются вместе как во время препарирования, так и при изготовлении гистологических препаратов (рис. 2, 3, 4, 5, 2). Они вместе легко отходят с брюшного щитка в виде цельного прозрачного пласта,

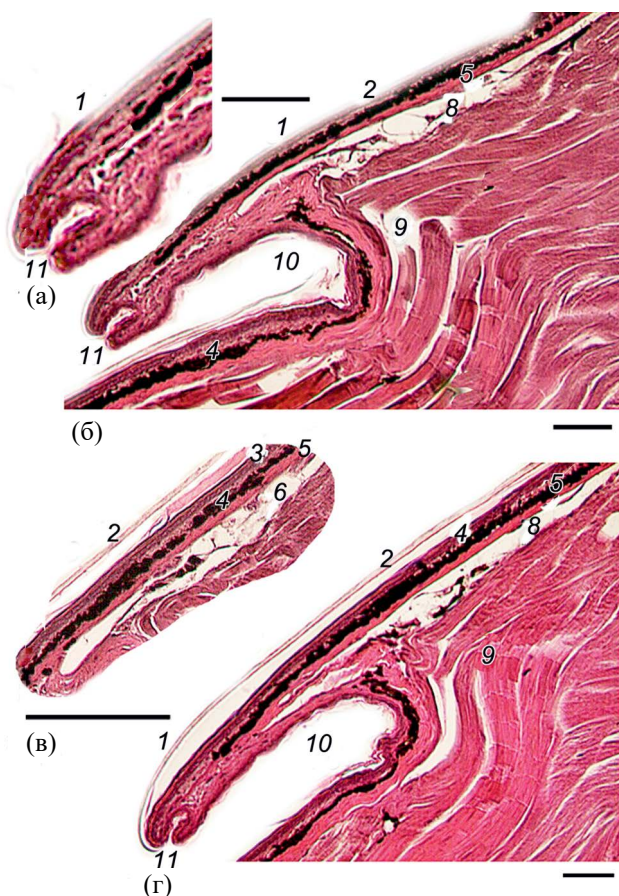


Рис. 3. Микроструктура брюшных щитков взрослой особи *Darevskia dahli* на сагитальных срезах. Продольная кожная складка на вентральной поверхности чешуи, образующая незамкнутую трубку (а). Общий вид (б, г). Лакуны подкожной клетчатки, залегающие под дермальным слоем (в). Обозначения как на рис. 2, 11 – открытая полость трубчатой складки. Окраска гематокисин-эозином. Микрофото. Масштаб 20 мкм.

имеющего форму параллелепипеда. Эпидермис и сплошной слой меланофоров в верхней части дермы хорошо дифференцируются (рис. 2, 3, 4, 5, 3, 4). В световом просвечивающем микроскопе в эпидермисе всех исследованных видов различимы слабо эозинофильные надкожица и трехрядный β-слой, присутствующие на всех изученных участках кожи. В зрелом состоянии β-слой гомогенный и хромофобный (практически не поддается окраске красителями).

На стадии покоя эпидермиса в межчешуйных карманах надкожица очень тонкая, хорошо различимы α-кератиновый слой, который имеет слоистую структуру и эозинофилен, слои презумптивных лакунарных клеток над герминативным слоем, а также заметно, что между надкожицей и α-слоем идет разрыв по механически непрочному и тонкому промежуточному слою.

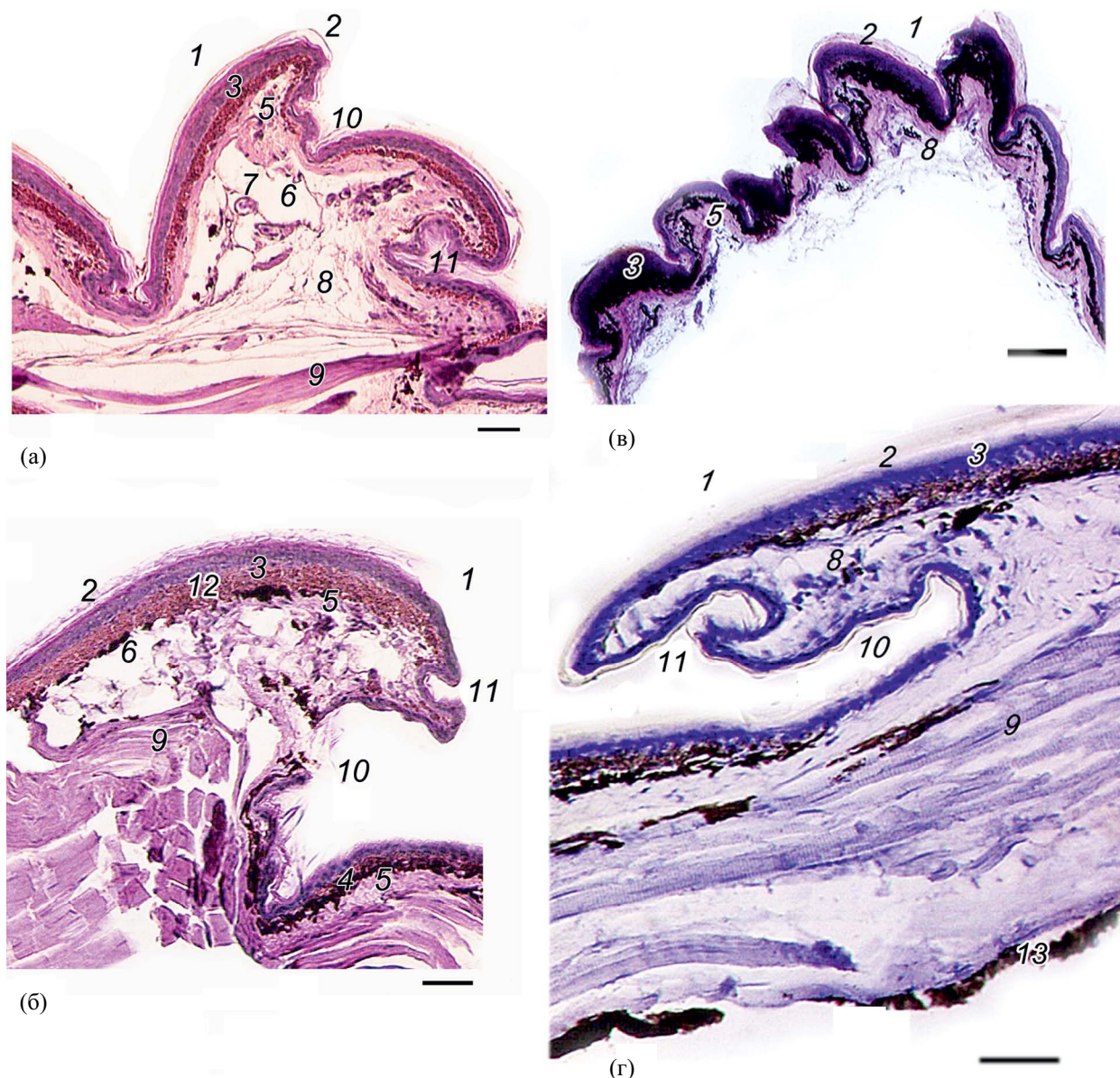


Рис. 4. Микроструктура бугорчатых дорсальных чешуй (в) и брюшных щитков (а, б, г) взрослых особей *Darevskia nairensis* (а, б) и *D. raddei* (в, г) на сагиттальных срезах. Обозначения как на рис. 2, 3, 12 – слой ксантофоров, 13 – пигментированная выстилка брюшной полости. Окраска гематоксилин-эозином + суданом Ш (липидные пласты не выявлены) (в, г). Микрофото. Масштаб 20 мкм.

Для более детального цитологического изучения кожи этих мелких тонкокожих ящериц необходимо применение электронной микроскопии, что мы планируем предпринять в будущем.

Дерма относительно тонкая (не превышает 4.5 мкм у самых мелких из исследованных скальных ящериц, ювенильных особей *D. valentini*, и 49.0 мкм у взрослой особи *D. nairensis*) (табл. 2, 3), разделяется на рыхлую и плотную, содержит тонкие слабо извитые пучки коллагеновых волокон, вытянутых параллельно поверхности кожи (рис. 2, 3, 4, 5, 5).

Подкожная клетчатка достаточно плотная или имеет многочисленные расширенные лакуны (рис. 2, 3, 4, 5, 6, 8). Среди этих лакун располагаются узкие или расширенные кровеносные сосуды, в которых видны овальные эритроциты с крупным округлым ядром (рис. 2, 4, 5, 7). В коже спины встречаются лишь отдельные группы лакун, в центре которых также проходят кровеносные капилляры небольшого диаметра. У взрослых скальных ящериц (*D. armeniaca*, *D. dahli*, *D. nairensis*, *D. raddei*) структурно оформленных

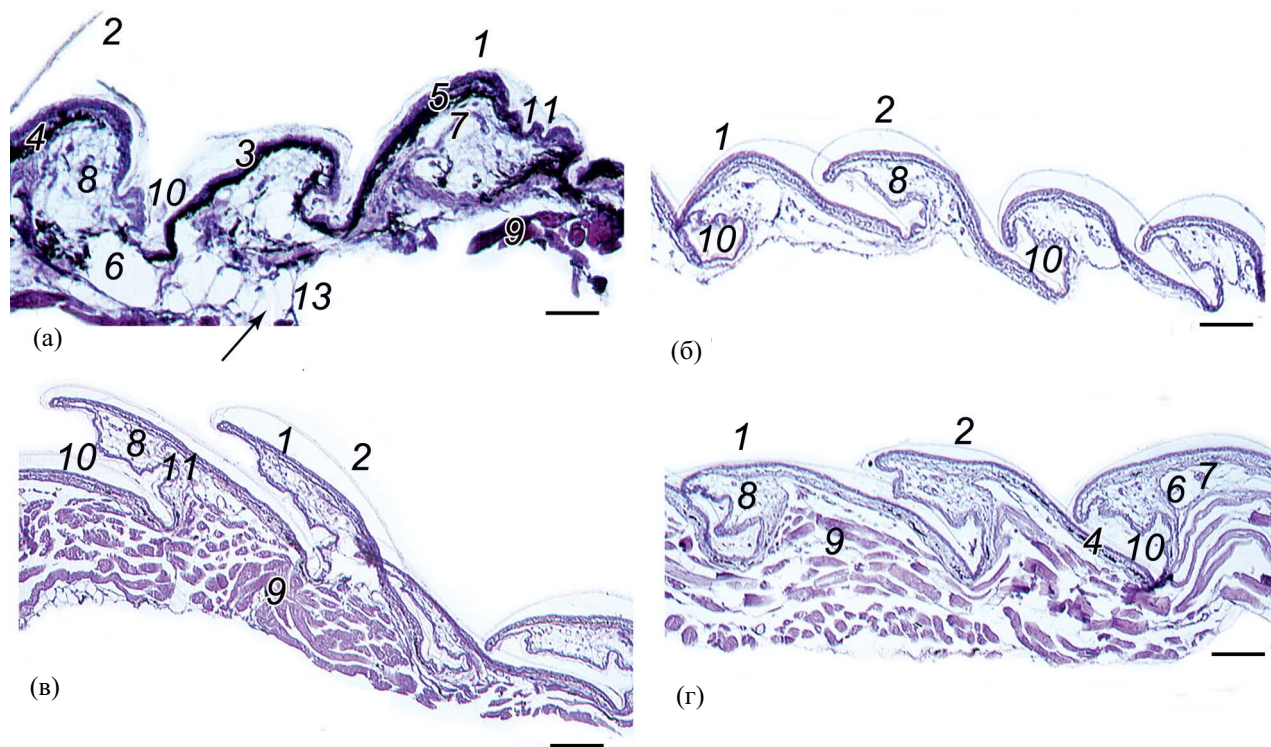


Рис. 5. Микроструктура бугорчатых дорсальных чешуй (а) и брюшных щитков (б, в, г) ювенильных особей *Darevskia valentini* на сагиттальных срезах: а, б — № 7, в — № 6, г — № 5. Обозначения как на рис. 2, 3, 4, 13 — жировая клетка с ядром (указана стрелкой). Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото. Масштаб 20 мкм.

жировых клеток с ядрами мы не обнаружили, а лакуны имеют вид разбухших овальных или полиморфных полостей. У одной из ювенильных особей *D. valentini* в коже спины, помимо лакун, встречаются крупные разбухшие цилиндрические жировые клетки с различимыми ядрами (рис. 5а, 13).

Общие липиды в виде свободных пластов в покровах скальных ящериц не выявлены при окраске Суданом III.

Сплошной толстый слой меланофоров имеется в верхних отделах дермы кожи спины (рис. 5а), а в коже брюшка присутствуют более светлые желтоватые ксантофоров, а меланофоров отсутствуют (рис. 5б, 5в) или редкие и не образуют сплошного слоя (рис. 5г).

У всех изученных особей снизу дерма подстилается мощным слоем поперечнополосатой мускулатуры (рис. 2, 3, 4, 5, 9), которая может глубоко заходить внутрь вентральных чешуй (рис. 3, 5г). У *D. nairensis* и *D. raddei* в коже спины присутствуют единичные остеодермы (рис. 2б, 2г, стрелки).

В табл. 2 приведены абсолютные значения промеров кожных структур на сагиттальных срезах спинных и брюшных чешуй. В табл. 3 указаны те же промеры, но нормированные по длине тела (табл. 3, SVL) ящериц.

Строение кожи *Zootoca vivipara*

У ювенильной особи *Z. vivipara* дорсальная кожа спины незначительно толще пластинчатой вентральной кожи, соответственно 22.4 ± 2.8 и 21.1 ± 1.2 мкм, что при нормировании по длине тела (табл. 2) равно 0.77 и 0.73 мкм/мм. Кожа спины имеет высокие чешуйки-бугорки; на брюхе чешуйки более уплощенные. Надкожица с β -слоем хорошо различима, толщиной 2.3–2.6 мкм (≈ 0.08 мкм/мм). Остальные структуры эпидермиса (промежуточный слой, α -слой, несколько рядов презумптивных лакунарных клеток и герминативный слой), дерма и слой меланофоров толще на спине, чем на брюхе; толщина эпидермиса на спине — 15.7 ± 1.8 (≈ 0.54 мкм/мм) против 11.5 ± 0.2 мкм (≈ 0.40 мкм/мм) на брюхе. Подкожная клетчатка развита сходно в обоих сравниваемых участках кожи.

У взрослых особей *Z. vivipara* микроструктура чешуек спины и брюшка вполне сходна с таковой у скальных ящериц (рис. 6). Толщина кожи спины составляет 74.5 ± 13.2 мкм (≈ 1.2 – 1.6 мкм/мм), толщина кожи на брюшке — 34.5 ± 12.8 мкм (≈ 0.6 – 0.8 мкм/мм при нормировании по длине тела). Надкожица вместе с β -слоем примерно вдвое толще (до 5.5 мкм), чем у ювенильных особей, но при нормировании по длине тела отличается не сильно (≈ 0.09 – 0.12 мкм/мм).

Таблица 2. Морфометрические показатели основных структур кожи изученных ящериц рода *Darevskia*

Вид	<i>D. armeniacae</i> , № 1			<i>D. dahlii</i> , № 2			<i>D. nairensis</i> , № 3			<i>D. raddei</i> , № 4			<i>D. valentini</i> , № 5, 6, 7		
	Параметр, М ± m*, n** = 5, мкм			Площадь***			Толщина			Пробы			Пробы		
Кожа Надкожица с β-слоем эпидермиса (без надкожицы и β-слоя) Дерма Подкожная клетчатка Слой меланофоров диаметр капилляров	Спина	Брюхо	Спина	Спина	Брюхо	Брюхо	Спина	Брюхо	Брюхо	Спина	Брюхо	Брюхо	Спина	Брюхо	Брюхо
	72.3 ± 3.1	33.4 ± 0.6	43.4 ± 3.4	14.3 ± 1.1	14.3 ± 1.1	23.3 ± 5.2	59.1 ± 6.9	23.3 ± 5.2	24.2 ± 1.3	21.2 ± 2.7	16.0 ± 2.7	27.1 ± 3.1	16.0 ± 2.7	27.1 ± 3.1	27.1 ± 3.1
	3.8 ± 0.8	5.1 ± 0.2	3.1 ± 1.1	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2	4.4 ± 1.2	2.8 ± 0.4	4.4 ± 1.2	2.6 ± 0.1	4.5 ± 0.9	2.5 ± 0.7	1.6 ± 0.2	2.5 ± 0.7	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2
	16.8 ± 1.7	11.3 ± 0.6	11.1 ± 1.5	6.5 ± 0.4	6.5 ± 0.4	8.5 ± 1.0	9.8 ± 0.6	8.5 ± 1.0	12.7 ± 1.1	7.0 ± 1.0	5.2 ± 1.0	1.8 ± 0.3	5.2 ± 1.0	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3
	18.3 ± 2.0	22.3 ± 0.7	8.2 ± 1.1	10.2 ± 2.6	10.2 ± 2.6	8.5 ± 0.8	35.2 ± 5.5	8.5 ± 0.8	12.1 ± 0.6	8.1 ± 0.3	6.0 ± 1.6	3.0 ± 0.8	6.0 ± 1.6	3.0 ± 0.8	3.0 ± 0.8
Лакун в подкожной клетчатке, lim, мкм ² Полости в кожной складке шарнирного эпидермиса, мкм ² Полости межчешуйного кармана, мкм ²	30.4 ± 5.2	23.4 ± 0.5	27.5 ± 4.8	8.7 ± 3.3	8.7 ± 3.3	11.3 ± 2.3	61.3 ± 18.4	11.3 ± 2.3	18.0 ± 0.3	11.2 ± 2.0	35.1 ± 5.2	15.5 ± 1.2	35.1 ± 5.2	15.5 ± 1.2	15.5 ± 1.2
	10.0 ± 2.0	5.5 ± 0.1	10.0 ± 1.3	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	6.1 ± 0.8	7.8 ± 0.6	6.1 ± 0.8	5.2 ± 1.2	6.2 ± 0.7	4.8 ± 0.9	1.3 ± 0.5	4.8 ± 0.9	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5
	3.7 ± 0.5	4.2 ± 0.1	9.2 ± 0.4	4.8 ± 0.8	4.8 ± 0.8	3.0 ± 0.3	7.1 ± 2.3	3.0 ± 0.3	7.7 ± 0.4	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2
	389.5 ± 512.7	23.0 ± 90.5	30.0 ± 90.5	42.8 ± 282.7	42.8 ± 282.7	251.6 ± 656.9	795.0 ± 2231.7	251.6 ± 656.9	33.5 ± 47.0	109.5 ± 139.6	148.7 ± 581.2	35.9 ± 192.1	148.7 ± 581.2	35.9 ± 192.1	35.9 ± 192.1
	—	54.5 ± 0.3	—	43.5 ± 0.2	43.5 ± 0.2	45.3 ± 0.5	—	45.3 ± 0.5	—	239.5 ± 0.3	60.5 ± 57.0	125.8 ± 65.1	60.5 ± 57.0	125.8 ± 65.1	125.8 ± 65.1
Полости межчешуйного кармана, мкм ²	276.5 ± 14.7	1978.5 ± 105.8	307.1 ± 125.2	2192.1 ± 103.5	2192.1 ± 103.5	1429.6 ± 748.2	392 ± 85.2	1429.6 ± 748.2	309.1 ± 100.0	1782.5 ± 1306.3	278.5 ± 57.0	657.1 ± 242.2	278.5 ± 57.0	657.1 ± 242.2	657.1 ± 242.2

Примечание. * Средняя арифметическая с ошибкой средней арифметической, ** число промеров для каждой особи, *** на сагиттальных срезах кожи, знак — обозначает отсутствие полости.

Таблица 3. Морфометрические показатели основных структур кожи ящериц рода *Darevskia*, приведенные к размеру тела

Вид	<i>D. armeniacae</i> , № 1			<i>D. dahlii</i> , № 2			<i>D. nairensis</i> , № 3			<i>D. raddei</i> , № 4			<i>D. valentini</i> , № 5, 6, 7		
	Параметр, М ± m*, n** = 5, мкм/мм			Площадь***			Толщина			Пробы			Пробы		
Кожа Надкожицы и β-слоя эпидермиса (без надкожицы и β-слоя) Дерма Подкожная клетчатка Слой меланофоров Диаметр капилляров	Спина	Брюхо	Спина	Спина	Брюхо	Брюхо	Спина	Брюхо	Брюхо	Спина	Брюхо	Брюхо	Спина	Брюхо	Брюхо
	2.13 ± 0.091	0.98 ± 0.018	1.21 ± 0.094	0.40 ± 0.031	0.40 ± 0.031	0.42 ± 0.093	1.06 ± 0.123	0.42 ± 0.093	0.42 ± 0.023	0.37 ± 0.047	0.67 ± 0.113	1.13 ± 0.129	0.67 ± 0.113	1.13 ± 0.129	1.13 ± 0.129
	0.11 ± 0.024	0.15 ± 0.006	0.09 ± 0.031	0.07 ± 0.006	0.07 ± 0.006	0.08 ± 0.021	0.05 ± 0.007	0.08 ± 0.021	0.05 ± 0.002	0.08 ± 0.016	0.10 ± 0.029	0.07 ± 0.008	0.10 ± 0.029	0.07 ± 0.008	0.07 ± 0.008
	0.49 ± 0.050	0.33 ± 0.018	0.31 ± 0.042	0.18 ± 0.011	0.18 ± 0.011	0.15 ± 0.018	0.18 ± 0.011	0.15 ± 0.018	0.22 ± 0.019	0.12 ± 0.018	0.22 ± 0.042	0.08 ± 0.013	0.22 ± 0.042	0.08 ± 0.013	0.08 ± 0.013
	0.54 ± 0.059	0.66 ± 0.021	0.23 ± 0.031	0.28 ± 0.072	0.28 ± 0.072	0.15 ± 0.014	0.63 ± 0.098	0.15 ± 0.014	0.21 ± 0.011	0.14 ± 0.005	0.25 ± 0.067	0.13 ± 0.033	0.25 ± 0.067	0.13 ± 0.033	0.13 ± 0.033
Лакун в подкожной клетчатке, lim, мкм ² /мм ² Полости в кожной складке шарнирного эпидермиса, мкм ² /мм ² Полости межчешуйного кармана, мкм ² /мм ²	0.89 ± 0.15	0.69 ± 0.015	0.76 ± 0.133	0.24 ± 0.092	0.24 ± 0.092	0.20 ± 0.041	1.09 ± 0.329	0.20 ± 0.041	0.32 ± 0.005	0.20 ± 0.035	1.46 ± 0.217	0.65 ± 0.050	1.46 ± 0.217	0.65 ± 0.050	0.65 ± 0.050
	0.89 ± 0.153	0.16 ± 0.003	0.28 ± 0.036	0.11 ± 0.008	0.11 ± 0.008	0.11 ± 0.014	0.14 ± 0.011	0.11 ± 0.014	0.09 ± 0.021	0.11 ± 0.012	0.20 ± 0.038	0.05 ± 0.021	0.20 ± 0.038	0.05 ± 0.021	0.05 ± 0.021
	0.11 ± 0.015	0.12 ± 0.003	0.26 ± 0.011	0.13 ± 0.022	0.13 ± 0.022	0.05 ± 0.005	0.13 ± 0.041	0.05 ± 0.005	0.14 ± 0.007	0.05 ± 0.002	0.10 ± 0.021	0.08 ± 0.008	0.10 ± 0.021	0.08 ± 0.008	0.08 ± 0.008
	0.337 ± 0.444	0.0199 ± 0.0783	0.0231 ± 0.0698	0.0330 ± 0.218	0.0330 ± 0.218	0.0802 ± 0.2095	0.253 ± 0.712	0.0802 ± 0.2095	0.0103 ± 0.0145	0.0337 ± 0.0430	0.258 ± 1.009	0.062 ± 0.333	0.258 ± 1.009	0.062 ± 0.333	0.062 ± 0.333
	—	0.0471 ± 0.0003	—	0.0336 ± 0.0002	0.0336 ± 0.0002	0.0144 ± 0.0002	—	0.0144 ± 0.0002	—	0.0737 ± 0.0001	0.105 ± 0.099	0.218 ± 0.113	0.105 ± 0.099	0.218 ± 0.113	0.218 ± 0.113
Полости межчешуйного кармана, мкм ² /мм ²	0.239 ± 0.013	1.712 ± 0.092	0.237 ± 0.097	1.691 ± 0.080	1.691 ± 0.080	0.456 ± 0.239	0.125 ± 0.027	0.456 ± 0.239	0.0951 ± 0.0307	0.549 ± 0.402	0.483 ± 0.099	1.141 ± 0.420	0.483 ± 0.099	1.141 ± 0.420	1.141 ± 0.420

Примечание. Линейные размеры кожных структур отнесены к длине тела (SVL, см. табл. 1); площади — к квадрату длины тела.

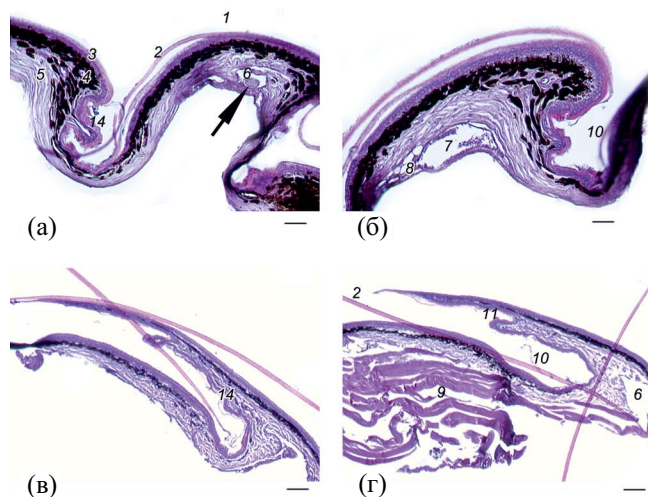


Рис. 6. Микроструктура бугорчатых дорсальных чешуй (а, б) и брюшных щитков (в, г) туловища у взрослой самки *Zootoca vivipara* на сагиттальных срезах. Обозначения как на рис. 2–5, 14 – кожная складка. Стрелкой указана остеодерма. Окраска гематоксин-эозином. Микрофото. Масштаб 20 мкм.

против 0.08 мкм/мм у ювенильной особи (см. выше). Эпидермис также толще на спине (13.6 ± 12.8 мкм или 0.2–0.3 мкм/мм), чем на брюшке (5.7 ± 1.3 мкм или 0.09–0.12 мкм/мм); т.е. толщина эпидермиса взрослых относительно размеров их тела оказалась примерно в два раза меньше, чем у ювенильной особи. В коже спины крупные пигментные кластеры разрежены, образуют рыхлый слой толщиной 13.9 ± 3.6 мкм (≈ 0.2 –0.3 мкм/мм), который гораздо толще, чем на брюшке (5.5 ± 0.2 мкм; ≈ 0.1 мкм/мм). Дермальный слой плотный, толще на спине (50.2 ± 13.2 мкм или примерно 0.8–1.1 мкм/мм при нормировании по длине тела), чем на брюшке (13.3 ± 0.4 мкм или примерно 0.2–0.3 мкм/мм). Присутствуют редкие остеодермы (рис. 6а, стрелка). Подкожная клетчатка на пробах не сохранилась, хотя ниже дермального слоя встречаются редкие и мелкие кластеры жировых клеток и отдельные расширенные лакуны.

Особенности строения кожи межчешуйного кармана

Кожа межчешуйного кармана отличается от кожи наружной поверхности чешуи. У изученных нами скальных ящериц (особенно у ювенильных особей *D. valentini*) и у взрослых особей *Z. vivipara* в межчешуйных карманах дорсальной кожи присутствуют единичные складки и дивертикулы кожной выстилки внутренней поверхности чешуи и образуемые ими полости (рис. 2, 5а, 5б), а также небольшая или крупная полость самого чешуйного кармана (рис. 2, 5, 10).

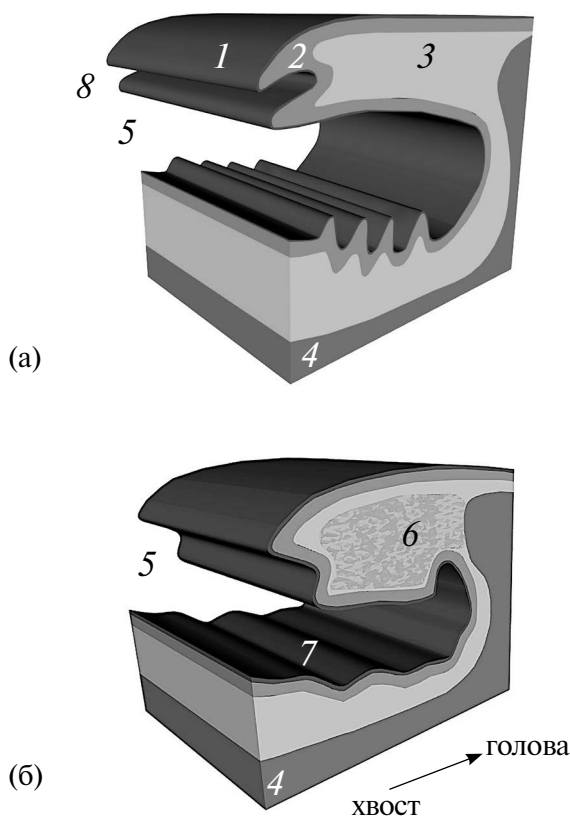


Рис. 7. Схема строения щитков вентральной чешуи взрослых (а) и ювенильных (б) ящериц рода *Darevskia*: 1 – надкожица (Oberhäutchen), 2 – нижележащие слои эпидермиса и дерма, 3 – подкожная клетчатка с пучками мышечных волокон, 4 – подкожная мускулатура, 5 – полость межчешуйного кармана, 6 – соединительно-тканый клапан, способный запереть полость межчешуйного кармана, 7 – кожные складки донной части межчешуйного кармана, 8 – кожный дивертикул каудального края щитка.

В вентральной коже эти дивертикулы выглядят по-иному. Схема строения вентральных щитков скальных ящериц представлена на рис. 7. У всех взрослых особей по внутренней поверхности чешуйной пластины вблизи ее наружного края тянется продольная кожная складка (из эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки), образующая незамкнутый сбоку канал (рис. 3, 4, 11, рис. 7, 8).

Крупная полость чешуйного кармана имеет хорошо выраженные рельефные кожные складки. У ювенильных особей *D. valentini* складчатость кожи межчешуйного кармана и внутренней поверхности чешуи также присутствует (рис. 5б–г, 8б), а образуемые ими полости, как и полость самого межчешуйного кармана имеют значительный объем, судя по его площади на сагиттальном срезе (табл. 2, 3). Причем, по середине внутренней поверхности

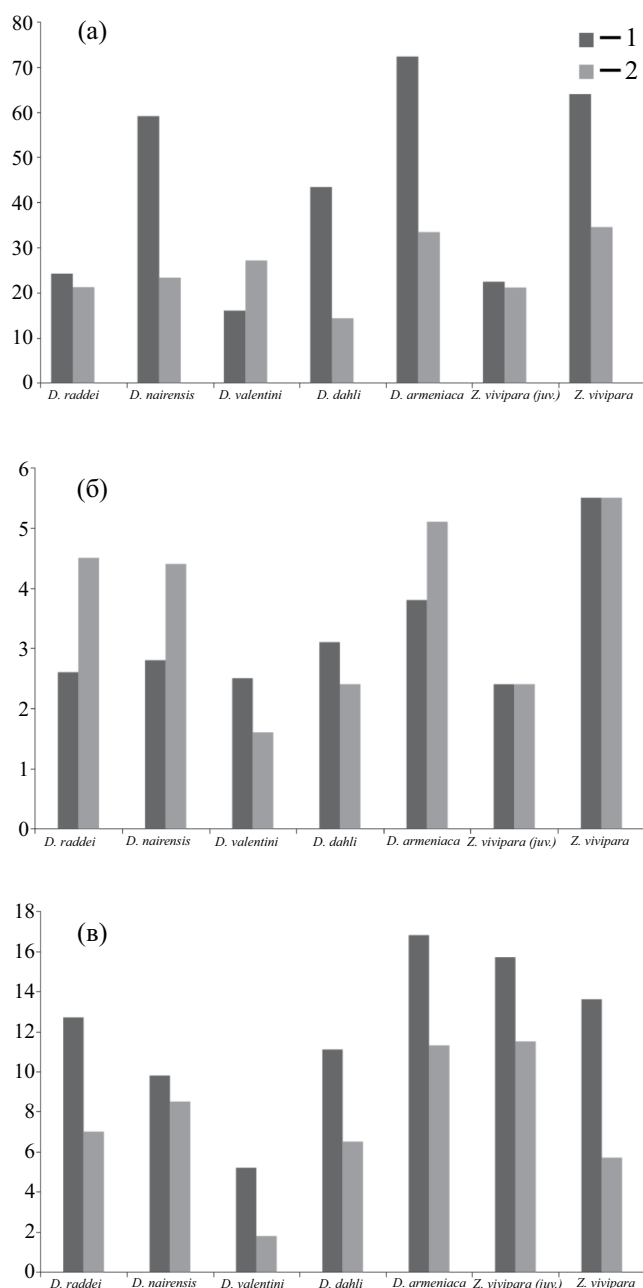


Рис. 8. Абсолютная толщина кожи и различных ее слоев (мкм) на дорсальной (1) и вентральной (2) частях тела исследованных ящериц. Толщина кожи без надкожицы с β -слоем (а) (здесь приведены данные по толщине кожи у обоих экземпляров *Zootoca vivipara*), толщина надкожицы с β -слоем (б), и эпидермиса (в).

чешуи проходит толстая и широкая продольная кожная складка, образованная в основном сильно васкуляризованной соединительной тканью (рис. 5б–г, 8, рис. 7б, 6).

У ювенильной особи *Z. vivipara* межчешуйные карманы, кожные дивертикулы и складки в них

не развиты, т.е. складчатость и дивертикулы кожи еще не сформированы у трехнедельной особи *Z. vivipara* по сравнению даже с четырех–пятидневными особями *D. valentini*.

Таким образом, у пяти изученных видов рода *Darevskia* и *Z. vivipara* в межчешуйных карманах развивается кожная складчатость, особенно сильно выраженная в пластинчатой коже брюха. На вентральной стороне тела взрослых особей представителей рода *Darevskia* трубчатая кожная складка-дивертикул тянется по внутренней стороне чешуи вблизи от ее проксимального края и образована всеми слоями кожи и подкожной клетчаткой (рис. 7а). К ее дистальному участку примыкают лакуны соединительной ткани (в которых не обнаружены жировые клетки и стандартными гистологическими методами не идентифицированы липидные вещества). Складка-дивертикул ограничивает глубокие отделы чешуйного кармана, которые сами превращаются в трубчатое образование, тянущееся по внутренней поверхности чешуи. Резервуар такой трубки небольшой по сравнению с широкой полостью всего межчешуйного кармана.

Все слои кожи в межчешуйном кармане нормально сформированы, за исключением β -слоя, который не развит. Его стенки – гладкие или имеют незначительно выраженные кожные утолщения, иногда формирующие мелкие дивертикулы, однако, структур, сколько-нибудь напоминающих извитые щелевые образования, характерные для межчешуйных карманов ящериц, способных захватывать и транспортировать воду на поверхности тела (Sherbrooke *et al.*, 2007), мы не обнаружили.

У взрослых особей *Darevskia* имеется мощная поперечнополосатая подкожная мускулатура, подстилающая чешую (рис. 3б, г, 4б, г, 9), причем на вентральной стороне туловища пучки этой мускулатуры заходят в тело чешуи (рис. 3б, г, рис. 7а, 4).

У ювенильных особей (*D. valentini*) складчатость кожи, выстилающей стенки чешуйного кармана, также хорошо выражена. У них в пластинчатой коже брюха внутренняя поверхность чешуи, помимо дивертикулов имеет широкую и толстую соединительнотканную складку (трапециевидную на сагитальном срезе, рис. 5б–г, 5, 8, рис. 7б, 6), к которой подходит хорошо развитая (как и у взрослых особей) подкожная поперечнополосатая мускулатура, заходящая внутрь чешуи (рис. 5в, г, 9, рис. 7б, 4).

У ювенильных особей *Z. vivipara* складчатость внутри межчешуйного кармана не выражена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Описанные нами особенности строения кожи скальных ящериц не позволяют однозначно судить о выраженных и устойчивых адаптациях кожного чешуйчатого покрова этих рептилий к дефициту влаги.

Кожные липиды

Сколько-нибудь заметного содержания липидов в коже у скальных ящериц, наличие которых могло бы снижать проницаемость кожи для воды, с помощью наших методов обнаружить не удалось. Только у четырехдневных особей *D. valentini* идентифицированы единичные жировые клетки, имеющие ядро; по-видимому, “живые” (метаболически активные) жировые клетки дегенерируют по мере взросления особи, перерождаясь в лакуны. У живородящих ящериц лакуны развиты существенно хуже, чем у скальных, но функциональная роль данных лакун у скальных ящериц нам пока не ясна.

Толщина кожи и эпидермиса

Данные о толщине кожи и отдельных ее слоев у представителей р. *Darevskia*, приведенные в табл. 2 и 3, вместе с данными по кожному покрову *Z. vivipara* не подтверждают наше предположение об утолщении кожи и эпидермиса у более ксерофильных видов. Это предположение было сделано на том основании, что транспорт влаги через кожные слои должен физически зависеть от их толщины (Landmann, 1986; Lillywhite, 2004, 2006). На рис. 8 представлены абсолютные значения толщины кожи, надкожицы и эпидермиса у изученных ящериц (рис. 8а, б, в). Эти параметры у самого ксерофильного вида, *D. raddei*, в целом не больше, чем у остальных ящериц несмотря на то, что особь *D. raddei* была наиболее крупной из исследованных (табл. 1). Небольшая выборка животных, имевшаяся в нашем распоряжении, не позволяет дать строгую статистическую оценку связи между влажностью местообитаний и толщиной покровов исследованных видов. Тем не менее, представленные на рис. 8 графики противоречат исходным предположениям и показывают тенденцию к увеличению толщины кожи и ее слоев скорее у более гигрофильных, нежели ксерофильных видов. Нормирование толщины кожи и ее компонентов по длине тела (которое в определенной степени нивелирует влияние общих размеров тела животных на размеры структур их кожи) подчеркивает эту тенденцию, особенно в отношении толщины кожных слоев на спине (рис. 9а, б, в). Значения толщины эпидермиса и надкожицы на спине и брюхе, отнесенные к толщине всей кожи на этих участках тела (рис. 10), также не позволяют сделать однозначный вывод о связи между развитием слоев эпидермиса и влажностью местообитания исследованных скальных ящериц. Показательно, что у представителей *Z. vivipara* — вида, не испытывающего проблем с доступностью воды в период активности (<https://sev-in.ru/...>) — кожа, эпидермис и надкожица оказались примерно такой же толщины, что и у наиболее ксерофильного вида скальных ящериц

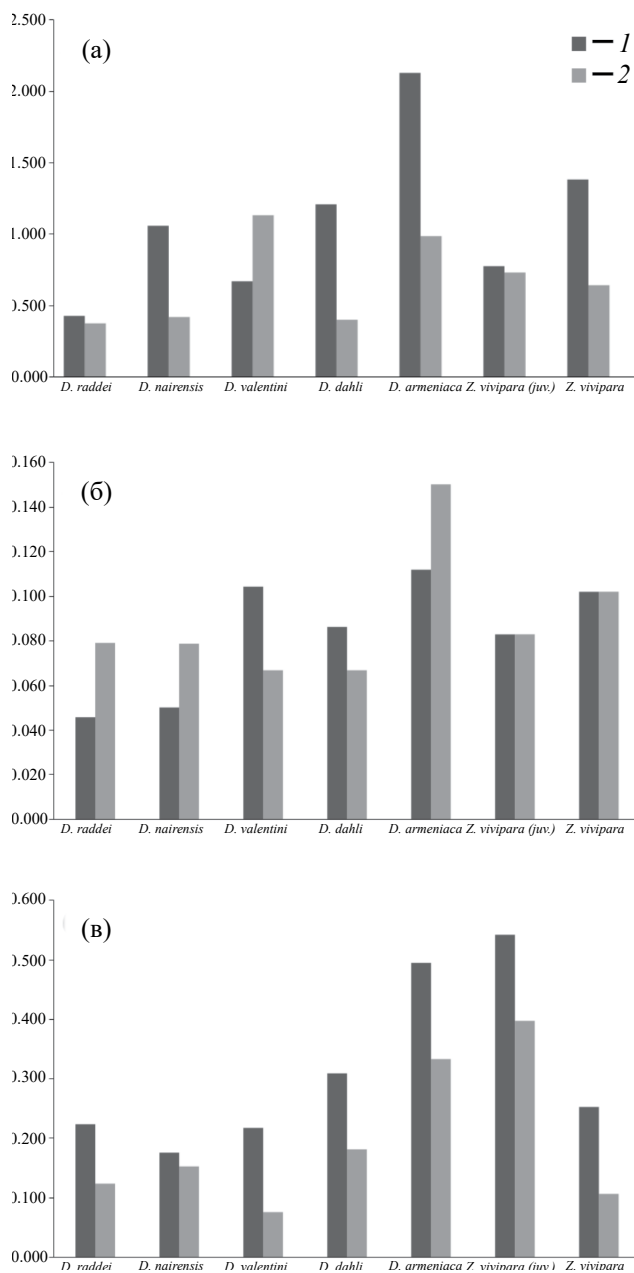


Рис. 9. Приведенные к длине тела (SVL) значения толщины кожи и различных ее слоев (мкм/мм) на дорсальной (1) и вентральной (2) сторонах туловища исследованных ящериц. Общая толщина кожи (а), толщина надкожицы с β -слоем (б), и эпидермиса (в).

в нашей выборке, *D. raddei* (рис. 8, 9, 10). Как отмечено выше, отсутствие выраженной связи между толщиной кожных покровов и влажностью местообитаний может быть следствием недостаточно большой выборки. Учитывая полученный нами существенный разброс морфометрических данных, характеризующих строение кожи, необходимая выборка должна быть более многочисленной

и отражать вариативность в размерах (возрасте), половой принадлежности и конкретных особенностях микроклимата стаций, где живут ящерицы. Тем не менее, даже такой многочисленный материал не гарантирует установление формальной статистически достоверной связи между толщиной покровов животных и микроклиматическими показателями мест их обитания. Хотя общие потери воды испарением у ксерофильных представителей Squamata, как правило, снижены по сравнению с мезо- и гигрофильными представителями этого отряда (Сох, Сох, 2015; Araya-Donoso *et al.*, 2022), потери испарением с поверхности кожи и с поверхности дыхательных путей могут дополнять и/или компенсировать друг друга.

Кроме того, толщина кожи — не единственный параметр, определяющий темп транспирации воды через кожные покровы рептилий. Существенное влияние на это процесс могут оказывать особенности организации на клеточном уровне покровов в целом и эпидермиса, в частности (Landmann, 1986; Lillywhite, 2004, 2006). В результате реакция кожного покрова на риск дегидратации животных может быть весьма оперативной и при этом обратимой, как показывает пример каролинских анолисов (*Anolis carolinensis* Voigt 1832), у которых существенное снижение потерь влаги через кожу происходило в течение 8–10 дней и восстанавливалось после очередной линьки, если факторы, вызывающие дегидратацию организма, были устранены (Kattan, Lillywhite, 1989). Таким образом, устойчивое увеличение физической толщины кожных покровов в качестве генетически закрепленного приспособления к снижению потерь воды можно ожидать только у видов, сформировавшихся и обитающих в условиях, в которых угроза дегидратации является одним из ключевых лимитирующих факторов, и в ее преодолении задействованы все доступные для этого морфологические, физиологические и поведенческие механизмы. Хотя влажность является фактором, влияющим на режим активности и распространение представителей рода *Darevskia* (Даревский, 1967), доступные приспособительные механизмы к недостатку влаги у этих видов могут быть использованы не на пределе своих возможностей, и конечный адаптивный эффект может быть достигнут на основе разной их комбинации. В этих обстоятельствах рассмотрение лишь одного из возможных способов приспособления к дефициту влаги может привести к неопределенному или даже неожиданному результату, каким, например, в нашем случае оказался относительно тонкий кожный покров у наиболее ксерофильного вида *D. raddei*. В данной связи уместно указать на парадоксальный с первого взгляда факт, касающийся водного обмена у живородящей ящерицы — вида-генералиста, использованного в нашей работе в качестве объекта для сравнения.

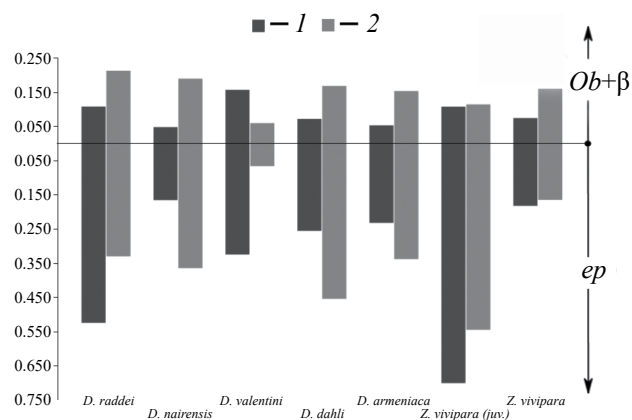


Рис. 10. Толщина надкожицы с β -слоем ($Ob+\beta$: верхняя часть диаграммы) и эпидермиса (ep : нижняя часть диаграммы) относительно толщины всей кожи на дорсальной (1) и вентральной (2) частях тела исследованных ящериц.

