

ISSN 1026-3470

Номер 3

Май - Июнь 2023

ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

# СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)

Журнал публикует статьи теоретических и экспериментальных исследований по различным аспектам биологии



# СОДЕРЖАНИЕ

Номер 3, 2023

## БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

- Клеточные линии меланомы, как основа для создания модели васкулогенной мимикрии  
*А. А. Вартанян, В. С. Косоруков* 227

## БИОХИМИЯ

- Фотохимия и сигнальная активность криптохромов растений. Обзор  
*Г. Я. Фрайкин, Н. С. Беленикина* 235

## ГЕНЕТИКА

- Множественный хромосомный полиморфизм у мышовок группы *subtilis* (Rodentia, Dipodoidea, *Sicista* sp.) из Саратовского Правобережья  
*М. И. Баскевич, М. Л. Опарин* 246

## МИКРОБИОЛОГИЯ

- Эктопаразитические клещи – переносчики бактериальных симбионтов среди насекомых  
*Е. В. Шайкевич, А. А. Горбачева, Д. А. Романов* 258

## БОТАНИКА

- Анатомическое строение и фитохимический анализ листа, стебля и корня гортензии древовидной (*Hydrangea arborescens* L.)  
*Ф. К. Мурзабулатова, К. А. Пупыкина, Е. В. Красюк, Н. В. Полякова, З. Х. Шигапов* 269

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

- Влияние светодиодного освещения разного спектра на развитие салата листового (*Lactuca sativa*)  
*О. В. Наконечная, А. С. Холин, Е. П. Субботин, Е. В. Бурковская, Ю. А. Хроленко, И. В. Гафицкая, И. Ю. Орловская, М. Л. Бурдуковский, А. В. Михеева, Ю. Н. Кульчин* 278

## ЗООЛОГИЯ

- Таксономическая оценка кариологических особенностей соболя (*Martes zibellina*) и других представителей рода *Martes* (Carnivora, Mammalia)  
*В. М. Малыгин, Л. Д. Сафронова, Е. Г. Сергеев, Е. С. Левенкова* 287

## ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

- Размеры тела и пищеварительного тракта у мелких млекопитающих-фитофагов: влияние экологических и физиологических факторов  
*Е. И. Наумова, Т. Ю. Чистова, Г. К. Жарова* 297
- Исходный тип вегетативной регуляции определяет развитие инфаркта у крыс в модели необратимой ишемии миокарда  
*М. П. Морозова, А. Д. Куренкова, Ю. Л. Волкова, А. Б. Бердалин, Е. Н. Банзелюк, Б. А. Умарова, Е. В. Лукошкова, С. А. Гаврилова* 308

## ЭКОЛОГИЯ

- Морфо-физиологические детерминанты формирования урожая картофеля в условиях дефицита почвенной влаги  
*А. Л. Бакунов, Н. Н. Дмитриева, С. Л. Рубцов, А. В. Милехин, В. Н. Нестеров, Е. С. Богданова, О. А. Розенцвет* 321

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Кутикула куколок черной львинки *Hermetia illucens* как биосорбент для пробиотиков  
*Н. А. Ушакова, С. В. Свергузова, И. Г. Шайхиев, Ж. А. Сапронова, А. И. Бастраков, Е. А. Левенко, Р. М. Хацаева* 332

---

---

# Contents

---

---

No. 3, 2023

---

---

## Cell Biology

Melanoma Cell Lines As a Basis for Vasculogenic Mimicry Model Development

*A. A. Vartanian and V. S. Kosorukov*

227

---

## Biochemistry

Photochemistry and Signaling Activities of Plant Cryptochromes. Review

*G. Ya. Fraikin and N. S. Belenikina*

235

---

## Genetics

Multiple Chromosomal Polymorphism in Birch Mice of the Subtilis Group (Rodentia, Dipodoidea, Siciста) from Saratov Right Bank

*M. I. Baskevich and M. L. Oparin*

246

---

## Microbiology

Exoparasitic Mites – Vectors of Bacterial Symbionts Among Insects

*E. V. Shaikevich, A. A. Gorbacheva, and D. A. Romanov*

258

---

## Botany

Anatomical Structure and Phytochemical Analysis of the Leaf, Stem and Root of Hydrangea Tree (*Hydrangea arborescens* L.)

*F. K. Murzabulatova, K. A. Pupykina, E.V. Krasnyuk, N.V. Polyakova, and Z.Kh. Shigapov*

269

---

## Plant Physiology

The Influence of LED Lights of Different Spectrum on the Development of *Lactuca sativa*

*O. V. Nakonechnaya, A. S. Kholin, E. P. Subbotin, E. V. Burkovskaya, Yu. A. Khrolenko, I. V. Gafitskaya, I. Yu. Orlovskaya, M. L. Burdukovsky, A. V. Mikheeva, and Yu. N. Kulchin*

278

---

## Zoology

Taxonomic Assessment of the Karyological Characteristics of Sable (*Martes zibellina*) and Other Representatives of the Genus *Martes* (Carnivora, Mammalia)

*V. M. Malygin, L. D. Safronova, E. G. Sergeev, and E. S. Levenkova*

287

---

## Animal and Human Physiology

Body and Digestive Tract Sizes in Small Phytophagous Mammals: Influence of Ecological and Physiological Factors

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

297

The initial of Autonomic Tone Determines the Development of Irreversible Myocardial Ischemia in Rats

*M. P. Morozova, A. D. Kurenkova, Ju. L. Volkova, A. B. Berdalin, E. N. Banzeluk, B. A. Umarova, E. V. Lukoshkova, and S. A. Gavrilova*

308

---

## Ecology

Morpho-Physiological Determinants of Potato Yield Formation under Conditions of Moisture Deficiency and High Temperatures

*A. L. Bakunov, N. N. Dmitrieva, S. L. Rubtsov, A. V. Milekhin, V. N. Nesterov, E. S. Bogdanova, and O. A. Rozentsvet*

321

---

## Short Communications

Cuticle of *Hermetia Illucens* Black Lion Pupa as A Biosorbent for Probiotics

*N. A. Ushakova, S. V. Sverguzova, I. G. Shaikhiev, Zh. A. Sapronova, A. I. Bastrakov, E. A. Levenko, and R. M. Khatsaeva*

332

---

---

УДК 616.5-006.81

## КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ, КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

© 2023 г. А. А. Вартанян\*, @, В. С. Косоруков\*

\*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н.Н. Блохина Минздрава России, ул. Каширская, 24, Москва, 115478 Россия

@E-mail: zhivotov57@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 24.08.2022 г.

Принята к публикации 24.08.2022 г.

В опухоли наряду с кровеносными сосудами, выстланными эндотелием, обнаруживаются и высокоструктурированные васкулярные каналы, образованные опухолевыми клетками. Предполагается, что сеть таких каналов компенсирует недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной системы и предотвращает ранний некроз внутри опухоли. Высокая статистическая корреляция между появлением в опухоли васкулярных каналов и низкой выживаемостью больных подтверждает эту гипотезу. Поэтому поиск ингибитора формирования васкулярных каналов в опухоли приобретает чрезвычайную актуальность. В настоящем обзоре обсуждается функциональное и прогностическое значение васкулогенной мимикрии. Особое внимание уделено оптимизации *in vitro* модели васкулогенной мимикрии на основе анализа 11 клеточных линий меланомы, полученных из метастазов больных диссеминированной меланомой. Кроме того, обсуждается разработка *in vivo* модели васкулогенной мимикрии для изучения ее механизмов и репрессии.

*Ключевые слова:* меланома, васкулогенная мимикрия, *in vitro*, *in vivo* модели

**DOI:** 10.31857/S102634702370018X, **EDN:** MZKDNY

Концепция о том, что VEGF-индуцируемый ангиогенез является фактором, лимитирующим рост опухоли, сегодня принята всеми (Al-Ostoot *et al.*, 2021). Отличаясь друг от друга по очень многим параметрам, все опухоли используют одни и те же сигнальные пути для васкуляризации. Терапия, направленная на блокирование формирования новых кровеносных сосудов, должна иметь значительно более широкий спектр применения в качестве общего противоопухолевого воздействия. Казалось бы, в этом правиле не должно быть исключений. Но уже первые клинические испытания препаратов, потенциально направленные на снижение кровоснабжения опухоли, выявили, что антиангиогенная терапия способствует переходу опухоли в фазу более агрессивного роста, хотя изначально и приводит к снижению размеров опухоли (El Alaoui-Lasmali, Faivre, 2018). Накапливаются факты, свидетельствующие о том, что большинство опухолей практически не отвечают на анти-VEGF-терапию (Jaszai, Schmidt, 2019).

Одной из причин выживаемости опухолевых клеток в условиях антиангиогенной терапии может быть гетерогенность кровеносных сосудов: формирование сосудов в опухоли происходит на фо-

не неконтролируемой митогенной стимуляции и измененного внеклеточного матрикса. Это приводит к развитию неполноценных сосудов, имеющих нередко нарушенную эндотелиальную выстилку. Эндотелий может замещаться опухолевыми клетками, а иногда и вовсе отсутствовать в сосудах опухоли. Образование микроваскулярной сети опухолевыми клетками *de novo*, без участия эндотелиальных клеток, т.е. независимо от ангиогенеза, получило название “васкулогенная мимикрия” (VM) (Maniotis *et al.*, 1999). Термин этот введен для описания кровоснабжения опухоли, имитирующей васкуляризацию эмбриона цитотрофобластами. Васкулярные каналы формируются опухолевыми клетками с высоко злокачественным фенотипом, слабоагрессивные опухолевые клетки таких структур не образуют (Hendrix *et al.*, 2003). VM может иметь неочевидное значение для опухолей, растущих массивными опухолевыми узлами с небольшим количеством васкулярной стромы.