Зависимость интенсивности потерь воды испарением от влажности местообитания у живородящих ящериц в целом повторяет результаты, полученные при межвидовом сравнении (Сох, Сох, 2015; Araya-Donoso *et al.*, 2022), а именно, у популяций с ограниченным доступом к водным ресурсам интенсивность испарительных потерь воды ниже (Dupoué *et al.*, 2017). Однако, обнаружено, что скорость потери влаги у живородящих ящериц из южных частей ареала оказывается меньше, чем у симпатричных, но более ксерофильных видов — ящерицы Хорвата (*Iberolacerta horvathi* Méhely 1904) и стенной ящерицы (*Podarcis muralis* Laurenti, 1768) (Žagar *et al.*, 2017). Одно из возможных объяснений этого парадокса состоит в том, что живородящие ящерицы (как, возможно, и некоторые другие мезо- и гигрофильные виды) неспособны в засушливые периоды переносить ту степень дегидратации, которую выдерживают ксерофилы, и вынуждены предотвращать обезвоживание организма за счет более эффективного снижения потерь воды. Увеличение толщины кожных покровов — один из возможных механизмов такого снижения. В контексте данного предположения считаем нужным обратить внимание на то, что толщина кожи и ее эпидермальных слоев у исследованных нами живородящих ящериц оказалось не меньше, чем в целом у представителей рода *Darevskia*, в том числе и у особи, представляющей самый ксерофильный вид в нашем исследовании, *D. raddei* (рис. 7, 8). Было бы весьма интересно посмотреть в этом плане эпидермис, включая толщину его роговых и “живых слоев”, у типичных ксерофилов — например, представителей рода *Eremias* того же семейства Lacertidae, что мы и предпримем в дальнейшем.

Морфо-функциональный анализ межчешуйных карманов

Строение межчешуйных карманов скальных и живородящей ящериц отличаются от шарнирного эпидермиса тех видов, у которых в межчешуйных карманах сформирована капиллярная система, обеспечивающая пассивный захват и транспорт влаги. Морфологическим маркером такой капиллярной системы можно считать щелевые структуры, образованные складками истонченного эпидермиса на дне чешуйных карманов (Sherbrooke *et al.*, 2007). У исследованных нами видов щелевых структур такого типа не обнаружено. В чешуйных карманах скальных и живородящей ящериц эпидермис не истончен и содержит надкожицу в отличие от “классического” шарнирного эпидермиса, в котором могут отсутствовать надкожица и светлый слой. В коже межчешуйных карманов скальных и живородящей ящериц хорошо развиты все слои, включая дерму и подкожную клетчатку.

В бугорчатой коже спины скальных ящериц кожные складки и дивертикулы развиты слабо, но в пластинчатой коже брюха они представляют собой хорошо выраженные структуры, которые формируют своеобразные борозды между не перекрывающимися чешуями (рис. 3, 4, 11). Просвет между стенками этих борозд может быть не более нескольких микрон (рис. 3, 4). Радиус кривизны менисков, которые могут образоваться в этих бороздах при контакте с водой, будет иметь размер такого же порядка. Капиллярное давление на границе этих менисков, обратно пропорциональное их радиусу и прямо пропорциональное поверхностному натяжению воды, составляющему 0.07 Н/м (Попов, 2013), может достигать и превышать 10^4 Па (>0.1 атм или 10^3 мм вод. ст.). Если поверхность кожи в просветах между чешуями смачивается, такого избыточного давления было бы вполне достаточно для того, чтобы обеспечить пассивный транспорт воды вдоль брюшной поверхности кожи при контакте этой части тела с влажным субстратом. В этом случае можно было бы предполагать наличие у скальных ящериц механизмов захвата влаги, аналогичных тем, которые ранее описаны у некоторых видов рептилий (Sherbrooke *et al.*, 2007; Comans *et al.*, 2015, 2016; Yenmiş *et al.*, 2016). Однако, в противном случае, т.е. если поверхность кожи не смачивается, капиллярные силы, наоборот, будут надежно блокировать заход и распространение воды в межчешуйных карманах и кожных бороздах внутри них. Соответственно, для понимания того, какой конкретно капиллярный эффект возможен в межчешуйных карманах на вентральной стороне тела и имеет ли он какое-либо функциональное значение, необходима информация о физико-химических свойствах поверхности кожи скальных ящериц.

Следует отметить сильно развитую подкожную поперечнополосатую мускулатуру исследованных ящериц, которая, как видно на препаратах кожи брюшной поверхности *D. dahli* (рис. 3б, г) и *D. alentini* (рис. 5г), может заходить непосредственно в основание чешуи (см. также рис. 7а, б, 4). Нам не известны описания случаев подобного глубокого проникновения подкожной мускулатуры в тело чешуи у каких-либо представителей Lacertidae. При таком залегании мышечного слоя его сокращение способно обеспечить смыкание или отодвигание соседних чешуй. Точный функциональный смысл этой способности кожного покрова скальных ящериц пока не ясен. Однако, стоит заметить, что если поверхность межчешуйных карманов смачивается водой, создавая возможности для ее движения посредством капиллярных сил, то активное изменение просвета между чешуями и ширины борозд внутри межчешуйных карманов меняло бы кривизну капиллярных менисков и, как результат, управляло движением жидкости, направляя ее в сторону более тонких просветов. Активное изменения формы и размеров капилляров, образованных чешуями, было бы функциональным аналогом статичной кожной капиллярной системы с переменными размерами, которая используется, например, такими рептилиями, как техасская жабовидная ящерица (*Phrynosoma cornutum* Harlan, 1825) для транспорта воды вдоль тела в каудо-краниальном направлении (Comans *et al.*, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У изученных ящериц вне состояния линьки слои кожи имеют типичное строение и содержат немногочисленные остеодермы, укрепляющие чешуи; бугорчатая кожа дорсальной стороны толще пластинчатой кожи вентральной стороны туловища и, по-видимому, гораздо прочнее. У ящериц рода *Darevskia* подкожная клетчатка имеет обильное кровоснабжение и сильно развитые лакуны. Предположение о том, что толщина кожи у ксерофильных форм должна увеличиваться, чтобы обеспечить барьер от влагопотерь, не подтверждается. У скальных ящериц, как более ксерофильных, так и более гигрофильных, в кожном покрове не обнаружено сколько-нибудь заметного содержания липидов, которые могли бы улучшать барьерные свойства кожи.

В межчешуйных карманах пяти видов скальных ящериц и у взрослых особей живородящей ящерицы в области основания чешуй (в области “шарнирного эпидермиса”) все слои кожи хорошо развиты, за исключением отсутствующего В-слоя. В шарнирной области межчешуйного кармана скальных ящериц отсутствуют щелевые структуры, характерные для других видов рептилий, кожа которых способна к пассивному захвату

влаги из окружающей среды; однако, у скальных ящериц и взрослых особей живородящей ящерицы в области межчешуйного кармана имеются развитые дивертикулы и борозды, идущие вдоль каудального края чешуй с их внутренней стороны. Наиболее развиты такие структуры на вентральной стороне тела ящериц. Капиллярные силы, которые могут возникать при контакте этих структур с влагой, способны обеспечить избыточное давление до 10^4 Па или 10^3 мм вод. ст. Сильно развитая подкожная мускулатура скальных ящериц может заходить внутрь чешуй, что делает возможным активное изменение их ориентации, колебаний ширины просветов между чешуями и объема борозд на внутренней поверхности и краях чешуй, что требует экспериментального подтверждения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования (ЦКП) “Инструментальные методы в экологии” при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, а также на оборудовании ЦКП Института биологии развития им. Н.К. Кольцова. Авторы благодарны сотрудникам Звенигородской биостанции и Научно-исследовательского зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова за предоставленный для исследования коллекционный материал. Мы благодарим сотрудника ИПЭЭ РАН А.Г. Буша за помощь в работе с гистологической техникой.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проводилась в рамках госзадания ИПЭЭ РАН, ЕГИСУ НИОКТР № 121122200210-0 и при частичной поддержке гранта РФФИ 22-14-00227.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все этические стандарты соблюдены. В ходе работы соблюдались все применимые международные, национальные и ведомственные рекомендации по уходу и использованию животных и ее выполнение выполнено при разрешении Комитета по этике экспериментальных животных А.Н. Северцова N48 27 мая 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гражданкин А. В. Особенности морфологии кожного покрова наземных рептилий в связи с их терморегуляцией // Зоол. журн. 1974. Т. 53. № 12. С. 1894–1897.
- Даревский И. С. Скальные ящерицы Кавказа: Систематика, экология и филогения полиморфной группы кавказских ящериц подрода *Archaeolacerta* / Зоол. ин-т. Л.: Наука. Ленингр. отд., 1967. 214 с.
- Даревский И. С., Гречко В. В., Куприянова Л. А. Ящерицы, размножающиеся без самцов // Природа. 2000. № 9. С. 131–133.
- Николаев О. Д., Белова Д. А., Новикова Б. А., Симиса И. Б., Петросян Р. К., Аракелян М. С., Комарова В. А., Галоян Э. А. Особенности термобиологии партеногенетических скальных ящериц (*Darevskia armeniaca* и *Darevskia unisexualis*) и обоеполового вида *Darevskia valentini* (Lacertidae, Squamata) // Зоол. журн. 2021. Т. 100. № 11. С. 1214–1223.
<https://doi.org/10.31857/S0044513421090063>
- Попов В. Л., Механика контактного взаимодействия и физика трения. От нанотрибологии до динамики землетрясений. М.: Физматлит, 2013. 352 с.
- Соколов В. Е., Даревский И. С., Котова Е. Л., Чернова О. Ф. Специализированные кожные органы такырной круглоголовки *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia. Squamata, Agamidae) // Зоол. журн. 1997. Т. 70. № 4. С. 466–472.
- Соколов В. Е., Котова Е. Л., Чернова О. Ф., 1994. Кожные железы рептилий (Reptilia). Обзор исследований. М.: МЦНЕИ. С. 1–94.
- Соколов В. Е., Скурят Л. Н., Степанова Л. В., Шабдаш С. А. Руководство по изучению кожного покрова млекопитающих. М.: Наука, 1988. 278 с.
- Abramoff M. D., Magalhaes P. J., Ram S. J. Image Processing with ImageJ // Biophotonics International. 2004. V. 11. № 7. P. 36–42.
- Ahmadzadeh F., Flecks M., Carretero M. A., Mozaffari O., Böhme W., Engler J., Harris D. J., Ilgaz C., Üzümlü N. Cryptic speciation patterns in Iranian rock lizards uncovered by integrative taxonomy // PloS ONE. 2013. V. 8. № 12. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080563>
- Akat E., Pombal V. F., Yenmiş M., Molist P., Megias M., Somuncu S., Vesely M., Anderson R., Ayaz D. Comparison of vertebrate skin structure at class level: A review // Anat. Rec. 2022. V. 305. № 12. P. 3543–3608.
<https://doi.org/10.1002/ar.24908>
- Alibardi L. Scale morphogenesis during embryonic development in the lizard *Anolis lineatopus* // J. Anat. 1996. V. 188. P. 713–725.
- Alibardi L. Morphogenesis of the digital pad lamellae in the embryo of the lizard *Anolis lineatopus* // J. Zool. 1997. V. 243. P. 47–56.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1997.tb05755.x>
- Alibardi L. Ultrastructure of the embryonic snake skin and putative role of histidine in the differentiation

- of the shedding complex // J. Morphol. 2002. V. 251. P. 149–168.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1080>
- Alibardi L.* Adaptation to the land: The skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes // J. Exp. Zool. Part B. Mol. Dev. Evol. 2003. V. 298. № 1. P. 12–41.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.24>
- Alibardi L.* Review: Cell biology of adhesive setae in gecko lizards // Zoology. 2009. V. 112. P. 403–424.
<https://doi.org/10.1016/j.zool.2009.03.005>
- Alibardi L.* Sauropsids cornification is based on corneous beta-proteins, a special type of keratin-associated corneous proteins of the epidermis // J. Exp. Zool. Part B. Mol. Dev. Evol. 2016. V. 326. № 6. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22689>
- Alibardi L.* Keratinization and cornification are not equivalent processes but keratinization in fish and amphibians evolved into cornification in terrestrial vertebrates // Exp. Dermat. 2022. V. 31. № 5. P. 794–799.
<https://doi.org/10.1111/exd.14525>
- Alibardi L., Thompson M. B.* Epidermal differentiation in the developing scales of embryos of the Australian scincid lizard *Lampropholis quicquid* // J. Morphol. 1999. V. 241. P. 139–152.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199908\)241:2<139::AID-JMOR4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199908)241:2<139::AID-JMOR4>3.0.CO;2-H)
- Alibardi L., Toni M.* Cytochemical, biochemical and molecular aspects of the process of keratinization in the epidermis of reptilian scales // Prog. Histochem. Cytochem. 2006. V. 40. № 2. P. 73–134.
<https://doi.org/10.1016/j.proghi.2006.01.001>
- Ananjeva N. B., Dilmuchamedov M., Matveyeva T.* The skin sense organs of some iguanian lizards // J. Herpetol. 1991. V. 25. P. 186–199.
<https://doi.org/10.2307/1564647>
- Araya-Donoso R., San Juan E., Tamburrino I., Lam-borot M., Veloso C., Véliz D.* Integrating genetics, physiology and morphology to study desert adaptation in a lizard species // J. Anim. Ecol. 2022. V. 91. № 6. P. 1148–1162.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.13546>
- Arribas O. J.* Phylogeny and relationships of the mountain lizards of Europe and Near East (*Archaeolacerta* Mertens, 1921, sensu lato) and their relationships among the Eurasian lacertid radiation // Russ. J. Herpetol. 1999. V. 6. № 1. P. 1–22.
- Breyer H.* Über Hautsinnesorgane und Haftung bei Lacertilien // Zool. Jahr. 1929. Bd. 51. Abt. F. Anatomie. S. 549–581.
- Calvaresi M., Eckhart L., Alibardi L.* The molecular organization of the beta-sheet region in *Corneous betaproteins* (beta-keratins) of sauropsids explains its stability and polymerization into filaments // J. Struct. Biol. 2016. V. 194. P. 282–291.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.004>
- Carver W. S., Sawyer R. H.* Development and keratinization of the epidermis in the common lizard, *Anolis carolinensis* // J. Exp. Zool. 1987. V. 243. P. 435–443.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402430310>
- Chang Ch., Wu P., Baker R. E., huong Ch.-M.* Reptile scale paradigm: Evo-Devo pattern formation and regeneration // Int. J. Dev. Biol. 2009. V. 53. P. 813–826.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072556cc>
- Comans P., Buchberger G., Buchsbaum A., Baumgartner R., Koller A., Bauer S., Baumgartner W.* Directional, passive liquid transport: the Texas horned lizard as a model for a biomimetic ‘liquid diode’ // J. R. Soc. Interface. 2015. V. 12. № 109. P. 20150415.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0415>
- Comans P., Withers P. C., Esser F. J., Baumgartner W.* Cutaneous water collection by a moisture-harvesting lizard, the thorny devil (*Moloch horridus*) // J. Exp. Biol. 2016. V. 219. № 21. P. 3473–3479.
<https://doi.org/10.1242/jeb.148791>
- Cox C. L., Cox R. M.* Evolutionary shifts in habitat aridity predict evaporative water loss across squamate reptiles // Evolution. 2015. V. 69. № 9. P. 2507–2516.
- Dhouailly D.* A new scenario for the evolutionary origin of hair, feather, and avian scales // J. Anat. 2009. V. 214. № 4. P. 587–606.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01041.x>
- Dupoué A., Rutschmann A., Le Galliard J. F., Miles D. B., Clobert J., Devardo D. F., Bruschi G. A. IV, Meylan S.* Water availability and environmental temperature correlate with geographic variation in water balance in common lizards // Oecologia. 2017. V. 185. № 4. P. 561–571.
<https://doi.org/10.1007/s00442-017-3973-6>
- Flaxman B. A.* Cell differentiation and its control in the vertebrate epidermis // Integrative and Comparative Biology (ICB). 1972. V. 12. № 1. P. 13–26.
<https://doi.org/10.1093/icb/12.1.13>
- Gabelaia M., Adriaens D., Tarkhnishvili D.* Phylogenetic signals in scale shape in Caucasian rock lizards (*Darevskia* species) // Zool. Anz. 2017. V. 268. P. 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.04.004>
- Galoyan E., Moskalenko V., Gabelaia M., Tarkhnishvili D., Spangenberg V. E., Shamkina A., Arakelyan M.* Syntopy of two species of rock lizards (*Darevskia raddei* and *Darevskia portschinskii*) may not lead to hybridization between them // Zool. Anz. 2020. V. 288. P. 43–52.
<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2020.06.007>
https://sev-in.ru/sites/default/files/2023-08/Supplementary_to_Skin_morphology_of_rock_lizards.pdf
- Irish F. J., Williams E. E., Seling E.* Scanning electron microscopy of changes in epidermal structure occurring during the shedding cycle in squamate reptiles // J. Morph. 1988. V. 197. № 1. P. 105–126.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1051970108>
- Kandagel R., Elwan M., Abumduor M.* Comparative ultrastructural-functional characterizations of the skin in three reptile species: *Chalcides ocellatus*, *Uromastyx aegyptia aegyptia*, and *Psammophis schokari aegyptia* (Forskål, 1775): Adaptive strategies to their

- habitat // *Microsc. Res. Tech.* 2021. V. 84. № 9. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1002/jemt.23766>
- Kattan G. H., Lillywhite H. B. Humidity acclimation and skin permeability in the lizard *Anolis carolinensis* // *Physiol. Zool.* 1989. V. 62. № 2. P. 593–606.
<https://doi.org/10.1086/physzool.62.2.30156187>
- Landmann L. The sense organs in the skin of the head of Squamata (Reptilia) // *Isr. J. Zool.* 1975. V. 24. P. 99–135.
<https://doi.org/10.1080/00212210.1975.10688416>
- Landmann L. Epidermis and dermis // *Biology of Integument*. V. 2. / Eds Bereiter-Hahn J., Matoltz A. G., Richards K. S. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1986. P. 150–187.
- Lillywhite H. B. Plasticity of the water barrier in vertebrate integument // *International Congress Series*. 2004. V. 1275. P. 283–290.
- Lillywhite H. B. Water relations of tetrapod integument // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. № 2. P. 202–226.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02007>
- Maderson P. F. A. Keratinized epidermal derivatives as an aid to climbing in gekkonid lizards // *Nature*. 1964. V. 203. P. 780–781.
<https://doi.org/10.1038/203780a0>
- Maderson P. F. A. The structure and development of the squamate epidermis // *Biology of the skin and hair growth* / Eds Lyne A. G., Short B. F. Sydney: Angus & Robertson, 1965. P. 129–153.
- Maderson P. F. A. Lizard glands and lizard hands: models for evolutionary study // *Forma et Functio*. 1970. V. 3. P. 179–204.
- Maderson P. F. A. Some developmental problems of the reptilian integument // *Biology of the Reptilia* / Eds Hans C., Billett F., Maderson P. F. A. . 1985. V. 14. P. 525–598.
- Maderson P. F. A., Licht P. Epidermal morphology and sloughing frequency in normal and prolactin treated *Anolis carolinensis* (Iguanidae, Lacertilia) // *J. Morphol.* 1967. V. 123. P. 157–172.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1051230205>
- Mi Ch., Ma L., Wang Y., Wu D., Du W., Sun B. Temperate and tropical lizards are vulnerable to climate warming due to increased water loss and heat stress // *Proc. Biol. Sci.* 2022. V. 289. № 1980. P. 20221074.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1074>
- Mittal A. K., Singh J. P. A. Hinge epidermis of *Natrix piscator* during its sloughing cycle – structural organization and protein histochemistry // *J. Zool.* 1987. V. 213. № 4. P. 685–695.
- Mohammed M. B. H. Skin development in the lizard embryo, *Chalcides ocellatus forskae* (Scincidae, Sauria, Reptilia) // *Wasm. J. Biol.* 1987. V. 45. № 1–2. P. 49–58.
- Roberts J. B., Lillywhite H. B. Lipid barrier to water exchange in Reptile epidermis // *Science*. 1980. V. 207. № 4435. P. 1077–1079.
<https://doi.org/10.1126/science.207.4435.1077>
- Rutland C. S., Cigler P., Kubale V. Reptilian skin and its special histological structure // *Veterinary Anatomy and Physiology* / Eds Rutland C. S., Kubale V. IntechOpen. 2019. P. 1–21.
www.intecho.com
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84212>
- Sherbrooke W. C., Scardino A. J., Rocke de Nys, Schwarzkopf L. Functional morphology of hinges used to transport water: Convergent drinking adaptations in desert lizards (*Moloch herpidus* and *Phrynosoma cornutum*) // *Zoomorphology*. 2007. V. 126. P. 89–102.
<https://doi.org/10.1007/s00435-007-0031-7>
- Swadźba E., Rupik W. Ultrastructural studies of epidermis keratinization in grass snake embryos *Natrix natrix* L. (Lepidosauria, Serpentes) during late embryogenesis // *Zoology*. 2010. V. 113. P. 339–360.
<https://doi.org/10.1016/j.zool.2010.07.002>
- Yenmiş M., Ayaz D., Sherbrooke W. C., Veselý M. A comparative behavioural and structural study of rain-harvesting and non-rain-harvesting agamid lizards of Anatolia (Turkey) // *Zoomorphology*. 2016. V. 135. № 1. P. 137–148.
<https://doi.org/10.1007/s00435-015-0285-4>
- Žagar A., Vrežec A., Carretero M. A. Do the thermal and hydric physiologies of *Zootoca (vivipara) carniolica* (Squamata: Lacertidae) reflect the conditions of its selected microhabitat? // *Salamandra*. 2017. V. 53. № 1. P. 153–159.

Skin morphology of five species of rock lizards of the genus *Darevskia* (Lacertidae, Squamata)

© 2024 O. F. Chernova^{1, @}, E. A. Galoyan¹ and Yu. F. Ivlev¹

¹A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia

[@]E-mail: olga.chernova.moscow@gmail.com

The microstructure of the tuberculate dorsal and lamellar ventral skin of the body in rock lizards of different ages (*Darevskia raddei*, *D. nairensis*, *D. valentini*, *D. dahli*, *D. armeniaca*) has been described for the first time. The thickness of the skin in the most xerophilic species (*D. raddei*) is less than that in the more hygrophilic species. Rock lizards have single or paired longitudinal skin folds that are not closed from the side, which stretch along the inner side of the scales to its distal edge. Small folds are also present in the lining of the squamous pocket; they consist of all layers of the skin and subcutaneous tissue. A large fold is able to completely block the cavity of the squamous pocket, the volume of which changes with the contraction of the subcutaneous muscle bundles reaching the bases of the scales. Small folds are also present on the scales of tuberos skin. In hygrophilic lizards (*Zootoca vivipara*), similar formations appear at later stages of postnatal ontogenesis than in rock lizards. The probable functional significance of the described skin structures is discussed.

Keywords: rock lizards, scales, histology, interspecies differences, adaptation

УДК 599.322: 57.024 59.084

ТЕСТЫ НА ПОКОРНОСТЬ, СМЕЛОСТЬ И ЛЮБОЗНАТЕЛЬНОСТЬ У ЖЕЛТОГО СУСЛИКА *SPERMOPHILUS FULVUS* LICHT. (SCIURIDAE) В ПРИРОДЕ

© 2024 г. Н. А. Васильева*, @, М. О. Маркина**, Н. С. Васильев*, **

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

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Ленинские горы, 1, Москва, 119234 Россия
@E-mail: ninavasilieva@gmail.com

Поступила в редакцию 18.09.2023 г.

После доработки 12.11.2023 г.

Принята к публикации 14.11.2023 г.

Изучение внутривидовых различий в поведении животных принимает все большие масштабы в современной биологии. Получение сравнимых данных по поведению разных видов требует подбора специфических методик. Мы опробовали три типа поведенческих тестов для детенышей желтого суслика — крупного зимоспящего грызуна. Тесты на покорность с оценкой времени и интенсивности движения зверька, помещенного в мешок, показали низкую повторяемость и оказались малопригодны, поскольку большинство детенышей замирало во время теста. Тесты на смелость с установкой экшн-камеры у норы оказались более перспективными, но и в них суслики долго не покидали нору, оставались настороженными и не исследовали новый объект. Результаты тестов указывают на высокую осторожность желтых сусликов, которая может быть устойчивой характеристикой поведения этого вида.

Ключевые слова: поведенческие тесты, поведение детенышей, наземные беличьи, желтый суслик.

DOI: 10.31857/S1026347024040056, **EDN:** VHTMWU

Представления о поведенческой разнокачественности особей в пределах вида к сегодняшнему дню заняли устойчивую позицию в зоологических работах и широко задействованы в исследованиях самых разных направлений (Шилов, 2001; Bell *et al.*, 2009; Dammhahn *et al.*, 2018). Концепция персональности (“personality”), которая предполагает существование разных устойчивых поведенческих фенотипов в пределах поло-возрастных групп (Gosling, 2001; Sih *et al.*, 2004; Vonk *et al.*, 2017), признается все большим числом ученых. Накопление информации о таких фенотипах в разных группах животных позволило говорить об универсальности характера изменчивости между особями в животном мире (Sih *et al.*, 2004). В первую очередь речь идет об основных осях изменчивости персональностей (Budaev, 1999; Sih *et al.*, 2004; Réale *et al.*, 2007; 2010): смелости (shyness – boldness), скорости исследования новых объектов, общей активности, агрессивности и социабельности — стремлении к контактам с конспецификами. Такое сходство между видами открывает возможность для

сравнительного анализа в самых разных группах животных (Gosling, 2001), а устойчивость таких фенотипов может помочь решать как научные, так и прикладные задачи, которые требуют, например, подбора особей с определенными характеристиками (Slabbert, Odendaal, 1999).

В то же время, до сих пор методологические подходы к исследованию персональностей находятся на стадии разработки, особенно для видов, которые трудно содержать в неволе. Для оценки поведенческой разнокачественности особей созданы поведенческие тесты, позволяющие при помещении животного в стандартизированную ситуацию по его реакции на внешние стимулы провести количественную оценку его поведенческих особенностей (Clary *et al.*, 2014; Dosmann *et al.*, 2015a; Aliperti *et al.*, 2021). Однако эти тесты разработаны, в первую очередь, для лабораторных животных, и лишь небольшое число видов на сегодня было исследовано в природе. Проведение поведенческих тестов в дикой природе необходимо для получения объективных представлений о внутри- и межвидовых различиях поведенческих

профилей. Особое значение имеют данные о видах со специфическими особенностями экологии, социальных систем, жизненных циклов, поскольку именно информация о таких видах может пролить свет на механизмы формирования персональностей и эволюцию поведения (Reale *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2007).

Наземные беличьи (суслики, сурки, луговые собачки) — группа дневных грызунов, которые населяют открытые пространства Евразии, Африки и Америки и многим из которых свойственно проводить существенную часть года в спячке (Michener, 1984; Шилова, 2004). Эта особенность жизненного цикла накладывает ограничения на все жизненные процессы этих видов и, в том числе, определяет специфику размножения, использования пространства, бюджета активности (Шилова, 2000; Dobson, 1984; Armitage, 1986; Waterman, 2007). При этом присутствие спячки в годовом цикле ограничивает возможности для содержания и размножения этих видов в неволе; как следствие, исследования разнообразия поведенческих профилей проводились лишь для нескольких видов наземных беличьих, среди которых до сих пор нет евразийских видов сусликов. Эти немногочисленные работы показали высокую информативность поведенческих тестов в дикой природе для оценки внутривидовой изменчивости персональностей у этих видов и ее связей с другими характеристиками особей. Например, у разных видов наземных беличьих были выявлены ассоциации поведенческих профилей с физиологическими показателями (Clary *et al.*, 2014), иммунным статусом (Dosmann *et al.*, 2015b), использованием пространства (Aliperti *et al.*, 2021), игровым поведением у детенышей (Marks *et al.*, 2017; Hurst-Hopf *et al.*, 2023), получены сведения о наследовании персональностей (Petelle *et al.*, 2015).

Желтый суслик (*Spermophilus fulvus* Licht. 1823) — крупный (до 2 кг) пустынный зеленоядный грызун с длительной спячкой до 9 месяцев; он населяет открытые аридные территории (пустыни и полупустыни) Средней Азии, Ирана, Китая, юга России (Млекопитающие..., 1969; Громов, Ербаева 1995; Thorington *et al.* 2012). Детеныши желтых сусликов впервые выходят из нор и прекращают питаться молоком матери в конце мая—начале июня в возрасте около 20–30 дней, и через 2–3 недели некоторые детеныши начинают расселяться (Млекопитающие..., 1969; Бокштейн и др., 1989; Vasileva *et al.*, 2022).

В данном исследовании мы предприняли попытку разработать тесты для оценки внутривидовой изменчивости поведенческих профилей у детенышей желтого суслика. Для этого мы опробовали в дикой природе три вида поведенческих тестов, в основу которых были положены стандартные тесты, широко применяющиеся для млекопитающих (Попов, Клинов, 2009;

Petelle *et al.*, 2013; Clary *et al.*, 2014; Dosmann *et al.*, 2015a): 1) **Тест 1** на покорность (docility) с оценкой **времени** в движении в мешке (bag test, Martin, Réale, 2008; Montiglio *et al.*, 2012); 2) **Тест 2** на покорность с оценкой **интенсивности** движения с использованием акселерометра. 3) **Тест 3** на **смелость** (boldness) и на реакцию на новый объект с установкой экшн-камеры у норы зверька. Поскольку покорность обратно коррелирует со смелостью (Martin, Réale, 2008), мы на основе всех этих тестов предполагали получить оценку поведения сусликов по шкале «shyness — boldness», а на основе Теста 3 еще и склонности к исследованию (exploration). Для Тестов 1 и 2 мы провели оценку повторяемости (repeatability, R; Bell *et al.* 2009) результатов для особей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект и место исследования. Сбор данных мы проводили в природном поселении желтого суслика (*Spermophilus fulvus orlovii* Ogn. 1937) в окрестностях с. Дьяковка Краснокутского района Саратовской области (50°43'88" с. ш. 46°46'04" в. д.) летом 2022 года. Индивидуальное мечение сусликов проводится в поселении с 2001 года, поэтому возраст и происхождение известны практически для всех особей. Мы отлавливали сусликов с помощью сетчатых ловушек оригинальной конструкции и петель с радиопередатчиками, которые при срабатывании мгновенно передавали предупреждающий сигнал по радиоканалу. При отлове сусликов метили с помощью подкожных ветеринарных микроципов и наносили им индивидуальные метки черным красителем (урзолом) для визуального распознавания. Детальное описание отлова и мечения желтых сусликов см. в ранее опубликованных работах (Васильева и др., 2009; Vasileva, Tchabovsky, 2014; 2015).

Проведение поведенческих тестов. Мы сосредоточились на оценке покорности, смелости и склонности к исследовательской деятельности (любопытности), поскольку эти характеристики входят в число наиболее часто используемых показателей для исследования персональностей (поведенческих фенотипов) у животных (Reale *et al.* 2007; Dosmann *et al.*, 2015a). Мы выбрали наиболее простые и широко используемые тесты, не требующие специального оборудования и позволяющие получить количественные характеристики поведения, и адаптировали их к специфике вида. Мы использовали два варианта тестов на покорность, так как заранее не знали, какая из характеристик (продолжительность или интенсивность движения) будет иметь распределение, лучше подходящее для статистического анализа, а также комбинированный тест на смелость и любопытность. Переменные,

полученные в Тестах 1 и 2, отражали сопротивление особи и технически были обратны покорности.

Тест 1, на время в движении. При помощи этого теста мы оценивали продолжительность двигательной активности, направленной на попытки освободиться из стесняющих движения условий, то есть он являлся разновидностью оценки ответа на ограничение (response to restraint, Réale *et al.*, 2000; Martin, Reale, 2008). Отловленного зверька после извлечения из ловушки помещали в мешок из хлопчатобумажной ткани и оставляли на гладкой поверхности. С помощью секундомера в течение 60 сек регистрировали визуально движения суслика и затем рассчитывали суммарное время, в течение которого зверек двигался, пытаясь высвободиться из мешка. Всего провели 91 тест с детенышами: 49 тестов для самок (32 особи), 42 тестов для самцов (30 особей). Тесты проводили на протяжении всего периода наземной активности детенышей: с момента выхода из гнезда и до залегания в спячку. Средний возраст детенышей составлял 20.5 ± 18.0 дней от первого выхода из норы (разброс составил от 1 до 60 дней). Кроме того, было проведено 10 тестов на время в движении для взрослых сусликов в те же даты, чтобы сравнить показатели молодых и взрослых особей.

Тест 2, на интенсивность движения. Этот тест представлял собой альтернативный вариант теста на покорность с количественной оценкой интенсивности движений зверька. Тест 2 проводили после Теста 1. Тканевый мешок со зверьком подвешивали на пружине к пластиковому держателю, на котором был расположен акселерометр; держатель был закреплен на неподвижной опоре (рис. 1). Акселерометр регистрировал в течение 60 сек амплитуду движений зверька в мешке. Роль акселерометра выполнял смартфон с установленным на нем приложением Physics Toolbox Accelerometer для Android. Данные, полученные с акселерометра, представляли собой абсолютное ускорение по трем координатным осям в трехмерном пространстве, которое регистрировалось с частотой 200 раз в секунду. Поскольку даже в том случае, когда визуально суслик был неподвижен, акселерометр регистрировал фоновое движение («шум»), мы для каждого теста вводили поправку: выбирали отрезок записи продолжительностью в несколько секунд, когда зверек не производил видимых движений, для этого отрезка рассчитывали среднее ускорение и затем из всех значений ускорения для данного теста вычитали это значение. Далее все значения ускорения суммировали и получали кумулятивную оценку интенсивности движений зверька за все время теста. Тест 2 проводили только в безветренную погоду; всего было проведено 53 теста с детенышами: 33 для самок (для 26 особей) и 20 для самцов (17 особей). Средний возраст зверьков составлял 28.3 ± 17.5 дней от первого выхода из норы

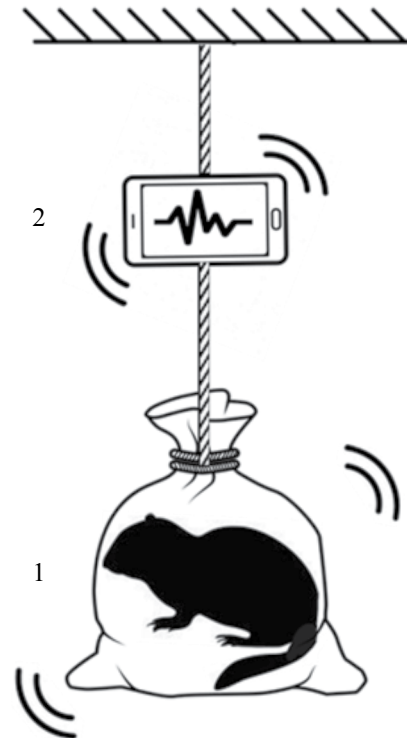


Рис. 1. Схема установки оригинальной конструкции для проведения поведенческого теста на интенсивность движения (Тест 1) у желтого суслика: 1 — суслик в хлопчатобумажном мешке; 2 — смартфон в пластиковом держателе.

(разброс составил от 1 до 60 дней). Также было проведено 7 тестов на интенсивность движения со взрослыми особями в те же даты.

Тест 3, на смелость и любознательность. Мы оценивали эти характеристики у детенышей сусликов не только потому, что это ключевые составляющие личности особи, но и потому, что они важны для детенышей в процессе расселения (Holekamp, 1986; Marks *et al.*, 2017). Чтобы получить количественную оценку смелости и одновременно оценить любознательность (Budaev, 1999; Sih *et al.*, 2004; Réale *et al.*, 2007, 2010) мы использовали комбинированный тест с экшн-камерой. Отчасти мы ориентировались на исследование личности у суслика Ричардсона (*Urocitellus richardsonii*, Clary *et al.*, 2014). В ходе Теста 3 зверька сначала вынуждали уйти в нору, а затем при помощи экшн-камеры, установленной у выхода из норы и включенной в режиме автоматической фотосъемки, регистрировали его выход из норы и последующее поведение. При этом экшн-камера одновременно выполняла роль и регистратора, и незнакомаго для зверька объекта, с помощью которого было возможно оценить склонность особи к исследовательской деятельности. Процедура

Теста 3 состояла из нескольких этапов: сначала наблюдатель в ходе осмотра территории поселения выбирал индивидуально опознаваемого суслика и медленным шагом (около 0.5 м/сек) приближался к зверьку до тех пор, пока суслик не скрывался в норе. Далее на расстоянии 1.5 м от входа в нору на опоре высотой 50 см наблюдатель устанавливал экшн-камеру Yi 4K Action Camera (Yi Technology) в водонепроницаемом прозрачном аквабоксе. Норы сусликов имеют единственный вход, поэтому зверек не мог покинуть нору, минуя поле зрения камеры. Съемка проводилась с частотой 1 кадр/10 сек и продолжалась 90 минут. Мы провели Тест 3 для 18 детенышей (14 самок, 4 самца) в сроки с 18.07.2022 по 25.07.2022 (в среднем, 53 ± 4 дня после выхода из нательной норы), что соответствовало периоду расселения и подготовки к спячке молодых особей, когда детеныши уже использовали индивидуальные норы и присутствие других особей в норе не могло повлиять на ход эксперимента.

Все манипуляции с животными прошли экспертизу и были одобрены Комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН, используемые нами методы соответствовали рекомендациям «Руководства по обращению с животными при проведении поведенческих исследований и обучении» (ASAB/ABS, Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching (Buchanan *et al.*, 2012)).

Анализ данных

Анализ данных был проведен в среде R 4.2.2 (R Development Core Team, 2022). Результаты статистических тестов мы считали достоверными при значении $p < 0.05$.

Тест 1. В каждом Тесте 1 мы получали для зверька общую продолжительность времени в движении в секундах, которая отражала сопротивление зверька. В случае, если суслик не производил активных движений на протяжении всего теста, наблюдатель приравнивал общее время в движении к нулю. Большое количество нулевых значений и скошенная форма распределения ограничивали возможности для анализа этих данных. В связи с этим, а также из-за малого объема выборок сравнение времени в движении у детенышей и взрослых особей мы производили с помощью перестановочного теста Фишера-Питмана (approximative two-sample Fisher-Pitman permutation test) с использованием аппроксимации Монте-Карло (N перестановок = 1000) в пакете *coin* (Hothorn *et al.*, 2008). Чтобы иметь возможность построить модель для оценки зависимости времени в движении от пола и возраста детенышей, мы перевели результаты Теста 1 в бинарную переменную «вероятность движения» (есть движение — 1, нет — 0). Была построена обобщенная линейная модель смешанных эффектов (linear mixed effect models) для биномиального распределения остатков

со связующей логит-функцией (logit link function) с помощью функции *glmer* из пакета *lme4* (Bates *et al.*, 2015). Вероятность движения в мешке была включена в качестве зависимой переменной, а пол и возраст зверька (в днях от момента первого выхода из норы) — в качестве независимых переменных. Недостаточное число повторов не позволило включить в модель и номер выводка, и номер особи, поэтому мы в данную модель включили только один случайный фактор — индивидуальный номер особи.

Тест 2. Интенсивность движения сусликов была прологарифмирована для соответствия нормальному распределению. Как и в Тесте 1, сравнение взрослых и молодых особей производили с помощью теста Фишера-Питмана. Мы оценили корреляцию между временем в движении (Тест 1) и интенсивностью движения (Тест 2) с помощью перестановочной корреляции Спирмана из пакета *coin* (approximative Spearman correlation test) с использованием аппроксимации Монте-Карло (N перестановок = 1000). Чтобы исследовать эффекты пола и возраста на результат Теста 2, была построена линейная модель, где зависимой переменной был логарифм интенсивности движения, а независимыми — пол и возраст молодых сусликов (в количестве дней после выхода из норы). Поскольку в выборке с результатами Теста 2 лишь 11 особей из 43 были протестированы 2 раза и более, мы не включали номер особи в модель в качестве случайного фактора и использовали для построения модели функцию *lm* (R Core Team, 2022).

Тест 3. Для сравнения самцов и самок мы использовали тест Фишера-Питмана, а для оценки корреляции между результатами Теста 3 с результатами Тестов 1 и 2 — перестановочную корреляцию Спирмана. Малый объем выборки не позволил построить линейные модели для Теста 3.

Мы провели оценку повторяемости (R; Bell *et al.* 2009) результатов Тестов 1 и 2. В Тесте 1 мы, как и в модели, описанной выше, в качестве зависимой переменной использовали бинарную переменную «вероятность движения». В качестве фиксированного эффекта в модель был добавлен возраст в днях после первого выхода из норы, а номер особи был включен в качестве случайного фактора. Для оценки R в Тесте 2 в качестве зависимой переменной использовали логарифм интенсивности движения; в модель не были включены фиксированные эффекты, номер особи был добавлен в качестве случайного фактора. Модели были построены с помощью функции *rptBinary* для бинарной зависимой переменной (Тест 1) и функции *rtp* для нормально распределенной зависимой переменной (Тест 2) в пакете *rptR* (Stoffel *et al.*, 2017). При этом мы получили оценки средней повторяемости с их ошибками ($\pm$ SE), значимость повторяемости (р-значение) на основе 1000 перестановок и границы 95% доверительного интервала с помощью 1000 бутстрепов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Тест на время в движении (Тест 1). Более чем в половине проведенных тестов (47 из 91, 51.6%, рис. 2а) детеныши не предпринимали попыток высвободиться из мешка и не производили видимых движений (демонстрировали реакцию затаивания), и общее время в движении приравнялось к нулю.

Даже в тех тестах, где наблюдалось движение зверьков в мешках, его продолжительность в большинстве случаев была очень мала: в 23 из 44 тестов с движением она составляла менее 5 сек из 60. Как следствие, распределение результатов теста на время в движении оказалось сильно скошенным и с большим количеством нулевых значений (рис. 2а). Время в движении у детенышей ($N = 91$)

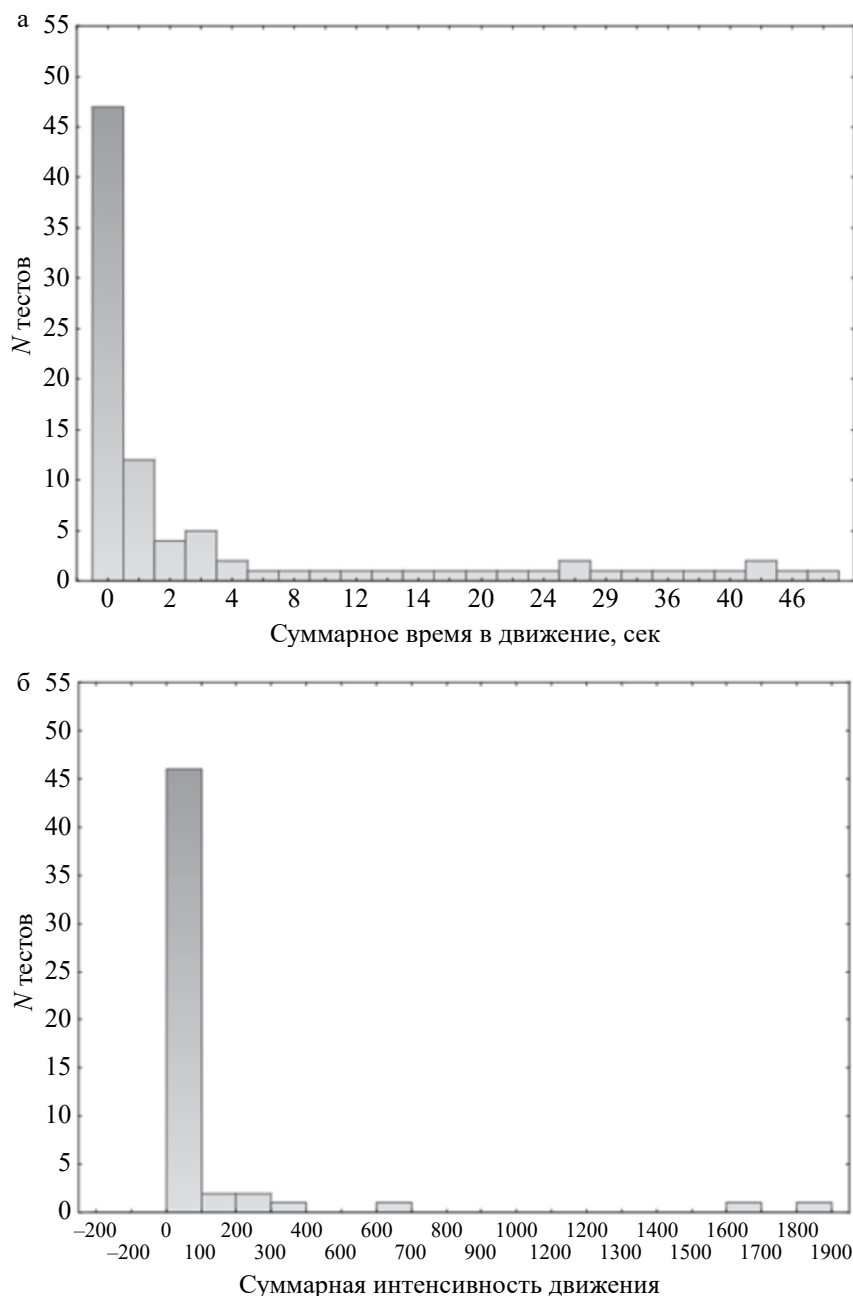


Рис. 2. Распределение результатов на покорность у детенышей желтого суслика. (а) Тест 1, на время в движении, $N = 91$, продолжительность теста 60 сек; (б) Тест 2, на интенсивность движения, $N = 53$, продолжительность теста 60 сек, по оси абсцисс безразмерная величина, характеризующая суммарную амплитуду движений зверька, складывающуюся из суммарного ускорения по трем координатным осям в трехмерном пространстве, которое регистрировалось с частотой 200 раз в секунду, за вычетом уровня «шума», специфического для каждого теста.

не отличалось от времени движения в аналогичных тестах, проведенных для взрослых особей ($N = 10$; перестановочный тест Фишера-Питмана, $Z = 1.1$, $p = 0.3$). Вероятность движения не зависела от пола особи (обобщенная модель смешанных эффектов, $B = 0.90 \pm 0.56$, $z = 1.6$, $p = 0.1$) и незначительно снижалась с возрастом детеныша ($B = -0.59 \pm 0.31$, $z = -1.9$, $p = 0.05$).

Тест на интенсивность движения (Тест 2). В большинстве тестов с акселерометром детеныши также демонстрировали низкую двигательную активность (рис. 26). Логарифмированная интенсивность движения не отличалась в тестах с детенышами ($N = 54$) и со взрослыми особями ($N = 7$; перестановочный тест Фишера-Питмана, $Z = 0.8$, $p = 0.5$), при этом интенсивность движения в Тесте 2 положительно коррелировала с временем в движении в Тесте 1: те особи, которые при отлове дольше двигались в тесте на время в движении, более интенсивно двигались и в тесте с акселерометром (перестановочная корреляция Спирмана, $Z = 2.5$, $p = 0.008$). Интенсивность движения в Тесте 2 не зависела ни от пола (общая линейная модель, $B = -0.07 \pm 0.10$, $t = -0.4$, $p = 0.7$), ни от возраста детенышей ($B = -0.02 \pm 0.08$, $t = -0.2$, $p = 0.8$).

Оценка повторяемости (R) в Тестах 1 и 2. Мы оценивали R только для особей, для которых соответствующий тест проводился дважды и более раз. Для вероятности движения в мешке мы включили в модель возраст детеныша, но не включили пол, опираясь на оценку значимости этих эффектов в модели, описанной выше; R в Тесте 1 не была значимой ($N = 24$, $p > 0.05$, время между тестами составляло 18 ± 12 дней). В тесте на интенсивность движения мы также не выявили достоверной повторяемости результатов ($N = 11$, $p > 0.1$, время между тестами 15 ± 11 дней) (табл. 1).

Тест 3, на смелость и любознательность. Лишь 13 из 18 детенышей показали из норы в течение 90 минут с момента установки камеры, при этом на все четыре лапы вышли на поверхность лишь девять особей (табл. 2). Те особи, которые показали из норы, почти все время пребывали в настороженной позе (табл. 2). Только шесть особей начали проявлять во время эксперимента, и только три особи проявляли исследовательское поведение по отношению к камере — приближались к камере вплотную и осматривали ее с расстояния менее 30 см, стоя в настороженной позе. Ни один зверек не прикасался к камере за время теста. В статистическом анализе

Таблица 1. Средняя повторяемость (R) со стандартными ошибками (SE) и 95% доверительными интервалами (CI) для тестов на время в движении и тестов на интенсивность движения

Модель	$R \pm SE$	CI	p -значение
Вероятность движения в мешке*	Link-scale $R = 0.21 \pm 0.21$ Original-scale $R = 0.2 \pm 13.5$	Link-scale $CI = 0 - 0.79$ Original-scale $CI = 0 - 1.01$	0.09
Интенсивность движения**	0.0 ± 0.2	$0 - 0.57$	1.0

Примечание. * — обобщенная линейная модель смешанных эффектов для бинарной зависимой переменной, в качестве фактора добавлен возраст детенышей в днях от первого выхода из норы, N особей = 24; ** — линейная модель смешанных эффектов, N особей = 11.

Таблица 2. Средние значения и стандартные отклонения параметров в тесте на смелость и реакцию на новый объект у сеголетков желтого суслика

Параметр	Среднее $\pm$ SD
Время до появления на поверхности, мин.	43 ± 27
Время до выхода на четыре лапы, мин.	54 ± 32
Время до начала кормового поведения, мин.	71 ± 26
Настороженная поза, % от времени в поле зрения камеры	$92 \pm 9 \%$
Проявление исследовательского поведения по отношению к камере	Да — 3 зверка (17%) Нет — 15 зверков (83%)

Примечание. В случае, если зверек не выполнял соответствующего действия за время эксперимента (за 90 мин), ему присваивали 90 мин в качестве значения соответствующего параметра.

мы использовали только время до появления на поверхности, т.е. оценку смелости, как переменную с наибольшей изменчивостью, так как для остальных переменных из табл. 2 было много нулевых значений. Самцы ($N = 4$) выходили из норы несколько раньше самок ($N = 14$), но эти различия не были достоверны (перестановочный тест Фишера-Питмана, $Z = 1.6$, $p = 0.1$). Результаты теста на время в движении и теста на интенсивность в движении, ближайших по времени к моменту Теста 3, не коррелировали с временем появления зверька из норы (перестановочная корреляция Спирмана, Тест 1: $Z = 1.0$, $p = 0.3$; Тест 2: $Z = -0.1$, $p = 0.9$).

Результаты исследования показали, что в тестах на покорность детеныши и взрослые особи показали низкую двигательную активность. В большинстве тестов они просто замирали, демонстрировали реакцию затаивания (freezing behavior, Sousa *et al.*, 2006) и не только не делали попыток освободиться из мешка, но и вообще не производили активных движений. Для тестов на покорность мы не выявили достоверной повторяемости результатов. В тестах на смелость и любознательность детеныши проявляли чрезвычайную осторожность, подолгу не покидали нору и не стремились исследовать новый объект.

В других работах по мелким млекопитающим, включая наземных беличьих, в тестах на покорность в мешке или ловушке зверьки, напротив, редко оставались полностью неподвижными на протяжении всего теста (напр., *Marmota flaviventris*, Petelle *et al.*, 2013; *Trichosurus vulpecula*, Mella *et al.*, 2015; *Tamias striatus*, Montiglio *et al.*, 2012; *Callospermophilus lateralis*, Aliperti *et al.*, 2021; *Urocitellus beldingi*, Hurst-Hopf *et al.*, 2023). В тех работах, в которых методика проведения теста в мешке совпадала с методикой нашего Теста 1, среднее время нахождения в неподвижном состоянии было существенно меньше, чем у желтого суслика и не превышало 50% от продолжительности теста. Например, у суслика Белдинга доля времени в неподвижном состоянии составляла около 40% (*Urocitellus beldingi*, Dosmann *et al.*, 2015a), у бурундуков 12% (*Tamias striatus*, Careau *et al.*, 2015), у пищух 24% (*Ochotona curzoniae*, Qu *et al.*, 2018). Во всех процитированных выше работах была выявлена значимая повторяемость результатов тестов на покорность, причем и в работах по детенышам, и по взрослым особям, что указывает на существование устойчивых внутривидовых различий поведенческих профилей у этих видов млекопитающих. У желтого суслика повторяемость в тестах на покорность не была достоверной; такой результат, возможно, отчасти объясняется переводом переменной в бинарный вид в сочетании с малым объемом выборки.

Оценка интенсивности движения с помощью акселерометра в тестах на покорность

у млекопитающих ранее в дикой природе не проводилась. Планируя эту работу, мы предполагали получить простой и объективный метод количественной оценки покорности, в противоположность ранговым и субъективным оценкам, которые зачастую применяются в подобных тестах (напр., Petelle *et al.*, 2013; Aliperti *et al.*, 2021). Однако для желтого суслика испробованный нами протокол Теста 2 не позволил получить переменную, пригодную для полноценного исследования поведенческих характеристик, поскольку, как и в Тесте 1, в Тесте 2 зверьки практически не двигались. Наши данные показали, по сути, непригодность стандартных тестов с мешком («bag tests», Qu *et al.*, 2018) для желтых сусликов. При такой низкой подвижности зверьков результаты тестов не могут быть использованы для количественной оценки изменчивости поведенческих профилей сусликов.

В то же время, мы предполагаем, что, несмотря на негативные результаты данного пилотного исследования, устойчивые различия детенышей *S. fulvus* по уровню покорности все-таки существуют: во-первых, на это указывают пограничные значения повторяемости для теста на время в движении (табл. 1, $p = 0.09$): R в нашем исследовании была близка к достоверной и составила около 21%, при том, что в разных таксонах животных повторяемость переменных в исследованиях персональности в среднем составляет около 35% (Bell *et al.*, 2009), а в аналогичных тестах в мешке для наземных беличьих она составляла около 16–28% (Montiglio *et al.*, 2012; Careau *et al.*, 2015; Aliperti *et al.*, 2021). Кроме того, оценки покорности из Теста 1 и 2 коррелировали между собой, что говорит в пользу существования реальных различий в поведении детенышей при отловах. Возможно, для желтого суслика для анализа покорности больше подошли бы ранговые оценки нескольких составляющих поведения на протяжении всей процедуры отлова зверька и манипуляций с ним (Petelle *et al.*, 2013; Aliperti *et al.*, 2021), что требует дальнейшего исследования.

Тест на смелость и любознательность показал, что для детенышей желтого суслика приближение человека и быстрая, практически бесшумная установка фотокамеры у норы являлись настолько пугающими событиями, что после этого более полутора часов некоторые особи не показывались из норы. Исходя из нашего предыдущего опыта работы с желтыми сусликами можно сказать, что эти зверьки действительно остро реагируют на приближение человека: зачастую минимальное беспокойство суслика служит для него поводом не выходить из норы более суток (Васильева и др., 2023). Чрезвычайную осторожность желтого суслика отмечали исследователи еще в начале XX века (Материалы..., 1929). Результаты данной работы показывают отличия поведения желтых сусликов от других

наземных беличьих. Например, суслики Ричардсона (*U. richardsonii*) в ходе теста, аналогичного нашему, показывались из норы через несколько минут после установки камеры, исследователь не уходил от норы дальше 15 метров (мы полностью покидали территорию на время теста), и регистрировал поведение зверьков в течение 10 мин, в то время как суслики активно исследовали новые объекты (Clary *et al.*, 2014). В другой работе после того, как золотистые суслики уходили в нору от наблюдателя (*Callospermophilus lateralis*), они возобновляли нормальную активность в считанные минуты (Aliperti *et al.*, 2021), а калифорнийские суслики (*Otospermophilus beecheyi*) в аналогичном тесте – через 25 мин (Ortiz-Jimenez *et al.*, 2022). В случае желтого суслика 90 мин оказалось недостаточным даже для появления зверька из норы, а исследование нового объекта (камеры) за это время практически ни одна особь не начала. Тем не менее, тест с установкой экшн-камеры, с нашей точки зрения, может быть использован для оценки поведенческой разнокачественности особей при условии большого размера выборки, поскольку большинство особей все же показывались из норы за время теста; для оценки любознательности и исследовательского поведения необходимо разрабатывать другие методики.

Во многих исследованиях млекопитающих для оценки смелости в тестах, аналогичных Тесту 3, измеряют дистанцию от приближающегося наблюдателя до зверька, в момент, когда животное пугается и начинает движение в укрытие (flight initiation distance, FID, Stankowich, Blumstein, 2005; Petelle *et al.*, 2013; Clary *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2018). В случае желтого суслика измерение этой дистанции было невыполнимой задачей, так как зверьки, зачастую, пугались наблюдателя и бежали к норе с расстояния более 100 м, в отличие от близких видов, а на таких расстояниях на FID начинает влиять множество посторонних факторов, таких как рельеф, растительность и т.п.

В целом, результаты всех тестов показывали острую реакцию желтых сусликов на контакт с незнакомыми условиями и с человеком, и эта пугливость практически не изменялась по мере взросления зверька и не зависела от пола особи. Можно предположить, что она является видовой характеристикой *S. fulvus*. Известно, что представители близких видов животных могут иметь устойчивые различия по комплексу поведенческих характеристик, и эти различия могут определять направление естественного отбора и ход эволюционного процесса (Uher *et al.*, 2008). Поведенческие характеристики определяют склонность вида к инвазии в чужие сообщества (Réale *et al.*, 2010; Chapple *et al.*, 2012), возможности для синантропного образа жизни, выживания в агроценозах

(Réale *et al.*, 2010; Debecker *et al.*, 2016), особенности содержания в неволе, перспективы одомашнивания животных. Пугливость желтого суслика может объясняться тем, что он до сих пор является промысловым видом (Лисовский и др., 2019). Однако, возможно, такое поведение имеет причины в особенностях его жизненного цикла и, возможно, в более низкой популяционной плотности по сравнению с близкими видами (Слудский, 1969), так как существуют данные о взаимосвязях между персональностями особей и плотностью популяции (Weiss, 2018). Пустынный образ жизни в сочетании с зеленоядностью определяют высокую продолжительность летне-зимней спячки в годовом цикле желтого суслика. Такой длительный период гипотермии, и соответственно, краткий сезон наземной активности, задает распорядок событий годового цикла и определяет характер и течение всех основных процессов в жизни этого вида: краткость периода родительской заботы, высокую скорость роста детенышей, их раннее расселение и созревание, их высокую смертность, низкую популяционную плотность (Васильева и др., 2009; Васильева, Чабовский, 2017; Vasilieva, Tchabovsky, 2015; 2020; Vasilieva *et al.*, 2022). Этот комплекс признаков можно назвать стратегией «быстрой и одиночной жизни» (fast-solitary life, Vasilieva *et al.*, 2022). В свете этого чрезвычайная осторожность детенышей может иметь адаптивное значение в условиях раннего окончания родительской заботы и ранней самостоятельности молодых сусликов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наше исследование не столько позволяет судить о внутривидовой разнокачественности поведения детенышей и взрослых особей, сколько дает информацию о видовой специфике поведенческого профиля желтого суслика. Чрезвычайную осторожность желтого суслика следует принимать во внимание при планировании исследований, в том числе, предполагающих учеты численности, визуальные наблюдения, установку фотоловушек, а также в решении прикладных задач по менеджменту популяций и при планировании природоохранных мероприятий. В то же время, для изучения поведенческих синдромов и персональностей у желтого суслика необходимо искать новые методики.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Л.Е. Савинецкой, А.В. Чабовскому, Н.В. Сидорчук, Е.В. Кузнецовой, А.А. Лупыреву, Т.Б. Демидовой.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00610, <https://rscf.ru/project/22-24-00610/>.

This research was supported by the Russian Science Foundation, project number 22-24-00610, <https://rscf.ru/project/22-24-00610/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспертиза Комиссии по биоэтике ИПЭЭ РАН. Номера протоколов, соответствующих нашим заявкам в комиссию по биоэтике: № 44 от 29.03.2021 и 44а от 08.04.2022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бокштейн Ф. М., Кучерук В. В., Тушикова Н. В. Использование территории и взаимоотношения желтых сусликов (*Citellus fulvus* Licht., 1823) // Экология. 1989. Т. 5. С. 45–50.
- Васильева Н. А., Лупырев А. А., Васильев Н. С. Суточная активность желтого суслика *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae): первый опыт инструментального исследования // Известия РАН. Сер. Биологическая 2023. № 6. С. 659–668.
- Васильева Н. А., Савинецкая Л. Е., Чабовский А. В. Крупный размер тела и короткий период наземной активности не препятствуют быстрому росту желтого суслика *Spermophilus fulvus* // Зоол. Журн. 2009. Т. 88. № 3. С. 339–343.
- Васильева Н. А., Чабовский А. В. Принятие репродуктивных решений в контексте “быстрого” жизненного цикла (на примере желтого суслика *Spermophilus fulvus*) // Жур. Общ. Биол. 2017. Т. 78. № 1. С. 3–14.
- Громов И. М., Ербаева М. А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб. 1995. 522 с.
- Лисовский А. А., Шефтель Б. И., Савельев А. П., Ермаков О. А., Козлов Ю. А., Смирнов Д. Г., Стахеев В. В., Глазов Д. М. Млекопитающие России: список видов и прикладные аспекты. Сборник трудов Зоологического музея МГУ. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2019. Т. 56. 191 с.
- Материалы к познанию фауны нижнего Поволжья. Вып. IV / Ред. Траут И. И., Орлов Е. И. Саратов: Изд. отдела применения Нилов. 1929. 122 с.
- Млекопитающие Казахстана. Т. 1 / Ред. Слудский А. А. Алма-Ата: Наука. 1969. 455 с.
- Попов С. В., Клинов А. Б. Устойчивость индивидуальных характеристик поведения монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) в тесте “выход из укрытия” // Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. 2009. Т. 59. С. 750–756.
- Слудский А. А., Варшавский С. Н., Исмагилов М. И., Капитонов В. И., Шубин И. Г. Млекопитающие Казахстана / Ред. Слудского А. А. А.: Наука. 1969. С. 236.
- Шилов И. А. Экология. М.: Высшая школа. 2001. 512 с.
- Шилова С. А. Земляные белки // Природа. 2004. № 3. С. 41–48.
- Шилова С. А. Пространственная и социальная организация земляных белок (р. *Spermophilus*, *Xerus*, *Sunomys*) как модель эколого-этологических исследований // Усп. Совр. Биол. 2000. Т. 120. № 6. С. 559–572.
- Aliperti J. R., Davis B. E., Fangue N. A., Todgham A. E., Van Vuren D. H. Bridging animal personality with space use and resource use in a free-ranging population of an asocial ground squirrel // Anim. Behav. 2021. V. 180. P. 291–306.
- Armitage K. B. Individual differences in the behavior of juvenile yellow-bellied marmots // Behav. Ecol. Soc. 1986. V. 18. P. 419–424.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. “Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4.” J. Stat. Softw. 2015. V. 67. P. 1–48.
- Bell A. M., Hankison S. J., Laskowski K. L. The repeatability of behaviour: a meta-analysis // Anim. Behav. 2009. V. 77. P. 771–783.
- Buchanan K., Burt de Perera T., Carere C., Carter T., Hailley A., Hubrecht R., Jennings D., Metcalfe N., Pitcher T., Peron F., Sneddon L., Sherwin C., Talling J., Thomas R., Thompson M. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching // Anim. Behav. 2012. V. 83. P. 301–309.
- Budaev S. V. Sex differences in the Big Five personality factors: Testing an evolutionary hypothesis // Pers. Individ. Differ. 1999. V. 26. P. 801–813.
- Careau V., Montiglio P. O., Garant D., Pelletier F., Speakman J. R., Humphries M. M., Réale D. Energy expenditure and personality in wild chipmunks // Behav. Ecol. Soc. 2015. V. 69. P. 653–661.
- Chapple D. G., Simmonds S. M., Wong B. B. Can behavioural and personality traits influence the success of unintentional species introductions? // Trends Ecol. Evol. 2012. V. 27. P. 57–64.
- Clary D., Skyner L. J., Ryan C. P., Gardiner L. E., Anderson W. G., Hare J. F. Shyness–Boldness, but not Exploration, Predicts Glucocorticoid Stress Response in Richardson’s Ground Squirrels (*Urocitellus richardsonii*). // Ethology. 2014. V. 120. P. 1101–1109.
- Dammhahn M., Dingemanse N. J., Niemelä P. T., Réale D. Pace-of-life syndromes: a framework for the adaptive integration of behaviour, physiology and life history // Behav. Ecol. Soc. 2018. V. 72. P. 1–8
- Debecker S., Sanmartín-Villar I., de Guinea-Luengo M., Cordero-Rivera A., Stoks R. Integrating the pace-of-life

- syndrome across species, sexes and individuals: covariation of life history and personality under pesticide exposure // *J. Anim. Ecol.* 2016. V. 85. P. 726–738.
- Dobson F. S. Environmental influences on sciurid mating systems // *The Biology of Ground-Dwelling Squirrels* / Eds Murie J. O., Michener G. R. Lincoln, L.: Univ. Nebraska Press. 1984. P. 227–249.
- Dosmann A. J., Brooks K. C., Mateo J. M. Within-individual correlations reveal link between a behavioral syndrome, condition, and cortisol in free-ranging Belding's ground squirrels. // *Ethology.* 2015a. V. 121. P. 125–134.
- Dosmann A. J., Brooks K. C., Mateo J. M. Evidence for a mechanism of phenotypic integration of behaviour and innate immunity in a wild rodent: implications for animal personality and ecological immunology // *Anim. Behav.* 2015b. V. 101. P. 179–189.
- Gosling S. D. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? // *Psychol. Bull.* 2001. V. 127. P. 45–86.
- Holekamp K. E. Proximal causes of natal dispersal in Belding's ground squirrels (*Spermophilus beldingi*). // *Ecol. Monogr.* 1986. V. 56. P. 365–391.
- Hothorn T., Hornik K., van de Wiel M. A., Zeileis A. Implementing a class of permutation tests: The coin package // *Journal of Statistical Software.* 2008. V. 28 P. 1–23.
- Hurst-Hopf J. S., Monroy Montemayor M. P., Leonardi N. N., Nunes S. Juvenile social play predicts docility in Belding's ground squirrels // *Behav. Ecol. Soc.* 2023. V. 77. P. 62.
<https://doi.org/10.1007/s00265-023-03341-7>
- Marks K. A., Vizconde D. L., Gibson E. S., Rodriguez J. R., Nunes S. Play behavior and responses to novel situations in juvenile ground squirrels // *J. Mammal.* V. 2017. V. 98. P. 1202–1210.
- Martin J. G., Réale D. Temperament, risk assessment and habituation to novelty in eastern chipmunks, *Tamias striatus* // *Anim. Behav.* 2008. V. 75. P. 309–318.
- Mella V. S. A., Ward A. J. W., Banks P. B., McArthur C. Personality affects the foraging response of a mammalian herbivore to the dual costs of food and fear // *Oecologia.* 2015. V. 177. P. 293–303.
- Michener G. R. Age, sex and species differences in the annual cycles of Ground-Dwelling Squirrels: implications for sociality. // *The Biology of Ground-Dwelling Squirrels* / Eds Murie J. O., Michener G. R. Lincoln, L.: Univ. Nebraska Press. 1984. P. 295–320.
- Montiglio P. O., Garant D., Pelletier F., Réale D. Personality differences are related to long-term stress reactivity in a population of wild eastern chipmunks, *Tamias striatus* // *Anim. Behav.* 2012. V. 84. P. 1071–1079.
- Ortiz-Jimenez C. A., Michelangeli M., Pendleton E., Sih A., Smith J. E. Behavioural correlations across multiple stages of the antipredator response: do animals that escape sooner hide longer? // *Anim. Behav.* 2022. V. 185. P. 175–184.
- Petelle M. B., Martin J. G., Blumstein D. T. Heritability and genetic correlations of personality traits in a wild population of yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*) // *J. Evol. Biol.* 2015. V. 28. P. 1840–1848.
- Petelle M. B., McCoy D. E., Alejandro V., Martin J. G., Blumstein D. T. Development of boldness and docility in yellow-bellied marmots // *Anim. Behav.* 2013. V. 86. P. 1147–1154.
- Qu J., Fletcher Q. E., Réale D., Li W., Zhang Y. Independence between coping style and stress reactivity in plateau pika // *Physiol. Behav.* 2018. V. 197 P. 1–8.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing. 2022. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Réale D., Gallant B. Y., Leblanc M., Festa-Bianchet M. Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behaviour and life history // *Anim. Behav.* 2000. V. 60. P. 589–97.
- Réale D., Garant D., Humphries M. M., Bergeron P., Careau V., Montiglio P. O. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level // *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2010. V. 365. P. 4051–4063.
- Réale D., Reader S. M., Sol D., McDougall P. T., Dingemanse N. J. Integrating animal temperament within ecology and evolution // *Biol. Rev.* 2007. V. 82. P. 291–318.
- Sih A., Bell A. M., Johnson J. C., Ziemba R. E. Behavioral syndromes: an integrative overview // *Q. Rev. Biol.* 2004. V. 79. P. 241–277.
- Slabbert J. M., Odendaal J. S. J. Early prediction of adult police dog efficiency – A longitudinal study // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1999. V. 64. P. 269–288.
- Sousa N., Almeida O. F. X., Wotjak C. T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents // *Genes Brain Behav.* 2006. V. 5. P. 5–24.
- Stankowich T., Blumstein D. T. Fear in animals: a meta-analysis and review of risk assessment // *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2005. V. 272. P. 2627–2634.
- Stoffel M. A., Nakagawa S., Schielzeth H. rptR: Repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models // *Methods Ecol. Evol.* 2017. V. 8. P. 1639–1644.
- Thorington Jr. R. W., Koprowski J. L., Steele M. A., Wharton J. F. *Squirrels of the world.* JHU Press, Maryland. 2012. 472 p.
- Uher J. Comparative personality research: methodological approaches // *Eur. J. Pers.* 2008. V. 22. P. 427–455.
- Vasilieva N. A., Savinetskaya L. E., Tchabovsky A. V. Juvenile survival curves in a solitary ground squirrel with a prolonged hibernation: effects of individual characteristics, environment, and maternal investment. // *Current Zoology.* 2022.
<https://doi.org/10.1093/cz/zoac097>
- Vasilieva N. A., Tchabovsky A. V. A shortage of males causes female reproductive failure in yellow ground squirrels // *Science Advances.* 2015. V. 1. № 9. e1500401.
- Vasilieva N. A., Tchabovsky A. V. Timing is the only thing: Reproduction in female yellow ground squirrels

- (*Spermophilus fulvus*) // Can. J. Zool. 2014. V. 92. P. 737–747.
- Vasilieva N. A., Tchabovsky A. V. Early predictors of female lifetime reproductive success in a solitary hibernator: Evidence for “silver spoon” effect // Oecologia. 2020. V. 193. P. 77–87.
- Vonk J., Weiss A., Kuczaj S. A. (Eds). Personality in non-human animals. Berlin, Germany: Springer International Publishing. 2017. 326 p.
- Waterman J. M. Male mating strategies in rodents // Rodent societies: an ecological and evolutionary perspective / Eds Sherman P. W., Wolff J. O. Chicago: Univ. Chicago Press. 2007. P. 27–41.
- Weiss A. Personality traits: A view from the animal kingdom. J. Personality // 2018. V. 86. P. 12–22.
- Wolf M., van Doorn G. S., Leimar O., Weissing F. J. Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities // Nature. 2007. V. 447. P. 581–584.

Measuring Docility, Boldness, and Exploration in the Free-Living Yellow Ground Squirrel *Spermophilus fulvus* Licht. (Sciuridae)

© 2024 N. A. Vasilieva^{a, *}, M. O. Markina^b, and N. S. Vasiliev^{a, b}

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bFaculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: ninavasilieva@gmail.com

Studying intraspecific variation in animal behavior is one of the key trends in recent biology. Comparative behavioral studies of different species require developing an adequate methodology for every new species. We performed three types of behavioral tests with juveniles of the yellow ground squirrel, a large hibernating rodent. Docility tests with an estimation of the time and intensity of the animal locomotor activity in a bag showed low repeatability and appeared to be inappropriate for this species since most of the pups demonstrated freezing behavior. Boldness tests with an action camera installed near the squirrel's burrow were more promising, but the juveniles still did not emerge aboveground for a long time after they escaped to their burrows, remained vigilant, and did not explore the new object. Test results indicate that yellow ground squirrels are very shy and cautious, which may be a persistent behavioral trait of this species.

Keywords: behavioral tests, juvenile behavior, ground squirrels, yellow ground squirrel

УДК: 575.174.015.3:599.735.53

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ РЕЗКОГО СНИЖЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ САЙГАКА (*SAIGA TATARICA TATARICA*) В ПОПУЛЯЦИИ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ПРИКАСПИЯ: СРАВНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ И МУЗЕЙНЫХ ОБРАЗЦОВ ПО мтДНК И МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

© 2024 г. Н. В. Кашинина*, @, А. А. Луцкекина*, П. А. Сорокин*, М. В. Холодова*

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

@E-mail: nadezda.kashinina@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.10.2023 г.

После доработки 19.02.2024 г.

Принята к публикации 19.02.2024 г.

Численность сайгака (*Saiga tatarica tatarica*) в популяции Северо-Западного Прикаспия в середине прошлого века достигала почти 800 тысяч особей. В конце XX в. произошло ее резкое сокращение, и к 2015 году численность составила около пяти тысяч. В статье представлены результаты анализа полиморфизма микросателлитных локусов и контрольного региона мтДНК, полученные для музейной выборки сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия, собранной на пике численности в 50-е годы XX в. Проведено сравнение с данными для образцов сайгака периода депрессии численности 1999–2016 гг. Показатели разнообразия контрольного региона мтДНК образцов музейной и современной выборок сайгака отличались незначительно. Наиболее существенным последствием резкого снижения численности в популяции оказалось значительное увеличение коэффициента инбридинга (Fis), рассчитанного по микросателлитным локусам яДНК.

Ключевые слова: сайгак, генетическое разнообразие, мтДНК, контрольный регион, микросателлитные локусы

DOI: 10.31857/S1026347024040067, EDN: VHOVBT

Существенное и длительное снижение численности популяций и связанные с этим процессы (известные, как “прохождение через бутылочное горлышко”), в ряде случаев могут приводить к значительной утрате генетического разнообразия животных (Avice, 2000; Неверова и др., 2020). В популяциях, прошедших через “бутылочное горлышко”, эффективная численность (N_e) может значительно снижаться, что, в свою очередь, может негативно отражаться на генетическом разнообразии и приводить к повышению вероятности возникновения инбридинга. В результате возникновения инбредной депрессии существует большой риск снижения репродуктивной способности, ухудшения сопротивляемости особей к заболеваниям, повышения смертности молодняка, что в дальнейшем может привести к неблагоприятным последствиям для существования той или иной популяции (Soule, 1987; Luikart *et al.*, 1998; Приходько, 2003; Frankham, 2005; Willi *et al.*, 2006; Pekkala *et al.*, 2014; Bundgaard *et al.*, 2021).

Сайгак (*Saiga tatarica*) на протяжении всего своего существования испытывал колебания численности (Банников и др., 1961; Кириков, 1966; Жирнов, 1998а; Жирнов и др., 1998а; Жирнов, Максимук, 1998). Его ареал еще в начале XVIII в. простирался от причерноморских степей на западе до аридных территорий Китая на востоке (Кириков, 1966). К началу XX в. под воздействием различных антропогенных и природных факторов сайгак сохранился только в нетронутых человеком самых глухих уголках Северо-Западного Прикаспия и Туранской низменности, а общая его численность сократилась предположительно до 1000 особей (Банников и др., 1961). К середине XX в. в результате принятия жестких охранных мер сайгак восстановил свое распространение на территории Евразии, и заселил пригодные для постоянного обитания участки аридных регионов, сформировав пять популяций: четыре трансграничные номинативного подвида (*S. t. tatarica*) – Бетпакдалинскую, Уральскую, Устьюртскую (на территории

Казахстана) и Северо-Западного Прикаспия (на территории России); и одну монгольского под-вида — *S. t. mongolica* (= *S. borealis*), населяющую Западную Монголию (Банников и др., 1961, Жирнов и др., 1998а; Каримова и др., 2021).

Последнее критическое снижение численности сайгака произошло в конце 1990-х гг. в результате распада Советского Союза, и последовавшим за этим многолетним экономическим кризисом и ростом браконьерства по всему ареалу. В 1995 г. было принято решение о включении вида в Приложение II СИТЕС, а в 2002 г. — в Красный список МСОП (IUCN) как “критически угрожаемый вид”, и в Приложение II Конвенции по сохранению мигрирующих видов диких животных (CMS). Низкий уровень численности сайгака на территории России послужил основанием для включения вида в 2021 г. в Красную книгу Российской Федерации (Красная книга..., 2021). В нашей стране в целях повышения эффективности охраны редких и находящихся под угрозой исчезновения видов, в 2014 г. утверждена Стратегия сохранения таких видов (Стратегия..., 2014), в которой особое место отведено генетическому мониторингу, и которому также уделяется большое внимание в ряде программ по сохранению отдельных редких видов (Стратегия..., 2010, 2021а; Рожнов и др., 2010, 2018 и др.). Исследования генетического разнообразия вида также являются неотъемлемой частью Стратегии по сохранению сайгака (*Saiga tatarica* Linnaeus, 1766) в Российской Федерации (Стратегия..., 2021б).

Популяция сайгака Северо-Западного Прикаспия, обитающая в России, населяет юго-западные районы Астраханской области (Лиманский район) и восточные районы Республики Калмыкия (Яшкульский и Черноземельский районы). Считается, что эта популяция в настоящее время изолирована от других (Каримова и др., 2021). Ее численность, несмотря на все предпринимаемые меры охраны и отмечающуюся тенденцию увеличения количества животных (Богун, 2019), остается на стабильно невысоком уровне. В конце 1950-х гг. численность сайгака этой популяции насчитывала около 800 тыс. особей (Банников и др., 1961), но уже к концу 1980-х гг. из-за промысла и интенсивного освоения степных территорий ее численность сократилась до 150–160 тыс. (Жирнов, Максимук, 1998). К 2015 г. по экспертным оценкам в популяции насчитывалось всего 4–5 тыс. особей (Каримова, Лушекина, 2018). Таким образом, с 1998 г. по 2016 г. общая численность сайгака в популяции Северо-Западного Прикаспия сократилась в 40 раз (Каримова, Лушекина, 2018), а эффективная численность популяции уменьшилась практически в 80 раз (Kashinina *et al.*, 2023).

Рога сайгака, имеющиеся только у самцов, издавна используются в традиционной китайской медицине. Поэтому браконьерская охота на взрослых

самцов — до недавнего времени считалась главной причиной нарушения половой структуры популяций (Близнюк, 1995; 2009; Жирнов, 1998а, 1998б; Жирнов, Максимук, 1998; Каримова и др., 2020). Из-за целенаправленного отстрела доля половозрелых самцов в популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия с середины 80-х гг. прошлого века до 2002 г. сократилась с 14.9–30.4% (Близнюк, 2009) до 1% (по экспертным оценкам), при пороговом значении в 2.5% (Milner-Gulland *et al.*, 2003; Каримова, Лушекина, 2018). Из-за такого критически низкого процента самцов большинство самок в начале второго тысячелетия оставались яловыми (до 63.8% молодых и 28.3% взрослых), хотя обычно для этого вида при нормальном соотношении полов в размножении участвует более 90% всех самок (Близнюк, 2009).

Все эти неблагоприятные события в демографической истории популяции могли иметь негативные последствия для генетического разнообразия сайгака, обитающего на территории Северо-Западного Прикаспия.

В недавней работе (Kashinina *et al.*, 2023) было описано генетическое разнообразие в популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия, где сравнивались образцы двух временных промежутков: конец 1990-х гг., когда началось стремительное снижение численности этой популяции, и в период ее минимальной численности — 3–5 тыс. особей (2010, 2011 и 2016 гг.). Значимых различий в показателях разнообразия обнаружено не было, генетическая дистанция между этими выборками оказалась равна нулю, но показан высокий уровень разнообразия контрольного региона мтДНК ($H = 0.91$, $\pi = 0.03$), и довольно низкий уровень разнообразия микросателлитных локусов ядерной ДНК (ядДНК) ($H_o = 0.422$, $H_e = 0.514$), а кроме того, повышенный коэффициент инбридинга ($F_{is} = 0.181$) (Kashinina *et al.*, 2023).

Для более полного понимания существования каких-либо генетических последствий последнего резкого снижения численности сайгака в популяции Северо-Западного Прикаспия возникла необходимость определения генетического разнообразия животных более раннего исторического периода: именно в то время, когда их численность была особенно высокой, и последующего сравнения результатов, полученных для музейных и современных образцов.

Цель работы: Выявить возможные последствия резкого снижения численности сайгака в популяции Северо-Западного Прикаспия на полиморфизм контрольного региона мтДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК при сравнении музейных образцов, собранных на пике восстановления численности популяции в середине XX в., и на современном этапе продолжающейся ее депрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы для молекулярно-генетического анализа были получены из Зоологического музея МГУ, где было отобрано 30 (16 самок и 14 самцов) проб стружки из нижней челюсти сайгаков. Все образцы были собраны в 1957 и 1958 гг. на территории Республики Калмыкия в период, когда в популяции Северо-Западного Прикаспия в период размножения насчитывалось 540 тыс. особей. Характеристика образцов представлена в табл. 1. В связи с сильной деградацией ДНК из анализа мтДНК было исключено 7 образцов ($n = 23$), а из анализа микросателлитных локусов — 1 образец ($n = 29$).

Первичная пробоподготовка проводилась на территории Зоологического музея МГУ. Перед началом выделения ДНК кости были протерты дистиллированной водой, а затем 70% спиртом от поверхностных загрязнений. Наиболее подходящий для взятия материала участок кости шлифовался с использованием ручной дрели Ргоххон (Германия), затем кость повторно промывали водой для устранения поверхностной костяной крошки. На месте шлифованной области с помощью дрели и насадок ставили кость до состояния костной муки. Около 100 мг костной муки от каждого образца собирали в отдельные пробирки и хранили в холодильнике.

Все дальнейшие лабораторные работы и статистические расчеты были выполнены в Кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, входящего в состав ЦКП “Инструментальные методы в экологии”.

Для предотвращения контаминации и кросс-контаминации выделение ДНК проводилось в отдельном ПЦР-боксе, предварительно обработанным раствором DNA-ExitusPlus (AppliChem, Германия), затем — дистиллированной водой, и прожженным ультрафиолетом в течение 15–20 мин. Образцы выделялись в 4 партии, после каждой из них проводилась такая же обработка.

ДНК из костной муки была выделена с помощью набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, Германия) с использованием протокола “Isolation of Total DNA from Bones and Teeth” с некоторыми модификациями: увеличением времени лизиса до суток и повторным внесением протеиназы К через 12 ч. Для исключения возможности контаминации постоянно ставился отрицательный контроль выделения и ПЦР-амплификации.

Для сравнения полученных данных было использовано 86 образцов, взятых от сайгаков, собранных в 1999–2016 гг. на территории Северо-Западного Прикаспия, и проанализированных нами ранее. Номера этих гаплотипов в ГенБанке (GenBank, NCBI): MT150278–MT150328 (Kashinina *et al.*, 2023).

В качестве молекулярных маркеров использовались: фрагмент контрольного региона мтДНК,

а также восемь аутосомных микросателлитных локусов ядерной ДНК, разработанных ранее специально для сайгака (Nowak *et al.*, 2013), и использованных для анализа современного генетического разнообразия сайгака (Kashinina *et al.*, 2023).

Амплификацию контрольного региона мтДНК проводили в 20 мкл общей реакционной смеси, содержащей 4 мкл 5x Master Mix (Диалат, Россия) с добавлением 0.5 ед. полимеразы SmartTAQ (Диалат, Россия), прямого FDL (5'-CCACTATCAACACCCAAAGCTG-3') (Sorokin *et al.*, 2011) и обратного gslsr (5'-GAGATGGCCCTGAAGAAAGAA-3') праймеров. С помощью этой пары праймеров удалось амплифицировать часть контрольного региона мтДНК — левый гипервариабельный участок длиной 448 п.н. Амплификация проводилась при следующих условиях: I — 94°C — 3 мин; II — 94°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 1 мин 20 с (40 циклов); III — 72°C — 6 мин. Очистку ПЦР-продукта проводили методом осаждения в 96% этиловом спирте с ацетатом натрия. Визуализацию результатов ПЦР осуществляли при проведении электрофореза в 1.5% агарозном геле в TBE буфере, с добавлением бромистого этидия. Определение нуклеотидных последовательностей продукта амплификации выполняли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора реактивов Big Dye Terminator kit 3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) с прямым и обратным праймерами, использованными при ПЦР-амплификации.

Амплификацию восьми микросателлитных локусов (STa14, STa20, STa26, STa30, STa39, STa41, STa43, STa47) осуществляли в мультиплексах, при режиме, описанном ранее (Kashinina *et al.*, 2023). Фрагментный анализ продуктов амплификации выполняли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием маркера молекулярного веса СД-450 (Синтол, Россия). В качестве положительного контроля и для калибровки использовали 8 современных образцов, данные для которых также были получены ранее. Генотипы контрольных образцов из современной выборки полностью совпадали с данными, полученными ранее (Kashinina *et al.*, 2023). Для уменьшения ошибок из-за выпадения аллелей и появления ложных аллелей амплификацию каждого локуса проводили от 4 до 6 раз (Taberlet *et al.*, 1996; 1999). При получении гетерозиготы у образца при трех независимых амплификациях из четырех, особь принималась за гетерозиготную. Если при четырех амплификациях вероятность гетерозиготы составляла 50%, то проводили еще два. В этом случае гетерозигота принималась при четырех случаях из шести. Таким образом, только у одного музейного образца сайгака из 30 не удалось определить микросателлитный профиль.

Таблица 1. Характеристика образцов *S. tatarica* из Зоологического музея МГУ, отобранных для генетического анализа

№ образца	Год сбора	Место сбора. Коллектор	Пол, возраст	Контрольный регион	Микро-сателлитные локусы	№ гаплотипа в ГенБанке
S61239	1957	Калмыцкие степи, Белозерный. А. Банников	m, ad		*	
S61240	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	m, ad	*	*	OR227835
S61241	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	f, ad		*	
S61242	1957	Калмыкия, Белозерный-Полынный. А. Банников	m, sub.ad		*	
S61244	1957	Калмыкия, окр. Меклеты. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227839
S61246	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	f, ad	*	*	OR227836
S61247	1957	Калмыкия, окр. Адыка. А. Банников	f, sub.ad	*	*	OR227837
S61248	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	f, ad	*	*	OR227837
S61249	1957	Калмыкия, с/з Полынный. А. Банников	f, ad	*	*	OR227838
S61250	1957	Калмыкия, окр. Адыка. А. Банников	F	*	*	OR227839
S61251	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227840
S61252	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227839
S61253	1957	Калмыкия, окр. Северного. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227838
S61254	1957	Калмыкия, Черноземельск. А. Банников	M	*	*	OR227841
S61255	1957	Калмыкия. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227842
S61256	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227839
S61257	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	m, sub.ad	*	*	OR227843
S61258	1957	Калмыкия, окр. Сарпы. А. Банников	m, sub.ad		*	
S61260	1957	Калмыкия. А. Банников	M	*	*	OR227839
S61261	1957	Калмыкия. А. Банников	M		*	
S61262	1957	Калмыкия. А. Банников	F	*	*	OR227844
S61275	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227839
S61276	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227837
S61277	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227837

Окончание таблицы 1

№ образца	Год сбора	Место сбора. Коллектор	Пол, возраст	Контрольный регион	Микро-сателлитные локусы	№ гаплотипа в ГенБанке
S61278	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227845
S61279	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227845
S61280	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227837
S61281	1958	Калмыкия. Фандеев	F			
S61282	1958	Калмыкия. Фандеев	F	*	*	OR227846
S61283	1958	Калмыкия. Фандеев	F		*	

Примечание. m — самцы; f — самки; ad — взрослое животное; sub.ad — молодое животное; знаком “*” обозначены получившиеся маркеры для каждого образца.

Статистический анализ

Анализ контрольного региона мтДНК. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли вручную с помощью программы Bioedit 7.1.9 (Hall, 1999). В программе Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier, Lischer, 2010) были рассчитаны показатели внутрипопуляционной изменчивости — гаплотипическое (генное, H) и нуклеотидное (π) разнообразие, нуклеотидный состав, количество изменчивых сайтов, транзиций/трансверсий, был проведен тест на нейтральность Таджимы (Tajima's D) (Tajima, 1989a, 1989b), а также рассчитан индекс Харпендинга (raggedness index, r) для оценки типа экспансии. Для построения медианных сетей гаплотипов контрольного региона мтДНК использовали программу Network 10 (Bandelt *et al.*, 1999). Последовательности контрольного региона мтДНК музейных образцов сравнивали с таковыми, полученными нами ранее для образцов современных сайгаков (Kashinina *et al.*, 2023).