Детальное исследование влияния широко используемых в клинике ингибиторов ангиогенеза на модулирование VM *in vitro* показало, что эти препараты не блокируют формирование васкуляр-

ной сети опухолевыми клетками (Van der Schaft *et al.*, 2004; Ribatti *et al.*, 2019).

ВМ представлена неодинаково в разных типах опухолей. В меланоме более 65% кровоснабжения осуществляется через каналы ВМ; при тройном негативном раке молочной железы – более 50%, при саркоме мягких тканей – 33–35%, при раке почки – 30–32%, при раке яичника, раке молочной железы – 15–18%; и меньше всего при раке толстой кишки – 10–12% (Vartanian, Baryshnikov, 2013). Васкулярные каналы в количестве 10–12% вряд ли что изменяют, но 40–65% явно могут иметь существенное значение.

В последние десятилетия усилия многих онкологов были направлены на исследование механизмов инициации и прогрессии злокачественной опухоли. Со временем стало понятно, что основная угроза злокачественных новообразований – распространение опухоли по всему организму. Метастазирование, или процесс миграции клеток опухоли из первичного очага с последующим формированием вторичных опухолевых очагов (метастазов) – одна из главных трудностей в лечении онкологических заболеваний. Появление в опухоли дополнительной системы кровоснабжения (ВМ) предполагает новый путь метастазирования. Это обстоятельство определяет потенциальную возможность использования блокирования ВМ для предотвращения появления метастазов.

В настоящее время не известен ни один физиологический процесс у взрослых или детей – аналог ВМ, что предоставляет определенные возможности для ингибирования роста агрессивной опухоли с минимальным воздействием на физиологические процессы в других тканях. Исследования механизмов инициации и роста васкулярных каналов, высланных опухолевыми клетками, сталкиваются с определенными трудностями, которые в основном, связаны с методологическими проблемами.

В данном обзоре обобщены результаты исследований, посвященные функциональному и прогностическому значению ВМ в общей выживаемости онкологических больных. Особое внимание уделено оптимизации *in vitro* модели ВМ на основе анализа 11 клеточных линий меланомы, полученных из метастазов больных диссеминированной меланомой. Кроме того, обсуждается разработка *in vivo* модели ВМ для изучения ее механизмов и репрессии.

### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВМ

Еще до открытия феномена ВМ, гистологическое исследование разных типов опухолей выявило

в метастатической опухоли каналы, озера и синусы, окруженные опухолевыми клетками (Timar, Toth, 2000). Интерес к этому процессу заметно возрос после обнаружения в таких каналах форменных элементов крови. Однако как микроциркуляторное русло в опухоли ВМ долгое время считалась сомнительной. Наличие каналов, высланных опухолевыми клетками, в злокачественных опухолях не отрицалось, но подвергалась сомнению роль таких каналов в кровоснабжении опухоли.

Вовлечение ВМ в микроциркуляцию крови в опухоли впервые было продемонстрировано на модели ишемизированных конечностей мышей (Hendrix *et al.*, 2002). При введении флуоресцентно меченых клеток метастатической меланомы в ишемизированную конечность мыши наблюдалось формирование “мозаичных” сосудов, состоящих из эндотелиальных и опухолевых клеток, а также васкулярных каналов, сформированных опухолевыми клетками.

Спустя год группой японских ученых было показано, что в экспериментальной модели рака молочной железы васкулярные каналы присутствуют, в основном, в центре опухоли, тогда как неоангиогенез обнаруживается на периферических ее участках. Контрастирующий флуоресцентный агент окрашивал и периферические, и центральные участки опухоли, что указывало на существование тока крови между участками неоангиогенеза и ВМ. В опухолях без ВМ накопление контрастирующего агента в центре опухоли отсутствовало (Shirakawa *et al.*, 2003). Эти исследования существенно изменили представления о роли ВМ в васкуляризации опухоли.

В настоящее время накоплен большой клинический материал о корреляции появления васкулярных каналов, сформированных опухолевыми клетками, с быстрой прогрессией опухоли, повышением метастазирования, и как следствие – короткой выживаемостью больных (Vartanian *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2020). Подобные наблюдения подтверждают способность васкулярных каналов поддерживать рост опухоли.

Определенный интерес вызывает происхождение опухолевых клеток, способных формировать васкулярные каналы.

### СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ОПУХОЛИ И ВМ

Поиск потенциальных мишеней на основе изменений наследственного аппарата клетки, воздействуя на которые можно было бы добиться подавления роста опухоли, к успеху не привел. Оказалось, что набор генетических поломок индивидуален не только для каждой опухоли, но и для различных

популяций клеток внутри одной опухоли (Meacham, Morrison, 2013). Для объяснения разнородного состава опухоли в 2006 г была предложена модель стволовой клетки опухоли (СКО) (Clarke *et al.*, 2006). Концепция СКО сегодня сводится к следующему: СКО – специфическая опухолевая клетка – долгоживущая и медленно пролиферирующая, способная при трансплантации иммунодефицитным животным инициировать рост опухоли, идентичной исходной, в то время как другие короткоживущие и более дифференцированные клетки опухоли этой способностью не обладают (Woodward, Hill, 2016). СКО появляется, по-видимому, в результате сбоя в регуляторной системе поврежденных ткане-специфических стволовых клеток (СК) и накоплению мутаций или при неадекватном ответе СК на внешние сигналы. В опухоли лишь очень небольшая доля клеток обладает такими характеристиками (0.01–1% клеток опухоли) (Dirks, 2010). Не уничтожив эту самую важную часть опухолевых клеток, мы не можем обсуждать возможности регрессии опухоли. В отличие от более дифференцированных клеток основной опухолевой массы, которые относительно неплохо уничтожают существующие средства цитотоксической противоопухолевой терапии, СКО характеризуется чрезвычайной терапевтической устойчивостью, которая в ответ на лечение только возрастает (Najafi *et al.*, 2019). Модель СКО, т.е. функциональной гетерогенности клеток опухоли, объясняет также процессы метастазирования. Сегодня уже достоверно известно, что предрасположенность опухоли к метастазированию заложена в геноме конкретной опухолевой клетки (Shiozawa *et al.*, 2013). За последнее десятилетие накоплен огромный экспериментальный материал, указывающий на то, что СКО вовлекается также в васкуляризацию опухоли и образование стромы (Melzer *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021). Так, многие вопросы клинической онкологии, начиная от возникновения лекарственной резистентности до появления рецидивов спустя десятилетия после кажущегося исцеления, находят объяснение в рамках модели СКО. Теперь мы знаем, что снижение размеров опухоли в результате лечения не столь уж и важно, гораздо важнее судьба СКО. Ибо, если они уцелели, то опухоль в ближайшее время “вернется”.

Два независимых наблюдения послужили основой для инициации экспериментов, подтверждающих участие СКО в ВМ. Первое, окраска гистологических срезов пимонидазолом (маркер гипоксии), показала, что микроокружение каналов ВМ в опухоли характеризуется глубокой гипоксией (Sun *et al.*, 2007). А гипоксия, как известно, – один

из важных параметров, необходимых для поддержания недифференцированного статуса СК. Второе, анализ экспрессии генов с использованием ДНК-микрочипов показал, что опухолевые клетки, способные формировать васкулярные каналы, экспрессируют гены, характерные для поддержания полипотентного, эмбрионально-подобного фенотипа, например, Nodal, Notch и Wnt (Hooijkaas *et al.*, 2011). С другой стороны, экспрессия меланоцит-специфических антигенов, таких как Melan-A, MIFT, TYR и TYRP1, снижена в 22; 34; 37 и 100 раз в клетках меланомы, способных формировать васкулярные каналы (Boiko *et al.*, 2010). Более того, в опухолевом материале, где присутствовали васкулярные каналы, высланные опухолевыми клетками, была обнаружена большая популяция СКО (Monzani, La Porta, 2008). Таким образом, сходство между СКО и опухолевыми клетками, способными формировать васкулярные каналы, по маркерам и сигнальным путям, предполагает, что СКО должна участвовать в формировании васкулярных каналов. Экспериментальное подтверждение этой идеи можно найти в обзорах последних 5–6 лет: клетки, выстилающие васкулярные каналы в опухоли, несут характеристики СКО (Bao *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019). Однако механизм, инициирующий трансдифференцировку СКО в эндотелий-подобную клетку, все еще неизвестен.

С целью повышения эффективности лечения злокачественных заболеваний в стадии агрессивного роста проводятся многочисленные клинические исследования новых противоопухолевых препаратов. Тем не менее, постоянно возрастающая резистентность к терапии оставляет открытым вопрос о лечении рака. Блокирование формирования васкулярных каналов в опухоли не только могло бы уменьшить рост опухоли и образование отдаленных метастазов, снижая доставку питания опухолевым клеткам, но и изменить характеристики СКО, предотвращая возвращение болезни.