Анализ микросателлитных локусов ядерной ДНК. Результаты фрагментного анализа считывали с помощью программы Gene Mapper 4.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Для оценки количества кластеров (K) использовалось программное обеспечение STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Заданное число кластеров K было от 1 до 5, использованная модель — LOCPRIOR, количество повторностей MCMC (interaction) — 500 000. Продолжительность периода (burning period) составила 50 000, количество циклов — 4. Оптимальное число кластеров K было рассчитано согласно алгоритму, основанному на величине ΔK с помощью приложения STRUCTURE HARVESTER (Earl, von Holdt, 2012) по методу Эванно (Evanno *et al.*, 2005). Для расчета общего числа аллелей (Na), числа эффективных аллелей (Ne), наблюдаемой (Ho) и ожидаемой гетерозиготности (He), коэффициента инбридинга (Fis) были использованы макросы GenAlEx 6.4. (Peakall, Smouse, 2006; 2012) для Microsoft Office Excel. С помощью этой же программы по каждому локусу мы оценили

отклонения от равновесия Харди — Вайнберга (HWE) и значение коэффициента информативности (I) (Brown, Weir, 1983), являющегося показателем генетического разнообразия, эквивалентным индексу Шеннона-Уивера (Shannon-Weaver Index) в экологии. Вероятность наличия «нулевого аллеля» (Fnull) рассчитывали в программе CERVUS 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Контрольный регион мтДНК. Фрагмент последовательности контрольного региона мтДНК длиной 448 п.н. был получен для 23 музейных образцов. Нуклеотидный состав последовательностей контрольного региона был следующим: C — 21.68%, G — 14.78%, T — 30.10%, A — 33.44%, что соответствует митохондриальному геному. Из 46 полиморфных сайтов было выявлено 40 замен, из них 39 транзиций и одна трансверсия. Кроме того, в двух образцах было обнаружено две индели (длиной от 1 до 5 нуклеотидов).

По результатам выравнивания было описано 12 гаплотипов, четыре из них отмечены у 2–6 образцов, остальные были уникальными. Все гаплотипы были зарегистрированы в ГенБанке под номерами OR227835–OR227846. Для анализа филогенетических отношений была построена медианная сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК музейных образцов сайгака (рис. 1).

Гаплотипическое (H) и нуклеотидное (π) разнообразие в выборке музейных образцов сайгака составило 0.893 ± 0.044 и 0.03 ± 0.016 соответственно.

Для того чтобы понять, повлияло ли последнее резкое снижение численности на генетическое разнообразие сайгака в популяции Северо-Западного Прикаспия, к выборке музейных образцов 1957–1958 гг. мы добавили современные (1999–2016 гг.) образцы сайгака ($n=86$), которые уже были проанализированы нами ранее (Kashinina *et al.*, 2023). Для сравнительного анализа последовательности контрольного региона мтДНК

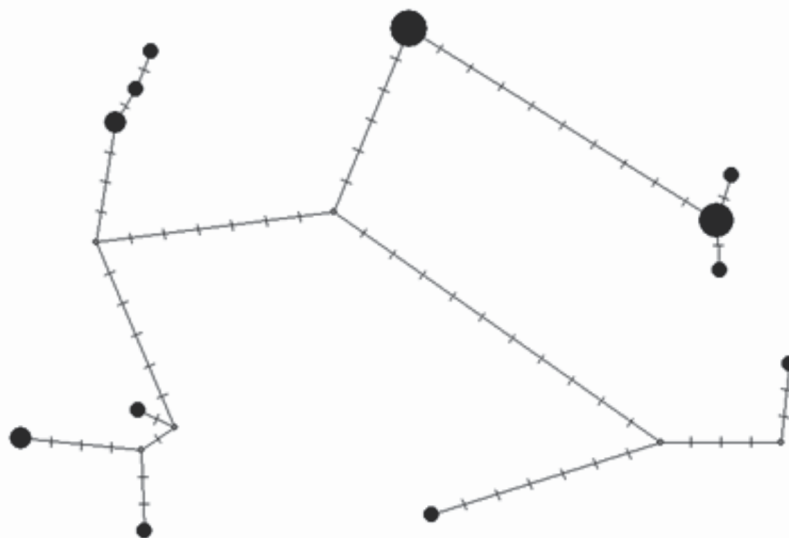


Рис. 1. Медианная сеть гаплотипов по фрагменту контрольного региона мтДНК (448 п.н.) музейных образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия. Мутационные позиции обозначены на ветвях вертикальными линиями, а диаметр кругов пропорционален числу образцов в гаплотипах.

современных образцов (длиной 920 п.н.) были обрезаны до 448 п.н.

Для установления филогенетических отношений между гаплотипами музейных и современных образцов была построена медианная сеть гаплотипов. Современных гаплотипов было 28. Суммарное количество гаплотипов — 31, девять из которых были общими для музейной и современной выборок, что составило около 29% от всех гаплотипов. Кроме того, для музейных образцов было описано три уникальных гаплотипа (рис. 2).

Уровни полиморфизма контрольного региона мтДНК музейных образцов сайгака, собранных на пике численности популяции во время ее восстановления (1957–1958 гг.), и современных образцов, собранных в период глубокой депрессии численности (1999, 2000, 2010, 2011 и 2016 гг.) отличались незначительно (табл. 2). Это может говорить о том, что последнее снижение численности не было критическим для этой популяции и не оказало заметного влияния на генетическое разнообразие материнских линий сайгака, обитающего на территории Северо-Западного Прикаспия. Интересно, что индекс Таджимы (табл. 2) был слабо положительным и недостоверным в обеих выборках, в популяции 1999–2016 гг. он был несколько выше.

Для популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия характерны широкие колебания численности. Например, значительное снижение численности сайгака было в начале прошлого столетия, о нем упоминают многие авторы (Банников и др., 1961; Жирнов, Максимук,

1998; Данилкин, 2005). При этом последующий рост численности популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия имел взрывной характер и был слишком коротким для того, чтобы отразиться на значении показателей полиморфизма контрольного региона мтДНК. Необходимо отметить, что для сайгака характерна наиболее высокая среди диких жвачных скорость восстановления численности. Практически все самки при нормальном соотношении полов участвуют в размножении, начиная репродуктивный период уже на первом году жизни, и приносят одного детеныша в первый год, и по два — в последующие (Банников и др., 1961). Кроме того, стоит обратить внимание на неравновесность исследованных нами выборок (23 музейных образца и 86 современных) и относительно небольшое количество проанализированных музейных образцов.

Форма графиков распределения частот парных нуклеотидных различий между гаплотипами (Mismatch distribution), отражающая историю демографических изменений, происходивших в популяциях (Rogers, Harpending, 1992; Rogers, 1995, 1997), имеет неоднородную структуру, включающую несколько пиков (рис. 3). Для обеих выборок был рассчитан индекс Харпендинга (raggedness index, r) (табл. 2). Статистически незначимое значение индекса Харпендинга (Harpending, 1994) подтверждает наличие пространственной экспансии, как для музейных, так и для современных образцов. Признаков демографической экспансии не наблюдалось.

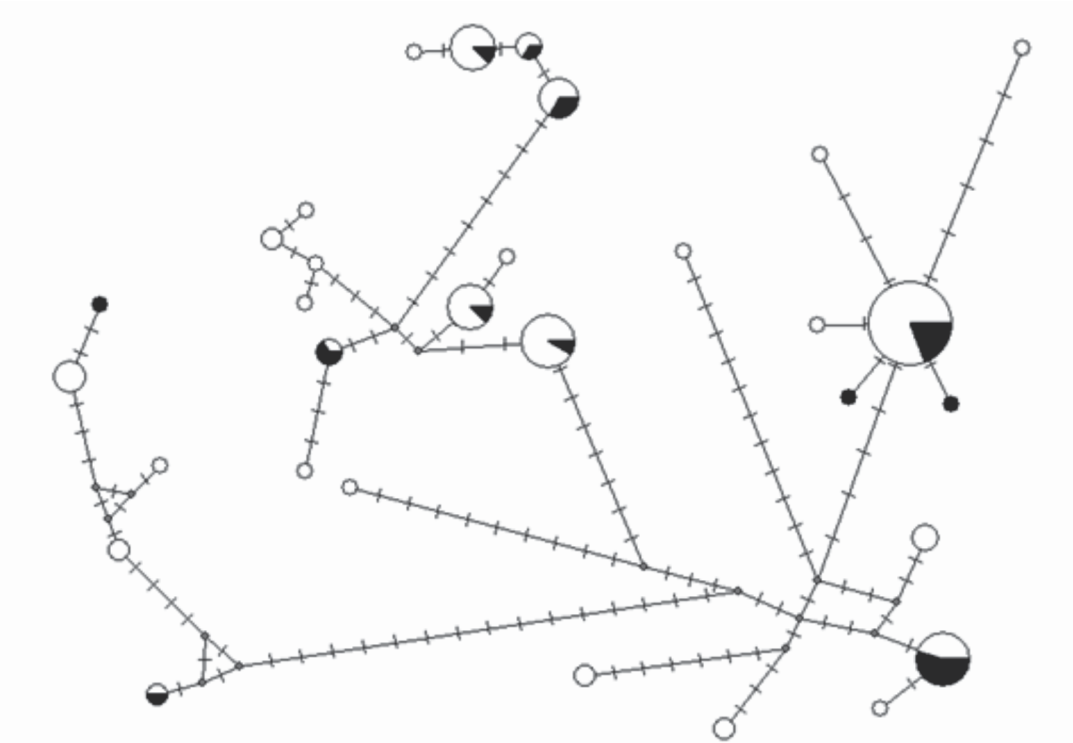


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия (448 п.н.). Черным цветом обозначены музейные образцы (1957–1958 гг.) Белым цветом обозначены современные образцы (1999–2016 гг.). Мутационные позиции обозначены на ветвях вертикальными линиями, а диаметр кругов пропорционален числу образцов в гаплотипах.

Соотношение кривых, построенных по наблюдаемым и моделируемым частотам парных различий для демографической и пространственной экспансии обеих выборок образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия, показано на рис. 3.

Наличие пространственной экспансии для музейных образцов и современной выборки сайгаков Северо-Западного Прикаспия хорошо подтверждает отсутствие изоляции этой популяции в прошлом, поскольку скорость мутирования мтДНК не позволяет отследить события, произошедшие полвека назад. Пространственная экспансия случалась в годы высокой численности, отмечавшейся в популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия. Так, в Европе в XVII–XVIII вв. сайгак заселял междуречье Дона и Волги, т. е. всю степную и пустынную зоны, достигая берегов Волги, а к середине XX в. на правобережье Волги он достиг возможных границ своего распространения. Будучи неплохими пловцами, сайгаки в состоянии преодолевать водные преграды, и известны случаи, когда они переплывали такие крупные реки, как Волга или Урал в их нижнем течении (Жиринов, 1982). В настоящее время ареалы популяций сайгака (в первую очередь это касается популяции Северо-Западного Прикаспия) пространственно

разобщены, однако при росте численности может происходить обмен животными между популяциями (Стратегия..., 2021).

Микросателлиты. Микросателлитный анализ был проведен для 29 музейных образцов сайгака.

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия для музейных и современных образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия

Выборка	Музейная	Современная
$H \pm S.E.$	0.911 ± 0.02	0.893 ± 0.044
$\pi \pm S.E.$	0.035 ± 0.017	0.032 ± 0.016
Tajima's D	0.703/0.81*	0.942/0.89*
Raggedness index (r) (гипотеза демографической экспансии)	0.06/0.036*	0.022/0.003*
Raggedness index (r) (гипотеза пространственной экспансии)	0.06/0.309*	0.022/0.566*

Примечание. H – гаплотипическое разнообразие; π – нуклеотидное разнообразие; S.E. – стандартная ошибка; Tajima's D – индекс Таджимы; Raggedness index (r) – индекс Харпендинга.
* Значение показателя/уровень статистической значимости (p).

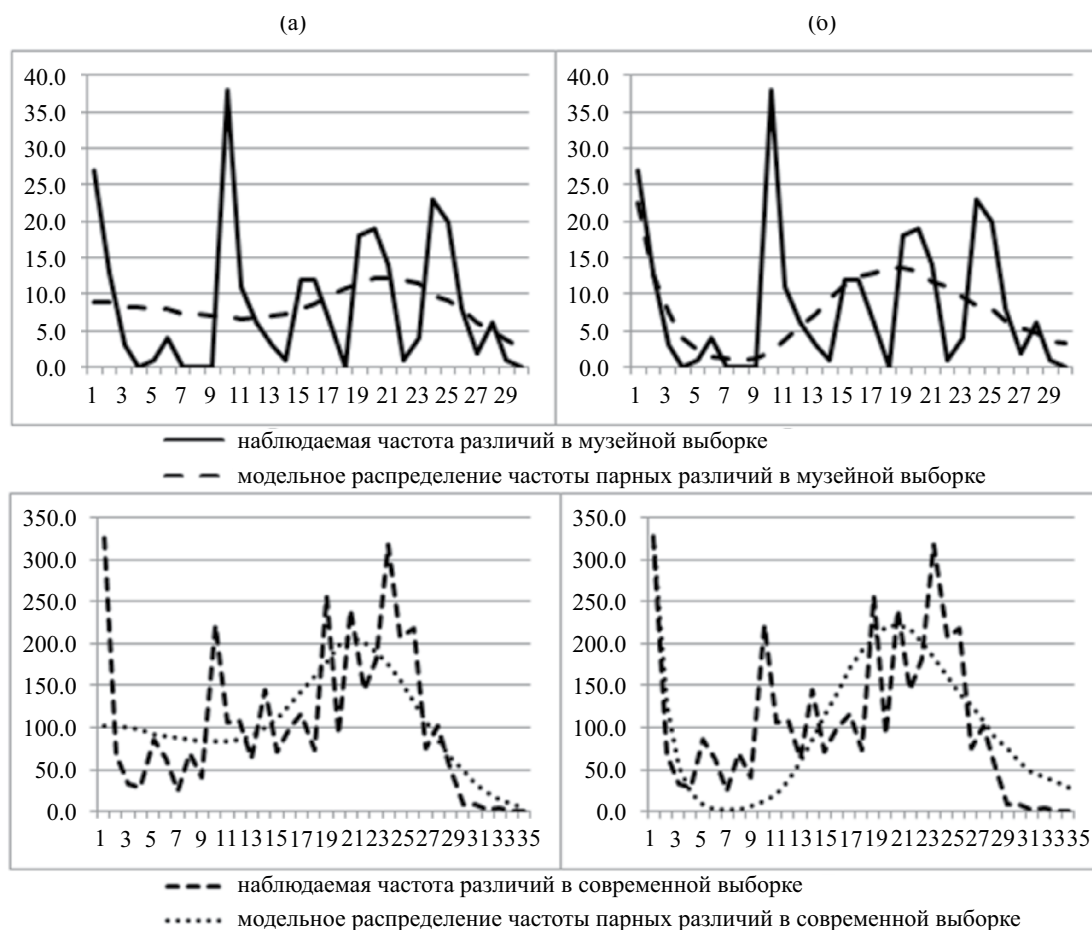


Рис. 3. Графики распределения частот (ось ординат) величин парных нуклеотидных различий (ось абсцисс) между гаплотипами фрагмента контрольного региона мтДНК (450 п.н.) сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия: а – для демографической и б – для пространственной экспансий.

Таблица 3. Показатели генетического разнообразия для каждого микросателлитного локуса музейных и современных образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия

Показатели	STa14	STa20	STa26	STa41	STa30	STa39	STa43	STa47
N	28/95	29/95	27/94	28/95	29/95	29/95	29/95	29/95
Na	2/2	2/4	3/6	8/9	2/2	6/7	7/8	3/3
Ne	1.88/1,96	1.11/1,21	2.09/2,41	4.83/5,15	1.49/1,47	3.11/3,38	4.31/4,03	1.15/1,40
I	0.66/0.68	0.20/0.35	0.84/1.03	1.75/1.79	0.51/0.50	1.43/1.43	1.62/1.63	0.29/0.56
Ho	0.54/0.41	0.10/0.19	0.70/0.49	0.75/0.76	0.21/0.13	0.48/0.67	0.76/0.48	0.14/0.24
He	0.47/0.49	0.1/0.17	0.52/0.59	0.79/0.81	0.33/0.32	0.68/0.70	0.77/0.75	0.13/0.29
Fis	-0.14/0.16	-0.06/-0.09	-0.35/0.16	0.05/0.06	0.37/0.61	0.29/0.04	0.01/0.36	-0.06/0.15
HWE	ns/ns	ns/ns	ns/**	ns/ns	*/**	*/ns	ns/**	ns/*
Fnull	-0.07/0.09	-0.02/-0.04	-0.16/0.1	0.03/0.03	0.23/0.43	0.15/0.03	0.01/0.22	-0.03/0.07

Примечание. N – количество образцов; Na – количество аллелей; Ne – количество эффективных аллелей; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; I – коэффициент информативности Шеннона; Fis – индекс фиксации; HWE – значения вероятности, полученные с помощью теста Харди–Вайнберга (ns = not significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$); Fnull – нуль-аллель. **Жирным** шрифтом выделены показатели для музейной выборки, без выделения – для современной, опубликованные ранее (Kashinina *et al.*, 2023).

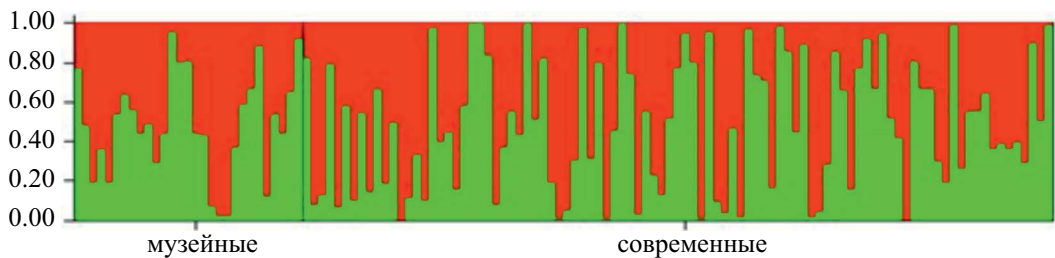


Рис. 4. Кластеризация образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия в программе STRUCTURE 2.3.4. (K = 2).

Средняя ожидаемая гетерозиготность выборки была равна 0.47, наблюдаемая – 0.46, но показатели различались по разным локусам (табл. 3).

Для того чтобы проверить наличие генетических последствий снижения численности сайгака с конца XX в., мы объединили две разновременные выборки: к музейным образцам ($n = 29$) были добавлены современные ($n = 86$)

При обработке данных, полученных с помощью программы STRUCTURE, оказалось, что согласно алгоритму, основанному на величине ΔK , оптимальное число кластеров для объединенной выборки $K = 2$. При этом распределение по выделенным программой кластерам в обеих выборках было сходным (рис. 4).

В результате анализа восьми микросателлитных локусов ядерной ДНК у музейных образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия установлен невысокий уровень изменчивости, сопоставимый с современным уровнем. По частотам аллелей выборки образцов отличались мало. Значение наблюдаемой гетерозиготности (H_o) было несколько выше у музейных образцов, а ожидаемой (H_e), наоборот, ниже (табл. 4).

Интересно, что аллельное разнообразие (AR) оказалось несколько выше в образцах современных сайгаков. Отклонение от Харди-Вайнберга было выявлено по двум локусам в музейной выборке, и по 4 другим локусам – в современной (Kashinina *et al.*, 2023). Основное отличие выборок музейных и современных образцов сайгака – существенная разница в средних значениях коэффициента инбридинга (Fis). У современного сайгака популяции Северо-Западного Прикаспия значение этого коэффициента оказалось на порядок выше, чем у сайгаков середины прошлого века в период высокой численности (0.18 и 0.02, соответственно).

В обеих выборках образцов в локусе STa30 был обнаружен существенный недостаток гетерозигот, что может быть результатом выпадения аллелей в музейном материале, или наличия нуль-аллелей (Fnull). Мы проверили наличие нуль-аллелей, их значения приведены в табл. 3. Оказалось, что Fnull для локуса STa30 составляет 0.23. Однако

исключение этого локуса из анализа не привело к изменению значений показателей гетерозиготности и порядок значений Fis не изменился (для музейной выборки он составил –0.04, а для современной – 0.12). Известно, что высокий уровень инбридинга во многих случаях сопровождается инбредной депрессией (Soule, 1987; Luikart *et al.*, 1998; Приходько, 2003; Frankham, 2005; Willi *et al.*, 2006; Pekkala *et al.*, 2014; Bundgaard *et al.*, 2021). Скорость падения численности сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия в конце XX в. – начале XXI в. настораживает. Как указывает в своей работе А. Куль с соавторами (Kuhl *et al.*, 2009), это одно из самых быстрых сокращений численности, зарегистрированных когда-либо для млекопитающих в мире. Особенно сильное опасение вызывает снижение эффективной численности (N_e). Используя формулу Райта, измененную для гаремных животных (Wright, 1949; Nomura, 2002), мы рассчитали эффективную численность сайгака исследуемой популяции за 1958 г. Она составила 331125 особей, при

Таблица 4. Средние показатели генетического разнообразия микросателлитных локусов, полученные для музейных и современных образцов сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия

Показатели $\pm$ S.E.	Музейные ($n = 29$)	Современные ($n = 86$)
Na	4.13 $\pm$ 0.86	5.13 $\pm$ 0.97
Ne	2.5 $\pm$ 0.51	2.63 $\pm$ 0.50
I	0.91 $\pm$ 0.22	0.1 $\pm$ 0.2
Ho	0.46 $\pm$ 0.1	0.42 $\pm$ 0.08
He	0.47 $\pm$ 0.1	0.51 $\pm$ 0.08
Fis	0.02 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.08
AR	4.09	4.3

Примечание. Na – количество аллелей; Ne – количество эффективных аллелей; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; I – коэффициент информативности Шеннона; Fis – коэффициент инбридинга; AR – аллельное разнообразие; S.E. – стандартная ошибка.

учетной численности в 540000, соотношение самцов и самок при этом было около 1:2.8 (Банников, 1961; Жирнов и др., 19986), а доля самцов в популяции — 26.3%. В современной популяции в период с 1998 по 2016 доля самцов составляла в среднем около 8% (минимальная 1.1%), при общей крайне небольшой численности животных. Вероятно, такое существенное снижение доли взрослых самцов и огромная разница в эффективной численности в разные исторические периоды популяции может объяснить полученное нами различие в коэффициентах инбридинга между двумя разновременными выборками, которое, в свою очередь, может быть самым первым сигналом о снижении генетического разнообразия сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительного анализа выборок музейных образцов сайгаков из популяции Северо-Западного Прикаспия, собранных на пике восстановления численности (середина XX в.), и современных, периода последней глубокой депрессии (конец XX — начало XXI вв.), по полиморфизму контрольного региона мтДНК выраженных различий выявлено не было. Анализ мтДНК обеих выборок выявил в истории данной популяции признаки наличия пространственной экспансии, что позволяет предположить, что в разные исторические периоды популяция сайгака, обитающая на территории России, не была полностью изолированной от других популяций *S. t. tatarica*. Большинство показателей полиморфизма микросателлитных локусов, включая уровень наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, в обеих выборках были сходными. Наиболее существенным последствием резкого снижения численности в популяции является значительное увеличение уровня инбридинга (Fis), рассчитанного по микросателлитным локусам яДНК. Такая большая разница в коэффициентах инбридинга между двумя разновременными выборками может быть самым первым сигналом о снижении генетического разнообразия сайгака из популяции Северо-Западного Прикаспия. Однако некоторое влияние на результаты могло оказать различие в объеме выборок.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников заповедника “Черные Земли” и заказника “Степной” за всестороннюю помощь в сборе образцов, а также Зоологический музей МГУ за возможность отобрать из коллекции материал для исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

В исследовании использовались музейные образцы сайгаков, собранные в 1950-е года, и хранившиеся в коллекции Зоологического музея МГУ, поэтому заключение комиссии по биоэтике не требуется.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (грант №17-04-01351).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банников А. Г., Жирнов Л. В., Лебедева Л. С. Фандеев А. А. Биология сайгака. М.: Изд-во сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов. 1961. 336 с.
- Близнюк А. И. Роль хозяйственного освоения территории в изменении численности калмыцкой популяции сайгака // Биота и природная среда Калмыкии. М.: Элиста. 1995. С. 222–244.
- Близнюк А. И. Сайгак калмыцкой популяции. Элиста: ЗАОр “НПП “Джангар”. 2009. 554 с.
- Богун С. А. Состояние популяции сайгака в заповеднике “Черные земли”: проблемы и перспективы ее сохранения // Научные труды Национального парка “Хвалынский”. Сборник научных статей VI Международной научно-практической конференции “Особо охраняемые природные территории: прошлое, настоящее, будущее”. Хвалынский, 17–18 октября 2019 г. Саратов: Изд-во ООО “Амирит”. 2019. С. 7–14.
- Данилкин А. А. Млекопитающие России и сопредельных регионов. Полорогие (Bovidae). М.: Т-во научных изданий КМК. 2005. 550 с.
- Жирнов Л. В. Возвращенные к жизни (экология, охрана и использование сайгаков). М.: Лесная промышленность. 1982. 224 с.
- Жирнов Л. В. Антропогенные факторы и их роль в регуляции численности популяций // Сайгак. Филогения, систематика, экология, охрана и использование. М.: Типография Россельхозакадемии. 1998. С. 252–264.
- Жирнов Л. В. Этологическая структура и социальная организация // Сайгак. Филогения, систематика, экология, охрана и использование. М.: Типография Россельхозакадемии. 1998. С. 144–155.
- Жирнов Л. В., Бекенов А. Б., Грачев Ю. А., Дуламцэрэн С., Луцкекина А. А. Ареал и его изменения

- в XX в. // Сайгак. Филогения, систематика, экология, охрана и использование. М.: Типография Россельхозакадемии. 1998. С. 60–66.
- Жирнов Л. В., Проняев А. В., Бекенов А. Б., Грачев Ю. А., Груздев А. Р. Структура популяций (половой и возрастной состав) // Сайгак. Филогения, систематика, экология, охрана и использование. М.: Типография Россельхозакадемии. 1998. С. 180–188.
- Жирнов Л. В., Максимук А. В. Численность сайгака в XX в. Северо-Западный Прикаспий // Сайгак. Филогения, систематика, экология, охрана и использование. М.: Типография Россельхозакадемии. 1998. С. 219–225.
- Каримова Т. Ю., Луцкекина А. А. Особенности пространственного размещения и этологической структуры популяции сайгака на территории Заказника “Степной” (Астраханская область) // Экосистемы: экология и динамика. 2018. Т. 2. № 1. С. 73–91.
- Каримова Т. Ю., Луцкекина А. А., Неронов В. М., Пюрвенова Н. Ю., Арылов Ю. Н. Биологические особенности популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия в периоды разной численности // Аридные экосистемы. 2020. Т. 26. № 4 (85). С. 51–58.
<https://doi.org/10.24411/1993-3916-2020-10118>
- Каримова Т. Ю., Луцкекина А. А., Неронов В. М. Современное состояние и ретроспективный анализ популяций сайгака в России и Казахстане // Аридные экосистемы. 2021. Т. 27. № 2 (87). С. 57–67.
<https://doi.org/10.24411/1993-3916-2021-10151>
- Кириков С. В. Промысловые животные, природная среда и человек. М.: Наука, 1966. 348 с.
- Красная книга Российской Федерации. Животные. М.: ФГБУ «ВНИИ Экологии». 2021. 1128 с.
- Неверова Г. П., Жданова О. Л., Фрисман Е. Я. Возникновение сложных режимов динамики численности в ходе эволюции структурированной лимитированной популяции // Генетика. 2020. Т. 56. № 6. С. 714–725.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820060065>
- Приходько В. И. Кабарга: происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. М.: ГЕОС. 2003. 443 с.
- Рожнов В. В., Спасская Н. Н., Чибилев А. А., Левыкин С. В., Орлов В. Н., Паклина Н. В., Позднякова М. К., Петрищев Б. И. Программа по восстановлению лошади Пржевальского в Оренбургской области. М. Т-во научных изданий КМК. 2010. 32 с.
- Рожнов В. В., Ячменникова А. А., Найденов С. В., Эрнандес-Бланко Х. А., Чистополова М. Д., Сорокин П. А., Добрынин Д. В., Сухова О. В., Поярков А. Д., Дронова Н. А., Третьяков С. А., Пхитиков А. Б., Пшегусов Р. Х., Магомедов М.-Р. Д. Мониторинг переднеазиатского леопарда и других крупных кошек. М.: Т-во научных изданий КМК. 2018. 121 с.
- Стратегия сохранения амурского тигра в Российской Федерации. [Электронный ресурс <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293723/4293723679.htm/> (дата обращения 24.05.2023)], 2010.
- Стратегия сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов в Российской Федерации на период до 2030 года. [Электронный ресурс <https://docs.cntd.ru/document/499077974> (дата обращения 24.05.2023)] 2014.
- Стратегия сохранения дальневосточного аиста в Российской Федерации. [Электронный ресурс <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/403175695/> (дата обращения 24.05.2023)]. 2021a.
- Стратегия сохранения сайгака в Российской Федерации. [Электронный ресурс <https://sudact.ru/law/rasporiazhenie-minprirody-rossii-ot-11082021-n-30-r/prilozhenie/> (дата обращения 24.05.2023)]. 2021b.
- Avise, J. C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge. 2000. 447 p.
- Bandelt H. J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Brown A., Weir B. Measuring genetic variability in plant populations // *Isozymes in Plant Genetics and Breeding* / Eds. Part A., Tanksley S. D., Orton T. J. Elsevier; Amsterdam. 1983. P. 219–239.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42226-2.50016-5>
- Bundgaard J., Loeschcke V., Schou M. F., Bijlsma K. R. Detecting purging of inbreeding depression by a slow rate of inbreeding for various traits: the impact of environmental and experimental conditions // *Heredity*, 2021. V. 127. P. 10–20.
<https://doi.org/10.1038/s41437-021-00436-7>
- Earl D. A., von Holdt B. M. STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method // *Conserv. Genet. Resour.* 2012. V. 4. P. 359–361.
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 2611–2620.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier L., Lischer H. E. L. Arlequin Suite ver. 3.5.1.2: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Frankham R. Conservation Biology: Ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity // *Heredity*. 2005. V. 95. P. 183–183.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800706>
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic acids symp. ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
- Harpending R. C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA

- mismatch distribution // *Hum. Biol.* 1994. V. 66. P. 591–600.
- Kashinina N. V., Lushchekina A. A., Sorokin P. A., Tarasyan K. K., Kholodova M. V. The modern state of the European saiga population (*Saiga tatarica tatarica*): mtDNA, DRB3 MHC gene, and microsatellite diversity // *Integr. Zool.* 2023. V. 00. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1111/1749-4877.12704>
- Kalinowski S. T., Taper M. L., Marshall T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment // *Mol. Ecology.* 2007. V. 16. P. 1099–1106.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kuhl A., Balinova N., Bykova E., Arylov Yu., Esipov A., Lushchekina A., Milner-Gulland E. J. The role of saiga poaching in rural communities: Linkages between attitudes, socio-economic circumstances and behavior // *Biol. Conserv.* 2009. V. 143. P. 1442–1449.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.009>
- Luikart G., Sherwin W. B., Steele B. M., Allendorf F. W. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 963–974.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00414.x>
- Milner-Gulland E. J., Bukreeva O. M., Coulson T. Lushchekina A. A., Kholodova M. V., Bekenov A. B., Grachev I. A. Reproductive collapse in saiga antelope harems // *Nature.* 2003. V. 422. P. 135–135.
<https://doi.org/10.1038/422135a>
- Nomura T. Effect size of populations with unequal sex ratio and variation in mating success // *J. Anim. Breed. Genet.* 2002. V. 119. P. 297–310.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2002.00347.x>
- Nowak C., Zuther S., Leontyev S. V., Geismar J. Rapid development of microsatellite markers for the critically endangered Saiga (*Saiga tatarica*) using Illumina_Miseq next generation sequencing technology // *Conserv. Genet. Resour.* 2013. V. 6. P. 159–162.
<https://doi.org/10.1007/s12686-013-0033-3>
- Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. P. 288–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pekkala N., Knott K. E., Kotiaho J. S., Nissinen K., Puurtinen M. The effect of inbreeding rate on fitness, inbreeding depression and heterosis over a range of inbreeding coefficients. *Evol. Appl.*, 2014. V. 7. № 9. P. 1107–1119.
<https://doi.org/10.1111/eva.12145>
- Pritchard K. J., Matthew Stephens, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.
<https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Rogers A. R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. № 3. P. 552–569.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727>
- Rogers A. R. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion // *Evolution.* 1995. V. 49. № 4. P. 608–615.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1995.tb02297.x>
- Rogers A. R. Population structure and modern human origin // *Progress in population genetics and human evolution.* N.Y.: Springer-Verlag. 1997. P. 55–79.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2609-1_4
- Soulé M. E. Viable populations for conservation. Cambridge, Univ. Press. 1987. 204 pp.
- Sorokin P. A., Soldatova N. V., Lukarevskiy V. S., Kholodova M. V. Genetic diversity and relations of the Goitered Gazelle (*Gazella subgutturosa*) groups from Uzbekistan, Turkmenistan, and Azerbaijan: Analysis of the D-loop of mitochondrial DNA // *Biology Bulletin.* 2011. V. 38. № 6. P. 585–590.
<https://doi.org/10.1134/S1062359011060124>
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L. P., Bouvet J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. № 16. P. 3189–3194.
- Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap // *Trends Ecol. Evol.* 1999. V. 14. № 8. P. 323–327.
[https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01637-7](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01637-7)
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics.* 1989a. V. 123. P. 585–595.
<https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism // *Genetics.* 1989b. V. 123. P. 597–601.
<https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.597>
- Willi Y., van Buskirk J., Hoffmann A. A. Limits to the Adaptive Potential of Small Populations // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2006. V. 37. P. 433–458.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110145>
- Wright S. The genetical structure of populations // *Ann. Eugen.* 1949. V. 15. P. 323–354.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>

**Genetic consequences of the dramatic decline
in the north-west pre-caspian saiga (*Saiga tatarica tatarica*) population:
a comparison of modern and museum samples on mtDNA and microsatellite loci**

© 2024 N. V. Kashinina[@], A. A. Lushchekina, P. A. Sorokin, M. V. Kholodova

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Russia,

¹*19071 Moscow, Leninsky Prospekt, 33*

[@]*E-mail: nadezda.kashinina@yandex.ru*

The North-West Pre-Caspian saiga (*Saiga tatarica tatarica*) population numbers was about 800 thousand individuals in the middle of the last century. There was a dramatic decline at the end of the 20th century, and by 2015 this saiga population numbers and was about five thousand animals. Our paper presents the results of microsatellite loci and of the mtDNA control region analysis obtained for the museum saiga samples from the North-West Pre-Caspian population, collected at the peak of their numbers in the 1950s. We compared these data with our previous results for the samples collected during the population depression in 1999–2016. There were no noticeable differences of mtDNA control region diversity between the museum and modern saiga samples. The most vivid genetic consequence of the severe decline in population numbers was a significant increase of the inbreeding coefficient (F_{is}) calculated from the microsatellite loci.

Keywords: saiga, genetic diversity, control region, mtDNA, microsatellite loci

УДК 599.325:591.32

КИНЕТИКА ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН У ДНЕВНОЙ ПЕСЧАНКИ: ЗНАЧЕНИЕ ИЗОЛИРУЮЩИХ СТРУКТУР ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА И КАЧЕСТВА КОРМА

© 2024 г. Е. И. Наумова^{®, *}, Г. К. Жарова^{*}, Т. Ю. Чистова^{*}

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

[®]E-mail: einaumova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2023 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Исследовано продвижение корма по пищеварительному тракту (ПТ) у зеленоядного представителя грызунов с однокамерным полужелезистым желудком — дневной песчанки *Psammomys obesus* методом многократного мечения корма инертными пластиковыми маркерами. Выявлены особенности кинетики содержимого в зависимости от морфологии ПТ, кормовых объектов и времени введения маркеров. Полное время выведения маркеров у дневной песчанки достигает 36 ч. Определено среднее время задержки маркеров в ПТ в целом (17–18 ч), а также отдельно в преджелудке (7–9 ч) и слепой кишке (7–12 ч). Выявлена неравномерность прохождения корма, которая рассматривается как важный механизм максимизации извлечения нутриентов из растительных кормов, включая микробную ферментацию структурных углеводов кормового рациона.

Ключевые слова: грызуны, пищеварительный тракт, многократное мечение корма, кинетика пищевых волокон.

DOI: 10.31857/S1026347024040075, **EDN:** VHONPC

Продвижение корма по пищеварительному тракту (ПТ) — одна из важнейших характеристик стратегии питания и пищеварения фитофагов, от которой зависит полнота и способ обеспечения организма питательными веществами. Скорость прохождения корма изучали на протяжении многих лет у ряда видов грызунов относящихся к *Myomorpha* и *Caviomorpha* (Kostelecka-Myrcha, Myrcha, 1964; Sakaguchi *et al.*, 1987; Sakaguchi, Ohmura, 1992; Hume *et al.*, 1993; Pei *et al.*, 2001 a, b; Clauss *et al.*, 2007; Hagen *et al.*, 2018). Основной акцент в этих исследованиях сделан на выяснении различий в продвижении жидкой и твердой фракций корма с применением методики, основанной на введении в корм животного маркированных фрагментов структурных углеводов и маркера жидкой фракции корма (Warner, 1981). На основании интенсивности выведения маркеров с экскрементами метод позволяет определить полный период и среднее время задержки в желудочно-кишечном тракте твердой и жидкой фракций корма. Анализ динамики выведения маркеров при определенных приемах расчета позволяет также обнаружить факты копрофагии и ее ритмику (Clauss *et al.*, 2007), и выяснить роль сепараторного механизма

ободочной кишки в кинетике содержимого (Hagen *et al.*, 2018). Однако для выяснения динамики прохождения корма по ПТ и оценки возможной длительности ферментации корма отдельно в преджелудке и слепой кишке при однократном мечении корма требуется значительное увеличение количества экспериментальных животных для их последовательного умерщвления и вскрытия на разных стадиях продвижения корма, как это было выполнено на примере полевки Брандта (Pei *et al.*, 2001a). Во всех цитированных публикациях показана важная роль жидкой фракции корма, содержащей бактерии и мелкие фрагменты растительных полимеров, которая служит для обогащения корма низкой питательной ценности. Однако кинетику труднопереваримых волокон и их значение в питании мелких грызунов метод проследить не позволяет. Для этой цели мы использовали метод многократного введения инертных пластиковых маркеров (Наумова, Кучерук, 1996; Жарова и др., 2002, 2010; Наумова и др., 2007).

Мелкие пластиковые частицы определенного цвета, поглощенные животными с приманкой, перемешиваются с кормом, обозначая его локализацию. Выполненная по окончании опыта

количественная оценка маркеров в содержимом пищеварительного тракта вскрытых животных позволяет воспроизвести кинетику потребленного корма. Итоговый суммарный анализ распределения в пищеварительном тракте инертных маркеров разного цвета, поглощенных через определенные промежутки времени, визуализирует локализацию последовательно съеденных порций корма. Метод многократного введения твердых пластиковых маркеров позволяет существенно сократить количество экспериментальных животных.

Ранее при использовании этого метода было выяснено, что у травоядных грызунов с двухкамерным полужелезистым желудком корм застаивается не только в слепой кишке, но и может задерживаться в преджелудке, что обусловлено возможностью бактериальной ферментации в этом органе (Варшавский и др., 2004, 2014; Наумова и др. 2007; Жарова и др., 2010). Задача настоящей работы – изучение кинетики структурной фракции корма у грызунов с однокамерным полужелезистым желудком. На примере зеленоядной песчанки *Psammomys obesus* мы рассмотрели характер продвижения по ПТ разных кормовых объектов и длительность их ферментации отдельно в преджелудке и слепой кишке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дневные песчанки *Psammomys obesus* – исключительно зеленоядные грызуны, которые характеризуется высокой переваримостью сухого вещества и клетчатковых элементов растений, что представляет особый интерес для исследования кинетики структурных компонентов корма.

Проведено 4 серии опытов с разными кормовыми рационами. В каждой экспериментальной группе были задействованы рожденные в неволе грызуны – по 6 взрослых не размножающихся песчанок обоих полов массой тела от 150 до 200 г. Работа выполнена в лаборатории университета им. Бен-Гуриона. В качестве монорационов использовали следующие виды вегетирующих растений, распространенных в местах обитания дневных песчанок: *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Sueda monoica*, *Salsola tetrandra*. Перечисленные травы различались по содержанию питательных веществ, что отразилось на переваримости грызунами сухого вещества корма, колебавшейся от 59% при потреблении *A. articulata* до 70% при потреблении *S. tetrandra* (Degen et al., 2000, Naumova et al. 2019).

Для детализации путей продвижения твердых фракций корма мы применили семикратное мечение корма инертными маркерами. В качестве инертного маркера волокнистой фракции корма использовали кусочки тонкой пластиковой пленки семи разных оттенков под номерами 1–7

(в данных опытах – красного, синего, желтого, зеленого, фиолетового, белого, серебристого), которые измельчали на мелкие фрагменты длиной не более 15 мм. Небольшую дозу стружек смешивали с хорошо поедаемой песчанками приманкой. Масса приманки не превышала 0.01 г. Время поедания и длительность экспозиции маркеров в каждой экспериментальной группе песчанок приведено в табл. 1. После скармливания приманки грызунов пересаживали в чистые клетки во избежание прилипания маркера к лапкам и экскрементам.

В конце опыта зверьков умерщвляли, извлекали содержимое отдельно из каждого органа ПТ (преджелудка, железистой части желудка, тонкого кишечника, слепой кишки, проксимальной и дистальной частей ободочной кишки), и изучали распределение по ПТ поглощенных в разное время маркеров, которые легко идентифицировали по цвету. Для количественной оценки

Таблица 1. График поступления маркеров в ПТ песчанок разных групп

Кормовой рацион	№ маркера	Время поедания приманки	Длительность экспозиции маркера
<i>Atriplex halimus</i>	1	8:00	36
	2	14:00	30
	3	20:00	24
	4	9:00	11
	5	13:00	7
	6	16:00	4
	7	18:00	2
<i>Sueda monoica</i>	1	8:00	36
	2	14:00	30
	3	20:30	23
	4	9:30	10
	5	13:30	6
	6	16:00	4
<i>Salsola tetrandra</i>	1	12:00	33
	2	18:00	27
	3	0:00	21
	4	9:00	12
	5	12:00	9
	6	15:00	6
	7	18:00	3
<i>Anabasis articulata</i>	1	12:00	33
	2	18:00	27
	3	0:00	21
	4	9:00	12
	5	12:00	9
	6	15:00	6
	7	18:00	3

распределения маркеров в желудочно-кишечном тракте и их визуализации содержимое каждого органа размывали на ситах; образцы промытого содержимого высушивали и в каждом образце подсчитывали количество частиц маркеров каждого цвета. Количество всех поступивших в ПТ частиц маркеров одного цвета (выведенных с экскрементами и оставшихся в полости) принимали за 100%. Животные каждой группы относительно дружно поедали приманку, разброс во времени поедания составил 5–7 мин.

Среднее время задержки корма (*MRT*) в ПТ рассчитывали по формуле (Warner, 1981):

$$MRT = \sum_{i=1}^n m_i t_i / \sum_{i=1}^n m_i$$

где m_i — количество частиц маркера в экскрементах, выделенных за время t_i после поедания маркированной приманки, n — количество дефекаций за время полного выведения маркера. *MRT* рассчитывали отдельно по каждому маркеру.

Аналогично рассчитывали время задержки корма в желудке и слепой кишке. При этом за m_i принимали количество фрагментов маркера, прошедшее через данный орган (то есть, обнаруженных в ПТ позади желудка или слепой кишки и экскрементах). За t_i принимали время экспозиции маркера в желудке или слепой кишке.

Для расчета *MRT* учитывали не все этапы маркировки. Время экспозиции первых и последних маркеров либо превысили время прохождения по ПТ (№ 1 и № 2) и успели выйти задолго до вскрытия животных, либо не охватили весь цикл пищеварения (№ 6 и № 7). Расчеты были выполнены по результатам распределения тех маркеров, которые были максимально выведены (от 85 до 98%) за более короткое время (при потреблении *A. halimus* — маркер № 3, *S. monoica* — № 2 и 3, *A. articulata* и *S. tetrandra* — № 1 и 2). Маркер № 1 в группе песчанок, потреблявших *A. halimus* и *S. monoica*, не учитывали, поскольку поступивший в ПТ позже маркер № 2 уже почти вышел к моменту вскрытия, а время экспозиции маркера № 1 зафиксировать не удалось.

Обобщенные диаграммы кинетики содержимого в ПТ по отдельным органам и в экскрементах построены на основании данных о распределении маркеров в конце опыта у умерщвленных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительность всего эксперимента составила 1.5 суток, в течение которых грызуны получали маркированные приманки в дневное время. Маркировка корма, проведенная более чем за сутки до окончания опыта, была предназначена для

определения длительности полного цикла пищеварения и визуализации движения корма в каудальных отделах кишечника. Цель маркировок корма с более короткой экспозицией маркеров (12 ч и менее), заключалась в выяснении циркуляции корма в начальных отделах ПТ. Поступательное движение корма анализировали, начиная с малых экспозиций маркеров в ПТ по мере увеличения длительности нахождения содержимого в ПТ.

Продвижение маркированного корма по отдельным органам

Желудок. Через 2–4 ч после потребления приманки из желудка у грызунов, содержавшихся на разных кормах, эвакуировалось от 10 до 50% маркера (рис. 1), причем большая часть оставшихся частиц маркеров задержалась в преджелудке. В группах, потреблявших *A. halimus* и *S. monoica*, через 4 ч из преджелудка было выведено около 60% маркера. При 6–7-часовой экспозиции маркера его содержание в преджелудке заметно уменьшилось (в разных группах от 5 до 37%). При более длительной экспозиции (9–12 ч) отмечены колебания содержания маркера: в некоторых случаях, например, у песчанок, потреблявших *A. articulata*, наблюдалось увеличение его количества с течением времени (13.5% при экспозиции 12 ч по сравнению с 5% при экспозиции 9 ч). Окончательное выведение из желудка было зарегистрировано через 21 ч пребывания маркера в пищеварительном тракте.

Тонкий отдел кишечника. Через 2 ч после поедания маркера уже началось его поступление в тонкий кишечник. В этом отделе корм не застаивался, поэтому большого количества маркеров здесь не наблюдалось, их содержание не достигало 30% и было синхронизировано с темпами их эвакуации из желудка в целом.

Слепая кишка. В это же время — через 2 ч — в большинстве случаев отмечено появление маркеров в слепой кишке. В этом отделе маркеры могли накапливаться и задерживаться в небольшом количестве до 24 ч; в отдельных случаях их содержание через сутки составляло около 7% (при потреблении *A. articulata* и *S. tetrandra*). Максимального содержания в слепой кишке маркеры достигали через 6 ч при потреблении песчанками *S. monoica* (около 50%) и через 9–12 ч при питании остальными травами (около 25%). Концентрация разных маркеров в слепой кишке не соответствует последовательности их поступления и экспозиции в ПТ.

Ободочная кишка. Проксимальная часть ободочной кишки, как правило, содержала очень мало маркеров или вовсе не содержала. Максимального значения (до 8%) эта цифра достигла при

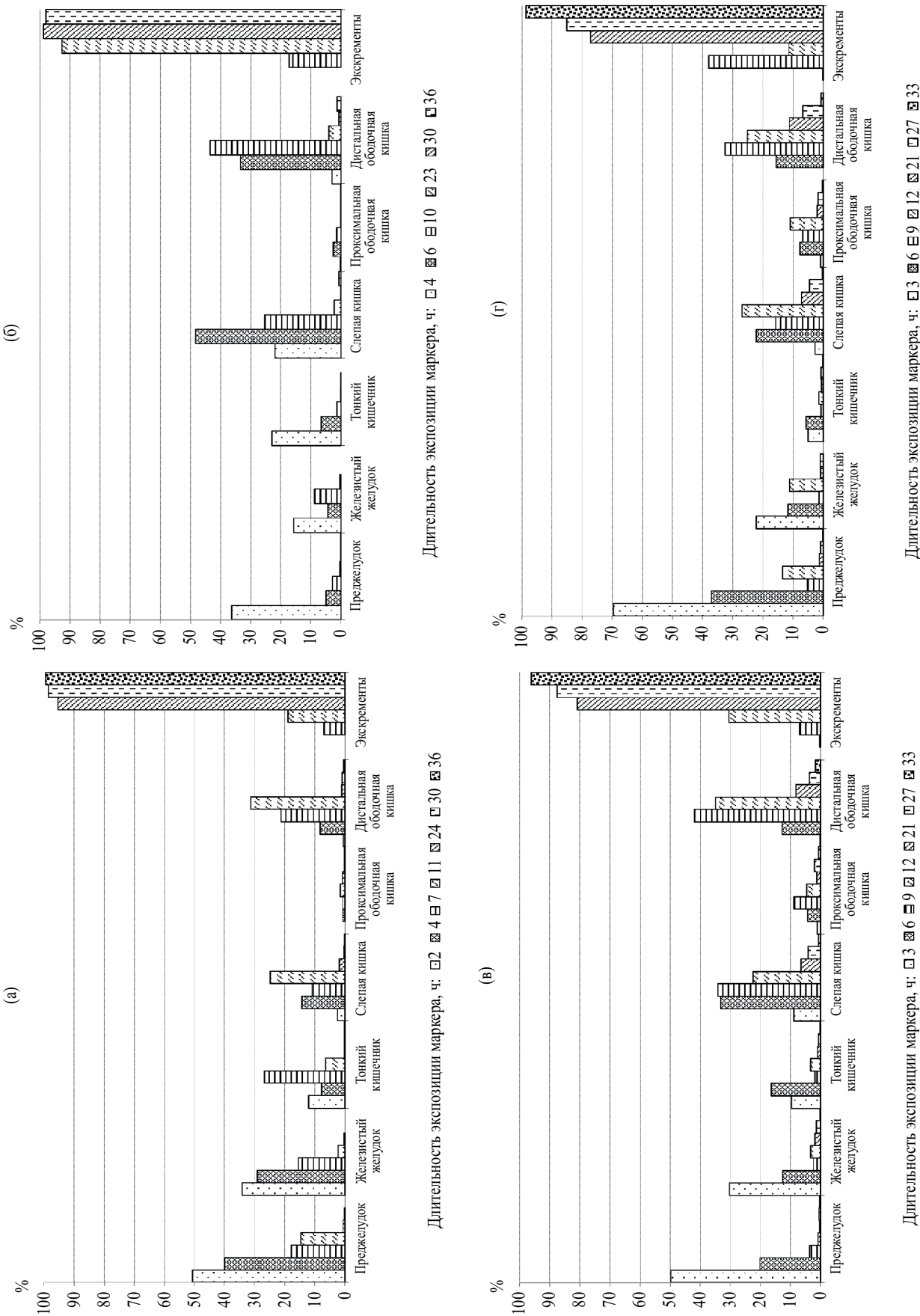


Рис. 1. Содержание маркеров с разной длительностью экспозиции в каждом органе ПТ по результатам вскрытия в группах песчанок, потреблявших разные корма: а – *A. halimus*, б – *S. monoica*, в – *S. tetrandra*, г – *A. articulata*.

12-часовой экспозиции, но единичные фрагменты могли оставаться в этом отделе более суток. В дистальной ободочной кишке, где начинают формироваться экскременты, наивысшее содержание маркеров 30% отмечено по истечении 9–12 ч их нахождения в пищеварительном тракте, и сходит на нет по истечении суток.

Экскременты. В экскрементах первые частицы маркеров появились при 7–9-часовой экспозиции, а основное их выведение закончилось по истечении суток. Через 30–36 ч после поедания грызунами приманки в пищеварительном тракте не осталось маркеров, почти 100% маркеров было локализовано в экскрементах.

Различия в динамике прохождения разных кормов

Анализ распределения маркеров, поступивших в желудок в разное время суток через короткие промежутки времени (2–4 ч), выявил ряд заметных различия между песчанками, получавшими разные корма. В целом следует отметить быстрое поступление части маркеров в слепую кишку (через 3–4 ч) и длительную задержку (до 11–12 ч) части маркированного корма в преджелудке. Быстрее всего корм начинал выводиться из преджелудка при питании животных *A. halimus* (около 50% за 2 ч). У песчанок, потреблявших *A. articulata* через 3 ч в преджелудке задерживалось до 70% маркера. Самое раннее поступление содержимого в слепую кишку наблюдалось в группах песчанок, потреблявших *A. halimus* и *S. tetrandra*. Первое появление маркеров в экскрементах было отмечено через 7 ч у животных, потреблявших *A. halimus*. Активное выведение с экскрементами зарегистрировано через 9 ч после поступления маркера в ПТ во всех группах песчанок, причем самое интенсивное при питании *A. articulata*.

Ситуация, отраженная на диаграммах, подтверждается расчетами задержки корма во всем ПТ и отдельно в желудке и слепой кишке (табл. 2). По этим показателям самый длинный период задержки корма характерен для грызунов, потреблявших *A. articulata*. Самый короткий период ферментации в преджелудке отмечен для животных, содержащихся на рационе, состоящем из *S. monoica*, а в слепой кишке — из *A. halimus*.

Различия в прохождении маркеров, поступивших в разное время суток

При рассмотрении диаграммы (рис. 1) видно, что очередность продвижения маркеров, соответствующая порядку их поступления в ПТ наблюдалась не всегда. При питании *A. articulata* маркер, пролежавший в ПТ 9 ч, начал выводиться из желудка и кишечника раньше, чем находившийся

Таблица 2. Полный период выведения и среднее время задержки корма

Кормовой рацион	MRT		
	ПТ	Желудок	Слепая кишка
<i>Atriplex halimus</i>	17.11	7.28	7.27
<i>Sueda monoica</i>	17.52	6.59	8.06
<i>Salsola tetrandra</i>	17.0	7.41	10.42
<i>Anabasis articulata</i>	18.36	8.71	12.37

в содержимом 12 ч. В слепой кишке при потреблении *A. halimus* и *A. articulata* преобладало содержание маркеров с экспозицией 11–12 ч, при питании *S. monoica* и *S. tetrandra* — с экспозицией 6–9 ч. Время полного выведения первого маркера, находившегося в ПТ самое длительное время, различается у песчанок, потреблявших разные травы. У животных, питавшихся *A. halimus* и *S. monoica*, более 90% маркеров были выведены через 24 ч. *A. articulata* и *S. tetrandra* задерживались в ПТ на 30–33 ч.

Среди зверьков одной и той же группы отмечены случаи разных темпов выведения маркеров из желудка, слепой кишки и с экскрементами. Особенно заметные различия проявились между экспериментальными животными при питании *A. articulata* (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по распределению маркеров, объединенные в диаграммы (рис. 3), отражают весь процесс продвижения корма, потребленного животными за период 33–36 ч. Детальный анализ распределения маркеров позволил визуализировать динамику прохождения корма через отдельные органы пищеварительного тракта.

Влияние пищевой специализации на прохождение корма в ПТ песчанок

Длительность задержки корма в преджелудке и слепой кишке служит важным функциональным показателем значения в ферментации корма. Среднее время задержки корма в ферментативных камерах различается в группах песчанок, получавших разные корма (табл. 2). В преджелудке у дневной песчанки оно колебалось от 6.6 до 8.7 ч, а в слепой кишке от 7.3 до 12.4 ч в зависимости от качества потребляемого корма. Более длительная задержка значительной части маркеров в этих органах при содержании грызунов на *A. articulata* может быть обусловлена повышенным содержанием в этом растении лигноцеллюлозных компонентов. Это обстоятельство оказалось также сопряжено с меньшим уровнем потребления

и низкой переваримостью корма (Naumova *et al.*, 2021). У дневной песчанки в преджелудке и слепой кишке ранее была выявлена высокая эндогликаназная активность (Наумова и др., 2021), которая обеспечивает доступ к использованию клетчатки в качестве нутриента. Уровень активности эндогликаназы у дневной песчанки сопоставим с уровнем активности этого фермента у зеленоядных полевок.

Однако следует учитывать, что время задержки потребленного корма в желудке и слепой кишке может быть замаскировано активизацией копрофагии. Особенно четко различия в кинетике содержимого ПТ проявляются при сравнении дневной песчанки с семеноядными видами — тамарисковой (*Meriones tamariscinus*) и когтистой (*Meriones unguiculatus*) песчанками (Pei *et al.*, 2001b; Жарова и др., 2010). Полный

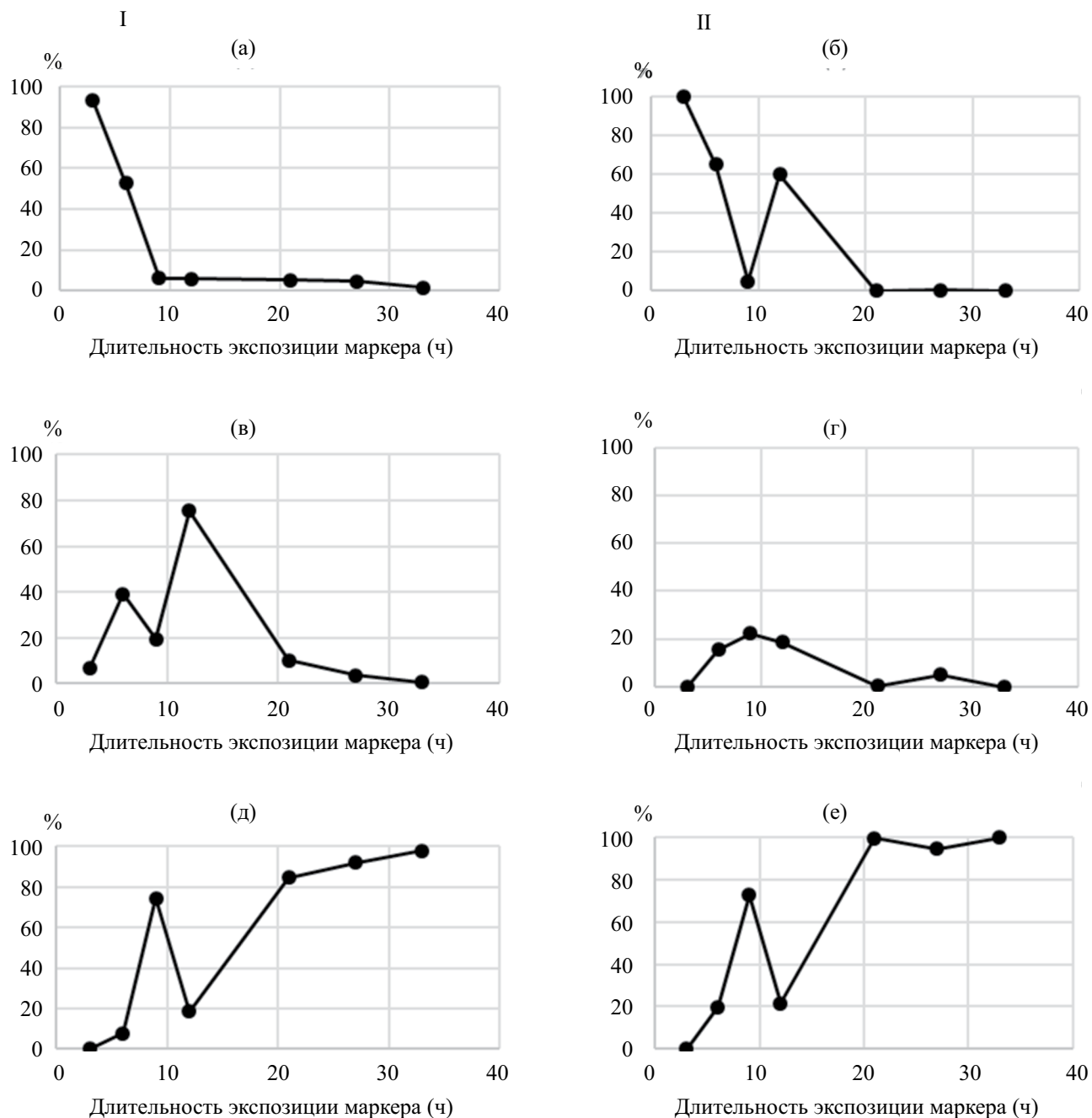


Рис. 2. Индивидуальные различия во временной динамике выведения меченого корма при потреблении *A. articulata*. I, II — разные особи; а, б — желудок; в, г — слепая кишка; д, е — экскременты.

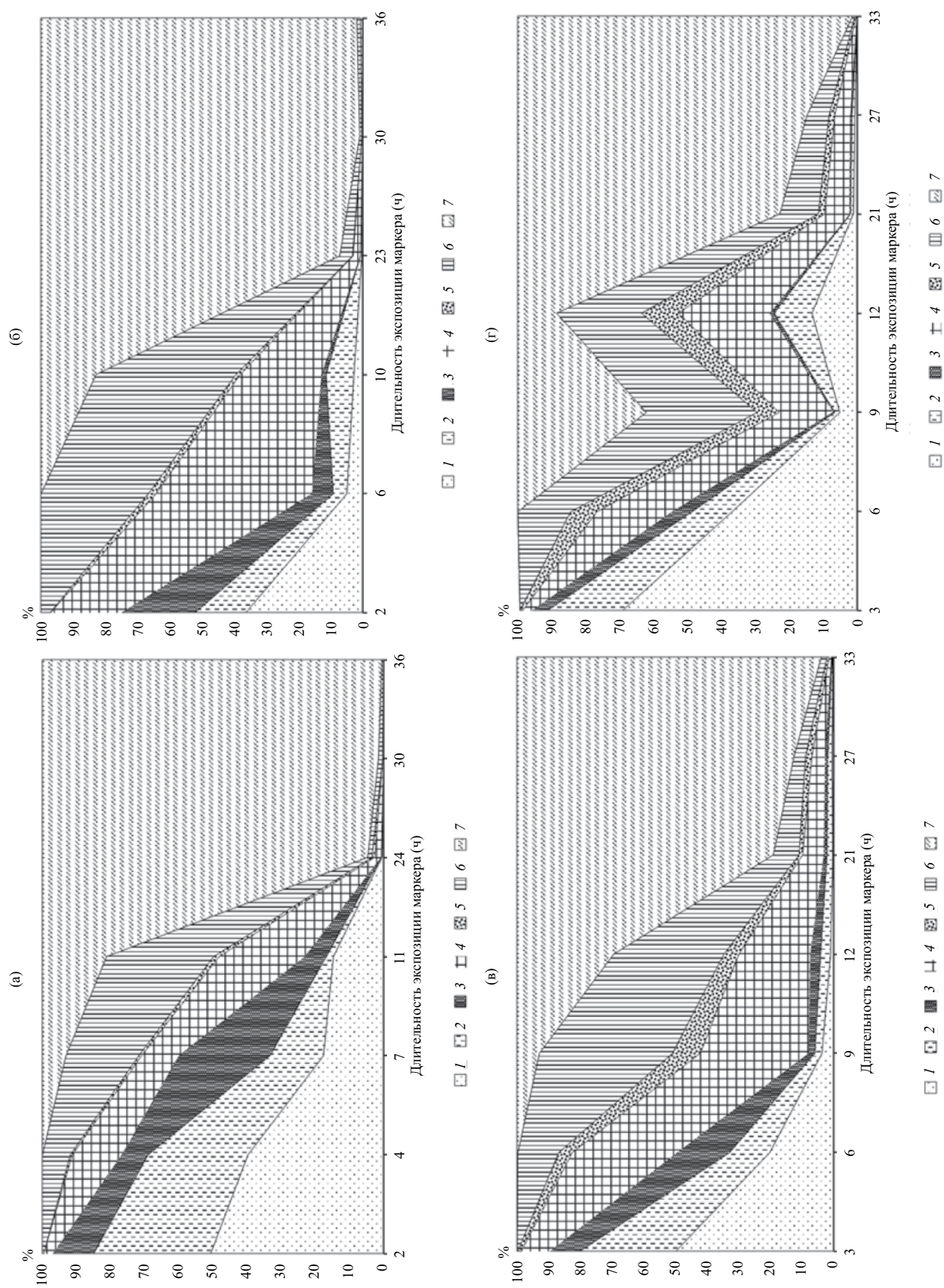


Рис. 3. Прохождение кормов: *A. halimius* (а), *S. monoica* (б), *S. tetrandra* (в), *A. arisulata* (г) по отдельным органам ПТ: 1 – преджелудок, 2 – железистый желудок, 3 – тонкий кишечник, 4 – слепая кишка, 5 – проксимальная ободочная кишка, 6 – дистальная ободочная кишка, 7 – экскременты.

период выведения концентрированных кормов у песчанок рода *Meriones* длится дольше, а время остаточного выведения содержимого из ферментативных камер сильнее растянуто. Это объясняется тем, что на длительное время у семеноядных песчанок в ПТ задерживается лишь небольшая часть маркированного корма — менее 30% маркеров в преджелудке, и менее 20% в слепой кишке. Что касается клетчатковых компонентов корма, то в силу их низкого содержания в семенных кормах они не служат важным нутриентом, а большая их часть выводится быстро из ПТ.

Неравномерность прохождения корма

Соответствует ли движение маркеров в ПТ ритмике поедания корма? При равномерном поступательном продвижении корма содержание маркеров в каждом органе должно последовательно уменьшаться с увеличением времени экспозиции маркеров в содержимом. Количественное соотношение частиц маркеров, потребленных песчанками в разное время, выявило их неравномерное прохождение по ПТ (рис. 1). Последовательность их поступательного продвижения в некоторых случаях нарушается из-за возможности застоя части корма в преджелудке и слепой кишке. Эту функцию обеспечивает структура пищеварительного тракта песчанок (Наумова и др., 2011; Naumova *et al.*, 2019). Частично изолированный с помощью угловой и пограничной складок преджелудок, объемная слепая кишка, снабженная хорошо развитым илеоцекальным клапаном, и керкринговы складки ободочной кишки позволяют застаиваться в этих зонах части корма для обеспечения длительной бактериальной ферментации, в том числе и лигноцеллюлозных фрагментов. На иллюстрациях продемонстрировано, что часть съеденного корма быстро эвакуируется в слепую кишку, а часть остается в преджелудке, то есть, корм делится на быстро и медленно проходящие фракции (рис. 3). Выведение маркеров с экскрементами оказывается сильно растянутым из-за нарушения порядка выведения последовательно съеденных порций корма.

Особого внимания заслуживают факты повышения содержания маркеров в железистой части желудка по сравнению с аналогичным показателем предшествующего мечения. Вторичное появление в желудке тех маркеров, которые уже были выведены оттуда, следует оценивать как факты копрофагии. В толстом отделе кишечника очередность прохождения поедаемого корма нарушается из-за функционирования сепараторного механизма — периодического возврата части содержимого из ободочной кишки в слепую кишку. У дневной песчанки этот механизм, судя по структуре ободочной кишки (Naumova *et al.*, 2019), вовлечен в циркуляцию содержимого.

В группе песчанок, потреблявших *A. articulata*, после выведения большей части маркеров из желудка наблюдалось повторное увеличение их содержания в этом органе в утреннее время (9 до 12 ч). Примерно в это же время менее выраженные пики отмечены и для других групп песчанок. *S. tetrandra* и *S. monoica* заметно быстрее выводятся из желудка и, соответственно раньше достигают слепой кишки.

Зависимость кинетики содержимого от степени наполнения ПТ

Обобщение данных по группам выявляет общие тенденции кинетики содержимого, но маскирует кратковременные индивидуальные флуктуации движения маркеров. Напротив, картина распределения маркеров у отдельных особей обнаруживает всплески их содержания, вызванные копрофагией и антиперистальтикой ободочной кишки (рис. 2). Продвижение маркеров в большой степени зависит от кормовой активности животных. Хотя и для серых полевок, и для дневной песчанки характерна круглосуточная кормовая активность (Мещерский и др., 2004; Khokhlova *et al.*, 2005), кормовые фазы у разных особей не синхронизированы. Поэтому желудок у разных особей наполнен по-разному (Наумова и др., 2023), а от количества содержимого зависит возможность задержки маркера в преджелудке, характер его эвакуации из желудка и продвижения до слепой кишки. Возможно, именно по этой причине путем мечения не всегда можно заметить проявление неритмичной копрофагии: надолго застрявший в слепом мешке желудка маркированный корм может маскировать проявления копрофагии. В наших экспериментах на суммарных диаграммах зарегистрированы пики концентрации маркеров в разных органах ПТ при содержании на всех кормах, но особенно четко они выражены у грызунов, потреблявших *A. articulata*. Повышение в преджелудке концентрации маркеров, отмеченное примерно через 10–12 ч после их поедания однозначно обозначает акты копрофагии. Важно отметить, что у отдельных особей пики концентрации маркеров выражены неодинаково, что отражает неравномерность движения содержимого (рис. 2). Результаты опыта на полевке Брандта (*Microtus brandti*) путем определения концентрации однократно введенного маркера (CrO_2) у умерщвляемых через короткие промежутки времени особей (Pei *et al.*, 2001a) также подтверждают неравномерность эвакуации содержимого из желудка. Аналогичная ситуация (периодическое повышение концентрации маркеров) наблюдается в слепой кишке дневных песчанок, что мы рассматриваем как накопление здесь маркеров вследствие функционирования илеоцекального соединения.

**Зависимость кинетики
содержимого ПТ от структуры желудка
и кишечника**

Неравномерность продвижения содержимого в ПТ наблюдалась и у других грызунов, в частности, у полевок при отслеживании выведения маркеров с экскрементами при однократном мечении корма (Kostecka-Myrcha, Myrcha, 1964; Owl, Batzli, 1988; Hammond, Wunder, 1991; Hume *et al.*, 1993; Pei *et al.*, 2001b). Двухкамерный желудок, крупная слепая кишка, у серых полевок составляющая в среднем 9% массы тела (Варшавский и др., 2017), хорошо развитые сепараторные структуры в ободочной кишке — признаки высокой специализации грызунов к бедным кормам.

Несмотря на лучшую изоляцию преджелудка и более структурированный толстый отдел кишечника у полевок, время задержки корма в ферментативных камерах у них заметно меньше, чем у дневной песчанки — 3.5–5 ч, а в слепой кишке — в среднем 6 ч (Наумова и др., 2007). Время полного выведения корма из ПТ у полевок также короче — 23–24 ч против 33–36 ч у песчанок. При этом растительные корма полевки переваривают с большей эффективностью, чем песчанки. Эта особенность обусловлена целым рядом других обстоятельств, например, лучшим измельчением корма зубами, что значительно ускоряет пищеварение.

Таким образом, при многократном мечении корма грызунов с однокамерным полужелезистым желудком визуализирована ситуация, когда позже поступившая маркированная пища быстрее проходит по пищеварительному тракту, чем уже находившаяся в нем до мечения, и раньше из него выводится (Наумова и др., 2007). Это обстоятельство успешно реализуется у грызунов с разной структурой ПТ. В неравномерности движения заключается важная особенность прохождения в пищеварительном тракте последовательно съеденных грызунами порций корма. Кроме того, на кинетику содержимого влияют такие факторы как качество корма, уровень его потребления и повторное попадание маркеров в желудок и слепую кишку путем копрофагии. Изолирующие структуры — пограничная и серповидная складки полужелезистого желудка и илеоцекальное соединение обеспечивают задержку содержимого в ферментативных органах.

БЛАГОЛАРНОСТИ

Авторы приносят глубокую благодарность израильским коллегам А. Дегену, М. Каму, И.С. Хохловой и Б.Р. Краснову за предоставленный материал и организацию работы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствуют коммерческие, финансовые, личные и профессиональные факторы, которые могли бы создать конфликт интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол эксперимента был одобрен Комитетом Медицинского университета Кермана (ИР. КМУ.АЭК.2023.004) с разрешением №.401000894 от 28 декабря 2022 г., соответствует требованиям ИИ.

Рекомендации по уходу и использованию лабораторных животных (Публикация НИЗ № 85-23, переработанная в 1985 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варшавский А. А., Манаева Е. С., Наумова Е. И. Функционирование диазотрофно-целлюлолитического звена внутренних цепей питания у полевок (*Microtus rossiaemeridionalis* и *Clethrionomys glareolus*) в зависимости от пищевой специализации // Докл. РАН. 2014. Т. 455. № 6. С. 716–720.
- Варшавский А. А., Наумова Е. И., Тихонов И. А. Особенности функционирования целлюлолитических симбионтов в преджелудке и слепой кишке серых полевок (*Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*) // Зоол.ж. 2004. Т. 83. № 11. С. 1299–1304.
- Варшавский А. А., Наумова Е. И., Жарова Г. К., Чистова Т. Ю., Варшавский А. А. Взаимосвязь размеров тела и органов пищеварительного тракта у некоторых *Myomorpha*: изометрия, или аллометрия? // Изв. РАН. Сер. биол. 2017. № 4. С. 534–540. <https://doi.org/10.1134/S1062359017040148>.
- Жарова Г. К., Наумова Е. И., Чистова Т. Ю., Нестерова Н. Г., Подтяжкин О. И. 2002. Особенности прохождения пищи по пищеварительному тракту серых полевок // Докл. РАН. Т. 382. № 4. С. 1–3.
- Жарова Г. К., Чистова Т. Ю., Наумова Е. И. Особенности продвижения корма по пищеварительному тракту тамарисковой песчанки *Meriones tamariscinus* // Докл. РАН. 2010. Т. 435. № 4. С. 1–4.
- Мещерский И. Г., Наумова Е. И., Костина Н. В., Варшавский А. А., Умаров М. М., Юрьева О. С. Влияние дефицита диетарного азота на переваримость целлюлозы и активность азотфиксирующей микрофлоры у восточноевропейских полевок *Microtus rossiaemeridionalis* // Изв. РАН. Сер. биол. 2004. № 5. С. 1–5.
- Наумова Е. И., Кучерук В. В. Экспериментальное исследование скорости и динамики продвижения разных кормов по пищеварительному тракту большой песчанки // Изв. РАН. Сер. биол. 1996. № 6. С. 716–724.

- Наумова Е. И., Жарова Г. К., Чистова Т. Ю. Исследование продвижения корма по пищеварительному тракту полевок методом многократного введения пластиковых маркеров // Зоол. журн. 2007. № 6. С. 739–750.
- Наумова Е. И., Жарова Г. К., Чистова Т. Ю. Изолирующие структуры желудка и кишечника песчанок (*Gerbillidae*, *Rhombomys*, *Meriones*) и их функциональное значение // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 4. С. 447–455.
- Наумова Е. И., Чистова Т. Ю., Варшавский А. А., Жарова Г. К. Функциональная диверсификация морфологически сходных органов пищеварительного тракта у представителей *Muroidea*. Изв. РАН. Сер. биол. 2021. № 3. С. 270–279.
<https://doi.org/10.31857/S0002332921020089>
- Наумова Е. И., Жарова Г. К., Чистова Т. Ю. Размеры тела и пищеварительного тракта у мелких млекопитающих-фитофагов: влияние экологических и физиологических факторов // Известия РАН. Серия биол. 2023. № 3. С. 297–307.
<https://doi.org/10.31857/S1026347022600832>
- Clauss M., Besselmann D., Schwarm A., Ortmann S., Hatt J.-M. Demonstrating coprophagy with passage markers? The example of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. 2007. V. 147. P. 453–459.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.013>
- Degen, A.A., Kam, M., Khokhlova, I.S., Zeevi, Y. 2000. Fiber digestion and energy Utilization of fat sand rats (*Psammomys obesus*) consuming the chenopod *Anabasis articulata*. // Physiol. Biochem. Zool. 2000. V. 73. 574–580.
- Hagen K. B., Müller D. W.H., Ortmann S., Kreuzerd M., Clauss M. Digesta kinetics in two arvicoline rodents, the field vole (*Microtus agrestis*) and the lemming (*Lagurus lagurus*) // Mamm. Biol. 2018. V. 89. P. 71–78.
<https://doi.org/10.1016.mambio.2018.01.003>
- Hammond K. A., Wunder B. A. The role of diet quality and energy need in the nutritional ecology of a small herbivore, *Microtus ochrogaster* // Physiol. Zool. 1991. V. 64. P. 541–567.
- Hume I. D., Morgan K. R., Kenagy G. J. Digesta retention and digestive performance in sciurid and microtine rodents: effect of hindgut morphology and body size // Physiol. Zool. 1993. V. 66. N 3. P. 396–411.
- Khokhlova I. S., Krasnov B. R., Kuznetsov V., Sartor C. E., Zan M., Salek L., Ghazaryan L., Kam M., Degen A. A. Dietary intake and time budget in two desert rodents: a diurnal herbivore, *Psammomys obesus*, and a nocturnal granivore, *Meriones crassus* (*Lagurus lagurus*) // Mammalia. 2005. V. 69. № 1. P. 1–11.
- Kostecka-Myrcha, A., Myrcha A.. The rate of passage of foodstuffs through the alimentary tracts of certain Microtidae under laboratory conditions // Acta Theriologica. 1964. V. 9. P. 37–53.
- Naumova E. I., Chistova T. Yu., Zharova G. K., Kam M., Khokhlova I. S., Krasnov B. R., Clauss M., Degen A. A. Particle size reduction along the digestive tract of fat sand rats (*Psammomys obesus*) fed four chenopods // Comp. Physiol. B. 2021. V. 191. P. 831–841.
<https://doi.org/10.1007/s00360-021-01357-x>
- Naumova E. I., Chistova T. Yu., Zharova G. K., Kam M., Khokhlova I. S., Krasnov B. R., Degen A. A. Energy requirements, length of digestive tract compartments and body mass in six gerbilline rodents of the Negev Desert // Zoology. 2019. V. 137. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.zool.2019.125715>
- Owl M. Y., Batzli G. O. The integrated processing response of voles to fibre content of natural diets // Funct. Ecology. 1988. V. 12. P. 4–13.
- Pei Y.-X., Wang D.-H., Hume I. D., Selective digesta retention and coprophagy in Brandt's vole (*Microtus brandti*) // Comp. Physiol. B. 2001a. V. 171. P. 457–464.
- Pei Y.-X., Wang, D.-H., Hume, I. Effect of Dietary Fibre on Digesta Passage, Nutrient Digestibility and Gastrointestinal Morphology in the Granivorous Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) // Physiol. Biochem. Zoology. 2001b. V. 74. № 5. P. 742–749.
- Sakaguchi E., Itoh H., Ushida S., Horigome T. Comparison of fibre digestion and digesta retention time between rabbits, guinea-pigs and hamsters. British J. of Nutrition. 1987. V. 58. P. 149–158.
- Sakaguchi E., Ohmura S. Fibre digestion and digesta retention time in guinea-pigs (*Cavia porcellus*), degus (*Octodon degus*) and leaf-eared mice (*Phyllotis darvini*) // Comp. Biochem. Physiol. 1992. V. 103 A. P. 787–791.
- Warner A. C.I. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds // Nutr. Abstr. Rev. 1981. Ser. B51. P. 789–820.

Kinetics of dietary fibers in a fat sand rat: importance of the digestive tract isolating structures and food quality

© 2024 E. I. Naumova*, G. K. Zharova, T. Yu. Chistova

**Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**E-mail: einaumova@gmail.com*

The pass of feed through the digestive tract in a herbivorous rodent with a single-chamber gemiglandular stomach, the fat sand rat *Psammomys obesus*, was studied by multiple marking of the food with inert plastic markers. The total mean retention time of markers in the digestive tract (DT), as well as in the stomach and caecum separately, was determined. The peculiarities of the digesta kinetics depending on the morphology of the digestive tract, diet and the time of markers intake were clarified. The total time for removing markers from DT in the fat sand rat reaches 36 hours. The mean retention time of markers in DT was determined as a whole (17–18 hours), as well as separately in the forestomach (7–9 hours) and caecum (7–12 hours). The uneven passage of feed has been revealed, which is considered as an important mechanism for maximizing the extraction of nutrients from plants, including microbial fermentation of structural carbohydrates of the food.

Keywords: rodents, digestive tract, multiple labeling of food, kinetics of dietary fiber.

УДК 630.114.444:577.152.1:631.417 (571.1)

СИСТЕМНО-ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕЗОННОЙ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ОСУШЕННЫХ ЛЕСНЫХ ПОЧВ МЕЖДУРЕЧЬЯ ОБИ И ТОМИ

© 2024 г. Т. Т. Ефремова*, @, С. П. Ефремов*, А. Ф. Аврова*

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

@E-mail: efr2@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

Изучали осушенные торфяные почвы (Histosols). В режиме слабого и умеренного осушения тренд сезонных колебаний (квадратичная парабола) показывает еженедельное среднее повышение активности дегидрогеназы с еженедельным средним замедлением, в режиме глубокого — еженедельное среднее замедление с еженедельным ускорением за июнь — октябрь. Выявлена достоверная нелинейная связь активности фермента: положительная — с окислительно-восстановительным потенциалом и pH, разнонаправленная — с объемной влажностью и температурой почв. Согласно каноническому анализу, обсуждаемое множество совокупно обуславливает сезонную активность дегидрогеназы на 50–81%. В качестве доминантного фактора статистически обоснован гидрологический режим. Установлено отрицательное сопряженное взаимодействие активности дегидрогеназы и пероксидазы, подтверждая их участие в биохимическом преобразовании органического вещества как единого целого.

Ключевые слова: тренд сезонных колебаний, темпы прироста (снижения), водно-физико-химические показатели, совокупный вклад, парные регрессионные модели, канонический анализ.

DOI: 10.31857/S1026347024040085, **EDN:** VHGYPM

Темпы минерализации органического вещества и процессы гумификации определяют продуктивность и характер дальнейшего функционирования осушенных болот как целостной экологической системы. Процессы, протекающие в почве, особенно в ее органической части, неизменно связаны с действием почвенного энзиматического комплекса, который выполняет функции катализатора биохимических процессов, обеспечивает взаимодействие экологических факторов и характеризует качественное состояние почв (Купревич, Щербакова, 1966; Хазиев, 1982; Allison, 2006; Makoi, Mdakidemi, 2008; Kagasa *et al.*, 2011). Большую роль в превращении органических соединений ароматического ряда играют окислительные ферменты полифенолоксидаза и пероксидаза (Кононова, 1963). В результате окисления полифенолов образуются хиноны, которые при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичную молекулу гуминовой кислоты. При этом хиноны могут снова восстанавливаться до полифенолов за счет реакций отщепления водорода, активированного анаэробной дегидрогеназой, вновь акцептировать кислород при участии фенолоксидаз и опять восстанавливаться (Рубин, 1971). Поэтому важно изучать не только реакции, идущие

с присоединением кислорода, но и реакции с отнятием водорода, чтобы полнее охарактеризовать почву как единую систему с согласованными и направленными биохимическими процессами. Оценка функционального разнообразия почвенных ферментов улучшит понимание связи биохимической трансформации органического вещества с экосистемными процессами (Caldwel, 2005; Burns, *et al.*, 2013). Однако высокая пространственно-временная изменчивость ферментов скрывает и затрудняет анализ взаимосвязи с переменными окружающей среды (Хазиев, 1982; Sinsabaugh, 2010). Отсюда вытекает необходимость системно-экологического подхода, призванного объяснить колебания ферментативной активности почв при изменении отдельных или совокупности экологических параметров, используя методы математической статистики (Хазиев, 1982).

Накопление и функционирование почвенной дегидрогеназы в большей мере обусловлено микробной биомассой, активность которой служит показателем общей микробиологической активности почв (Купревич, Щербакова, 1966; Петерсон, 1968; Хазиев, 2018a), в том числе, торфяных. Найдено, что дегидрогеназная активность мезотрофных гидроморфных почв коррелировала с интенсивностью

микробного метаболизма (Schaefer, 1963). Среди оксидоредуктаз активность дегидрогеназы является наиболее чувствительным показателем изменений свойств почв в ходе естественной эволюции, а также антропогенных воздействий (Brzezińska *et al.*, 2001; Borowic *et al.*, 2014; Галиулин и др., 2014; Хазиев, 2018б; Самусик и др., 2022,).

Анаэробные дегидрогеназы как минеральных, так и торфяных почв относятся к числу самых не изученных ферментов в классе оксидоредуктаз. В текущее десятилетие отрывочные сведения по активности фермента в торфяных почвах Западной Сибири приводятся в монографии (Инишева, 2020). Активность дегидрогеназы обсуждается в связи со способом сельскохозяйственного использования торфяных почв Белорусского Полесья (Лучинок и др., 2013). Статистически обоснован вес анаэробной дегидрогеназы в совокупный вклад фенолоксидаз и водно-физико-химических показателей в разграничение лесных почв междуречья Оби и Томи по степени осушения (Ефремова и др., 2006, 2007).

Цель работы: в торфяных почвах болотных сенокосов разной глубины осушения выявить закономерности сезонной активности дегидрогеназы в связи с динамикой экологических параметров. Методами математической статистики решали следующие задачи:

а) установление основной тенденции (тренда) дегидрогеназной активности, измерение интенсивности сезонных колебаний (индексов сезонности) и построение хода сезонной волны в почвах разной степени осушения,

б) построение парных регрессионных моделей связи активности дегидрогеназы с гидротермическими и химическими показателями почвенной среды,

в) анализ взаимообусловленного эффекта экологических параметров и выявление доминантных факторов, регулирующих дегидрогеназную активность торфяных почв разной глубины осушения,

г) статистическая оценка взаимосвязи активности почвенной дегидрогеназы и фенолоксидаз, комплексно осуществляющих биохимические реакции преобразования органического вещества торфяного субстрата.

Изучение сезонной активности дегидрогеназы в торфяных почвах разной глубины осушения позволит выявить доминантные экологические факторы, регулирование которых создает возможность управлять ферментативной активностью почв, определяющей интенсивность биохимической трансформации органического вещества и улучшать лесорастительные свойства болот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужило болото мезотрофного типа (географические координаты

56°23'71" с.ш., 84°34'04" в.д.), осушенное сетью мелких открытых каналов с различным междренним расстоянием с целью лесомелиорации 20–25 лет тому назад (к моменту исследования). Болото занято сосновыми древостоями (*Pinus sylvestris* L.) естественного происхождения. В пространстве осушительной сети выбраны три реперные точки, расположенные на междуречных полосах 47, 94 м и на стыке магистрального и ловчего каналов, которые характеризуют слабо, умеренно и интенсивно осушенные почвы. Среднемноголетний уровень стояния почвенно-грунтовых вод за май – октябрь составил 23.2, 41.5 и 70.2 см соответственно. Достоверность разбиения (дискриминации) торфяных почв в пространстве гидромелиоративной сети статистически обосновано методами многомерного статистического анализа (Ефремова и др., 2006, 2007).

Торфяная залежь мощностью более 3 м сложена осоково-сфагновыми торфами и представляет собой свиту погребенных почв. Современные почвообразовательные процессы протекают преимущественно в верхних 30 см торфяной залежи, залегающих, как правило, выше средневегетационного уровня стояния верховодки, – зона сосредоточения сосущих корней растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных. По классификации (Скрынникова, 1964; Пьявченко, 1978; Ефремова, 1992), почвы – освоенные переходного (мезотрофного) типа на мощных осоково-сфагновых торфях. Зольность торфяного субстрата снижается по профилю залежи и слабо возрастает с глубиной осушения. Она равняется: 8.9–5.2%, 10.6–5.8, 15.6–6.9% соответственно. Объемная влажность, температура и воздухоемкость современных почв за вегетационные периоды 3-х лет в среднем составили: в условиях слабого осушения – 77%, 10°C и 25%, умеренного – 42, 11 и 56, интенсивного – 29%, 12°C и 67%.

Степень гумификации (сумма гуминовых и фульвокислот) современной слабо осушенной торфяной почвы переходного типа (0–30 см) исходя из вариации по горизонтам, составляет в среднем 33% и характеризуется как слабая (оценка по: Ефремова, 1992). Обогащенность органического вещества азотом (C/N) – 21–44. Запасы гумуса в коренасыщенном слое 0–20 см очень низкие – 49 т/га. Тип гумуса – отношение углерода гуминовых кислот к углероду фульвокислот (Сгк:Сфк) 1–1.5 в горизонтах 0–5, 5–10. 10–20 и 20–30 см расширяется с глубиной и характеризует фульватно-гуматный тип гумуса.

Степень гумификации торфа возрастает до средних характеристик при умеренном осушении почв (46%) и высоких – при интенсивном (53%). Содержание гумуса увеличивается до 93 и 97 т/га соответственно. Обогащенность органического вещества азотом повышается по сравнению с почвами слабого осушения в 1.5 раза. Тип гумуса сохраняется фульватно-гуматным в режиме интенсивного осушения

и при умеренной гидромелиорации преобразуется в гуматный — 1.5–2.

Современные, морфологически слабо дифференцированные почвы, изучались по горизонтам 0–5, 5–10, 10–20, 20–30 см, которые разграничивались преимущественно по степени загруженности сосущими корнями, слабо — цвету и плотности торфяных слоев. Сезонную активность почвенных оксидоредуктаз на каждом из трех объектов изучали в течение одного года с июня по октябрь с шагом 5–8 дней (в среднем неделя), то есть в общей сложности в течение трех лет. Годы наблюдений практически не различались погодными условиями. Сумма среднемесячных температур за май–октябрь составила 70.5, 69.0, 71.6°C, сумма осадков — 284.6, 283.2, 299.2 мм. Это обстоятельство позволило проводить сравнительный анализ сезонной активности дегидрогеназ на основании положения объектов в пространстве осушительной сети.

Определяли актуальную анаэробную дегидрогеназу в естественно-влажных образцах (без добавления глюкозы) при разрежении 10–12 мм рт. ст. 2–3 мин и последующем компостировании в термостате при 30°C в течение суток (метод Галстяна, Хазиев, 2005). Активность дегидрогеназы выражали в мг формазана на 1 г абс. сух. навески за 24 ч. Определение активности пероксидазы выполнено по руководству Ф. Х. Хазиева (1996) — метод К.А. Козлова. Изучение сезонной активности дегидрогеназы и пероксидазы выполнялись параллельно в одни и те же годы и сроки. В сезонной динамике, наряду с ферментативной активностью, изучали условия почвенной среды. Окислительно-восстановительный потенциал, реакцию среды (рН) измеряли с помощью переносного рН-метра-милливольтметра ППМ-03М I непосредственно в почвенном профиле по горизонтам свежевыкопанного в день определения разреза, а также температуру почв штыревыми термометрами. Из этого же разреза отбирали почвенные образцы на химический анализ. Полевую влажность определяли термостатно-весовым методом с последующим перерасчетом на объемную массу (объемная влажность). Анализ состава органического вещества выполнен по методике, разработанной для торфяно-болотных почв (Пономарева, Николаева, 1959).