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВМ

Для выявления каналов ВМ в опухоли в лабораторной практике используют окрашивание гистологических срезов PAS-реагентом (Periodic acid Schiff). В основе PAS-реакции лежит окисление базального ламинарного матрикса васкулярных каналов периодной кислотой (Folberg *et al.*, 2000). Отрицательная PAS-реакция является индикатором отсутствия в опухоли васкулярных каналов, высланных опухолевыми клетками. Первые исследования с выявлением васкулярных каналов были проведены на гистологических срезах юве-

альной меланомы глаза 20 больных в лаборатории Фолберг (Folberg *et al.*, 1993). Опухоль оценивалась по размеру, ее расположению в области хороидеи или цилиарного тела и наличием или отсутствием PAS-положительных структур. При отсутствии PAS-положительных сетей выживаемость больных без прогрессии составила 10 и более лет. Для подтверждения своих результатов R. Folberg и соавторы провели более масштабное исследование, включающее 234 случая ювальной меланомой глаза, период наблюдения составлял не менее 10 лет. Кривые выживаемости по Каплану-Мейеру показали, что выживаемость больных, в опухолевой ткани которых отсутствовал компонент ВМ, была значительно выше (91.7%) выживаемости больных, в опухолевой ткани которых такие структуры присутствовали (56.9%,  $p = 0.0001$ ) (Folberg *et al.*, 1994). Другой важный вывод, который следовал из этого исследования – в ткани меланомы глаза, размер которой превышал 1 см, отсутствовал некроз, что предполагало, что опухоль хорошо васкуляризована.

Исследования прогностической значимости PAS-положительных структур при диссеминированной меланоме кожи были проведены и в нашей лаборатории (Григорьева и др., 2011). В случае определения в опухолевой ткани параллельных с пересечением PAS-положительных структур болезнь возвращалась через 10 мес. по сравнению с 30 мес. при отсутствии в опухолевой ткани таких структур ( $p = 0.057$ ). Крайне интересным оказался тот факт, что PAS-положительные структуры в образцах опухоли достоверно определялись в тех участках опухоли, где плотность сосудов, высланных эндотелиальными клетками, была минимальной.

Прогностическое значение PAS-положительных структур при раке молочной железы, раке яичника, мезотелиальной саркоме, рабдомиосаркоме, раке легкого, гепатоцеллюлярной саркоме, раке почки подтверждено рядом лабораторий (Ren *et al.*, 2019; Treps *et al.*, 2021). Отмечается высокий уровень надежности и соответствия результатов гистологического определения данных структур клиническому течению болезни. Статистически значимой зависимости между такими показателями, как локализация, стадия заболевания, возраст пациента и присутствием в ткани опухоли ВМ не выявлено.

#### КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ, КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ВМ

Современная антиангиогенная терапия направлена на блокирование пролиферации эндотелиальных клеток или их апоптоз. Снижение

плотности кровеносных сосудов приводит к повышению гипоксии в опухоли. Адаптация к условиям гипоксии сопровождается селекцией клеток с более агрессивным фенотипом, которые, скорее всего, для компенсации недостатка питания и кислорода и формируют каналы ВМ. Антиангиогенная терапия непреднамеренно активирует альтернативную, более агрессивную систему кровоснабжения опухоли (Vartanian *et al.*, 2013).

ВМ может быть инициирована и самим терапевтическим воздействием. Химиотерапия является основным, а при некоторых формах и стадиях распространения злокачественной опухоли – единственным методом лечения онкологических больных. Наиболее серьезным препятствием к повышению эффективности химиотерапии остается лекарственная резистентность. Опухоль перестает отвечать на терапию независимо от комбинирования применяемых препаратов. Если при этом исчерпаны другие виды лечения – хирургическое и иммунотерапия – болезнь переходит в терминальную фазу. Нами было получено экспериментальное подтверждение, что резистентные к ДНК-повреждающим агентам опухолевые клетки, в отличие от клеток дикого типа, формируют васкулярные каналы (Vartanian *et al.*, 2017).

К настоящему времени описано небольшое количество охарактеризованных моделей для изучения механизмов инициации и роста васкулярных каналов, высланных опухолевыми клетками. Анализ исследований последних десяти лет, посвященных изучению молекулярных событий, лежащих в основе патогенеза меланомы, дает основание к выбору меланомы кожи как оптимальной модели для изучения ВМ. Классические подходы (химио- и радиотерапия) в случае меланомы дают менее выраженные эффекты, чем в других опухолях. Меланома практически резистентна к такой терапии, что подтверждает высоко злокачественный фенотип клеток меланомы, а значит и возможность формирования васкулярных каналов (Gogas *et al.*, 2007). Меланома также не отвечает на антиангиогенную терапию, что предполагает существование в опухоли системы циркуляции крови, не зависящей от эндотелия (Cui *et al.*, 2014). Из метастазов больных диссеминированной меланомы нами были получены 11 клеточных линий меланомы (Михайлова и др., 2017). На основе анализа способности этих клеток формировать васкулярные каналы была оптимизирована *in vitro* и разработана *in vivo* модель ВМ.

*Клеточные линии меланомы, как основа для создания in vitro модели ВМ*

В настоящее время *in vitro* моделью исследования ВМ служит тест на формирование сосудисто-подобных структур (СПС) в 3D-культуре, разработанный для выявления ингибиторов и активаторов ангиогенеза (Maniotis *et al.*, 1999). Если опухолевые клетки на гелевой матрице вместо равномерного монослоя формируют структуры, подобные пчелиным сотам (honey-like comb), то такие клетки будут формировать и тубулярные структуры. Полученные нами клетки меланомы (Mel Z, Mel Mtp, Mel Rac, Mel P, Mel Kor, Mel Si, Mel Ibr, Mel Cher, Mel Gus, Mel Ch) прошли не менее 20 пассажей. Клетки были анеуплоидные, модальное число хромосом соответствовало триплоидному набору. Статус меланомы был подтвержден экспрессией пяти тканеспецифических антигенов: CD63, HMB45, Melan A, Tyrosinase, HMW. Для всех клеточных линий метастатической меланомы кожи была характерна высокая пролиферативная активность (Ki-67 > 60%) (Михайлова и др., 2017).

В *in vitro* экспериментах в качестве гелевой матрицы мы использовали Матригель. По сравнению с коллагеновым гелем или фибронектином Матригель является более обогащенной матрицей. В ходе работы были выявлены следующие составляющие стандартизированной *in vitro* модели ВМ: основной детерминантой формирования СПС оказалась механическая жесткость геля — его способность деформироваться в ответ на кооперацию с клетками. Разбавление Матригеля (8.7 мг/мл) более чем в два раза снижало способность клеток меланомы к организации в СПС. Другой детерминантой образования подобных структур оказалась необходимость наличия в культуральной среде факторов роста сыворотки (Вартанян и др., 2005). Биомеханическая способность клеток меланомы формировать СПС зависела также от инвазивного потенциала клетки (Vartanian *et al.*, 2007) и экспрессии опухолевыми клетками эндотелий-специфических генов и маркеров стволовых клеток (Sefitov *et al.*, 2002; Оборотова и др., 2015).

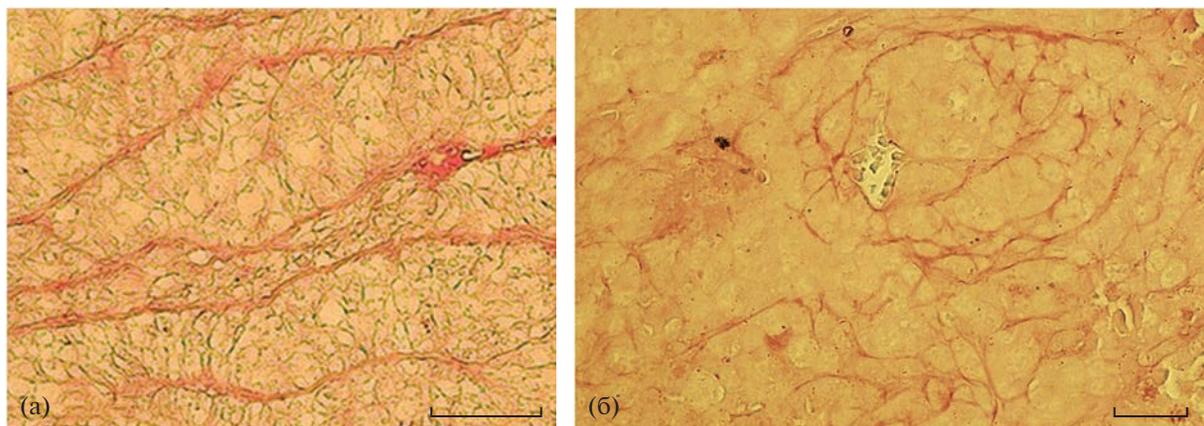
Культивирование клеток метастатической меланомы кожи на Матригеле приводило к формированию трех типов СПС. В качестве контроля была использована клеточная линия эндотелиальных клеток SVEC-4-10. Клетки меланомы Mel Cher, Mel P, Mel Ch и Mel Si формировали стабильные СПС, которые сохранялись более 24 ч. Вторую группу составили Mel Kor, Mel Il, Mel Gus и Mel Mtp клетки, которые формировали нестабильные СПС, к 14–16 ч инкубации на Матригеле появлялись разрывы в контактах клеток, нарушалась структура СПС. Три клеточные линии Mel

Ksen, Mel Ibr и Mel Me сохраняли способность мигрировать на Матригеле и узнавать друг друга, однако не формировали СПС, при этом наблюдалась организация опухолевых клеток в небольшие кластеры (Вартанян и др., 2005). Поведение всех трех групп клеток на Матригеле воспроизводилось стабильно, от опыта к опыту.