Статистический анализ экспериментальных данных выполнен по руководству (Халафян, 2007). Статистическая характеристика рядов распределения сезонной активности дегидрогеназы — по прописям (Чекотовский, 2002). При обсуждении сезонной анаэробной активности дегидрогеназы использовали подходы системно-экологического анализа, призванного “объяснить пространственно-временные колебания ферментативной активности почв и ... предсказать

возможные ее изменения с изменением отдельных экологических параметров или их совокупности” (Хазиев, 1982, стр. 21).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика активности анаэробной дегидрогеназы. Средневзвешенный потенциал активности дегидрогеназы за июнь — октябрь в современных торфяных почвах (0–30 см) можно оценить как достаточно высокий — 0.71–0.83 мг формазана на 1 г абс. сух. навески за 24 часа (табл. 1). В торфяных почвах Башкирии аналогичный показатель составляет всего 0.27–0.41, в серой лесной почве Южного Урала — 0.18 мг формазана (Мукатанов, 1979; Хабиров, 1979). Профиль лесных торфяных почв вне зависимости от глубины осушения четко дифференцирован на три зоны по активности дегидрогеназы: интенсивную 0–5 см (1.78 единиц), умеренно активную 5–10 см (0.69) и относительно пассивную 10–30 см (0.30 единиц). То есть потенциал дегидрогеназы выделенных зон различается более чем в 2 раза. Дифференциация почвенного профиля объясняется, скорее всего, ризосферным эффектом — максимальной активностью микроорганизмов в прикорневой зоне. Установлено, что в осушенных сосняках верхние 4 см торфяных почв вмещают 58% массы физиологически активных корней диаметром 1–2 см, 4–8 см — 33, 8–18 см — 7, 18–30 см — 1% (Ефремов, Ефремова, 1973). В верхнем горизонте болот переходного (мезотрофного) типа насчитывается 2.0–6.9 млн микроорганизмов на 1 г торфяной почвы, количество которых снижается с глубиной и подвержено сезонным колебаниям, наиболее распространенную группу составляют неспороносные бактерии с преобладанием флюоресцирующих и плесневые грибы (пенициллы и мукоровые) (Загуральская, 1967). О резком уменьшении с глубиной микробной биомассы и ферментативной активности в лесных почвах говорится также в работе (Baldrian, Štursová, 2011).

Сезонная динамика активности дегидрогеназы. Коэффициенты вариации показывают значительные колебания сезонной активности фермента $C_v = 55–109\%$ (табл. 1). Однако графоаналитические построения за июнь — октябрь затрудняют оценку сезонной динамики фермента. Чтобы наилучшим образом отобразить основную тенденцию развития уровней временного ряда, применили математическую функцию — уравнение тренда, которая заменяет эмпирические данные выровненными, теоретическими. Наиболее адекватной функцией сезонного тренда активности дегидрогеназы в толще торфяных почв (0–30 см) — парабола второго порядка. Степень надежности выбранного трендового уравнения связи активности дегидрогеназы и фактора времени подтверждается высокой значимостью коэффициентов детерминации (рис. 1а–в). Выбранный тип

математической функции принимается в качестве количественной модели, знаки параметров b_1 и b_2 выражают ускоренное или замедленное изменение уровней временного ряда: если знак параметра b_1 положительный, а параметр b_2 отрицательный, то выровненные уровни временного ряда увеличиваются с замедлением, равным $2b_2$ (Чекотовский, 2002). Согласно параметрам регрессионных уравнений, в слабо осушенных почвах еженедельное увеличение активности дегидрогеназы составляло в среднем 0.205 единиц с еженедельным средним замедлением 0.022, в почвах умеренно осушенных – 0.291 с замедлением 0.032 мг формазана на 1 г абс. сух. почвы за 24 часа. В режиме интенсивного осушения параболический тренд отражает еженедельное замедление уровней временного ряда в среднем на 0.131 с еженедельным средним ускорением на 0.022 единиц. Ссылаясь на исследования (Загуральская, 1967), противоположную направленность развития ферментативных процессов можно предположительно увязать с большими изменениями в соотношении отдельных групп микроорганизмов, растущих на МПА, в условиях повышенной воздухоемкости торфяных почв, как показано нами выше, 76% против 25% в более влажных условиях. Вместе с тем, уравнения тренда отражают, по сути, лишь основную тенденцию развития потенциала дегидрогеназы и прямого отношения к динамике сезонной активности во времени не имеют (Чекотовский, 2002).

При статистическом изучении сезонных колебаний необходимы данные о внутрисезонных периодах, в случае недельного интервала наблюдений период колебаний равняется месяцу (Чекотовский, 2002). Для более ясной оценки уровней временного

ряда рекомендуется использовать относительные аналитические показатели: темпы роста (индекс сезонности) и темпы прироста. Они определяются как процентные отношения фактических уровней временного ряда y_i к некоторой базе сравнения y_j , за которую приняли среднюю арифметическую взвешенную за весь период наблюдений в слое 0–30 см соответствующих почв. Индекс сезонности: $I_s = y_i/y_j \cdot 100\%$ характеризует относительную скорость изменения уровней временного ряда и показывает, какую часть временного среднего он составляет (табл. 2). В индивидуальных индексах сезонности влияние основной тенденции развития сезонных колебаний (тренда) устраняется (Чекотовский, 2002). На основе темпов роста T (индекса сезонности) рассчитали темпы прироста (ТП) активности дегидрогеназы: $ТП, \% = (T - 100)$. Темп прироста показывает, на какой процент уровень данного срока наблюдений больше или меньше базисного уровня: положительное значение прироста означает увеличение, отрицательное – уменьшение.

Специфический ход сезонных колебаний дегидрогеназы по горизонтам торфяных почв совпадает с выделенными зонами активности фермента в пределах почвенного профиля. Обозначилась область 0–5 см – преимущественно положительных, 10–30 см – отрицательных и 5–10 см – специфических темпов прироста, обусловленных глубиной осушения (рис. 2а–в). Однако выделенные области различаются по интенсивности сезонной динамики и основной тенденции уровней временного ряда в связи с влажностью почв.

В режиме слабого осушения зона положительных темпов прироста активности дегидрогеназы

Таблица 1. Статистические показатели активности дегидрогеназы в лесных торфяных почвах разной глубины осушения за июнь–октябрь

Статистические показатели	Глубина почвенных горизонтов, см				
	0–5	5–10	10–20	20–30	0–30
Слабо осушенные почвы					
Средневзвешенное	2.02	0.46	0.15	0.22	0.71
Медиана	1.96	0.35	0.11	0.19	0.69
Минимум–максимум:	0.35–4.78	0–1.91	0–0.46	0–0.62	0.23–1.47
Коэффициент вариации, %	55	101	82	81	51
Умеренно осушенные почвы					
Средневзвешенное	1.32	0.98	0.52	0.27	0.77
Медиана	1.24	0.81	0.52	0.23	0.77
Минимум–максимум:	0.47–3.40	0–3.15	0–1.20	0–1.02	0.28–1.67
Коэффициент вариации, %	57	82	70	109	51
Интенсивно осушенные почвы					
Средневзвешенное	1.99	0.65	0.39	0.27	0.83
Медиана	1.61	1.61	0.67	0.33	0.62
Минимум–максимум:	0.09–4.36	0.12–1.55	0.13–0.94	0.08–0.56	0.13–1.76
Коэффициент вариации, %	69	65	66	55	59

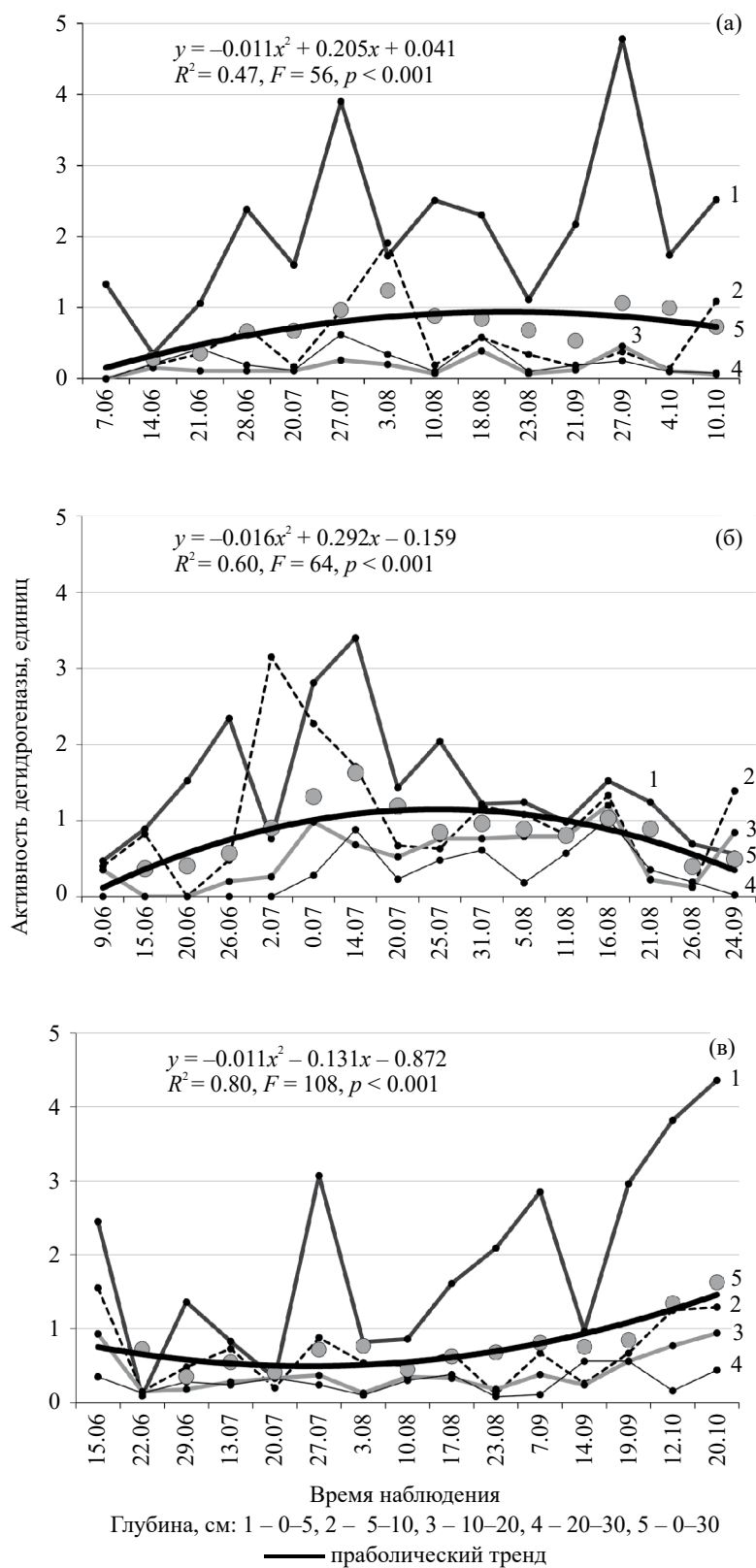


Рис. 1. Динамика активности анаэробной дегидрогеназы в горизонтах лесных торфяных почв разной глубины осушения и основная тенденция (тренд) сезонных колебаний в пределах профиля 0–30 см за июнь–октябрь. Степень осушения: слабо – а, умеренно – б, интенсивно – в, для рис. 1, 2, 4.

Таблица 2. Статистическая группировка средневзвешенной сезонной активности дегидрогеназы за период наблюдений по месяцам

Месяц	0–5 см		5–10 см		10–20 см		20–30 см		0–30 см	
	Ед.	Т, %	Ед.	Т, %	Ед.	Т, %	Ед.	Т, %	Ед.	Т, %
Слабо осушенные торфяные почвы										
Июнь	1.28	180	0.32	44	0.09	13	0.21	29	0.47	66
Июль	2.75	387	0.56	79	0.19	26	0.37	52	0.97	137
Август	1.91	269	0.76	106	0.18	26	0.28	39	0.78	110
Сентябрь	3.48	489	0.27	39	0.29	41	0.22	31	1.06	149
Октябрь	2.13	300	0.61	86	0.08	12	0.09	13	0.73	103
Умеренно осушенные торфяные почвы										
Июнь	1.31	169	0.43	55	0.14	18	0.001	0	0.47	61
Июль	1.94	252	1.60	208	0.66	86	0.41	54	1.16	151
Август	1.13	147	0.71	93	0.63	81	0.46	60	0.73	95
Сентябрь	0.56	73	1.39	181	0.84	109	0.02	3	0.70	91
Интенсивно осушенные торфяные почвы										
Июнь	1.30	157	0.73	88	0.42	51	0.253	31	0.68	82
Июль	1.41	170	0.60	73	0.33	39	0.27	33	0.65	78
Август	1.35	162	0.46	55	0.25	30	0.22	26	0.57	69
Сентябрь	2.26	272	0.53	64	0.39	47	0.41	49	0.90	108
Октябрь	4.09	493	1.27	153	0.86	103	0.30	36	1.63	196

Примечание. Ед. — единицы измерения, мг формаза на 1 г почвы за 24 ч, Т — темпы роста активности дегидрогеназы относительно средневзвешенной за период наблюдений, %.

(0–5 см) характеризуется наиболее выраженными колебаниями и высокими показателями в июле и сентябре +290...+390%. В режиме умеренного осушения они не превышают +150% в июле. В интенсивно осушенных почвах темпы прироста, относительно стабильные летом +60...+70%, повышаются в октябре до +400%. На глубине 5–10 см в июне отмечается падение темпов прироста активности дегидрогеназы независимо от режима осушения. Тенденция сохраняется в слабо осушенных почвах вплоть до октября. В режиме интенсивной мелиорации в октябре наблюдается положительный прирост (+53%). В условиях умеренного осушения положительные темпы прироста (помимо июня) обнаруживаются в течение всего теплого периода. В зоне отрицательного прироста активности дегидрогеназы (10–30 см) максимальное снижение темпов установлено в июне и октябре на глубине 10–20 см (–88%) слабо осушенных почв, 20–30 см (–100%) — умеренно осушенных. В режиме глубокого осушения — в августе в почвенном профиле 10–30 см (–72%).

Обобщая ход сезонной волны активности дегидрогеназы по профилю (0–30 см) торфяных почв, отмечаем снижение темпов прироста в июне вне зависимости от глубины осушения. Последующий временной период характеризуется положительными приростами активности фермента в слабо осушенных почвах и преимущественно отрицательными

в условиях интенсивного и умеренного осушения с единичными положительными подъемами активности в июле и октябре соответственно.

Экологическая обусловленность сезонной активности дегидрогеназы. Сброс избыточной влаги при гидромелиорации болотных экосистем сопровождается прежде улучшением режима аэрации. Поэтому изучение оксидоредуктаз напрямую связано с педоэкопараметрами, прямо или косвенно определяющими уровень развития окислительно-восстановительных процессов: объемная влажность, температура почв, pH, окислительно-восстановительный потенциал.

Влажность почв участвует во всех звеньях формирования ферментативного пула почв — поступлении, стабилизации и течении биохимических процессов. Установлено, что в торфяных почвах сезонная активность анаэробной дегидрогеназы тесно, $R^2 = 0.72–0.84$, по типу параболы второго порядка, обусловлена объемной влажностью почв (рис. 3 а–в). В слабо осушенных почвах (интервал влажности 46–82%) связь характеризуется отрицательной направленностью, в режиме интенсивного осушения (13–51%) — положительной. В умеренно осушенных почвах (18–59%) хорошо выражены разнонаправленные ветви параболы. Точка перегиба, в среднем около 50%, рассчитанная по регрессионным уравнениям, показывает, что дальнейшее повышение объемной влажности

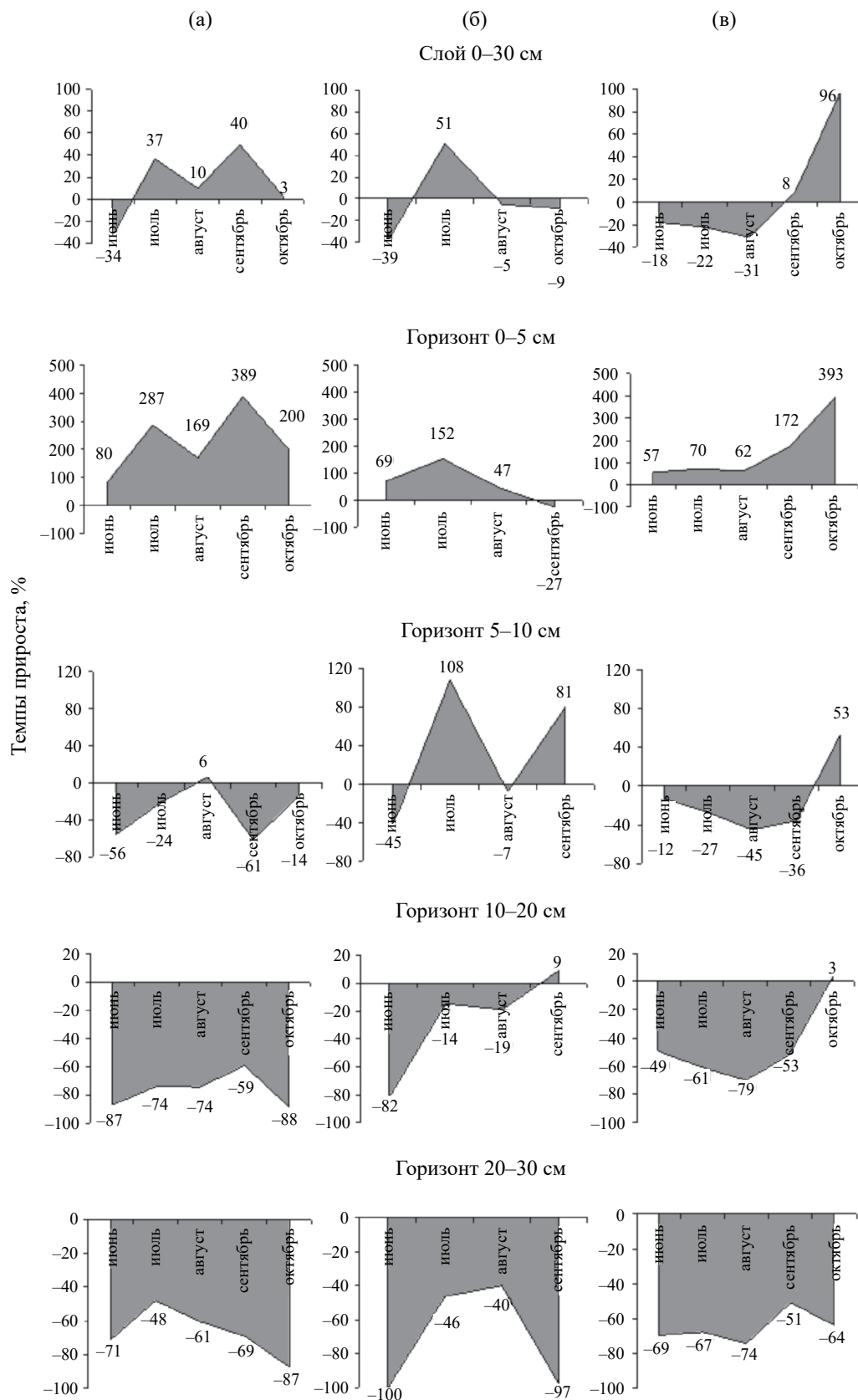


Рис. 2. Темпы прироста сезонной активности дегидрогеназы в горизонтах почв за период наблюдений.

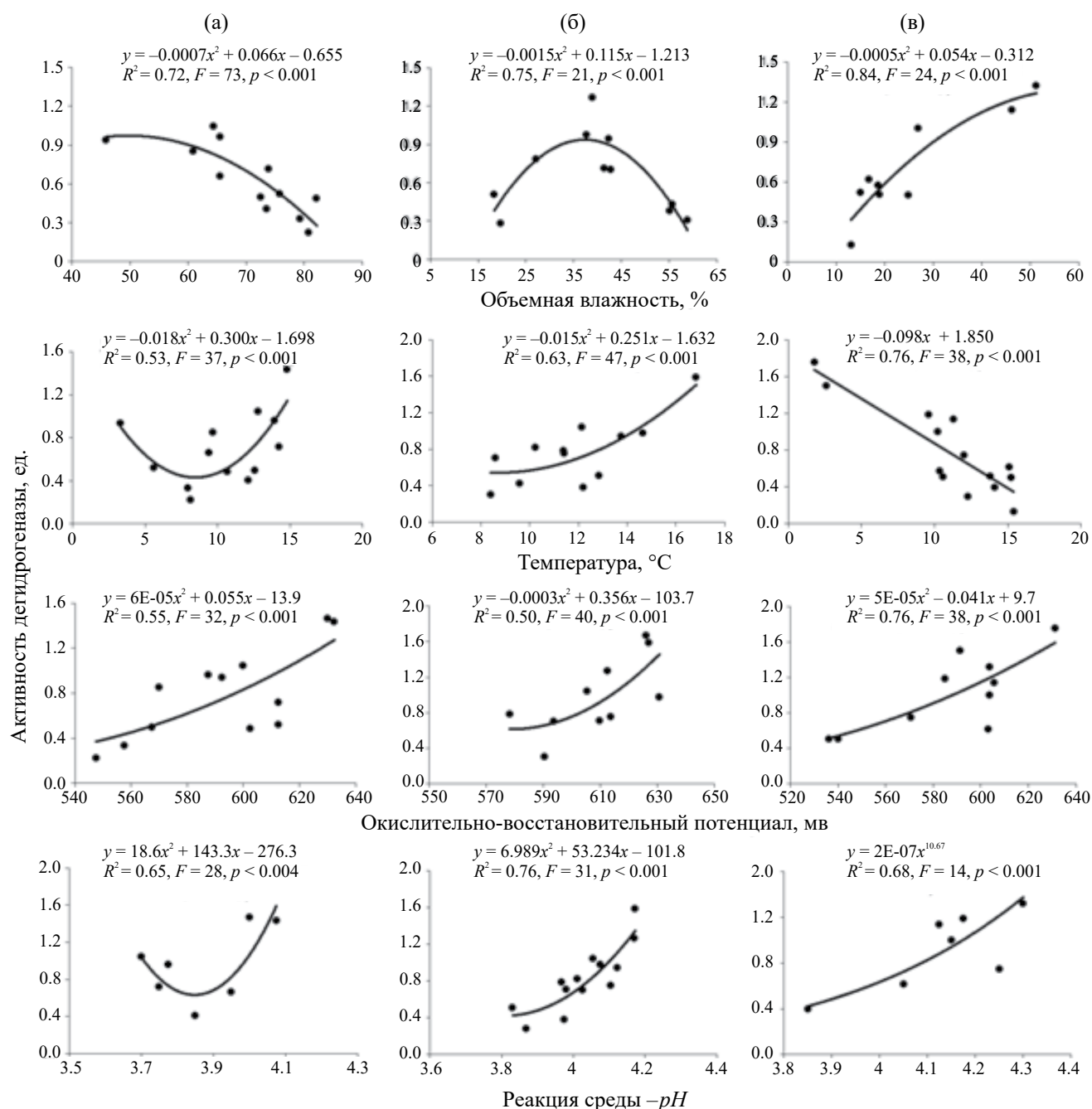


Рис. 3. Регрессионная связь дегидрогеназной активности современных торфяных почв 0–30 см и факторов среды.

сопровождается падением активности дегидрогеназы, снижение — подъемом.

Связь сезонной активности дегидрогеназы и температуры почв в режиме слабого и умеренного осушения достоверно на уровне средней тесноты аппроксимируется функцией параболы (рис. 3 а, б). Точки перегиба составляют около 9°C: ниже указанной величины связь показателей носит отрицательный характер, выше — изменяется на положительный знак.

В интенсивно осушенных почвах связь активности дегидрогеназы и температуры (2–15°C) становится тесной и описывается отрицательной линейной функцией (рис. 3в). Разнонаправленность термальной зависимости дегидрогеназы в осушенных торфяных почвах, возможно, определяется численностью и составом микроорганизмов как основных факторов, определяющих уровень активности дегидрогеназы. Вероятно, в режиме интенсивного осушения

Таблица 3. Результаты канонического анализа связи сезонной активности анаэробной дегидрогеназы с водно-физико-химическими показателями лесных торфяных почв разной глубины осушения

Переменные	Слабо осушенная почва		Умеренно осушенная почва		Интенсивно осушенная почва	
	Канонический вес	Факторная структура	Канонический вес	Факторная структура	Канонический вес	Факторная структура
ОВП	−0.51	−0.72	0.20	−0.22	−0.02	−0.07
Температура	−0.40	−0.25	−0.68	−0.60	0.73	0.83
Влажность	0.75	0.71	−0.25	−0.58	−0.57	−0.70
pH	н.д.*	н.д.	−0.63	−0.77	0.02	−0.15
Оценка корня: $R^2 = 0.65$, χ -критерий −10.99, p -уровень − 0.012			Оценка корня: $R^2 = 0.50$, χ -критерий −7.63, p -уровень − 0.036		Оценка корня: $R^2 = 0.81$, χ -критерий −18.38, p -уровень − 0.001	

Примечание. н.д. — нет данных.

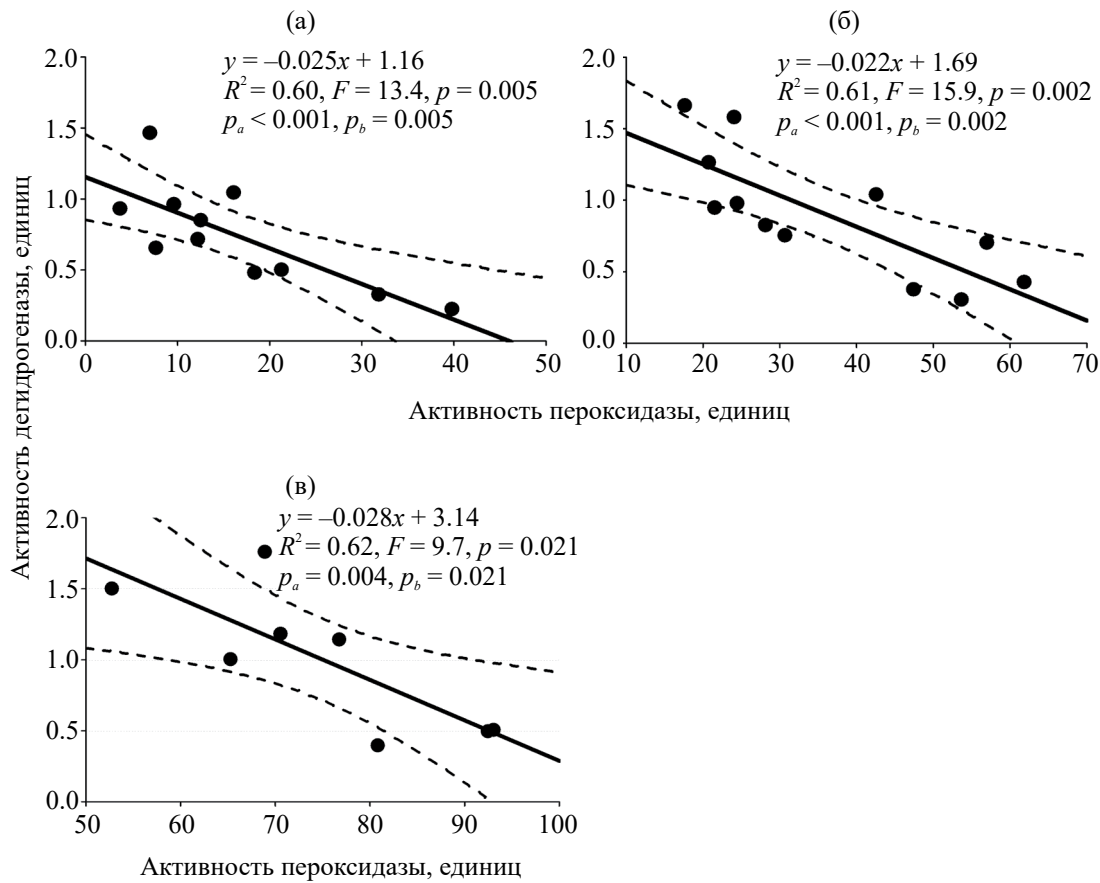


Рис. 4. Регрессионная связь активности дегидрогеназы и пероксидазы лесных осушенных торфяных почв.

снижается жизнедеятельность плесневых грибов, состав и количество которых определяют микробиологический фон почв мезотрофного типа (Загуральская, 1967). Имеет также значение локализация фермента, характер адсорбируемой поверхности и/или специфика отдельных стадий каталитических процессов в условиях сложного ферментного комплекса почв (Хазиев, 2018б).

Сезонная активность дегидрогеназы достоверно на уровне средней тесноты положительно детерминирована окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП – 550–633 мВ) в виде восходящих ветвей параболы (рис. 3а–в). Окислительные условия среды, по всей видимости, способствовали накоплению в почве хинонов – акцепторов отщепляемого дегидрогеназой водорода. Можно допустить,

что именно по этой причине активизируется деятельность почвенных дегидрогеназ. Доказано, что в ответ на поступление в среду специфического субстрата соответствующие ферменты вырабатывают микроорганизмы и растения (Хазиев, 1982).

Активность анаэробной дегидрогеназы торфяных почв и величина рН 3.8–4.3 тесно положительно аппроксимируется параболой (рис. 3а–в). Показано: во всех экосистемах активность оксидоредуктаз обычно возрастает с повышением рН почвы (Sinsabaugh, 2010; Lia *et al.*, 2022). Точка перегиба – рН 3.8.

Канонический анализ. В системных исследованиях ферментативной активности почв важно установить не только роль отдельных экопараметров. Эффект разобшенного влияния любого из показателей на ферментативную активность отличается от их совокупного воздействия. В синтезе результатов сезонной динамики дегидрогеназы и компонентов почвенной среды использовали канонический анализ, который является обобщением множественной корреляции как меры связи одной случайной величины с множеством других случайных величин. Взвешенные суммы переменных из каждого множества определяют канонический корень – некую “скрытую” переменную, объясняющую долю изменчивости между двумя наборами переменных и оценивает вес каждой переменной в совокупном вкладе. С множеством водно-физико-химических показателей в осушенных торфяных почвах выделилось по одному каноническому корню (табл. 3). Канонические индексы детерминации и значимые χ^2 -критерии свидетельствуют, что обсуждаемое множество достоверно объясняет ход сезонных колебаний активности дегидрогеназы на 65% в режиме слабого осушения, 50% – умеренного и 81% – интенсивного. Согласно каноническим весам, наибольший уникальный вклад во взвешенную сумму (каноническую переменную – корень) вносят влажность, рН и температура соответственно. Коэффициенты факторной структуры отражают полную корреляцию между соответствующей переменной и взвешенной суммой (корнем) и интерпретируются подобно коэффициентам корреляции. Во всех вариантах осушенных торфяных почв статистически обоснован гидрологический режим как доминантный фактор, контролирующий сезонную динамику дегидрогеназы. Аналогичные выводы сделаны и другими авторами на примере торфяных почв Белорусского Полесья, серых лесных почв Кавказа, а также семи биогеоклиматических зон Канады (Brockett *et al.*, 2012; Лученок и др., 2013; Козунь и др. 2022;). На фоне доминирующего влияния водного режима специфика глубины осушения проявляется в наиболее высокой канонической корреляции с температурой в режиме интенсивной мелиорации, величиной рН – умеренного, окислительно-восстановительным потенциалом – в условиях слабого осушения.

Общепризнанно, что активность дегидрогеназ имеет большое значение в биохимии гумусообразования в качестве биологических катализаторов реакций дегидрирования различных органических веществ. Мобилизованный дегидрогеназой водород может акцептироваться органическими соединениями типа хинонов (продуктов окисления полифенолов посредством фенолоксидаз) и вновь восстанавливаться. Регрессионные модели на примере лесных торфяных почв достоверно статистически подтверждают: дегидрогеназы и фенолоксидазы функционируют в качестве единого целого с согласованными и разнонаправленными биохимическими процессами, обеспечивая трансформацию исходного органического вещества и образование гумусовых компонентов (рис. 4а–в).

ВЫВОДЫ

1. В лесных торфяных почвах слабо, умеренно и интенсивно осушенных средневзвешенный потенциал анаэробной дегидрогеназы за период наблюдений составил 0.71, 0.77, 0.83 мг формазана на 1 г абс. сух. навески за 24 ч единиц соответственно.

2. Наиболее адекватной функцией основной тенденции (тренда) развития сезонных колебаний активности дегидрогеназы является полином второго порядка. Знаки коэффициентов детерминации показывают, что средняя активность дегидрогеназы в слабо и умеренно осушенных почвах с июня по октябрь еженедельно повышалась с еженедельным средним замедлением, в режиме интенсивного осушения – еженедельно замедлялась с ускорением.

3. Почвенная толща дифференцирована на зоны относительного роста или снижения сезонной активности дегидрогеназы. Выделяются области: преимущественно положительных темпов прироста – 0–5 см, б) отрицательных – 10–30 см и специфического хода в зависимости от условий осушения 5–10 см.

4. Итоги парного регрессионного анализа достоверно характеризуют нелинейную связь активности дегидрогеназы: положительную с окислительно-восстановительным потенциалом и величиной рН, разнонаправленную с объемной влажностью и температурой почв.

5. Методом канонического анализа установлено, что сезонная активность дегидрогеназы на 50–81% определяется совокупным влиянием водно-физико-химических показателей. Канонические корреляции характеризуют объемную влажность в качестве доминантного фактора во всех режимах осушения. В слабо осушенных почвах в числе наиболее важных – окислительно-восстановительный потенциал, умеренно осушенных – величина рН, интенсивно осушенных – температура.

6. Достоверная отрицательная связь активности анаэробной дегидрогеназы и пероксидазы статистически подтверждает их участие в биохимическом преобразовании органического вещества как единого целого.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН — Обособленное подразделение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Галиулин Р. В., Башкин В. Н., Галиулина Р. А. Оценка эффективности рекультивации почв в условиях добычи углеводородов посредством анализа активности дегидрогеназы // *Агрохимия*. 2014. № 6. С. 84–88.
- Даденко Е. В., Мясникова М. А., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Биологическая активность чернозема обыкновенного при длительном использовании под пашню // *Почвоведение*. 2014. № 6. С. 724–733.
<https://doi.org/10.7868/S0032180X14060021>
- Ефремов С. П., Ефремова Т. Т. Влияние осушения на загрузженность торфяной почвы корнями древесных и травянистых растений / Комплексная оценка болот и заболоченных лесов в связи с их мелиорацией. Новосибирск: Наука. 1973. С. 113–127.
- Ефремова Т. Т. Почвообразование и диагностика торфяных почв болотных экосистем // *Почвоведение*. 1992. № 12. С. 25–35.
- Ефремова Т. Т., Овчинникова Т. М., Суховольский В. Г. Многопараметрический анализ почвенных свойств лесных осушенных болот Западной Сибири // *Почвоведение*. 2006. № 6. С. 657–667.
- Ефремова Т. Т., Овчинникова Т. М. Оксидоредуктазная активность торфяных почв как показатель глубины биохимической трансформации лесных осушенных болот Западной Сибири // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2007. № 3. С. 360–367.
- Загуральская Л. М. Микронаселение торфяно-болотных почв Томской области / *Взаимоотношение леса и болота*. М.: Наука, 1967. С. 56–81.
- Инишева Л. И. Закономерности функционирования болотных экосистем в условиях воздействия природных и антропогенных факторов. Томск: Изд-во ТГПУ, 2020. 482 с.
- Козунь Ю. С., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Влияние климата на ферментативную активность лесных почв Северного Кавказа // *Лесоведение* № 3. 2022. С. 262–269.
<https://doi.org/10.31857/S002411482203010X>
- Кононова М. М. Органическое вещество почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 314 с.
- Купревич В. Ф., Щербакова Т. А. Почвенная энзимология. Минск: Наука и техника, 1966. 275 с.
- Лучинок Л. Н., Баран С. Г., Тулина А. С., Семенов В. М. Влияние способа сельскохозяйственного использования на ферментативную активность торфяных почв Полесья и эмиссию CO₂ // *Мелиорация*. 2013. № 2 (70). С. 55–64.
- Мукатанов А. Х. Географо-экологические условия и ферментативная активность почв / *Экологические условия и ферментативная активность почв*. Уфа, 1979. С. 32–41.
- Петерсон Н. В. О сущности явления, описываемого под названием “дегидрогеназная активность почв” / Сборник докладов Симпозиума по ферментам почвы. Минск: Изд-во “Наука и техника”. 1968. С. 120–128.
- Пономарева В. В., Николаева Т. А. К методике изучения органического вещества в торфяно-болотных почвах / *Современные почвенные процессы в лесной зоне*. М.: Изд-во АН СССР. 1959. С. 170–203.
- Пьявченко Н. И. О диагностике типов торфяных почв и залежей при изысканиях и проектировании лесосушительных мелиораций // *Исследования по лесному болотоведению и мелиорации*. Петрозаводск, 1978. С. 5–24.
- Рубин Б. А. Курс физиологии растений. М: Высшая школа, 1971. С. 671.
- Самусик Е. А., Головатый С. Е. ферментативная активность дерново-подзолистых почв в условиях воздействия выбросов предприятия по производству строительных материалов // *Журнал белорусского государственного университета. Экология*. 2022. № 1. С. 104–113.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2022-1-104-113>
- Пьявченко Н. И. О диагностике типов торфяных почв и залежей при изысканиях и проектировании лесосушительных мелиораций // *Исследования по лесному болотоведению и мелиорации*. Петрозаводск, 1978. С. 5–24.

- Скрынникова И. Н. Классификация целинных болотных и мелиоративных торфяных почв СССР // Почвоведение. 1964. № 5. С. 14–27.
- Хабиров И. К. Физические свойства и ферментативная активность почв / Экологические условия и ферментативная активность почв. Уфа, 1979. С. 99–112.
- Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М: Наука, 2005. 252 с.
- Хазиев Ф. Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1982. 203 с.
- Хазиев Ф. Х. Экологические связи ферментативной активности почв. <http://ecobiotech-journal.ru> Экобиотех, 2018а. Т. 1. № 2. С. 80–92.
- Хазиев Ф. Х. О кинетике ферментативных процессов в почвах // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018б. № 3. С. 45–51.
- Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник. М.: ООО «Бином-Пресс». 2007. 515 с.
- Чекотовский Э. В. Графический анализ статистических данных в Microsoft Excel 2000. М.: Издательский дом “Вильямс”. 2002. 464 с.
- Allison S. D. Soil minerals and humic acids enzyme stability: implications for ecosystem processes // Biogeochemistry. 2006. V. 81. № 6. P. 361–373.
- Baldrian P., Štursová M. Enzymes in Forest Soils / Soil Enzymology. Berlin: Springer-Verlag. 2011. P. 61–73.
- Borowicz A., Wyszowska J., Kucharski M., Kucharski J. Resistance of dehydrogenases, catalase, urease and plants to soil contamination with zinc // J. Elementol. 2014. V. 19. № 4. P. 929–936.
- Brockett B. F. T., Prescott C. E., Grayston S. J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada // Soil Biology and Biochemistry. 2012. V. 44. № 1. P. 9–20.
- Brzezińska M., Stepniewska Z., Stepniewski W. Dehydrogenase and catalase activity of soil irrigated with municipal wastewater // Polish Journal of Environmental Studies. 2001. V. 10. № 5. P. 307–311.
- Burns R. G., DeForest J. L., Marxsen J., Sinsabaugh R. L., Stromberger M. E., Wallenstein M. D., Weintraub M. N., Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 58. P. 216–234.
- Caldwell B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review // Pedobiologia. 2005. V. 49. № 6. P. 637–644.
- Karaca A., Cetin S. C., Turgau O. S., Kizilkaya R. Soil enzymes as indication of soil quality / Soil Enzymology. Berlin: Springer-Verlag. 2011. P. 119–148.
- Lia Q., Jiab W., Zhang Q., Cheng X. Localized plant-soil-microbe interactions regulate spatial variations of soil oxidase activities within afforested systems in a subtropical area // Geoderma. 2022. V. 406. № 4. EDN: TPMGTL
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115499>
- Makoi J. H., Mdakidemi P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem // African Journ. of Biotech. 2008. V. 7. № 3. P. 181–191.
- Schaefer R. L'activité déshydrogénasique comme mesure de l'activité biologique globale des sols. // Ann. Inst. Pasteur. 1963. V. 105. № 2. P. 326–331.
- Sinsabaugh R. L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 391–404.

Systematic-ecological estimation of seasonal activity of dehydrogenase in drained swamp soils of interstream of Ob and Tom

© 2024 T. T. Efremova[@], S. P. Efremov, A. F. Avrova

Sukachev Institute of Forest, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia
^{@E-mail:} efr2@ksc.krasn.ru

Drained peat soils (Histosols) were studied. In the mode of weak and moderate drainage, the trend of seasonal fluctuations (quadratic parabola) shows a weekly average increase in dehydrogenase activity with a weekly average deceleration, in the intensive mode – a weekly average deceleration with a weekly acceleration for June–October. A reliable nonlinear relationship of enzyme activity was revealed: positive – with redox potential and pH, multidirectional – with soil bulk moisture and soil temperature. According to canonical analysis, the discussed set cumulatively determines the seasonal dehydrogenase activity by 50–81%. The hydrological regime is statistically proved as a dominant factor. A negative conjugate interaction of dehydrogenase and peroxidase activity has been established, confirming their participation in the biochemical transformation of organic matter as a whole.

Keywords: seasonal fluctuations trend, growth (decrease) rates, water-physico-chemical indicators, cumulative contribution, paired regression models, canonical analysis.

УДК 181.19:582.76

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ЗАПАСНЫХ УГЛЕВОДОВ В СЕМЕНАХ ИНВАЗИОННОГО ВИДА *ACER NEGUNDO* И АБОРИГЕННОГО ВИДА *ACER TATARICUM* В СВЯЗИ С ИХ КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТЬЮ В БИОЦЕНОЗАХ

© 2024 г. М. В. Семенова[®], В. В. Кондратьева, А. Г. Куклина,
Л. С. Олехнович, Т. В. Воронкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, ул. Ботаническая, 4, Москва, 127276 Россия

[®]E-mail: lab-physiol@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2023 г.

После доработки 19.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Изучали изменения в содержании различных фенолкарбоновых кислот (ФКК) – хлорогеновой (ХК), кофейной (КК), феруловой (ФК), а также суммы флавоноидов и запасных углеводов (моносахаридов, полисахаридов и крахмала) в тканях зародышей семян *Acer tataricum* и *Acer negundo* (аборигенный и инвазивный виды, соответственно) при их хранении с октября по март (холодная камера, $t^{\circ} = +5^{\circ}\text{C}$, влажность 80%). Отмечен значительный рост содержания ХК и отсутствие КК в декабре–январе у аборигенного вида с длительным периодом покоя. У инвазивного вида *A. negundo*, не имеющего периода покоя, уровень ХК также увеличился, но был в десять раз ниже, чем у *A. tataricum*, при этом идентифицирован высокий уровень КК. По содержанию флавоноидов аборигенный вид *A. tataricum* в десять раз превосходит инвазивный *A. negundo*. Содержание углеводов у *A. tataricum* составляло около 40%, а в тканях зародышей семян *A. negundo* около 15% и не менялось в течение всего периода хранения. Обсуждается динамика содержания фенольных соединений и форм запасных углеводов, их связь с активацией метаболических процессов и протекторных антистрессовых механизмов в период холодного хранения семян и конкурентоспособностью в биоценозах.

Ключевые слова: *Acer tataricum*, *Acer negundo*, семена, инвазивный вид, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, запасные углеводы

DOI: 10.31857/S1026347024040092, **EDN:** VHGVQR

Массовое распространение инвазивных видов растений приводит к ряду проблем в природных биоценозах и существенно влияет на экономику региона (Виноградова и др., 2022). В связи с этим изучение агрессивных инвазивных видов, их взаимодействие с аборигенными видами становится все более актуальным.

На территории России встречается около 20 аборигенных видов клена (*Acer* L., *Sapindaceae*). В европейской части страны произрастают: *A. tataricum* L., *A. pseudoplatanus* L., *A. campestre* L., *A. platanoides* L.

Естественный ареал клена татарского *A. tataricum* L. (секция *Ginnala*) в основном расположен в черноземной полосе европейской части России. Он используется в озеленении, изредка дичает.

Одним из активно распространяющихся видов является клен ясенелистный – *Acer negundo* L. (секция *Negundo*), естественный ареал которого находится

в Северной Америке. Он приспособился к различным почвенно-климатическим условиям и расселился от Калининграда до Владивостока (Виноградова и др., 2022). В европейской части России *A. negundo* стал опасным инвазивным видом, вытесняющим аборигенную флору. Он успешно произрастает в густонаселенных районах, проникая в природоохранные зоны. *A. negundo* отличается устойчивостью к биогенным и абиогенным стрессам. Реализация функций агрессивного инвазивного генотипа закрепляется в ходе микроэволюции и сопровождается сложными физиологическими процессами, происходящими в семенах (Виноградова и др., 2022).

Плоды *A. negundo* и *A. tataricum* – крылатки, состоящие из двух крылышек с одним семенем в каждом, созревают в августе – октябре, но осыпаются только в начале вегетации, т. е. остаются на дереве до весны. Семена у обоих видов клена без эндосперма.

Семена *A. tataricum*, хотя и адаптированы к сезонным климатическим изменениям, к моменту опадения плодов, еще не достигают физиологической зрелости. Они обладают выраженным состоянием покоя и нуждаются в длительной стратификации (до 200 дней). Всхожесть семян сохраняется в течение 2–3 лет (Воронина и др., 2021).

Семена *A. negundo* уже в начале августа содержат максимальное количество запасных питательных веществ и готовы к прорастанию (Бугрова, 2014). По данным исследований М.И. Седаевой и А.И. Лобанова (Седаева, Лобанов, 2018) потенциальная жизнеспособность семян *A. negundo* достигает до 96%; у *A. tataricum* – 91%.

В отечественной литературе сведений о биохимических особенностях *A. negundo* и *A. tataricum* очень мало. Обсуждаются различные гипотезы, объясняющие способность видов к быстрой адаптации и последующей натурализации в новых местах обитания (Виноградова и др., 2010). Сравнительное изучение физиологических процессов в отдельных органах натурализирующихся инвазионных и аборигенных видов одного таксона позволяет глубже понять адаптационные особенности их метаболизма (Kupchan *et al.*, 1971; Inoue *et al.*, 1992; Zhao, Cheng 1998; Veselkin *et al.*, 2019). В многоступенчатом адаптационном механизме у растений значительную роль играют фенолкарбоновые кислоты (ФКК), присутствующие в тканях в виде сложных эфиров, а также моносахариды и полисахариды (Dixon, Paiva, 1995; Zhao, Zou, 2002; Boudet, 2007; Pourcel *et al.*, 2007). Процессы метаболизма в семенах инвазионных и аборигенных видов в связи с их конкурентоспособностью исследованы недостаточно. Анализ специфики накопления фенольных соединений и углеводов в зародышах семян этих видов остается актуальным.

Цель данного исследования – сравнить динамику содержания вторичных метаболитов и запасных углеводов в семенах аборигенного вида *A. tataricum* и инвазионного *A. negundo* в период холодного хранения и оценить их конкурентоспособность в биоценозах. Задача изучения – проанализировать изменения содержания фенолкарбоновых кислот, суммы флавоноидов и различных форм углеводов (моносахаридов, полисахаридов и крахмала) в тканях зародышей семян двух видов кленов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Семена аборигенного *A. tataricum* и инвазионного вида *A. negundo* собраны на территории памятника природы “Участок русла реки Суры” (53.725283° с.ш.; 45.495777° в.д.) в окрестностях пос. Луговой Лунинского района Пензенской области в сентябре 2022 г. Для сбора образцов выбирали по 5 деревьев, растущих рядом

в одном биотопе прирусловой поймы. Из среднего яруса каждого дерева собирали зрелые семена и помещали в холодильную камеру при температуре +5°C и влажности 80%. Ежемесячно с октября по март для биохимического исследования выделяли зародыши из 30–40 семян обоих видов. Анализы выполняли на свежем материале. Перед каждым анализом визуально оценивали качество семян (%) обоих видов, отбраковывая семена с повреждениями и пораженные болезнями.

Анализ фенолкарбоновых кислот (ФКК). Анализ проводили методом ВЭЖХ, модифицированным в лаборатории физиологии и биохимии растений ГБС РАН. Навеску зародышей семян массой 0.1 г заливали 80% этанолом и помещали на магнитную мешалку на 1 ч в холодильник (при температуре 3–5°C). Процедуру повторяли три раза. Объединенный экстракт фильтровали и упаривали досуха на ротационном испарителе при температуре 40°C. Сухой остаток растворяли в 1 мл 96% этанола. Экстракт очищали методом тонкослойной хроматографии на силифоловых пластинках в восходящем токе растворителя БУВ: н-бутанол, уксусная кислота и вода (в соотношении 6:1:2). Внешним стандартом были синтезированные аналоги хлорогеновой (ХК), кофейной (КК), феруловой (ФК) кислот (фирма Serva, Германия). Пятно с ФКК счищали с пластинок, элюировали в 2 мл 96% этанола при температуре +5°C, элюат сливали и упаривали досуха. Идентификацию и количественное определение ФКК проводили на изократической системе “Стайер” (Россия) методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой RP-18, жидкая фаза: ацетонитрил, вода и уксусная кислота (в соотношении 50:50:1). Идентификацию ФКК проводили при длине волны 254 нм. Все образцы брали в 5-кратной аналитической повторяемости.

Анализа суммы флавоноидов. Для анализа использовали реактив Фолина-Чокальтеу (Денисенко и др., 2015). Навеску зародышей семян массой 1 г гомогенизировали с добавлением 70% этанола, центрифугировали при 2000 г и надосадочную жидкость доводили водой до объема 25 мл. Из полученного раствора отбирали аликвоты для определения фенольных соединений. В колбе на 25 мл смешивали исследуемый раствор, 0.3 мл реактива, 3 мл 20% Na_2CO_3 и доводили объем до метки. Светопоглощение растворов измеряли через 20 мин при длине волны 720 нм. Сумму флавоноидов определяли по градуировочному графику, построенному ранее, используя спектрофотометр Spekol 300. Для приготовления раствора сравнения в колбе на 25 мл смешивали 3 мл 20% раствора Na_2CO_3 и 0.3 мл реактива Фолина, затем доводили до метки 70% этанолом. Результаты приведены в пересчете на кверцетин.

Анализ состава запасных углеводов. Анализ проводили колориметрическим методом (Минеев,

2001). Навеску семян массой 1 г гомогенизировали с добавлением дистиллированной воды, затем центрифугировали при 2000 г и надосадочную жидкость доводили водой до объема 25 мл, отбирали алиquotы в 3-х повторностях для определения моносахаридов. Для определения полисахаридов и крахмала применяли кислотный гидролиз. Далее в пробирке смешивали алиquotу исследуемого раствора с 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 3 мл 20% раствора Na_2CO_3 , помещали в кипящую водяную баню на 30 мин, затем переносили в колбу на 25 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Моносахариды, полисахариды и крахмал количественно определяли по градуировочному графику, построенному ранее, на спектрофотометре Spekol 300 (Минеев, 2001). Для приготовления раствора сравнения в колбе на 25 мл смешивали 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, 3 мл 20% раствора Na_2CO_3 и доводили до метки дистиллированной водой. Результаты приведены в пересчете на глюкозу.

Статистический анализ. Определение среднего значения показателей (М) и стандартного отклонения ($\pm\text{SEM}$) выполняли в Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во время созревания семян происходит превращение различных органических веществ, при этом основными формами запасных веществ являются крахмал, жиры и белки. По преобладающей форме запасных веществ семена разделяют на крахмалистые и маслянистые. Семена *A. negundo* можно

отнести к маслянистым т. к. по литературным данным уже в начале осени более половины массы семян *A. negundo* составляют запасные питательные вещества, в том числе углеводы 6.8%, жиры — 29.5%, белки — 7.5% (Бугрова, 2014). В нашем исследовании сумма запасных сахаров в семенах *A. negundo* составляла в среднем 15% от массы зародыша и практически не менялась с октября по март. При этом преобладали моно- и полисахариды. Значимое количество крахмала отмечено только в октябре и ноябре.

Данных о составе запасных веществ в семенах *A. tataricum* в литературе не обнаружено. В нашем исследовании в семенах *A. tataricum* сумма углеводов составила до 40% от массы зародыша, представленных, в основном, моносахаридами. Содержание крахмала было менее 25% от суммы запасных сахаров. Оно оставалось относительно стабильным в течение всего периода наблюдений и снизилось к марту (рис. 1). Очевидно, *A. tataricum* по составу запасных веществ семян близок к клену серебристому (*Acer saccharinum* L., секция *Rubra*), происходящему из Северной Америки. Семена *A. saccharinum* содержат до 62% углеводов (Бугрова, 2014), так же, как и у *A. tataricum* опадают весной, а для их проращивания требуется длительная холодная стратификация.

Фенолкарбоновые кислоты, активно участвующие в ростовых и протекторных механизмах, часто находятся в растениях в виде сложных эфиров. Так, наиболее распространенная ХК является сложным эфиром КК и хинной кислоты. Она формирует устойчивость растений к поражению фитопатогенными грибами, является регулятором ростовых процессов (Дейнека и др., 2008). Однако собственно ХК обладает слабой активностью, наиболее

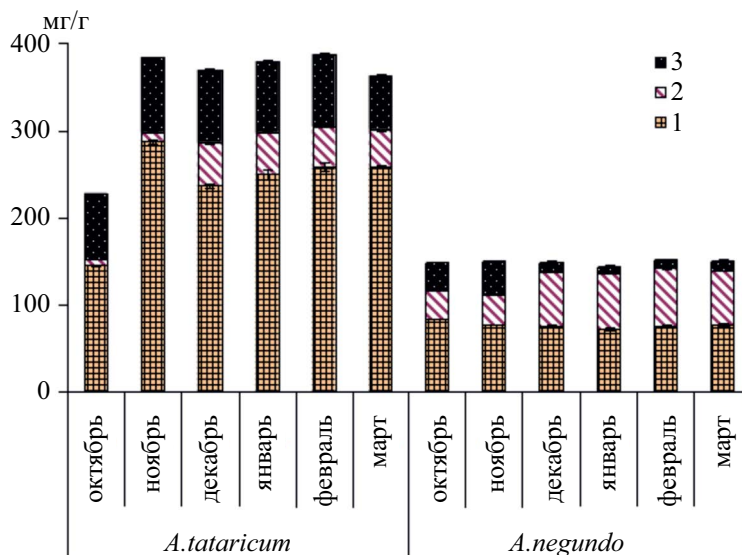


Рис. 1. Динамика содержания запасных сахаров в семенах *Acer tataricum* и *Acer negundo* в период холодного хранения: 1 — моносахара, 2 — полисахариды, 3 — крахмал, мг/г воздушно-сухой массы.

Таблица 1. Содержание ФКК в тканях зародышей семян *Acer tataricum* и *A. negundo*, мкг/г

Дата	<i>Acer tataricum</i>			
	ХК	КК	ФК	КК/ХК
Октябрь	1.58 ± 0.18	0.82 ± 0.05	нет	0.52
Ноябрь	40.24 ± 2.27	нет	3.83 ± 0.33	нет
Декабрь	252.84 ± 5.89	нет	6.62 ± 0.55	нет
Январь	182.75 ± 5.89	нет	4.25 ± 0.32	нет
Февраль	44.40 ± 1.05	нет	2.27 ± 0.64	нет
Март	0.49 ± 0.05	нет	0.07 ± 0.02	нет
	<i>Acer negundo</i>			
	ХК	КК	ФК	КК/ХК
Октябрь	1.61 ± 0.16	0.94 ± 0.08	нет	0.58
Ноябрь	1.41 ± 0.11	0.96 ± 0.05	нет	0.68
Декабрь	2.69 ± 0.25	0.77 ± 0.07	0.11 ± 0.02	0.3
Январь	2.54 ± 0.24	0.99 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.4
Февраль	1.23 ± 0.17	0.57 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.48
Март	1.71 ± 0.24	0.44 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.26

активна КК, являющаяся ее производным. В связи с этим более корректно оценивать воздействие ФКК на устойчивость растений к биогенным и абиогенным стрессам по соотношению КК/ХК (Meng *et al.*, 2013). В наших исследованиях выявлена отрицательная корреляция между соотношением КК/ХК и степенью поражения патогеном (Каштанова и др., 2021). Защитные функции оксикоричных кислот отмечены в экспериментах с листьями *Urtica dioica* L., клеточные стенки которых утолщаются и препятствуют проникновению токсичных веществ (Бобина и др., 2021). В растениях часто присутствует феруловая кислота, которая входит в состав лигнина, участвует в метаболизме свободных радикалов, блокирующих активные формы кислорода, в тканях растений. ФК, как правило, представлена в виде гликозида (Blum, Rebbeek, 1989; Dixon, Paiva, 1995).

В тканях зародыша обоих видов клена в течение всего периода наблюдений идентифицировали ХК и ФК, а у *A. negundo* – еще и КК (табл. 1).

Динамика этих фенольных соединений с октября по март существенно не отличалась у аборигенного и инвазионного видов. В октябре уровень ХК почти одинаков у обоих видов. В этот период и у *A. negundo* и у *A. tataricum* идентифицирована КК, а ФК не найдена в тканях зародышей обоих видов клена.

В декабре-январе у аборигенного вида с длительным периодом покоя уровень ХК возрастает в сотни раз по сравнению с исходным, достигая максимума, а затем снижается в марте, при этом КК не обнаружена.

У *A. negundo*, не имеющего периода покоя, содержание ХК также растет в декабре-январе, а в остальные месяцы существенно не меняется, при этом отмечается высокий уровень КК, снижающийся к марту. Максимальное соотношение КК/ХК

отмечено в ноябре и феврале, т. е. при вхождении в период отрицательных температур и при подготовке к весенней вегетации в естественных условиях. Уровень ФК на порядок выше у *A. tataricum*, максимум содержания ее в тканях клеток зародыша, как и ХК, в декабре-январе. Вероятно, в семенах *A. negundo*, не имеющих периода покоя идут активные метаболические процессы по подготовке к быстрому прорастанию при возникновении подходящих условий и ФКК использовались для включения ростовых процессов и запуска протекторных антистрессовых механизмов.

В наших лабораторных опытах семена *A. negundo* прорастали и в январе, и в феврале, и в марте, образуя жизнеспособные проростки, тогда как у *A. tataricum* семена не прорастали в марте, после 5 месяцев стратификации (Кондратьева и др., 2023). Выявлено, что количество полноценных семян с неповрежденным зародышем у *A. negundo* выше, чем у семян *A. tataricum* в период хранения при температуре +5°C (табл. 2).

Несмотря на то, что общее содержание ХК за изученный период в зародышах семян *A. tataricum* превосходило более чем в 100 раз уровень ХК у *A. negundo*, активный метаболит, КК, отсутствовал. Вероятно, без специфических внешних условий (стратификация) запуск ростовых и протекторных механизмов у *A. tataricum* происходит медленней, чем у *A. negundo*, семена долго не прорастают и проростки теряют преимущество при конкурентной борьбе за выживание и распространение в биоценозе.

С формированием протекторных антистрессовых механизмов связаны наиболее часто встречающиеся в растениях фенольные соединения – флавоноиды (Pourcel *et al.*, 2007). Среди этих

Таблица 2. Визуальная оценка качества зародыша в семенах *A. negundo* и *A. tataricum* при холодном хранении, %

Месяц	<i>A. negundo</i>	<i>A. tataricum</i>
Октябрь	100	100
Ноябрь	100	95
Декабрь	96	75.5
Январь	90	78.2
Февраль	92	60.5
Март	94	70.4

Таблица 3. Динамика содержания суммы флавоноидов в семенах *A. tataricum* и *A. negundo* в период холодного хранения, мг/г воздушно-сухой массы

Дата	<i>A. tataricum</i>	<i>A. negundo</i>
Октябрь	163.5 ± 11.2	2.11 ± 0.08
Ноябрь	22.2 ± 1.3	2.33 ± 0.09
Декабрь	22.4 ± 0.5	2.72 ± 0.09
Январь	23.7 ± 0.7	2.61 ± 0.09
Февраль	23.5 ± 0.6	2.62 ± 0.12
Март	22.3 ± 1.2	3.92 ± 0.19

многофункциональных соединений выделяют семь групп, различающихся по химическому строению и свойствам, участвующих в окислительно-восстановительном метаболизме (Волинец, 2013; Загоскина, 2018). Флавоноиды, по-видимому, играют значительную роль в процессе созревания семян. Высокая антиоксидантная активность обнаружена как в водных, так и в спиртовых экстрактах из молодых листьев, женских и мужских цветков *A. negundo* (Виноградова и др., 2022). В цветках *A. negundo* содержатся флавоноиды, обладающие антиоксидантной активностью, а в зрелых плодах их уровень в 3 раза ниже, чем в зеленых (Куклина, Цыбулько, 2020). Значительные отличия выявлены нами между семенами *A. negundo* и *A. tataricum* по содержанию флавоноидов. В семенах *A. negundo* уровень флавоноидов стабильный и невысокий по сравнению с *A. tataricum* с октября по март (табл. 3). В семенах *A. tataricum* наибольшее количество флавоноидов отмечено в октябре. В ноябре их содержание резко снизилось в это же время значительно возросло количество моносахаридов. В тот же период, в ноябре зафиксировано поражение семян *A. tataricum* кленовым долгоносиком-семяедем ~ до 30%. Поскольку флавоноиды часто находятся в растительных тканях в форме гликозидов, возможно, при расходовании активной части молекулы на метаболические процессы высвобождаются моносахара, пополняющие фонд запасных углеводов. В дальнейшем с ноября по март сумма флавоноидов в семенах *A. tataricum* оставалась стабильной (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что семена аборигенного вида *A. tataricum*, имеющего продолжительный период покоя и нуждающиеся в длительной стратификации, отличаются высоким уровнем ФКК, флавоноидов и запасных углеводов (преимущественно моносахаридов). Но в них не идентифицирована КК – наиболее активный метаболит, в сравнении с ХК.

Установлено, что инвазионный *A. negundo* по сравнению с аборигенным *A. tataricum* отличается рядом преимуществ, способствующих лучшим конкурентным возможностям. Его семена, не требуют стратификации, до весеннего периода они сохраняют хорошую доброкачественность и высокую жизнеспособность. В осенне-зимний период в семенах *A. negundo* отмечен низкий уровень ХК и ФК, флавоноидов и запасных углеводов, но высокий уровень КК.

Возможно, в семенах *A. negundo*, не имеющих периода покоя, ростовые и протекторные механизмы активны в течение всего осенне-зимнего периода благодаря комплексу вторичных метаболитов и запасных веществ. При появлении благоприятных условий температуры и влажности семена *A. negundo* быстро прорастают, образуют дружные всходы и занимают свободные участки в биоценозе, препятствуя росту и развитию аборигенных растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме Государственного задания ГБС РАН № 075-00745-22-01 “Инвазионные растения России: инвентаризация, биоморфологические особенности и эффективные методы контроля расселения”, № госрегистрации 122042600141-3. Благодарим Министерство Науки и Высшего образования РФ за поддержку ЦКП “Гербарий ГБС РАН”, грант 075-15-2021-678.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны инженеру О.Л. Ениной за помощь в подготовке образцов к анализу и первичную обработку результатов исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ
ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бобина Е. А., Шишорина Л. А., Дьякова Н. А. Влияние антропогенного воздействия на накопление оксикоричных кислот в листьях крапивы двудомной, собранной в урбаноценозах Воронежской области // Смоленский медицинский альманах. 2021. № 1. С. 48–51.
- Бугрова, К. В. Доброкачественность и всхожесть семян клена ясенелистного и клена Гиннала // Научное творчество молодежи — лесному комплексу России: материалы X Всерос. науч.-техн. конф. студентов и аспирантов; ред. С. В. Залесов [и др.]. — Екатеринбург: УГЛТУ. 2014. Ч. 2. С. 22–24.
- Виноградова Ю. К., Майоров С. Р., Хорун Л. В. Черная книга флоры Средней России: чужеродные виды в экосистемах Средней России. М.: ГЕОС. 2010. 512 с.
- Виноградова Ю. К., Майоров С. Р., Костина М. В. Клен ясенелистный (*Acer negundo* L.): морфология, биология и оценка инвазивности. М.: Т-во науч. изданий КМК. 2022. 218 с.
- Вольнец А. П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск: Беларуская наука. 2013. 283 с.
- Воронина В. П., Долмонега М. А., Зарубина А. В. Биологические особенности видов рода клен (*Acer*) на урбанизированных почвах Нижнего Поволжья // Вестн. Бурят. гос. с.-х. акад. им. В. Р. Филиппова. Улан-Удэ. 2021. N 2(63). С. 69–76. <https://doi.org/10.34655/bgsha.2021.63.2.010>
- Дейнека В. И., Хлебников В. А., Сорокопудов В. Н., Анисимович И. П. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Berberidaceae // Химия растительного сырья. 2008. № 1. С. 57–61.
- Денисенко Т. А., Вишникин А. Б., Цыганок Л. П. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. № 4. С. 373–380. <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.4.012>.
- Загоскина Н. В. Фенольные соединения: функциональная роль в растениях. М.: ИФР РАН, 2018. 443 с.
- Каштанова О. А., Ткаченко О. Б., Кондратьева В. В., Олехнович Л. С., Воронкова Т. В. Устойчивость таксонов конского каштана *Aesculus* к каштановой минирующей моли *Cameraria ohridella* // Субтропическое и декоративное садоводство. 2021. Вып. 79. С. 153–163. <https://doi.org/10.31360/2225-3068-2021-79>
- Кондратьева В. В., Семенова М. В., Олехнович Л. С., Воронкова Т. В., Енина О. Л. Клен ясенелистный (*Acer negundo* L.) как фактор воздействия на растительность речной поймы, физиологический аспект // Теоретические и прикладные аспекты организации проведения и использования мониторинговых наблюдений. Материалы международной научной конференции. Минск. 2023. С. 216–218.
- Куклина А. Г., Цыбулько Н. С. Фитохимический анализ генеративных органов и листьев *Acer negundo* и *A. platanoides* // Вестник ТвГУ. Серия “Биология и экология”. 2020. Вып. 1 (57). С. 139–148.
- Минеев В. Г. Определение растворимых углеводов фотометрически с пикриновой кислотой (модификация Соловьева) // Практикум по агрохимии. 2-е изд. М.: Изд-во МГУ. 2001. С. 419–422.
- Седаева М. И., Лобанов А. И. Фенология и репродуктивная способность растений рода *Acer* L. в дендрарии Института леса им. В. Н. Сукачева (Красноярск) // Hortus Botanicus. 2018. Т. 13. С. 260–272.
- Blum U., Rebbeek J. Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture // J. Chem. Ecol. 1989. V. 15. P. 917–928.
- Boudet A.-M. Evolution and current status of research in phenolic compounds // Phytochemistry. 2007. V. 68. P. 2722–2735.
- Dixon R. A., Paiva N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1085–1097.
- Inoue T., Sakurai N., Nagai S. Studies on the constituents of Aceraceae plants (X). Isolation of flavonoid glycosides and a cerebroside from the leaves of *Acer negundo* // Shoyakugaku Zasshi. 1992. V. 46. № 3. P. 261–264.
- Kupchan S. M., Takasugi M., Smmith R. M., Steyn P. S. Tumor inhibitors. LXII. Structures of acerotin and acero-cin. Novel triterpene ester aglycones from the tumor inhibitory saponins of *Acer negundo* (maple) // Journal of Organic Chemistry. 1971. V. 36. P. 1972–1976. <https://doi.org/10.1021/jo00813a028>
- Meng S., Cao J., Feng Q., Peng J., Hu, Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review // Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2013. V. 2013. Article ID801457, 11 p. <http://doi.org/10.1155/2013/801457>
- Pourcel L., Routaboul J. M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions // Plant Sci. 2007. V. 12. № 1. P. 29–36.
- Veselkin D. V., Kuyantseva N. B., Chashchina O. E., Mumber A. G., Zamshina G. A., Molchanova D. A. Levers of leaf damage by phyllophages in invasive *Acer nungundu* and native *Betula pendula* and *Salix caprea* // Russian Journal Ecology. 2019. V. 50. №.6. P. 511–516. <https://doi.org/10.1134/S1067413619060134>
- Zhao L., Cheng X. Comparative Analysis on Water Soluble Phenolic Substances in Male and Female Plant Leaves of *Acer negundo* L. // J. of Xinjiang Agricultural University. 1998. V. 3. P. 229–232.
- Zhao H. J., Zou Q. Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress // Photosynthetica. 2002. V.40. P. 523–527.

**Phenolic compounds and spare carbohydrates content dynamics
in seeds of the invasive species *Acer negundo* and the native species *Acer tataricum*
in connection with their competitiveness in biocenoses**

© 2024 M. V. Semenova[@], V. V. Kondrat'eva, A. G. Kuklina,
L. S. Olekhovich, T. V. Voronkova

Federal State Budgetary Institution of Science N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the RAS,

⁴ *Botanic Str., Moscow, 127276 Russia*

[@] *E-mail: lab-physiol@mail.ru*

Changes in the content of various phenolic carboxylic acids (FCC) – chlorogenic (HC), caffeic (CC), ferulic (FC), as well as the amounts of flavonoids and spare carbohydrates (monosaccharides, polysaccharides and starch) in the tissues of *Acer tataricum* and *Acer negundo* seed embryos (indigenous and invasive species, respectively) during their storage were studied from October to March (cold chamber, $t^{\circ} = +5^{\circ}\text{C}$, humidity 80%). There was a significant increase in the content of HC and the absence of CC in December-January in an aboriginal species with a long dormant period. In the invasive species *A. negundo*, which does not have a rest period, the level of HC also increased, but was ten times lower than in *A. tataricum*, while a high level of CC was identified. In terms of flavonoid content, the native species *A. tataricum* is ten times superior to the invasive *A. negundo*. The carbohydrate content in *A. tataricum* was about 40%, and in the tissues of *A. negundo* seed embryos about 15% and did not change during the entire storage period. The dynamics of the content of phenolic compounds and forms of spare carbohydrates, their relationship with the activation of metabolic processes and protective anti-stress mechanisms during the cold storage of seeds and competitiveness in biocenoses are discussed.

Keywords: *Acer tataricum*, *Acer negundo*, seeds, invasive species, phenolic carboxylic acids, flavonoids, spare carbohydrates

УДК 574.42

РОЛЬ КОРНЕВЫХ СИСТЕМ *PINUS SYLVESTRIS* L. ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ВТОРИЧНЫХ СОСНОВЫХ ЛЕСОВ НА ВЫРУБКАХ НА КОЛЬСКОМ СЕВЕРЕ

© 2024 г. В. Т. Ярмишко

ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,
ул. проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия
Email: vasiliyarmishko@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 04.01.2024 г.

Принята к публикации 04.01.2024 г.

Исследовалась роль корней и корневых систем *Pinus sylvestris* L. при формировании вторичных сосняков на вырубках Кольского Севера. Установлено, что у сеянцев сосны на нарушенных территориях корневая и побеговая системы формируются достаточно быстро. Уже в I-ом классе возраста проявляются характерные морфологические признаки корневых систем, площади питания деревьев начинают налагаться друг на друга. Основная масса корней (80–85%) сосредоточивается в верхнем 20-сантиметровом слое почвы. Выявлена линейная связь таксационных показателей деревьев с массой корневых систем. Проведенные исследования показали, что формирование лесных сообществ сосны обыкновенной на вырубках Кольского Севера, их устойчивость и продуктивность находятся в прямой зависимости от степени развития отдельных корней и корневых систем в целом.

Ключевые слова: зеленомошно-лишайниковые леса, вырубки, сосна обыкновенная, корни, радиальный рост, микориза, Кольский Север.

DOI: 10.31857/S1026347024040102, **EDN:** VHDFJW

Интенсивное индустриальное развитие Кольского Севера (Мурманская обл.) сопровождается нарастанием освоения лесных ресурсов с применением современной лесозаготовительной технологии, часто не обеспечивающей сохранения молодых поколений леса. Наряду с упомянутыми воздействиями значительный вклад в дестабилизацию лесных экосистем вносят лесные пожары, ветровалы, а также вспышки насекомых-вредителей и болезней. Вследствие этого сокращаются площади продуктивных лесов, нарушается их устойчивость, ослабляются экологические функции лесных экосистем в целом.

Северотаежные леса, сформированные хвойными породами на подзолистых почвах, достаточно устойчивы к суровым природным условиям существования. Однако они чрезвычайно чувствительны к воздействию таких антропогенных факторов, как рубки, пожары, промышленное атмосферное загрязнение, которые нередко приводят к их деградации (Лукина, Никонов, 1993; Ярмишко, 1997; Цветков, 2002; Черненко, 2002; Проблемы экологии..., 2005; Динамика..., 2009; Ярмишко, Игнатова, 2019, 2021; Евдокимов, Ярмишко, 2023 и др.).

Известно, что жизненное состояние, устойчивость и продуктивность вида во многом зависят

от развития и жизнедеятельности корней, роль которых весьма разнообразна. Корневая система является основным органом, служащим для прикрепления растений к почве, обеспечения их устойчивости в сообществе и получения питательных веществ и воды из почвы. Кроме того, она служит местом запаса пластических веществ и синтеза ряда веществ, играющих большую роль в метаболизме растений.

Характер развития и состояние подземных органов во многом объясняет эколого-биологические особенности растений, их приуроченность к определенным условиям местообитаний, способность конкурировать с другими видами (Рысин, Рысина, 1987; Ярмишко, Цветков, 1987; Зайцев, 2008 и др.). Некоторые авторы отмечают, что сосна обыкновенная может приспосабливаться к различным экологическим условиям, развивая как глубоко проникающую, так и поверхностную корневую систему (Лашинский, 1981; Бобкова, 1987; Persson, 1987; Hanisch, Kilz, 1990; Helmisaari *et al.*, 2000 и др.). Пластичность является одной из особенностей корневой системы сосны обыкновенной. Произрастая в широком диапазоне почвенно-гидрологических условий, сосна достаточно активно приспосабливается к их особенностям,

изменяя в определенных пределах свои морфологические характеристики (Ярмишко, Игнатьева, 2021). Для формирования корневой системы важное значение имеет мощность корнеобитаемого слоя почвы, которая может ограничиваться избыточным увлажнением и близким залеганием плотных пород или ортштейновых горизонтов.

Основная цель настоящей работы состояла в изучении и оценке роли корневых систем сосны обыкновенной в формировании вторичных сосновых лесов на вырубках в условиях Кольского Севера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования лесов на Кольском Севере проводились с 1981 по 2021 гг. на постоянных пробных площадях (ППП), заложенных, главным образом, в возобновившихся лесных сообществах на вырубках (рис. 1). Принадлежность сообществ, имеющих

разную степень нарушенности, к одному типу леса устанавливалась по положению в ландшафте, по составу растительности, характеру почвообразующих пород и типу почв. Большая часть (75%) ППП — была заложена в так называемых фоновых районах, где лесные сообщества не подвержены влиянию антропогенных факторов, включая промышленные эмиссии.

Сосновые леса на территории районов исследований распространены в средних частях северных и восточных склонов холмов, реже на относительно ровных участках моренных равнин, сложенных песчаными завалуненными ледниковыми и водноледниковыми отложениями. Для сообществ этой группы характерны Al-Fe-гумусовые подзолистые почвы с толщиной подстилки 3–5 см и содержанием гумуса в иллювиальном горизонте до 2–3%.

Древесный ярус лишайниковых и зеленомошно-лишайниковых сосновых лесов образован сосной обыкновенной — *Pinus sylvestris* L с небольшим

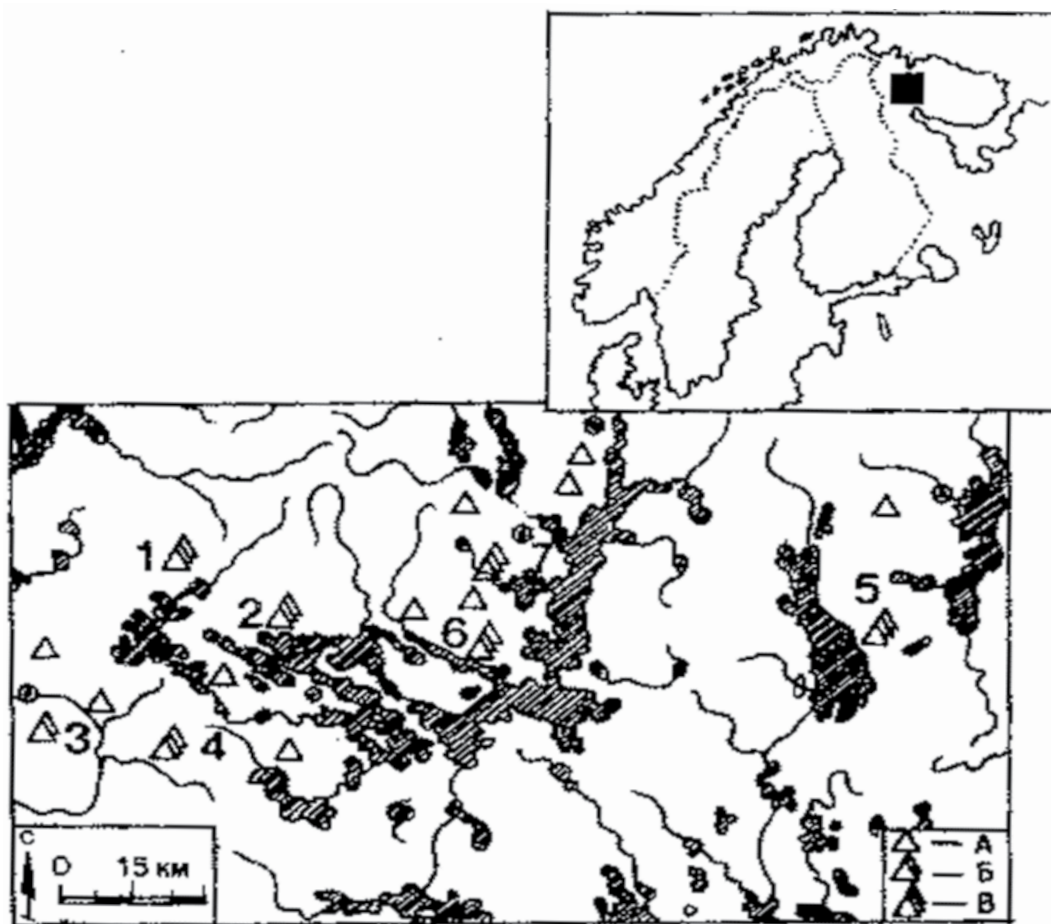


Рис. 1. Схема размещения постоянных пробных площадей (ППП) в сосновых лесах на Кольском Севере. Основные районы исследований: 1 — Ливский; 2 — Мавринский; 3 — Ено-Ковдорский; 4 — Уполокшский; 5 — Ловозерский; 6 — Чунозерский; 7 — Мончегорский. Расположение пробных площадей: А — одиночное; Б — группой из 3–5 ППП; В — группой из 5 и более ППП на небольшой территории.

Таблица 1. Краткая характеристика древесного яруса лесных сообществ на ППП в 4 районах на Кольском полуострове в период интенсивных полевых исследований (1995 г.).

№№ пробных площадей	Тип леса	Состав древесного яруса	Средние таксационные характеристики древесного яруса (древостоя) исследуемых лесных сообществ						Бонитет	Давность пожара, лет
			Возраст, лет	Высота, м	Диаметр, см	Количество деревьев, шт./га	Запас древесины, м³/га	Полнота		
1. Ено-Ковдорский район исследований										
1	С. лишайниковый	10 С	45	9.7	10.9	$\frac{702}{12}$	$\frac{36.7}{0.2}$	0.3	V	65
2	С. зеленомошнолишайниковый	10 С+Б	220	10.4	15.6	$\frac{595}{115}$	$\frac{76.2}{6.9}$	0.4	V _a	—
3	С. зеленомошнолишайниковый	10 С	50	9.9	11.2	$\frac{2600}{134}$	$\frac{44.6}{4.3}$	0.5	V	65
2. Мавринский район										
4	С. лишайниковый	10 С, I ярус 10 С, II ярус	300 120	17.2 12.5	33.3 14.0	$\frac{88}{24}$	$\frac{86.9}{14.9}$	0.3 0.3	V V _a	130
5	С. лишайниковый	10 С+Б	35	6.8	6.1	$\frac{3048}{0}$	$\frac{26.9}{0}$	0.5	IV–V	40
6	С. лишайниковый	10 С	50	10.0	11.4	$\frac{1378}{11}$	$\frac{44.3}{0.1}$	0.4	V	60
3. Уполокшеский район										
7	С. лишайниковый	10 С	50	6.9	5.5	$\frac{7150}{150}$	$\frac{63.0}{0.4}$	0.7	V	50–60
8	С. лишайниковый	10 С	250	10.0	19.0	$\frac{289}{36}$	$\frac{40.1}{4.7}$	0.3	V ₆	—
9	С. лишайниковый	10 С+Б	40	7.0	9.8	$\frac{990}{26}$	$\frac{21.3}{0.5}$	0.3	V	50
4. Ловозерский район										
10	С. зеленомошно-лишайниковый	10 С	50	9.6	8.0	$\frac{4299}{27}$	$\frac{126.4}{0.7}$	0.8	IV	—
11	С. лишайниковый	10 С	210	12.8	26.0	$\frac{295}{9}$	$\frac{115.5}{1.8}$	0.5	V _a	90
12	С. чернично-вороничный	10 С	50	8.0	6.4	$\frac{6815}{22}$	$\frac{126.7}{0.1}$	1.0	V	—

участием березы пушистой *Betula pubescens* L, иногда с единичной примесью ели сибирской *Picea obovata* L (табл. 1). Древесный ярус исследуемых северотаежных сосновых лесов отличается разреженностью, низкой сомкнутостью крон, низкими таксационными характеристиками (высота, диаметр, сумма площадей сечений).

Основу травяно-кустарничкового яруса сосновых лесов формируют *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Empetrum hermaphroditum* Hagerup. Общее проективное покрытие яруса составляет в среднем около 30%. В напочвенном покрове зеленомошно-лишайниковых сосняков в зависимости от давности пожара в разных соотношениях представлены виды родов *Cladonia*, *Cladina* и *Pleurozium schreberi*.

Подбор и закладка ППП выполнялись по общепринятым (ГОСТ 16128-70) и подробно описанным в литературе методикам (Моисеев, 1971; Ярмишко, 1997; Санитарные правила..., 1998; Методы..., 2002 и др.). Размер ППП определялся в значительной мере густотой эдифицирующей синузии (древостоя) исследуемых сообществ. Мы исходили из того, чтобы на ППП, расположенных в молодых и средневозрастных сосняках, было не менее 200 деревьев с диаметром стволов 4 см и более на высоте 1.3 м от корневой шейки. На ППП учету подлежали все особи, имеющие высоту более 1.5 м. По периферии пробной площади отграничивались рабочие зоны, где выполнялись все экспериментальные работы: почвенные разрезы, спиливание и разделка моделей, укусы растительности для определения фитомассы напочвенного покрова, изучения подземных органов растений и выборка из почвы корней модельных деревьев для определения их массы.

Анализ существующих методов изучения корневых систем показывает, что ни один из рассмотренных методов (Методы..., 2002), взятый отдельно, не позволяет в полной мере охарактеризовать строение, развитие и жизненное состояние корневых систем древесных и кустарниковых видов растений. Для получения объективных данных целесообразно применять одновременно несколько методов, дополняющих друг друга. На основе использования существующих методов нами предложен комплексный метод исследования подземных органов древесных растений. Неоднократно проверенный в лесных сообществах метод дает достаточно полное представление о развитии корешков у проростков, о росте и строении корней разных древесных пород в лесных насаждениях (Методы..., 2002).

Некоторые способы учета корней сводятся к раскопкам площадей в пределах средних проекций крон или по средним площадям питания (Молчанов, Смирнов, 1967; Родин и др., 1968), путем ограничения при раскопках определенных площадей (Орлов, 1967; Якушев, 1968) или путем полной раскопки

корневой системы исследуемой модели (Лашинский, 1981; Калинин, 1983, Ярмишко, Цветков, 1987).

При решении задачи по оценке запасов фитомассы на каждой ключевой пробной площади в рабочей зоне были подобраны по 5–9 модельных деревьев сосны. Исследования мы начинали с детального описания и измерения надземных органов исследуемых растений и затем приступали к горизонтальной раскопке корневых систем, обнажая в первую очередь корни около ствола на глубину 25–30 см. Поверхностная раскопка всей корневой системы позволяет установить радиус распространения корней в горизонтальной плоскости, определить длину основных корней, характер их ветвления, площадь питания дерева и особенность использования площади в целом. Затем спиливали дерево, описывали, обмеряли и разделяли его по 1-метровым секциям по фракциям (сухие ветви, живые ветви без хвои и охвоенные, ствол). Потом приступали к постепенному извлечению всей корневой системы из почвы, разделяя корни на мелкие (1–3 мм), средние (3–10 мм) и толстые (>10 мм). Извлеченные и разделанные на части по крупности корни взвешивали, одновременно отбирая образцы на определение абсолютно-сухого веса. Отдельно фиксировали в спирт-глицериновой смеси тонкие проводящие и сосущие корни с микоризными окончаниями для лабораторных исследований и определения типа микориз. Изучение тонких корней сосны обыкновенной с микоризными окончаниями проводили по имеющимся методикам (Шубин, 1973; Семенова, 1980; Hanish, Kilz, 1990).

Изучение радиального прироста скелетных корней сосны выполнено по методике, опубликованной в коллективной монографии (Методы..., 2002) с использованием прибора для измерения ширины годовичных слоев древесины (Ярмишко, 1983).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуя сосновые леса VII–XVII классов возраста на Кольском п-ове, мы обратили внимание на отсутствие под их пологом подроста. Дело в том, что в таких сообществах сформирован мощный живой напочвенный покров из лишайников и мхов, препятствующий прорастанию попадающих на него семян, в которых зародыш может сохраняться в течение длительного времени от воздействия неблагоприятных условий окружающей среды. Однако, попадая на поверхность минерализованной почвы, лишенной напочвенного покрова в результате механизированных лесозаготовок или низовых пожаров, семя прорастает в проросток, который дает начало развитию молодого растения. Причем, у проростков сосны обыкновенной просматривается только стержневой корень и несколько боковых ответвлений.

У всходов сосны обыкновенной на вырубке, где резко ослаблена конкуренция за свет в надземной части и питательные вещества в подземной сфере, достаточно быстро происходит нарастание корневой и побеговой систем.

В процессе развития корневой системы молодых растений меняется физиологическая и структурно образовательная роль ее отдельных компонентов. Так, доля участия главного корня в общей длине корневой системы к концу периода вегетации снижается. На ранних этапах органогенеза стержневой корень и боковые окончания всходов имеют корневые волоски, выполняющие роль сосущих корней. По мере их роста эндодерма пробковеет и корни начинают выполнять, главным образом, скелетную и проводящую функции.

Основная масса боковых корней сосны на начальных этапах формирования распространяется в подстилке и в верхнем минерализованном слое почвы (глубиной до 10 см), который обладает наилучшими физическими свойствами и аэрацией, содержит основные запасы питательных веществ, а также интенсивнее прогревается в начале вегетации.

У молодых растений корни распределяются по глубине проникновения главного корня более равномерно. Однако и здесь большая часть боковых корней разрастается в горизонтальном направлении и часто их размеры по радиусу во много раз превышают размеры кроны (Ярмишко, Цветков, 1987).

В молодых, формирующихся после внешних нарушений, сосняках лишайниковых и зеленомошно-лишайниковых наблюдается интенсивный рост и развитие надземных органов деревьев, и формирование их корневых систем. Причем эти процессы протекают синхронно. В ходе исследований установлена тесная линейная связь

таксационных показателей деревьев с массой их корневых систем в древостоях II класса возраста (рис. 2).

Исследуемые участки сосновых древостоев характеризуются маломощными, в разной степени завалунными почвами с выраженным уплотненным горизонтом, образованным ортштейновыми линзами, оглееными прослойками, скоплением камней. Уплотненный горизонт, отличающийся отсутствием монолитности, представляет собой определенные препятствия для проникновения корней вертикальной ориентации вглубь почвы. Корни сосны при этом развиваются присущими этой древесной породе темпами лишь в пределах слоя почвы, ограниченного снизу уплотненным горизонтом. Так, например, в местах скопления крупных камней или близко расположенного к поверхности почвы уплотненного ортштейнового горизонта, главный (стержневой) корень сосны сильно редуцирован или просто отсутствует (рис. 3).

В других случаях, при достижении препятствия в почве главный корень приостанавливает свой рост или меняет направление с вертикального на горизонтальное. На разрастающиеся толстые боковые корни опирается вся масса надземной части дерева и эти корни, в большинстве своем, обеспечивают механическую устойчивость деревьев в вертикальном положении (рис. 3).

Анализируя радиальный прирост скелетных корней сосны обыкновенной не трудно заметить, что в возрасте до 10 лет наблюдается достаточно тесная связь между приростом в вертикальной плоскости как вверх от анатомической оси, так и вниз ($r = 0.91$; $n = 10$; $P < 0.05$).

По мере увеличения надземной массы и достижением корней уплотненных горизонтов почвы, прирост по направлению от анатомической оси

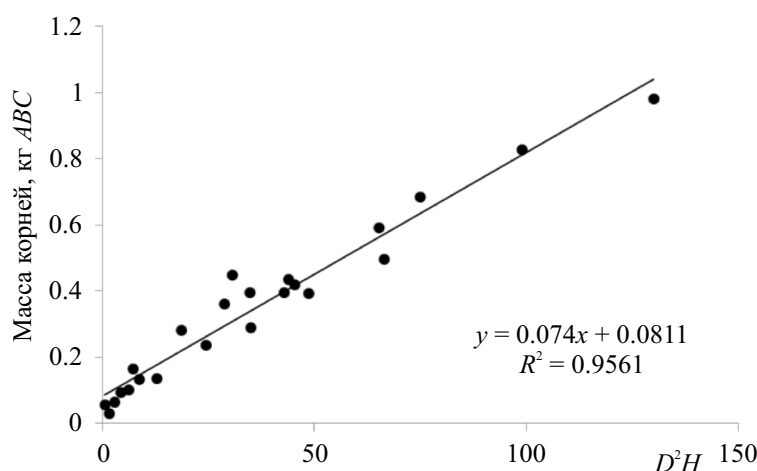


Рис. 2. Аппроксимация зависимости массы корней сосны обыкновенной в древостоях II класса возраста на Кольском полуострове от таксационных характеристик деревьев (D^2H). По вертикали — масса корней в кг АБС, по горизонтали произведение квадрата диаметра на высоту модельных деревьев.