*Клеточные линии меланомы, как основа для создания in vivo модели ВМ*

К моменту, когда мы начинали разработку *in vivo* модели ВМ, основной моделью было формирование на Матригеле тубулярных структур клетками ювеальной меланомы человека MUMB2B. Формирование тубулярных структур на Матригеле происходило при высокой плотности MUMB2B клеток и занимало 2 нед. (Maniotis *et al.*, 1999). По данным Maniotis A. и др., предложивших этот метод, для таких тубулярных структур было характерно положительное окрашивание PAS-реагентом, что свидетельствовало о присутствии базальной мембраны, окружающей тубулярные структуры на Матригеле. В литературе отсутствовали сообщения о ксенографтной модели ВМ. При разработке модели роста человеческой меланомы кожи в бестимусных мышцах мы фокусировали наше внимание на реализации двух постулатов: *in vivo* модель ВМ должна обладать параметрами для исследования динамики роста экспериментальной меланомы в условиях блокирования ВМ, и второе, обеспечивать надежную воспроизводимость визуализации сети васкулярных каналов в опухоли.

Клеточная линия Mel Cher была отобрана для имплантации иммунодефицитным мышам. Данная клеточная линия обладала стабильными культуральными и морфологическими характеристиками. Mel Cher клетки для приобретения эндотелий-подобных характеристик экспрессировали с высокой интенсивностью белка VEGF-рецептор-лигандной системы, фактор фон Виллебранда/фактор VIII, белок гомотипического узнавания эндотелиальных клеток, VE-кадхерин и белок, инициирующий васкуляризацию эмбриона, Mig-7 (Vartanian, Baryshnikov, 2013). С другой стороны, наблюдалась экспрессия маркеров, характерных как для стволовой клетки меланомы (CD133, CD271), так и для маркеров стволовой клетки других типов опухоли (CD24, CD44, CD90, CD271 и CD117), что позволяло этим клеткам имитировать поведение ангиобласта (Folberg *et al.*, 2000). На Матригеле Mel Cher клетки формировали СПС. Образованные структуры имели вид упорядоченной сети и сохранялись более 24 ч. Инкубация клеток Mel Cher с низкомолекулярными соединениями поз-



**Рис. 1.** PAS-положительные структуры при меланоме кожи. а – PAS-положительные структуры на гистологических срезах опухоли, б – PAS-положительные структуры в ксенографтах. Масштаб 100  $\mu\text{м}$ .

воляла идентифицировать вещества, блокирующие формирование СПС. Также клеточная линия меланомы кожи Mel Cher формировала тубулярные структуры в долгосрочных тестах (до 3 нед.).

При имплантации бестимусным мышам Mel Cher клеток подкожные узлы появлялись на 5 день. К 20 дню средний объем опухоли составил 180  $\text{мм}^3$ . Гистологическое исследование срезов опухоли, полученных на 25-й день после перевивки, выявила в опухоли PAS-положительные структуры, характерные для опухолей человека (рис. 1а, 1б) (Григорьева и др., 2010; Vartanian *et al.*, 2017).

Динамика роста опухоли и гистологические характеристики сохранялись в 3 независимых экспериментах, т.е. получена стабильно перевиваемая ксенографтная модель. Таким образом, клеточная линия меланомы кожи Mel Cher может быть рекомендована в качестве *in vitro* и *in vivo* модели ВМ. Mel Cher клетки формируют стабильные СПС на Матригеле. При подкожном введении опухолевых клеток иммунодефицитным мышам формируют опухоль, на гистологических срезах васкулярные каналы визуализируются PAS-окрашиванием (Vartanian *et al.*, 2013).

Впервые о ВМ заговорили в самом конце 1999 г. За прошедшие годы накоплен экспериментальный материал, подтвердивший гипотезу о том, что появление в опухоли ВМ является неблагоприятным фактором, и видимо, может быть инициировано самим терапевтическим воздействием. ВМ – сложный биологический процесс, в который вовлекаются более десяти сигнальных путей. Не определен ее вклад в общую циркуляцию крови в опухоли. Предлагаемые нами *in vitro* и *in vivo* модели ВМ существенно расширяют возможности исследований в области молекулярных механизмов инициации и роста каналов ВМ в опухоли, а скри-

нинг соединений, ингибирующих ВМ, возможно, позволит повысить эффективность лечения злокачественных заболеваний.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1060.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вартанян А.А., Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Вовлечение апоптоза в становление васкулогенной мимикрии при злокачественных новообразованиях // Доклады РАН. 2005. Т. 402. № 1. С. 129–132.
- Григорьева И.Н., Степанова Е.В., Вартанян А.А., Барышников А.Ю., Михайлова И.Н., Морозова Л.Ф., Бурова О.С. Применение клеточной линии меланомы кожи Mel Cher в качестве положительной модели васкулогенной мимикрии // Патент РФ, RU2402243. Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2010.
- Григорьева И.Г., Степанова Е.В., Барышников А.Ю. Клиническое значение васкулогенной мимикрии для больших меланомой кожи // Росс. Биотер Журн. 2011. Т. 10. № 1. С. 22–23.
- Михайлова И.Н., Морозова Л.Ф., Голубева В.А., Бурова О.С., Барышников А.Ю. Получение и культивирование клеточных линий меланомы. 2017. С. 15–20. В монографии “Клеточные линии меланомы человека”. Под редакцией Михайловой И.Н. и Давыдова М.И. Санкт-Петербург. Изд. “Научное издание”. ISBN 978-5-9909412-3-6.
- Оборотова М.В., Бурова О.С., Барышникова М.А., Заботина Т.А., Барышников К.А., Михайлова И.Н., Морозова Л.Ф., Сураева Н.М., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток на клеточных линиях меланомы

- человека // Росс. Биотер. Журн. 2015. Т. 14. № 1. С. 11–14.
- Al-Ostoot F.H., Salah S., Khamees H.A., Khanum S.A.* Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities // *Cancer Treat Res Commun.* 2021. V. 28. P. 100422–100426.
- Bao Z., Cheng Z., Chai D.* The expressions of CD133, ALDH1, and vasculogenic mimicry in osteosarcoma and their clinical significance // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2018. V. 11(7). P. 3656–3663.
- Boiko A.D., Razorenova O.V., Johnson D.L., Ly D.P., Butler P.D., Yang G.P., Joshua B., Kaplan M.J., Longaker M.T., Weissman I.L.* Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271 // *Nature.* 2010. V. 466. P. 133–137.
- Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.* Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 9339–9344.
- Cui C., Tang B., Guo J.* Chemotherapy, biochemotherapy and anti-VEGF therapy in metastatic melanoma // *Chin Clin Oncol.* 2014. V. 3(3). P. 36–42.
- Dirks P.* Cancer stem cells: invitation to a second round // *Nature.* 2010. V. 466. P. 40–41.
- El Alaoui-Lasmali K., Faivre B.* Antiangiogenic therapy: Markers of response, “normalization” and resistance // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018. V. 128. P. 118–129.
- Folberg R., Rummelt R., Parys-Van Ginderdeuren T., Woolson R.F., Pe'er J., Gruman L.M.* The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma // *Ophthalmology.* 1993. V. 100. P. 1389–1398.
- Folberg R., Hendrix M.J.C., Maniatis A.J.* Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis // *Am. J. Pathol.* 2000. V. 156. P. 361–381.
- Folberg R., Pe'er J., Gruman L.M., Woolson R.F., Jeng G., Montague P.R., Moninger T.O., Yi H., Moore K.C.* The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study // *Hum Pathol.* 1994. V. 23. P. 1298–1305.
- Gogas H.J., Kirkwood J.M., Sondak V.K.* Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? // *Cancer.* 2007. V. 109(3). P. 455–464.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Hess A.R., Seftor R.E.* Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma // *Nature Reviews Cancer.* 2003. V. 3. P. 411–421.
- Hendrix M.J., Seftor R.E., Seftor E.A., Gruman L.M., Lee L.M., Nickoloff B.J., Miele L., Sheriff D., Schattman G.C.* Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 665–668.
- Hooijkaas A.I., Gadiot J., van Boven H., Blank C.* Expression of the embryological morphogen Nodal in stage III/IV melanoma // *Melanoma Res.* 2011. V. 21(6). P. 491–501.
- Jászai J., Schmidt M.H.H.* Trends and Challenges in Tumor Anti-angiogenic Therapy // *Cells.* 2019. V. 8(9). P. 1102–1109.
- Li F., Xu J., Liu S.* Cancer Stem Cells and Neovascularization // *Cells.* 2021. V. 10(5). P. 1070–1078.
- Luo Q., Wang J., Zhao W., Peng Z., Liu X., Li B., Zhang H., Shan B., Zhang C., Duan C.* Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications // *J Hematol Oncol.* 2020. V. 13(1). P. 19–28.
- Maniatis A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M.G., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., Hendrix M.J.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry // *Am. J. Pathology.* 1999. V. 155(3). P. 739–752.
- Meacham C.E., Morrison S.J.* Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity // *Nature.* 2013. V. 501(7467). P. 328–337.
- Melzer C., von der Ohe J., Hass R.* Concise Review: Crosstalk of Mesenchymal Stroma/Stem-Like Cells with Cancer Cells Provides Therapeutic Potential // *Stem Cells.* 2018. V. 36(7). P. 951–968.
- Monzani, E., La Porta C.A.* Targeting cancer stem cell to modulate alternative vascularization mechanisms // *Stem Cell Rev.* 2008. V. 4. P. 51–56.
- Najafi M., Mortezaee K., Majidpoo S.* Cancer stem cell (CSC) resistance drivers // *J. Life Sci.* 2019. V. 234. P. 116781–116786.
- Ren H.Y., Shen J.X., Mao X.M., Zhang X.Y., Zhou P., Li S.Y., Zheng Z.W., Shen D.Y., Meng J.R.* Correlation Between Tumor Vasculogenic Mimicry and Poor Prognosis of Human Digestive Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Pathol. Oncol. Res.* 2019. V. 25(3). P. 849–858.
- Ribatti D., Annesse T., Ruggieri S., Tamma R., Crivellato E.* Limitations of Anti-Angiogenic Treatment of Tumors // *Transl Oncol.* 2019. V. 12(7). P. 981–986.
- Seftor E.A., Meltzer P.S., Schattman G.C., Gruman L.M., Hess A.S., Kirschmann D.A., Seftor R.E., Hendrix M.J.* Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002. V. 44(1). P. 17–27.
- Shiozawa Y., Nie B., Pienta K.J., Morgan T.M., Taichman R.S.* Cancer stem cells and their role in metastasis // *Pharmacol. Ther.* 2013. V. 138(2). P. 285–293.
- Shirakawa K., Kobayashi H., Sobajima J., Hashimoto D., Shimizu H., Wakasugi H.* Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft // *Breast Cancer Res.* 2003. V. 5. P. 136–139.
- Sun B., Zhang D., Zhan S., Zhang W., Guo H., Zhao X.* Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma // *Cancer.* 2007. V. 249. P. 188–197.
- Sun H., Yao N., Cheng S., Li L., Liu S., Yang Z., Shang G., Zhang D., Yao Z.* Cancer stem-like cells directly participate in vasculogenic mimicry channels in triple-negative breast cancer // *Cancer. Biol. Med.* 2019. V. 16(2). P. 299–311.
- Tímár J., Tóth J.* Tumor sinuses – vascular channels // *Pathol. Oncol. Res.* 2000. V. 6. P. 83–86.
- Treps L., Faure S., Clere N.* Vasculogenic mimicry, a complex and devious process favoring tumorigenesis – Interest in making it a therapeutic target // *Pharmacol. Ther.* 2021. V. 223. P. 107805–107813.
- Van der Schaft D.W.J., Seftor R.E., Seftor E.A., Hess A.R., Gruman L.M., Kirschmann D.A., Yokoyama Y., Grif-*