вниз замедляется, а в отдельных случаях прекращается формирование годичных колец. При этом прирост корней вверх от анатомической оси, наоборот, интенсифицируется (рис. 4). В целом, в рассматриваемых условиях роста и развития корневой системы, наблюдается отрицательная связь ($r = -0.33$; $n = 21$; $P < 0.05$) между приростом скелетных корней в вертикальной плоскости (вверх и вниз от анатомической оси). Более того, прирост корня в вертикальном направлении от анатомической оси вниз фактически приостанавливает свой рост (рис. 4).

Следует отметить, что на Кольском Севере не последнее место в жизни растений вообще и в размещении корней на сухих песчаных и супесчаных подзолах в частности, принадлежит теплообеспеченности корнеобитаемых горизонтов почвы. В этих условиях, где практически отсутствуют уплотненные слои почвы, радиальный

прирост молодых скелетных корней наблюдается практически с одинаковой интенсивностью по всем исследованным радиусам (вверх от анатомической оси, вниз, а также в восточном и западном направлениях). При этом существует достаточно тесная связь между приростом древесины скелетных корней в вертикальной плоскости вверх и вниз от анатомической оси ($r = 0.84$; $n = 20$; $P < 0.05$).

На щебнисто-каменистых почвах в древостоях III–IV классов возраста формируются отдельные скелетные корни сосны обыкновенной не эллипсовидной формы сечения, а напоминающие досковидные корни у растений в тропиках. При таком сечении вертикальные стороны корня на значительном, по сравнению с поперечным диаметром, расстоянии располагаются почти параллельно.

В сосняках черничниках главный стержневой корень дерева часто, начиная с глубины 0.4–0.5 м,



Рис. 3. Корневая система сосны обыкновенной III класса возраста, сформированная на подзолистой почве с мощным нижним подстилающим орштейновым горизонтом, содержащим железистые образования, представляющие собой мелкие рассеянные конкреции или крупные гнезда, нередко переходящие в пластообразные формы.

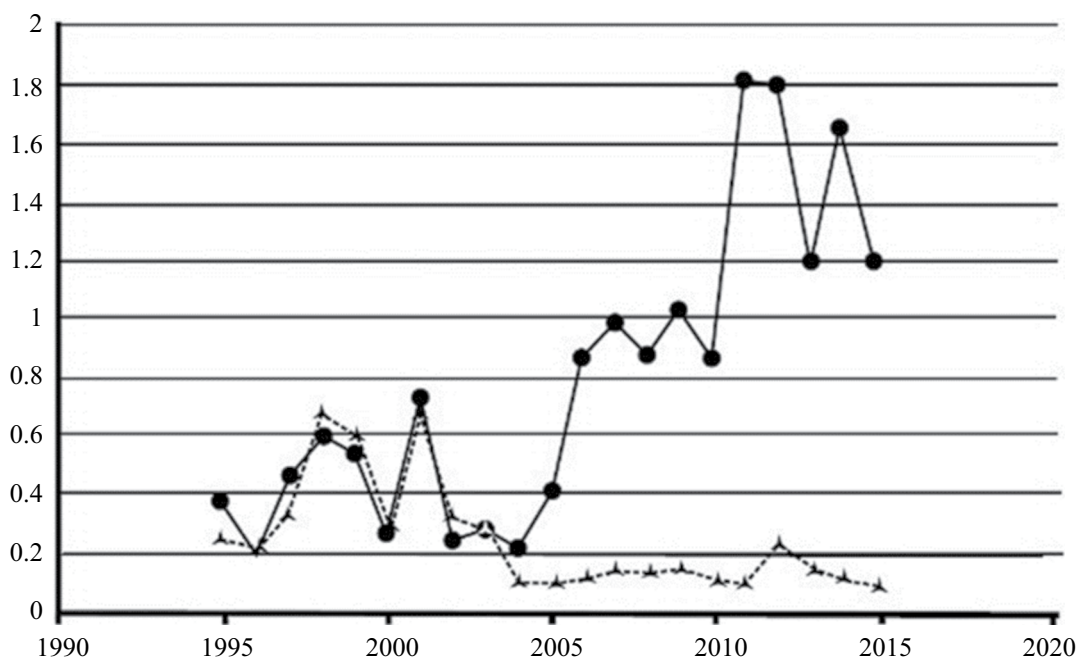


Рис. 4. Динамика радиального прироста скелетных корней сосны об. II класса возраста, произрастающей на щебнисто-каменистых почвах на Кольском Севере. По вертикали – прирост древесины корня в мм, по горизонтали – годы, сплошная линия – прирост скелетного корня от анатомической оси вверх; пунктирная линия – прирост скелетного корня от анатомической оси вниз.

изменяет направление роста и поднимается в вышележащие слои почвы, где гидротермический и воздушный режимы более благоприятны (Цветков, Семенов, 1985). Более глубокие слои почвы в сосновых древостоях на Кольском полуострове осваиваются боковыми корнями главного корня или вертикальными ответвлениями от горизонтальных корней, которые проникают вглубь, используя ходы старых корней, щели и трещины в уплотненных горизонтах. Длина главного корня в пределах скелетной части (с диаметром не менее 10 мм) лишь в двух случаях превышала 1 м. У подавляющего большинства исследованных деревьев сосны обыкновенной III–IV классов возраста она колеблется в пределах от 0.1 до 0.6 м.

Скелетные корни отходящие от корневой шейки и стержневого корня в количестве 5–6, нередко 8–10 шт./дерево, распространяются в горизонтальной плоскости. На расстоянии 20–30 см от ствола ветвятся на корни следующего порядка, которые, в свою очередь, образуют ряд более мелких корней, имеющих многочисленные ответвления, переплетающиеся и заканчивающиеся густой сетью тонких сосущих корешков. Нами установлено, что наибольшее количество боковых корней (II-го порядка) формируется у сосны обыкновенной в сосняках лишайниковых на подзолистых почвах (4–12 шт./дерево).

Интенсивное ветвление корней (до 9 порядков) создает очень разветвленную густую корневую систему, причем площади питания деревьев, несмотря даже на разреженность древостоев в условиях Кольского Севера, налагаются друг на друга. Вблизи ствола горизонтальные скелетные корни находятся на глубине 20–25 см, иногда до 30 см. Затем с удалением от ствола они поднимаются к поверхности почвы и располагаются в перегнойно-аккумулятивном или подзолистом горизонтах (Ярмишко, 1997).

Исследования тонкой физиологически активной части корневой системы сосны показали, что сосущие корни располагаются преимущественно на проводящих корнях диаметром менее 1 мм последнего и предпоследнего порядков ветвления, покрыты грибным чехлом и образуют достаточно разветвленную сеть корней.

На исследованных участках древостоев встречаются относительно большие количества микоризных грибов из родов *Cortinarius*, *Boletus*, *Sarcodon*, *Lactarius* и др. (Ярмишко, 1997). По мнению В.И. Шубина (1973), все они являются хорошими микоризообразователями в сосновых лесах Мурманской области. Проводящие и размещенные на них сосущие корни толщиной менее 1 мм представляют собой постоянно обновляющуюся часть корневой системы (Heikureinen, 1959; Орлов, 1967; Бобкова, 1987; Forest condition..., 2000). Длина у них составляет в среднем 15 см, а прирост за год варьирует в пределах от 3 до 5 см. Некоторые

исследователи (Саляев, 1961; Lye *et al.*, 1980; Gorissen *et al.*, 1991) отмечают, что характер и форма ветвления микоризных окончаний определяют вид растения. Однако вклад отдельных видов в образование микориз на корнях сосны определить пока чрезвычайно сложно. Лишь очень немногие из них можно установить по внешнему виду микоризы (Hanisch, Kilz, 1990).

По форме различают простые, вильчатые, коралловидные окончания и “ведьмины шары” (Саляев, 1961; Шубин, 1973; Семенова, 1980; Hanisch, Kilz, 1990). В условиях Кольского Севера чаще встречаются окончания первой-третьей формы. Клубневидная форма микоризных окончаний характерна для сосущих корней сосны, развитых на торфяных почвах сфагновых типов фитоценозов (Бобкова, 1987). По мере роста мелких проводящих корней на них формируются сосущие и тонкие ростовые корни последних порядков ветвления. Сосущие корни сосны вне зависимости от формы имели длину, не превышающую 8 мм, а диаметр от 0.2 до 0.6 мм. Наиболее часто встречаются микоризные окончания диаметром 0.3–0.4 мм. Продолжительность роста и время жизни у них весьма различны. В исследованных нами сосняках микоризные корни размещались на сосущих корнях сосны в большинстве случаев единично и на них преобладала простая вильчатая и реже коралловидная форма микориз (по классификации Л.А.Семеновой, 1980). Меньшее распространение имеют другие формы микориз, и они приурочены чаще всего к полусгнившим пням и упавшим стволам деревьев, где имеются запасы питательных веществ и влага. С увеличением глубины почвы число микоризных корней на единицу проводящего корня уменьшается.

Проведенные исследования в сохранившихся еще сосновых лесах III–IV классов возраста с разной интенсивностью загрязнения воздуха и почвы показали, что на фоне разнообразных изменений и нарушений роста и развития корней у сосны сохраняется генетически унаследованный тип корневой системы даже в условиях достаточно сильного загрязнения. В начале наших наблюдений было замечено, что в условиях слабых уровней аэротехногенного загрязнения корни сосны реагируют на поступление в почву токсикантов как на удобрения, образуя на сосущих корнях целые колонии (микопласты) сосущих корней с микоризными окончаниями. В дальнейшем, по мере накопления в почве серы и соединений тяжелых металлов, эти микопласты повреждаются и корни с микоризами отмирают.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характер строения и степень развития корневых систем сосны обыкновенной, а также распространение их в почве определяются биологическими

свойствами этой древесной породы и факторами окружающей среды. В лишайниковых и зелено-мошно-лишайниковых сообществах на таежных подзолистых почвах Кольского Севера корневая система сосны проявляет высокую пластичность по отношению к эдафическим условиям. Во всех исследованных сообществах она образует поверхностную корневую систему. Основная масса (до 85%) крупных и мелких корней на дерново-подзолистых почвах сосредоточена в верхнем 20-сантиметровом слое почвы. Сеть же тонких корней, куда входит основная масса активно всасывающих корней, концентрируется в верхнем 10-сантиметровом слое почвы, где более интенсивно протекают все биохимические процессы.

Сосна обыкновенная формирует характерные морфологические особенности корневых систем уже к 10–12 годам. С возрастом принципиальных изменений в их строении не наблюдается — происходит лишь увеличение морфометрических характеристик корней и их массы. Установлена линейная связь таксационных показателей деревьев с массой корневых систем в древостоях I–II классов возраста. Подобная зависимость сохраняется и у древостоев более старшего возраста.

На сухих песчаных и супесчаных подзолах, где практически отсутствуют уплотненные слои почвы, кроме глубоко уходящих корней разрастаются многочисленные поверхностные корни сосны обыкновенной. Радиальный прирост древесины молодых скелетных корней наблюдается практически с одинаковой интенсивностью по всей окружности годичных слоев (вверх от анатомической оси, вниз и в стороны).

Уплотненный горизонт, отличающийся отсутствием монолитности, представляет собой определенные препятствия для проникновения корней вертикальной ориентации вглубь почвы. При этом генетический тип строения корневой системы сосны обыкновенной деформируется. Корни сосны при этом развиваются присущими этой древесной породе темпами и особенностями лишь в пределах неуплотненного слоя почвы. Интенсивность радиального прироста древесины скелетных корней по направлению вверх от анатомической оси в 3 раза выше, чем по направлению вниз. Не редки случаи, когда по мере достижения уплотненных горизонтов почвы и увеличения массы надземной части сосны обыкновенной формирование годичных слоев древесины у скелетных корней в нижней части (по направлению от анатомической оси вниз) прекращается.

В формировании лесных сообществ на вырубках и жизнедеятельности сосны обыкновенной важнейшую роль играют физиологически активные корни. В основном они обеспечивают растение водой и минеральной пищей и принимают деятельное участие в синтезе новых органических соединений.

Срок жизни активных корней в течение года меняется и зависит от биологических особенностей вида и степени увлажнения почвы. Недостаток влаги сильно сокращает количество и продолжительность жизни активных корней.

Интенсивное ветвление корней (до 9 порядков) создает очень разветвленную густую корневую систему, причем площади питания деревьев, несмотря даже на разреженность древостоев в условиях Кольского Севера, налагаются друг на друга уже в I классе возраста. Исследования тонкой физиологически активной части корневой системы сосны показали, что сосущие корни располагаются преимущественно на сосущих, реже на проводящих, корнях диаметром менее 1 мм последнего и предпоследнего порядков ветвления, покрыты грибным чехлом и образуют достаточно разветвленную сеть корней. Микоризные корни размещаются, в большинстве случаев, единично с преобладанием простой вильчатой и реже коралловидной форм. Меньшее распространение имеют другие формы микориз, и они приурочены чаще всего к полусгнившим пням и упавшим стволам деревьев.

Локализованной связи между отдельной частью корневой системы и кроной дерева не существует. Любая корневая мочка способна питать разные участки кроны. Интенсивность поступления питательных веществ в ветки кроны определяется энергией их роста.

В сохранившихся еще молодых древостоях в районах слабого атмосферного загрязнения почвы соединениями серы и тяжелых металлов корни сосны обыкновенной реагируют как на мелиорирующий эффект (удобрения), образуя целые колонии сосущих корешков с микоризными окончаниями. Со временем, по мере насыщения почвы загрязнителями, физиологически активные корни с микоризами постепенно отмирают.

Проведенные исследования позволили заключить, что формирование лесных сообществ сосны обыкновенной на вырубках на Кольском Севере, их устойчивость и продуктивность находятся в прямой зависимости от степени развития отдельных корней и корневых систем в целом. Рост и развитие корней в свою очередь обуславливаются экологическими факторами окружающей среды и биологическими свойствами этой древесной породы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по плановой теме «Коллекции живых растений Ботанического института им. В.Л. Комарова (история, современное состояние, перспективы использования)», регистрационный номер:122011900031-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бобкова К. С. Биологическая продуктивность хвойных лесов Европейского Северо-Востока. Л.: Наука. 1987. 156 с.
- Динамика лесных сообществ Северо-Запада России / В. Т. Ярмишко, И. Ю. Баккал и др. Отв. редактор В. Т. Ярмишко. СПб.: ВВМ. 2009. 276 с.
- Евдокимов А. С., Ярмишко В. Т. Структура древесного яруса лесных сообществ центральной части Кольского полуострова, формируемая при снижении аэротехногенной эмиссии // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2023. Том 31 № 1. С. 115–126.
<http://doi.org/10.22363/2313-2310-31-1-116-1206>.
- Зайцев Г. А. Адаптация корневых систем хвойных древесных растений к экстремальным лесорастительным условиям. Автореферат диссертации на соиск. степени доктора биол. наук. Тольятти, 2008. 45 с.
- Калинин М. И. Формирование корневой системы деревьев. М. 1983. 152 с.
- Лащинский Н. Н. Структура и динамика сосновых лесов Нижнего Приангарья. Новосибирск, 1981. 272 с.
- Лукина Н. В., Никонов В. В. Состояние биогеоценозов Севера в условиях техногенного загрязнения. Апатиты. 1993. 134 с.
- Методы изучения лесных сообществ. СПб.: НИИ химии СПбГУ. 2002. 240 с.
- Моисеев В. С. Таксация молодняков. Л. 1971. 343 с.
- Молчанов А. А., Смирнов В. В. Методика изучения прироста древесных растений. М.: Наука. 1967. 100 с.
- Орлов А. Я. Метод определения массы корней деревьев в лесу и возможность учета годичного прироста органической массы в толще лесной почвы. Лесоведение. 1967. № 1, с. 44–70.
- Проблемы экологии растительных сообществ Севера. СПб.: ООО «ВВМ». 2005. 450 с.
- Родин Л. Е., Ремезов Н. П., Базилович Н. И. Методические указания к изучению динамики и биологического круговорота в фитоценозах. Л.: 1968. 143 с.
- Рысин Л. П., Рысина Г. П. Морфоструктура подземных органов лесных травянистых растений. М.: Наука. 1987. 207 с.
- Саляев Р. К. Изучение физиологически активной части корневых систем у главных древесных пород таежной зоны. Автореф. диссерт. канд. биол. наук. Петрозаводск, 1961. 20 с.
- Санитарные правила в лесах Российской Федерации (Утв. приказом Федеральной службы лес. хоз-ва России от 15.01.1998 г.) М. 1998 № 10. 18 с.
- Семенова Л. Ф. Морфология микориз сосны обыкновенной в спелых лесах // Микоризные грибы и микоризы лесообразующих пород Севера. Петрозаводск: Кар. фил. АН СССР. 1980. С. 103–132.
- Цветков В. Ф., Семенов Б. А. Сосняки Крайнего Севера. М.: Агропромиздат. 1985. 116 с.
- Цветков В. Ф. Сосняки Кольской лесорастительной области и ведение хозяйства в них. Архангельск: Изд-во Арханг. гос. тех. ун-та. 2002. 380 с.
- Черненко Т. В. Реакция лесной растительности на промышленное загрязнение. М.: Наука. 2002. 191 с.
- Шубин В. И. Микотрофность древесных пород: значение при разведении леса в таежной зоне. Л., 1973. 264 с.
- Якушев Б. И. Рост и взаимодействие корневых систем древесных и травянистых растений / Эколого-физиологические особенности взаимоотношений растений в растительных сообществах. Минск. 1968. С. 91–123.
- Ярмишко В. Т. Прибор для измерения годичных колец деревьев // Ботан. журн. 1983. Т. 68. № 10. С. 1428–1430.
- Ярмишко В. Т., Цветков В. Ф. Строение, запасы и распределение в почве корневых систем растений в сообществах сосновых молодняков Кольского полуострова // Бот. журнал. 1987. Т. 2. № 4. С. 496–505.
- Ярмишко В. Т. Сосна обыкновенная и атмосферное загрязнение на Европейском Севере. СПб.: Изд-во НИИ химии СПбГУ. 1997. 210 с.
- Ярмишко В. Т., Игнатьева О. В. Многолетний импактный мониторинг состояния сосновых лесов в центральной части Кольского полуострова // Изв. РАН. Серия биологическая. 2019. № 6. С. 658–668.
- Ярмишко В. Т., Игнатьева О. В. Сообщества *Pinus sylvestris* L. в техногенной среде на европейском Севере России: структура, особенности роста и состояние // Сибирский лесной журнал. 2021. № 3. С. 44–55.
- Forest Condition in a Changing Environment. The Finnish Case / Ed. Eino Mälikönen). Kluwer Acad. Publ. 2000. 380 p.
- Gorissen B. A., Joosten N. N., Jansen A. E. Effects of ozone and ammonium sulphate on carbon partitioning to mycorrhizal roots of juvenile Douglas fir // New Phytol. 1991 V. 119. p. 243–250.
- Hanisch B., Kilz E. Waldschaden erkennen. Fichte und Kiefer. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer. 1990. 334 p.
- Heikureinen L. Der Würzelaufbau in Michwalder auf entwässerten Moorboden // Acta Forest Fenn. 1959. Bd. 67. H 2. P. 24–28.

- Helmisaari H.-S., Lehto T., Makkonen K.* Fine roots and soil properties // *Forest Condition in a Changing Environment. The Finnish Case* (Ed Eino Mälikönen). Kluwer Acad. Publ. 2000. P. 203–217.
- Lyear J. G., Corey R. D., Wilde S. A.* Mycorrhizae facts and fallacies // *Agricult.* 1980. V. 6. № 8 P. 213–220.
- Persson H.* Root dynamics in a young Scots pine stand in central Sweden // *Oikos*. 1987. V. 30. P. 508–519.
- Yarmishko V. T., Evdokimov A. S.* Spatial structure of recuperating lichen-green pine forests in the Central part of the Kola Peninsula (Russia) // *Journal of Technical and Natural Sciences*. 2019. V. 2. № 11. P.35–39.

The role of root systems of *Pinus sylvestris* L. during the formation of secondary pine forests in deforestation in the Kola North

© 2024 V. T. Yarmishko

*V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences,
Prof. Popova, 2, St. Petersburg, 197376 Russia
@E mail: vasilyarmishko@yandex.ru*

The role of the roots and root systems of *Pinus sylvestris* L. in the formation of secondary pine forests in the cuttings of the Kola North was studied. It has been established that in pine seedlings in disturbed areas, root and shoot systems are formed quite quickly. Already in the I-th grade of age, characteristic morphological signs of root systems appear, the feeding areas of trees begin to overlap each other. The bulk of the roots (80–85%) is concentrated in the upper 20-centimeter soil layer. A linear relationship between the taxation indicators of trees and the mass of root systems has been revealed. The conducted studies have shown that the formation of forest communities of Scots pine in the cuttings of the Kola North, their stability and productivity are directly dependent on the degree of development of individual roots and root systems as a whole.

Keywords: moss-lichen forests, deforestation, Scots pine, roots, radial growth, mycorrhiza, Kola North.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 594.124:[577.124.22.044:546.21]

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПИРУВАТКИНАЗЫ,
МАЛАТ- И ОКТОПИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В ЖАБРАХ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS (LAMARCK, 1819)
В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ**

© 2024 г. А. О. Лантушенко*, А. С. Кохан**, А. А. Солдатов*, ** @,
И. В. Дегтяр*, А. Ю. Андреева**

*Севастопольский государственный университет, ул. Университетская 33, Севастополь, 299053 Россия

**Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»,
"росп. Нахимова 2, Севастополь, 299011 Россия

@E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

После доработки 01.03.2024 г.

Принята к публикации 01.03.2024 г.

Исследовали в условиях эксперимента влияние гипоксии на уровень экспрессии генов пируваткиназы (*PKM*), октопиндегидрогеназы (*OcDH*) и малатдегидрогеназы (*MDH*) в жаберной ткани средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (L., 1819). Контрольная группа моллюсков содержалась при 9–10°C и уровне кислорода в воде 8.5 мгО₂ л⁻¹. Опытная — при 9–10°C и 2.2 мгО₂ л⁻¹. Экспозиция — 24 и 72 ч. Часть особей в дальнейшем подвергалась процедуре реоксигенации. В условиях гипоксии происходило повышение уровня экспрессии генов *OcDH* и *MDH* соответственно в 3 и 2 раза ($p < 0.05$). При этом экспрессия *OcDH* проявляла чувствительность к содержанию кислорода в среде. В условиях реоксигенации процесс полностью подавлялся. Экспрессия гена *PKM*, напротив, не зависела от гипоксического воздействия и сохранялась на уровне контрольных значений.

Ключевые слова: *Mytilus galloprovincialis*, гипоксия, экспрессия генов, жабры, малатдегидрогеназа, октопиндегидрогеназа, пируваткиназа

DOI: 10.31857/S1026347024040113, **EDN:** VHCVFA

Основными причинами образования гипоксических и аноксических зон в шельфовых зонах Мирового океана являются низкая скорость диффузии кислорода и ограничение водообмена (Karstensen *et al.*, 2008; Paulmier, Ruiz-Pino, 2009). Часто это дополняют и процессы эвтрофикации, особенно в местах впадения крупных рек (Rabalais *et al.*, 2014). Ожидается, что в условиях глобального потепления число зон с критически низкой концентрацией кислорода будет только возрастать (Karstensen *et al.*, 2008; Paulmier, Ruiz-Pino, 2009). Это приведет к трансформации, прежде всего, донных сообществ и повысит роль организмов толерантных к условиям гипоксии.

Моллюски считаются одними из наиболее устойчивых организмов к дефициту кислорода. Это качество определяется их способностью переходить к гипометаболическим состояниям (Storey, Storey, 2004) и использовать на этом фоне эффективные

анаэробные стратегии, позволяющих поддерживать энергетический статус тканей (St-Pierre *et al.*, 2000; Le Moullac *et al.*, 2007). В условиях острой гипоксии (аноксии) у них отмечается сопряжение реакций гликолиза с процессами белкового обмена. В тканях повышается содержание соединений не свойственных аэробному обмену (аланин, сукцинат) (Buck, 2000), усиливается продукция NH₄⁺ (Chew *et al.*, 2005), растет активность аланин- и аспартатамино-трансфераз (Soldatov *et al.*, 2009).

Ряд авторов отмечают низкую активность лактатдегидрогеназы в тканях моллюсков при внешнем дефиците кислорода (Soldatov *et al.*, 2010). Это допускает образование иных гликолитических метаболитов, например, опинов (Vacchiocchi, Principato, 2000). Семейство опиндегидрогеназ (*OpDH*) широко представлено среди морских беспозвоночных, в основном представителей типов Mollusca и Annelida (Vázquez-Dorado *et al.*, 2013).

Они катализируют восстановительную реакцию конденсации пирувата и аминокислот с образованием опинов (Vázquez-Dorado *et al.*, 2013):



Среди них выделяется октопиндегидрогеназа (*OcDH*) (EC 1.5.1.11), проявляющая выраженное сродство к L-аргинину (Vázquez-Dorado *et al.*, 2011). В настоящее время доступны последовательности мРНК и кДНК для данного фермента (Endo *et al.*, 2007). Частично последовательности *OcDH* представлены в геномных базах для некоторых видов головоногих (Allcock *et al.*, 2007; Strugnell *et al.*, 2008) и двустворчатых моллюсков (Hollenbeck, Johnston, 2018). В ряде работ отмечен рост активности *OcDH* в тканях моллюсков при гипоксических состояниях (Storey, Dando, 1982). Активность *OcDH* была идентифицирована и в тканях представителей рода *Mytilus* (Storey, Dando, 1982), в том числе *Mytilus galloprovincialis* (Gosling, 1981).

Образование опинов позволяет решить проблему конечных токсических метаболитов (лактат), так как опины не оказывают столь выраженного влияния на величину тканевого pH (Zammit 1978). Об эффективности перестройки терминальных реакций гликолиза в тканях моллюсков в условиях дефицита кислорода можно судить и по уровню экспрессии соответствующих генов.

В настоящей работе, на примере средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), в условиях эксперимента исследуется влияние острых форм гипоксии на уровень экспрессии генов ряда дегидрогеназ: малат-, октопиндегидрогеназы (*MDH*, *OcDH*), а также пируваткиназы (*PKM*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на взрослых особях средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (L., 1819). Длина раковины – 18.3±0.9 мм.

Моллюсков собирали с коллекторных установок в Мартыновой бухте (район Севастополя, Крым) и доставляли в аквариальную в сухих пенопластовых холодильных ящиках в течение 2–3 ч. На протяжении 14 суток их выдерживали в проточной воде для снятия состояния манипуляционного стресса. Кормление осуществлялось смесью микроводорослей по мере выедания.

Контрольная группа мидий содержалась при 9–10°C и уровне кислорода в воде 8.5 мгО₂ л⁻¹. Опытная – при 9–10°C и 2.2 мгО₂ л⁻¹. Экспозиция – 24 и 72 ч. Фотопериод – 12 ч день : 12 ч ночь. Содержание кислорода в воде понижали путем барботажа газообразным азотом. Контроль за содержанием кислорода в воде проводили при помощи оксиметра Ohaus Starter 300 D (США). По прошествии указанного времени часть особей подвергалась процедуре реоксигенации (барботаж воздухом) с восстановлением исходного уровня кислорода в воде и выдерживалась в данных условиях в течение 24 ч. Жабры моллюсков считаются наиболее чувствительной тканью к условиям водной среды (Soldatov *et al.*, 2014), поэтому они были выбраны в качестве объекта исследования. Образцы жабр получали на 24 и 72 ч эксперимента и после реоксигенации. Из каждой экспериментальной группы (контроль, суточная, трехсуточная гипоксия, реоксигенация) было отобрано по 8 особей на точку. Ткани извлекали на льду и сразу помещали в реагент для лизиса, гомогенизировали с помощью гомогенизатора Tissue Ruptor II (Quagen, Germany) и тут же проводили выделение РНК.

Общую РНК экстрагировали из жаберной ткани с использованием набора реактивов «РНК-ЭКСТРАН» (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Количество выделенной РНК проверяли на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Чистоту полученной РНК определяли по соотношению A260/A280, полученному с помощью нанофотометра Implen (Германия). кДНК синтезировали с использованием набора Mint-2 (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную

Таблица 1. Перечень праймеров, использованных в данной работе

Ген	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')	Длина ампликона	Ссылка
<i>Ef-1</i>	CCTCCCACCATCAAGACCCA	GGCTGGAGCAAAGGTAACAAC	145	Giannetto et al., 2015
<i>OcDH</i>	CAGCATTTGCTCACGCTCAG	AACTGCTGGCTTTGTACCA	135	Vázquez-Dorado et al., 2011
<i>PKM</i>	CAAAGCGGCTGTATGTGTGG	ACATCTACAACATCTGATGGCTTTG	159	Данная работа
<i>MDH</i>	TCCAGCCAATACCAACGCAT	ACACCTAGCTTGGCTGCA AT	126	Данная работа

транскрипцию проводили в конечном объеме 15 мкл, содержащем 1 мкг очищенной общей РНК. В качестве референсного гена использовали *Ef-1*. Для выбора праймеров использовали литературные данные и транскрипты генов *MDH* (КФ 1.1.1.37), *OcDH* (КФ 1.5.1.11) и *PKM* (КФ 2.7.1.40), полученные авторами ранее (Andreyeva *et al.*, 2021). С помощью программы Primer Blast, выбирали праймеры для ампликонов с длиной около 150 н.п. (табл. 1). Эффективность каждой пары праймеров отображена в табл. 2.

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени (RT-qPCR) проводили на амплификаторе ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad, США) с использованием набора qPCRMix-HS с красителем SYBR Green I (Евроген, Россия). Реакционная смесь (общий объем 25 мкл) содержала 1 мкл кДНК, по 1 мкл каждого праймера с концентрацией 10 мкМ, 5 мкл ПЦР-смеси qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) и 17 мкл деионизированной воды (MilliQ). Протокол реакции состоял из 3-минутной начальной денатурации при 95 °С, за которой следовали 44 цикла: 30 с при 95 °С, 30 с при 60 °С и 30 с при 72 °С. Также была выполнена кривая плавления продуктов ПЦР (65–95 °С (0.5 °С/с)), чтобы исключить наличие других продуктов. Все реакции проводили в трех технических повторностях. Для каждого эксперимента использовали отрицательный контроль без матрицы. Эффективность амплификации определяли путем построения стандартной кривой с последовательными разведениями кДНК. Для каждого измерения определяли пороговое значение *Ct*. Для расчета относительной экспрессии использовали метод $\Delta\Delta C_t$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как $M \pm m$. В работе использовали стандартный пакет SigmaPlot (версия 12.5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований представлены на рис. 1. Как видно, значительные изменения уровня экспрессии отмечались со стороны генов *MDH* и *OcDH*. В обоих случаях в условиях гипоксии (24 и 72 ч) отмечали рост значений соответственно в 2 и 3 раза ($p < 0.05$). После реоксигенации уровень экспрессии *OcDH* восстанавливался до исходных значений, тогда как экспрессия *MDH* сохранялась на относительно высоком уровне. При этом повышалась вариабельность регистрируемых значений.

Сведения об экспрессии *OcDH* весьма ограничены. В работах (Kimura *et al.*, 2004; Vázquez-Dorado *et al.*, 2011) описывается лишь клонирование и гетерологичная экспрессия *OcDH* из гепатопанкреаса *M. galloprovincialis*.

Таблица 2. Эффективность праймеров (%)

Условия эксперимента	<i>Ef-1</i>	MDG	ODH	PK
Контроль	97.7	94.5	90.2	98.0
Гипоксия, 24 ч	110.2	90.9	90.4	92.0
Гипоксия, 72 ч	93.0	101.0	99.0	95.6
Реоксигенация	92.6	96.6	96.7	94.6

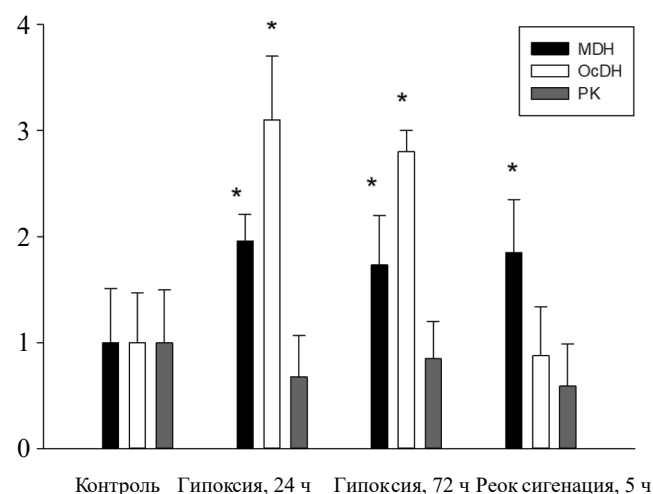


Рис. 1. Экспрессия генов *MDH*, *OcDH* и *PKM* в жабрах средиземноморской мидии в условиях гипоксии (2.2 мгО₂ л⁻¹) и после реоксигенации. Значения на оси ординат показаны изменения кратности (Fold change). * — достоверно по отношению к контролю (непараметрический критерий Манна-Уитни), $p < 0.05$.

Природа чувствительности экспрессии гена *OcDH* к содержанию кислорода в воде показана впервые. По-видимому, она определяется синтезом HIF-1 α фактора (*hypoxia inducible factor*). Близкий к млекопитающим по структуре и функциональным характеристикам белковый фактор (766 аминокислот) впервые был идентифицирован и в плазме крови форелей (*Salmo gairdneri*), содержащейся в условиях гипоксии (5% насыщения воды кислородом) (Soitamo *et al.*, 2001). Отмечено, что его продукция всегда повышалась в условиях гипоксии и у других рыб (Heise *et al.*, 2006; Ju *et al.*, 2007). Это происходило на фоне роста активности лактатдегидрогеназы (*LDH*), что отражало усиление процессов анаэробного метаболизма в тканях (Rees *et al.*, 2001). HIF-1 α был идентифицирован и у представителей рода *Mytilus* (Giannetto *et al.*, 2015). *OcDH* фактически является конкурентом *LDH* за гликолитический пируват в тканевых структурах моллюска. Его активность почти в 15 раз выше (Storey, Dando, 1982). На этом основании можно предположить, что выработка HIF-1 α регулирует экспрессию гена *OcDH*.

Другим результатом настоящей работы явилось обнаружение роста экспрессии гена *MDH*, которая,

в отличие от *OcDH*, не подавлялась в условиях реоксигенации. Показано, что ген данного фермента активно экспрессируется в тканях средиземноморской мидии (Soldatov *et al.*, 2023). Известно, что *MDH* катализирует как прямую, так и обратную реакцию превращения S-малата. Этот процесс является элементом многих метаболических путей, протекающих как в аэробных, так и анаэробных условиях (Chang, Tong, 2003). Благодаря *MDH* реализуются глюкозо-сукцинатная и аспартат-сукцинатная реакции, которые более эффективны в условиях анаэробноза, в сравнении с глюкозо-опиновым и глюкозо-лактатным направлениями метаболизма (Livingstone, 1991). Эти процессы достаточно инерционны. В этом, по-видимому, следует усматривать отсутствие прямой зависимости экспрессии гена *MDH* от содержания кислорода.

Экспрессия *PKM* в настоящих экспериментах не изменялась (рис. 1). Отмечена даже некоторая тенденция на подавление данного процесса. Известно, что в условиях внешнего дефицита кислорода активность *PKM* понижается. Это показано для морских гребешков, ряда брюхоногих моллюсков и отражает усиление анаэробных процессов в их тканевых структурах, в которых активное участие принимает *MDH* (Sokolova, Pörtner, 2001; Van Hellemond *et al.*, 2003). Эта информация согласуется с данными по экспрессии *MDH* и *PKM*, рассмотренными выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных материалов следует, что условия острой гипоксии сопровождаются повышением уровня экспрессии генов *OcDH* и *MDH* в жабрах средиземноморской мидии при отсутствии изменений со стороны гена *PKM*. При этом экспрессия *OcDH* проявляет чувствительность к содержанию кислорода в среде. Обнаруженные изменения направлены на повышение эффективности анаэробных процессов в ткани в условиях внешнего дефицита кислорода.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Этические нормы: все процедуры с использованием моллюсков были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/EU) и одобрены местным учреждением по уходу и использованию животных (протокол № 4/23 от 26.10.2023).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственной программы АААА-А18-118021490093-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allcock A. L., Strugnell J. M., Prodohl P., Piatkowski U., Vecchione M. A new species of *Parleodoene* (Cephalopoda: Octopodidae) from Antarctic Peninsula Waters // *Polar Biology*. 2007. V. 30. P. 883–893.
- Andreyeva, A. Y., Gostyukhina, O. L., Kladchenko, E. S., Afonnikov, D. A., Rasskazov, D. A., Lantushenko, A. O., & Vodiasova, E. A. Hypoxia exerts oxidative stress and changes in expression of antioxidant enzyme genes in gills of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) // *Marine Biology Research*. 2021. V. 17. Iss. 4. P. 369–379.
- Bacchiocchi S., Principato G. Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis // *J. Exp. Zool.* 2000. V. 286. Iss. 2. P. 107–113.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(20000201\)286:2<107::aid-jez1>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(20000201)286:2<107::aid-jez1>3.0.co;2-8).
- Buck L. T. Succinate and alanine as anaerobic end-products in the diving turtle (*Chrysemys picta bellii*) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*. 2000. V. 126. Iss. 3. P. 409–413.
[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00215-7)
- Chang G. G., Tong L. Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases // *Biochemistry*. 2003. V. 42. No. 44. P. 12721–12733.
<https://doi.org/10.1021/bi035251+>
- Chew S. F., Gan J., Ip Y. K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // *Physiol. Biochem. Zool.* 2005. V. 78. No 4. P. 620–629.
<https://doi.org/10.1086/430233>
- Endo N., Kan-no N., Nagahisa E. Purification, characterization, and cDNA cloning of opine dehydrogenases from the polychaete rock worm *Marphysa sanguinea* // *Comp. Biochem. Physiol. B*. 2007. V. 14. P. 293–307.
- Giannetto A., Maisano M., Cappello T., Oliva S., Parrino V., Natalotto A., De Marco G., Barberi C., Romeo O., Mauceri A., Fasulo S. Hypoxia-Inducible Factor α and Hif-prolyl Hydroxylase Characterization and Gene Expression in Short-Time Air-Exposed *Mytilus galloprovincialis* // *Mar. Biotechnol.* 2015. V. 17. Iss. 6. P. 3–16.
<https://doi.org/10.1007/s10126-015-9655-7>
- Gosling E. Ecological genetics of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on Irish coasts // *Marine Ecology Progress Series*. 1981. V. 4. No 2. P. 221–227.
<https://doi.org/10.3354/meps004221>
- Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M., Lucassen M., Portner H. O., Abele D. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) // *Comp.*

- Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 2006. V. 143. No 4. P. 494–503.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.014>.
- Hollenbeck C. M., Johnston I. A. Genomic Tools and Selective Breeding in Molluscs // Front. Genet. 2018. V. 9. P. 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00253>
- Ju Z., Wells M. C., Heater S. J., Walter R. B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. C. 2007. V. 145. No 1. P. 134–144.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.06.012>
- Karstensen J., Stramma L., Visbeck M. Oxygen minimum zones in the eastern tropical Atlantic and Pacific Oceans // Prog. Oceanogr. 2008. V. 77. P. 331–350.
<https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.05.009>
- Kimura T., Nakano T., Yamaguchi T. et al. Complementary DNA Cloning and Molecular Evolution of Opine Dehydrogenases in Some Marine Invertebrates // October 2004 Marine Biotechnology. 2004. V. 6. Iss. 5. P. 493–502.
<https://doi.org/10.1007/s10126-004-2700-6>
- Le Moullac G., Bacca H., Huvet A., Moal J., Pouvreau S., Van Wormhoudt A. Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia // J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol. 2007. V. 307A. Iss. 7. P. 371–382.
<https://doi.org/10.1002/jez.390>
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method // Methods. 2001. V. 25. Iss. 4. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Livingstone D. R. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom // Am. Zool. 1991. V. 31. P. 522–534.
- Paulmier A., Ruiz-Pino D. Oxygen minimum zones in the modern ocean // Prog. Oceanogr. 2009. V. 80. P. 113–128.
<https://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.08.001>
- Rabalais N. N., Cai W.-J., Carstensen J. Eutrophication-driven deoxygenation in the coastal ocean // Oceanography. 2014. V. 27. No 1. P. 172–183.
<https://doi.org/10.5670/oceanog.2014.21>.
- Rees B. B., Bowman J. A. L., Schulte P. M. Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus* // Biol. Bull. 2001. V. 200. P. 247–251.
<https://doi.org/10.2307/1543505>
- Soitamo A. J., Raabergh C. M. I., Gassmann M., Sistonen L., Nikinmaa M. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. No 23. P. 19699–19705.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M009057200>.
- Sokolova I. M., Pörtner H. O. Temperature effects on key metabolic enzymes in *Littorina saxatilis* and *L. obtusata* from different latitudes and shore levels // Mar. Biol. 2001. V. 139. P. 113–126.
- Soldatov A. A., Andreenko T. I., Golovina I. V., Stolbov A. Y. Peculiarities of organization of tissue metabolism in molluscs with different tolerance to external hypoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2010. V. 46. No 4. P. 341–349.
<https://doi.org/10.1134/S0022093010040022>
- Soldatov A. A., Andreenko T. I., Sysoeva I. V., Sysoev A. A. Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. under conditions of experimental anoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2009. V. 45. No 3. P. 349–355.
<https://doi.org/10.1134/S002209300903003X>
- Soldatov A. A., Golovina I. V., Lantushenko A. O., Kokhan A. S., Sysoeva I. V., Sysoev A. A., Kolesnikova E. E. Adenylate System State, Malate Dehydrogenase Activity and Expression Level in Tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 // Thalassas: An International Journal of Marine Sciences. 2023. V. 39. P. 739–747.
<https://doi.org/10.1007/s41208-023-00563-4>
- Soldatov A. A., Gostyukhina O. L., Golovina I. V. Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress // J. Evol. Biochem. Physiol. 2014. V. 50. Iss. 3. P. 206–214.
<https://doi.org/10.1134/S0022093014030028>
- Storey K. B., Dando P. R. Substrate specificities of octopine dehydrogenases from marine invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. 1982. V. 73. P. 521–528.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90069-4)
- Storey K. B., Storey J. M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls // Biol. Rev. 2004. V. 79. P. 207–233.
<https://doi.org/10.1017/s1464793103006195>
- St-Pierre J., Tattersall G. J., Boutilier R. G. Metabolic depression and enhanced O₂ affinity of mitochondria in hypoxic hypometabolism // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000. V. 279. Iss. 4. P. R1205–R1214.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1205>
- Strugnell J. M., Collins M. A., Allcock A. L. Molecular evolutionary relationships of the octopodid genus *Thaumeledone* (Cephalopoda: Octopodidae) from the Southern Ocean // Antarctic Science. 2008. V. 20. P. 245–251.
- Van Hellemond J. J., Van der Klei A., Van Weelden S. W. H. Tielens A. G. M. Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2003. V. 358. P. 205–215.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1182>
- Vázquez-Dorado S., Sanjuan A., Comesaña A. S., Carlos A. Identification of octopine dehydrogenase from *Mytilus galloprovincialis* // Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 2011. V. 160. P. 94–103.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.003>

- Vázquez-Dorado S., De Carlos A., Comesaña A. S., Andrés Sanjuán A. Phylogenetic comparison of opine dehydrogenase sequences from marine invertebrates // Biochem. Genet. 2013. V. 51. Iss. 1–2. P. 154–65. DOI: 10.1007/s10528-012-9551-z
- Zammit V.A. Possible relationship between energy metabolism of muscle and oxygen binding characteristics of haemocyanin of cephalopods // J. Mar. Biol. Assoc. UK. 1978. V. 58. P. 421–424. DOI: 10.1017/S0025315400028083

Expression of pyruvate kinase, malate and octopine dehydrogenase genes in the gills of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) under conditions of hypoxia and reoxygenation

© 2024 A. O. Lantushenko*, A. S. Kohan**, A. A. Soldatov*, **, @,
I. V. Degtyar*, A. Yu. Andreeva**

*Sevastopol State University, Universitetskaya str. 33, Sevastopol 299053 Russia

**Federal Research Center “A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences”,
Nakhimov Avenue, Sevastopol, 2299011 Russia

*E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

The effect of hypoxia on the expression level of pyruvate kinase (*PKM*), octopine dehydrogenase (*OcDH*) and malate dehydrogenase (*MDH*) genes in the gill tissue of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (L., 1819) was studied experimentally. The control group of mollusks was kept at 9–10°C and the oxygen level in the water was 8.5 mgO₂ l⁻¹. Experimental — at 9–10°C and 2.2 mgO₂ l⁻¹. The exposure was 24 and 72 hours. Some of the individuals were subsequently subjected to the reoxygenation procedure. Under conditions of hypoxia, the expression level of *OcDH* and *MDH* genes increased by 3 and 2 times, respectively ($p < 0.05$). At the same time, *OcDH* expression showed sensitivity to the oxygen content in the medium. Under the conditions of reoxygenation, the process was completely suppressed. The expression of the *PKM* gene, on the contrary, did not depend on hypoxic effects and remained at the level of control values.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, hypoxia, gene expression, gills, malate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, pyruvate kinase