- fioen A.W., Hendrix M.J.* Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells // *J. Natl. Cancer. Inst.* 2004. V. 96(19). P. 1473–1477.
- Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V., Baryshnikov A.Yu.* The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // *Melanoma Res.* 2007. V. 17(1). P. 1–8.
- Vartanian A., Baryshnikov A.* Molecular determinants of melanoma vasculogenic mimicry. in “Melanoma, risk factor, molecular biology, and treatment options”. 2013. P. 67–92. Eds. *A.C. Jones*. N.Y. NOVA BioMedical Press.
- Vartanian A., Gatsina G., Grigorieva I., Solomko E., Dombrovsky V., Baryshnikov A., Stepanova E.* The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry // *Clin. Exp. Med.* 2013. V. 13(3). P. 201–219.
- Vartanian A., Golubeva I., Shprakh Z.* Is vasculogenic mimicry a hallmark of cancer? // *Horizons in Cancer Res.* 2017. V. 65. P. 13–34.
- Vartanian A., Baryshnikova M., Burova O., Afanasieva D., Misyurin V., Belyavsky A., Shprakh Z.* Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents // *Melanoma Res.* 2017. V. 27(1). P. 8–16.
- Vartanian A.A., Khochenkov D.A., Khochenkova Yu.A., Machkova Yu.S., Khachatryan D.S., Kolotaev A.V., Osipov V.N.* Effect of Derivatives of Hydroxamic Acids on Vasculogenic Mimicry // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 46(2). P. 207–219.
- Woodward W.A., Hill R.P.* Cancer Stem Cells. Recent Results // *Cancer Res.* 2016. V. 198. P. 25–44.

## Melanoma Cell Lines As a Basis for Vasculogenic Mimicry Model Development

A. A. Vartanian<sup>1, #</sup> and V. S. Kosorukov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia,  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478 Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: zivotov57@mail.ru*

In tumors, traditional angiogenesis is observed in addition to vascular channels that lack endothelial cell lining. It is assumed that the network of such channels compensates for the insufficiently development of the blood circulatory system in the tumor and prevents early necrosis inside the tumor. A strong statistical correlation established between the presence of vascular channels in the tumor and the low survival rate of patients confirms this hypothesis. In the light of these data, the search for a low-molecular inhibitor of vascular channels formation in a tumor becomes extremely relevant. This review discusses the functional and prognostic significance of vasculogenic mimicry. Particular attention is paid to the optimization of the in vitro vasculogenic mimicry model based on the analysis of 11 melanoma cell lines obtained from metastases of patients with disseminated melanoma. In addition, the development of an in vivo vasculogenic mimicry model is being discussed.

*Keywords:* melanoma, vasculogenic mimicry, *in vitro*, *in vivo* models

УДК 577.25

## ФОТОХИМИЯ И СИГНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КРИПТОХРОМОВ РАСТЕНИЙ. ОБЗОР

© 2023 г. Г. Я. Фрайкин\*, Н. С. Беленикина\*, @

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, Москва, 119234 Россия

@E-mail: nata.belenikina@ya.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

Криптохромы составляют обширный класс сенсорных рецепторов синего света, которые у растений регулируют процессы развития и циркадный ритм. Эти фоторецепторы могут также действовать как магниторецепторы. Криптохромы связывают в качестве хромофора флавинадениндинуклеотид (ФАД) в гомологичном ДНК-фотолиазе домене PNR; вблизи ФАД-связывающего сайта к нему присоединено С-концевое удлинение ССЕ. Активация криптохрома инициируется фотореакциями ФАД с переносом электрона/протона и образованием редокс-форм. При фотовосстановлении ФАД белок подвергается конформационному изменению, вызывающему разобщение PNR-домена и ССЕ, что сопровождается образованием функционально активных олигомеров криптохромных молекул. Фотоолигомеризация рассматривается как ключевой процесс, необходимый для сигнальной активности криптохромов.

**Ключевые слова:** криптохромы, фоторецепторы, ФАД-хромофор, фотоцикл, фотоактивация, сигнальные свойства

**DOI:** 10.31857/S1026347022700111, **EDN:** HKBFVO

Свет — источник энергии для растений, которые в процессе фотосинтеза трансформируют световую энергию в биохимически доступную форму энергии. Вместе с тем свет действует как ключевой регуляторный сигнал, необходимый для роста и морфогенетического развития растений. Восприятие растениями световых сигналов осуществляется несколькими фоторецепторами, включая сенсор ультрафиолетового света (УФ-света) В-области (УФВ, 290–320 нм), белок UV resistance 8 (UVR8), сенсоры УФ-света А-области (УФА)/синего света (320–400 нм/400–500 нм), криптохромы и фототропины, а также сенсоры красного/дальнего красного света (600–750 нм) фитохромы (Фрайкин, 2018).

Криптохромы (cryptochromes, CRY) — флавопротеиновые фоторецепторы, найденные у организмов всего биологического царства (Chaves *et al.*, 2011; Losi, Gartner, 2012; Dasgupta *et al.*, 2016; Michael *et al.*, 2017). Криптохромы растения *Arabidopsis thaliana* CRY1/2 ближе к N-концу содержат консервативный домен PNR (photolyase homology region), который выполняет фотосенсорную функцию и имеет высокую степень гомологии с фотолиазами — ферментами, осуществляющими светозависимую репарацию ДНК. В PNR-домеене имеются два кармана для хромофорных группировок:

ближе к С-концу связывается флавин (ФАД), ближе к N-концу может располагаться птерин (5,10-methenyltetrahydrofolate, МТНФ). Индуцированный синим светом внутримолекулярный перенос электрона/протона к возбужденному состоянию ФАД считается первичным механизмом фотоактивации криптохрома. Образование в результате этой реакции нейтрального радикала ФАДН<sup>•</sup> определяет способность фоторецептора поглощать зеленый, желтый и красный свет в области 500–650 нм *in vitro*. Зеленый свет, добавленный к синему свету, ингибирует опосредованный криптохромом фотофизиологический ответ. Поэтому криптохром с ФАДН рассматривается как биологически активное состояние фоторецептора. При поглощении зеленого света этим радикалом равновесие сдвигается в сторону формирования неактивного состояния криптохрома с анион-восстановленной формой флавина ФАДН<sup>-</sup> (Ahmad, 2016). Таким образом, активация криптохрома посредством фотовосстановления ФАД является обратимым механизмом и, как продемонстрировано при изучении фотоиндуцированного удлинения гипокотыля *A. thaliana*, криптохромы — это не только сенсоры синего света, но и сенсоры отношения синего света к зеленому свету (Sellaro *et al.*, 2010). В этом проявляется определенная

аналогия криптохромов с фитохромами – сенсорами красного (К)/дальнего красного (ДК) света. Фитохром в неактивной форме, поглощающей К-свет с максимумом при 660–670 нм, под действием К-света переходит в физиологически активную форму, поглощающую ДК-свет с максимумом при 730 нм. Фотоиндуцированное взаимопревращение двух форм фитохрома – результат прямой и обратной изомеризации его билинового хромофора. Эти реакции лежат в основе действия фитохрома как молекулярного фотопереклювателя в растительной клетке. В процессе фотообратимого перехода между двумя формами фитохрома устанавливается зависимое от длины волны равновесие, делающее эту фоторецепторную систему эффективным сенсором фотонов в К/ДК-области спектра, а также сенсором отношения К-света к ДК-свету. Хотя первичные фотохимические реакции хромофоров у фитохромов и криптохромов различаются, криптохромы тоже можно считать молекулярными фотопереклювателями при действии синего и зеленого света на растительную клетку (Фрайкин и др., 2013).

Помимо фотосенсорного PHR-домена белки CRY1/2 имеют также удлиненную C-концевую часть (CCE); она менее консервативна и отвечает за связывание криптохрома с сигнальными белками и трансдукцию сигнала (Zoltowski, 2015). У CRY1 и CRY2 CCE-домен состоит из 180 и 110 аминокислотных остатков (а.о.) соответственно. В темноте CCE-домен сильно связан PHR-доменом, но после фотоактивации высвобождается из ядра PHR и переходит в неупорядоченное состояние. Деструктурированная часть CCE из 80 а.о. становится затем доступной для взаимодействия с некоторыми белками – компонентами сигнальных путей криптохромов. У фотолиз CCE-домен отсутствует, а у криптохромов играет роль эффекторного домена. Ранее считалось, что PHR криптохромов растений действует только как фотосенсорный домен. Однако полученные недавно данные о физическом взаимодействии большинства известных в настоящее время сигнальных белков с PHR-доменом криптохромов позволяют считать, что PHR, как и CCE, тоже может выполнять функцию эффекторного домена (Wang *et al.*, 2018).

Принято считать, что криптохромы эволюционировали от фотолиазного предшественника. Подтверждением общих эволюционных корней фотолиаз и криптохромов может служить открытие у гриба *Aspergillus nidulans* гена, кодирующего белок с двойной функцией – фотолиазной и регуляторной. Белки с комбинированной функцией обнаружены также у диатом и зеленых водорослей (Konig *et al.*, 2017; Kottke *et al.*, 2017; Вечтомова и др., 2020). Криптохромы, как и фотолиазы, содержат в качестве основного хромофора ФАД, однако, в отличие от его каталитической функции у

фотолиаз, у криптохромов ФАД определяет главным образом их фотосенсорные свойства. Большинство криптохромов не способны катализировать фоторепарацию ДНК. Однако отдельные их представители, относящиеся к семейству криптохромов/фотолиаз (CPF), сохраняют эту способность. Эти криптохромы обладают как ДНК-репарирующей активностью, так и фоторегуляторными свойствами.

Согласно современной филогенетической и функциональной классификации (Ozturk, 2017; Вечтомова и др., 2020), белки CPF подразделяются на четыре класса. Среди них отметим два основных: растительные криптохромы и подобные им белки (plant-like, pCRY) и криптохромы животных и схожие с ними белки (animal-like, aCRY). Водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* содержит два белка: pCRY (*Chlamydomonas photolyase homologue 1*, CPH1), а также aCRY (*CraCRY*) – бифункциональный белок, проявляющий фотолиазную активность и функцию регуляторов экспрессии генов (Kottke *et al.*, 2017).

Почти все белки CPF подвергаются светоиндуцированной реакции, называемой фотоактивацией, в которой каталитически неактивный ФАД при фотовозбуждении отрывает электрон от соседнего триптофана. В восстановленном состоянии флавиновый хромофор либо инициирует трансдукцию сигнала (ФАДН<sup>•</sup>), либо после дальнейшего поглощения фотона катализирует репарацию ДНК (ФАДН<sup>-</sup>). Быстрый перенос электрона с поверхности белка на ФАД обеспечивается триадой триптофанов. Этот внутримолекулярный путь переноса электрона удлиняется у *CraCRY* и криптохрома *Drosophila melanogaster* (dCRY) за счет четвертого ароматического остатка (Paulus *et al.*, 2015; Oldemeyer *et al.*, 2016) – триптофана (dCRY) или тирозина (*CraCRY*).

По современным представлениям, фотоактивация криптохромов растений начинается с поглощения фотона синего света хромофором ФАД и его фотовосстановления. Это приводит к конформационным изменениям, вызывающим разобщение PHR- и CCE-доменов и последующий переход фоторецептора из конформации с закрытым CCE-доменом в конформацию с открытым CCE-доменом. Такие изменения сопровождаются формированием гомодимеров и гомотетрамеров криптохромов, которые необходимы для образования их комплексов с различными сигнальными белками (Chen *et al.*, 2022). Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая тем самым регуляцию ими экспрессии генов и программ развития растений.

Цель работы – обобщение и анализ недавно полученных данных о молекулярных основах фотосенсорных и сигнальных процессов, запускае-

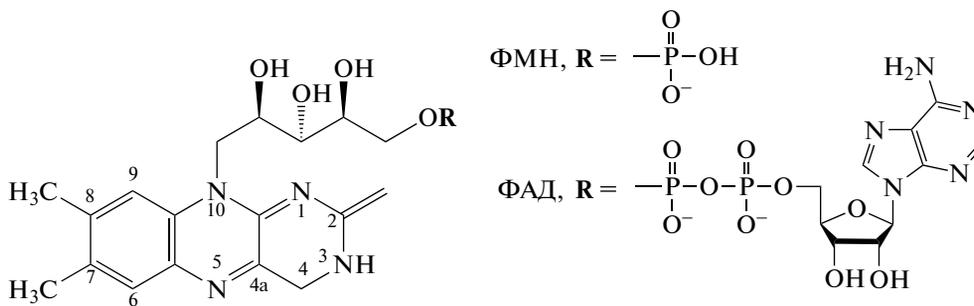


Рис. 1. Изоаллоксазиновое кольцо флавиновых хромофоров.

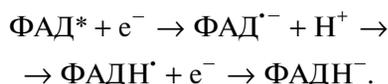
мых фотореакциями ФАД-хромофора у криптохромов растений.

*Фотовозбужденные состояния и редокс-формы флавиновых хромофоров*

Фотофизические, фотохимические и спектроскопические свойства флавинов определяются системой сопряженных двойных связей их изоаллоксазинового кольца (рис. 1). При поглощении фотона УФА/синего света происходит перераспределение заряда в изоаллоксазиновом кольце и изменение редокс-потенциала флавина, что инициирует его фотохимические превращения, вовлекающие перенос электрона/протона и образование редокс-форм. Результаты теоретического изучения изоаллоксазинового кольца свидетельствуют, что как первое синглетное ( $S_1$ ), так и триплетное ( $T_1$ ) возбужденные состояния флавинов соответствуют  $\pi-\pi^*$ -переходам. Однако свойства этих состояний ФАД и флавиномононуклеотида (ФМН), служащего хромофором у фототропинов, отличаются. У ФМН  $T_1$ -состояние формируется с высоким квантовым выходом ( $\phi = 0.5-0.7$ ). При этом эффективное заселение  $T_1$ -уровня ФМН, ответственное за фотохимическую активность этого хромофора, определяется исключительно внутренним свойством изоаллоксазинового кольца. Хромофор криптохромов ФАД отличается от ФМН тем, что на проявление свойств фотовозбужденного изоаллоксазина влияет пространственная близость второго гетероцикла – аденина. Создаваемое ими стэкинг расположение (стопочная U-образная конфигурация) обуславливает фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос электрона. Это приводит к тушению  $S_1$ -состояния, снижению интенсивности флуоресценции с максимумом при 520–530 нм и значительному ослаблению формирования  $T_1$ -состояния ФАД (Losi, Gartner, 2012).

У криптохромов растений ФАД может существовать в четырех формах: полностью окисленной (ФАД), анион-радикальной (ФАД $^{\cdot-}$ ), нейтральной радикальной (ФАДН $^{\cdot}$ ) и анион-восстановленной

(ФАДН $^-$ ). Восстановление фотовозбужденного флавина (ФАД\*) включает следующие реакции:



Согласно теоретически рассчитанным абсорбционным электронным спектрам с колебательно разрешенной структурой, у всех редокс-форм ФАД энергетически наименьший максимум представлен одним электронным переходом типа  $\pi-\pi^*$ , сосредоточенным в центре изоаллоксазинового кольца (Schwinn *et al.*, 2020). Анализ этих спектров показывает, что в целом они согласуются с экспериментальными абсорбционными спектрами ФАД (рис. 2). Все редокс-формы ФАД имеют в спектрах поглощения максимум в области УФА при 360–370 нм. У анион-восстановленной формы ФАДН $^-$  максимум в этой области единственный (видимый свет ФАДН $^-$  поглощает очень слабо). У полностью окисленной формы ФАД максимум в видимой области спектра расположен при 450 нм, анион-радикал ФАД $^{\cdot-}$  имеет максимумы при 410 нм и 470 нм. У ФАДН $^{\cdot}$  максимумы сильно сдвинуты из синей области в зеленую и красную области спектра между 500 и 650 нм; это принципиальное отличие нейтрального радикала от ФАД и ФАД $^{\cdot-}$ . Как видно из приведенных данных, каждая редокс-форма ФАД характеризуется специфическими максимумами в спектрах поглощения. Поэтому абсорбционные спектры в области УФА и видимой области предоставляют важную информацию о редокс-состояниях хромофора ФАД в фоторецепторных белках.

*Фотохимия ФАД-хромофора в белках CPF и фотоактивация криптохромов*

Структурное сходство между PRR-доменом криптохромов и фотолиазами, особенно в белковом кармане, связывающем флаavin, определяет общий принцип их реагирования на свет: у обоих типов белков фотоиндуцированное возбуждение хромофора инициирует реакции переноса элек-

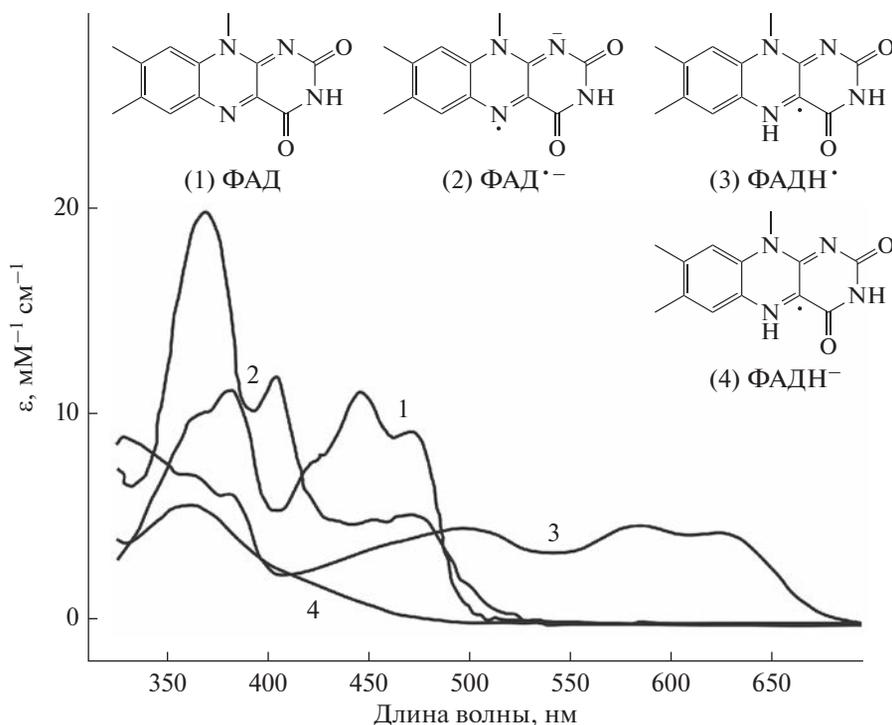


Рис. 2. Абсорбционные спектры четырех редокс-форм ФАД-хромофора криптохромов растений.

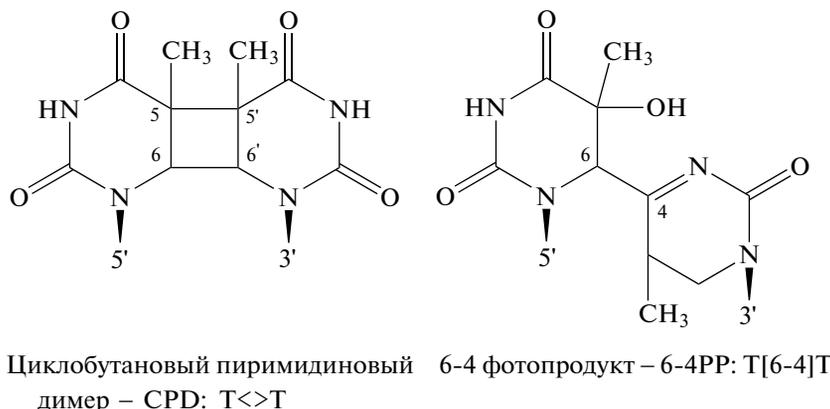
трона. Однако механизмы фотохимических процессов у криптохромов и фотолиаз фундаментально различаются. Это, в частности, выражается в редокс-состояниях хромофора ФАД в ходе его фотоциклов. Активация светом фотолиаз происходит с участием двух хромофоров: каталитического ФАД, существующего в основном состоянии в анион-восстановленной форме (ФАДН<sup>-</sup>), и антенного хромофора. У большинства фотолиаз функцию антенного хромофора выполняют МТНФ или 8-гидроксидезафлавин (8-hydroxydeazaflavin, 8-HDF). Указанные хромофору имеют более высокие коэффициенты молярного поглощения в области УФА ( $\epsilon_{370 \text{ нм}} = 29000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  у МТНФ или  $\epsilon_{400 \text{ нм}} = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  у 8-HDF) по сравнению с ФАДН<sup>-</sup> ( $\epsilon_{370 \text{ нм}} = 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  или  $\epsilon_{400 \text{ нм}} = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Это увеличивает количество поглощенных фотонов, используемых для фотофизического резонансного переноса энергии возбуждения к ФАДН<sup>-</sup>, повышая его потенциал восстанавливать повреждения ДНК как первый этап в процессе репарации. Кроме того, может значительно повышаться скорость репарации ДНК, что важно в условиях слабой освещенности.

Главные индуцированные УФ-излучением повреждения ДНК — это циклобутановые пиримидиновые димеры (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) и пиримидин (6-4) пиримидиновые фотопродукты (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts, 6-4PP) (рис. 3). Ферменты, репарирующие

CPD или 6-4PP, названы соответственно CPD-фотолиазами или (6-4) фотолиазами (Zhang *et al.*, 2017). Несмотря на сходство структур двух типов фотолиаз и первичной фотохимии их флавинового кофактора, квантовый выход фоторепарации (6-4) фотолиазами ( $\phi = 0.1$ ) значительно меньше квантового выхода фоторепарации CPD-фотолиазами ( $\phi = 0.7-0.9$ ). Это обусловлено тем, что фоторепарация 6-4PP по сравнению с CPD более сложная реакция.

При связывании фотолиазы с участком ДНК, содержащим CPD или 6-4PP, образуется стабильный комплекс. В нем эти фотопродукты оказываются в тесном (в пределах действия ван-дер-ваальсовых сил) контакте с ФАДН<sup>-</sup>. В каталитическом акте происходит перенос электрона от фотовозбужденного ФАДН<sup>-</sup> к повреждению ДНК, что приводит к образованию комплекса с переносом заряда между нейтральным радикалом флавина (ФАДН<sup>•</sup>) и анион-радикалом CPD или 6-4PP. Далее, в анион-радикале CPD происходит перераспределение электронной плотности и расщепление циклобутанового кольца на два исходных пиримидина, а ФАДН<sup>•</sup> восстанавливается обратным переносом избыточного электрона в активную форму ФАДН<sup>-</sup>, участвующую в последующих фотокаталитических циклах.

В анион-радикале 6-4PP С6 5'-основания соединен с С4 3'-основания; при этом ОН-группа при С4 3'-основания перемещена к С5 5'-основа-



**Рис. 3.** Индуцированные УФ-излучением повреждения ДНК на примере оснований тимина (Т), расположенных в одной цепи ДНК.

ния (рис. 3). В отличие от CPD, в котором разрыв 5–6-связей восстанавливает основания в их исходные формы, в анион-радикале 6-4PP разрыв связей C6–C4 и C5–ОН приводил бы к формированию двух поврежденных оснований, т.е. репарации ДНК не происходило бы. Поэтому для репарации 6-4PP фермент должен катализировать не только реакции разрыва связей, но и реакцию переноса ОН-группы. Однако поскольку интермедиат в форме анион-радикала 6-4PP не может подвергаться этим двум согласованным реакциям, была предложена модель, согласно которой формирование неповрежденных пиримидинов (после разрыва связей C4–C6 и C5–ОН) возможно при условии превращения анион-радикала в другой интермедиат – оксетан (Zhang *et al.*, 2017).

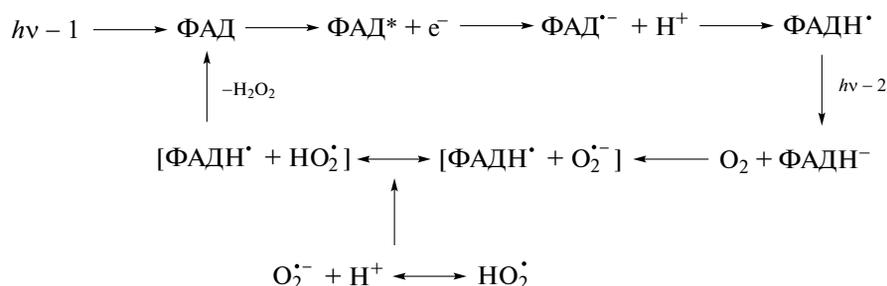
Недавно этот механизм подтвержден данными кристаллографического анализа структуры комплекса РНР *CraCRY* с фрагментом ДНК, содержащим 6-4PP (Franz *et al.*, 2018). Из анализа следует, что в формировании интермедиата оксетана ключевую роль играют два остатка гистидина в активном сайте, которые вовлекаются в перенос протонов. В соответствии с полученными результатами механизм репарации ДНК (6-4) фотолиазой предполагает поглощение второго фотона для перехода от интермедиата оксетана к разрыву связей C4–C6 и C5–ОН. Эта вторая стадия аналогична однофотонной репарации димеров пиримидинов CPD-фотолиазами.

Большинство данных по фотохимии криптохромов получено при изучении CRY1/CRY2 *A. thaliana*, CPN1 и *CraCRY C. reinhardtii* и dCRY *D. melanogaster* (Hense *et al.*, 2015; Paulus *et al.*, 2015; Ahmad, 2016; Lacombe *et al.*, 2019; Oldemeyer *et al.*, 2020; Goettzink, Kottke, 2021). В отличие от фотолиаз, эти криптохромы в основном состоянии содержат ФАД в окисленной форме и обычно (за исключением *CraCRY*, который дополнительно встраивает хро-

мофор 8-HDF,) не связывают антенный хромофор.

В исследованиях CRY1 и CPN1 с применением спектроскопии временного разрешения установлено, что при поглощении синего света ФАД в синглетном возбужденном состоянии восстанавливается в анион-радикал (ФАД<sup>•-</sup>) посредством переноса электрона от соседнего остатка триптофана – компонента консервативной триады триптофанов. Сверхбыстрые реакции переноса электрона от триптофана (Три<sub>1</sub>Н) к ФАД и между концевым триптофаном (Три<sub>3</sub>Н) и (Три<sub>1</sub>Н) происходят за 0.4 пикосекунды и 31 пикосекунду соответственно. Они сопровождаются формированием катион-радикала концевой триптофана (Три<sub>3</sub>Н<sup>•+</sup>), который после депротонирования переходит в радикал Три<sub>3</sub><sup>•</sup>. Последующее взаимодействие нейтрального радикала триптофана с остатком тирозина (ТирОН) вызывает его восстановление до Три<sub>3</sub>Н и образование радикала тирозина (ТирО<sup>•</sup>) в течение нескольких миллисекунд (Thoing *et al.*, 2015).

Образующийся при фотовосстановлении ФАД анион-радикал (ФАД<sup>•-</sup>) протонируется у CRY1 и CPN1 в течение нескольких микросекунд и переходит в нейтральный радикал (ФАДН<sup>•</sup>). Согласно полученным данным, донором протона в этой реакции может служить близко расположенный к изоаллоксазиновому кольцу флавина остаток аспарагиновой кислоты (Асп396). Очевидно, что исчезновение радикала ФАД<sup>•-</sup> отделено от процессов внутри триады триптофанов, поскольку его протонирование и переход в форму ФАДН<sup>•</sup> задержано во времени на 6–7 порядков по отношению к изначальному переносу электрона. Однако такое отчетливое разделение двух процессов представляется удивительным, если учесть, что донор протона Асп396 находится в непосредственной близости к флавину. Объяснение этого



**Рис. 4.** Схема фотоцикла ФАД-хромофора в криптохромах растений с последовательными его превращениями в три редокс-формы. Цикл завершается окислением ФАДН<sup>·</sup> молекулярным кислородом в исходную форму ФАД. На первой стадии окисления интермедиатом может быть радикальная пара [ФАДН<sup>·</sup> + O<sub>2</sub><sup>·-</sup>]. На второй стадии в радикальной паре супероксид O<sub>2</sub><sup>·-</sup> заменен на свою протонированную форму НО<sub>2</sub><sup>·</sup>, с которой он находится в равновесии и которая окисляет ФАДН<sup>·</sup> в ФАД с выходом Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (Muller, Ahmad, 2011); *hν*-1 – фотон синего света (450 нм), *hν*-2 – фотон длинноволнового видимого света в области 500–650 нм.

противоречия может состоять в том, что для переноса протона аспарагиновой кислоте требуется предварительная структурная реорганизация, так как Асп396 формирует водородную связь с атомом кислорода белковой структуры (Thoing *et al.*, 2015).

Интересно, что Асп396 сохранен только у криптохромов растений, тогда как у криптохрома дрозофилы dCRY он замещен остатком цистеина. Вероятно, этим объясняется отсутствие сопряженного с переносом электрона протонирования при фотовосстановлении ФАД у dCRY и образование только анион-радикала ФАД<sup>·-</sup>. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, согласно которым замена Асп396 на цистеин в РНР-домеине СРН1 полностью блокирует перенос протона (Thoing *et al.*, 2015).

Важное следствие реакции протонирования – стабилизация радикала флавина в состоянии ФАДН<sup>·</sup> и продление его времени жизни до нескольких миллисекунд *in vitro* и нескольких минут *in vivo* (Herbel *et al.*, 2013; Hense *et al.*, 2015). Как отмечено выше, в отличие от всех других редокс-форм флавина, имеющих поглощение только в синей области, ФАДН<sup>·</sup> поглощает в зеленой и красной области (500–650 нм). Это свойство ФАДН<sup>·</sup> способствовало установлению его роли как сигнальной формы флавинового хромофора у криптохромов растений. Было показано, что добавление зеленого света подавляет контролируемый криптохромом физиологический ответ на синий свет. Антагонистическое действие зеленого света по отношению к синему свету коррелировало с уменьшением концентрации ФАДН<sup>·</sup> в результате его фотовосстановления в неактивную форму ФАДН<sup>-</sup>. Последующая реакция ФАДН<sup>-</sup> с кислородом приводит к регенерации исходного окисленного состояния ФАД (Ahmad, 2016). Фотоцикл ФАД, включающий последовательные его редокс превращения в криптохромах растений,

можно представить в виде схемы, приведенной на рис. 4.

Как уже было отмечено, сигнальная активность криптохромов обеспечивается их ССЕ-доменом, тогда как РНР-домен осуществляет регулируемый светом контроль над функцией ССЕ. После фотоактивации ССЕ высвобождается и может затем взаимодействовать с компонентами сигнальных путей криптохрома. Однако до недавнего времени вопрос о том, как высвобождение ССЕ связано с фотохимией криптохрома, оставался невыясненным.

В исследовании с применением ИК-спектроскопии временного разрешения обнаружено, что после формирования сигнальной формы ФАДН<sup>·</sup>, в *N*-концевом α/β-субдомеине РНР СРН1 в течение 500 микросекунд происходит заметное изменение структуры β-листа. На основании полученных результатов выдвинуто предположение о ключевой роли β-листа во взаимодействии РНР и ССЕ, а также роли его деструктуризации в сигнальном процессе (Thoing *et al.*, 2015). Интересно, что у CRY1 переход ССЕ в неупорядоченное состояние происходит за время 100 миллисекунд после формирования ФАДН<sup>·</sup>, т.е. намного позже. В предложенной на основе этих данных модели показано, как структурные изменения согласуются во времени с фотохимией флавинового хромофора у криптохромов растений.

#### *Структурные аспекты фотоолигомеризации криптохромов и их взаимодействия с сигнальными белками*

Как следует из рассмотренных выше данных, криптохромы с фотовосстановленным ФАД подвергаются конформационным изменениям, приводящим к разобщению РНР- и ССЕ-доменов. В последнее время показано, что этот процесс может вызывать изменения во взаимодействии между молекулами криптохромов, сопровождаемые

их олигомеризацией. Фотоолигомеризация требуется для функциональной активности криптохромов растений, так как обеспечивает повышение их сродства к другим белкам (Yang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020). К известным в настоящее время 30 белкам, взаимодействующим с криптохромами, относятся, например, транскрипционные факторы CRY-interacting basing helix-loop-helix – bHLHs (CIBs), комплекс репрессоров фотоморфогенеза constitutive photomorphogenic1 (COP1)/supressors of phytochrome A (SPAs) и ингибиторы криптохромов (blue-light inhibitors of CRYs, BICs). В результате взаимодействия в комплексе гомоолигомера криптохрома с белками изменяется их сигнальная активность, что приводит к изменению экспрессии генов и регуляции программ развития растений (Wang, Lin, 2020b).

**Комплексы CRY–CIB.** Фотоактивированный CRY2 при взаимодействии с CIB1 опосредует регуляцию им транскрипции гена *flowering locus T (FT)*, кодирующего центральный регулятор инициации цветения. При этом CRY2 не изменяет сродство CIB1-белка к ДНК или хроматину (Liu *et al.*, 2008). Однако, как недавно показано, CIB1 напрямую взаимодействует с другим транскрипционным фактором – CONSTANS (CO), и это вызывает активацию транскрипции гена *FT* (Liu *et al.*, 2018). На основании установленного факта предполагается, что CRY2 может опосредованно регулировать *FT*-транскрипцию путем изменения CIB1–CO-взаимодействия. Точный механизм, лежащий в основе CRY2-индуцированной активации белка CIB1 или его комплекса с белком CO, пока неизвестен.

**Взаимодействие криптохромов с COP1–SPA-комплексами.** Ключевой репрессор фотоморфогенеза растений сигнальный белок COP1 действует в комплексе с белками SPA (SPA1–SPA4). Этот тетрамерный комплекс из двух COP1- и двух SPA-белков выполняет функцию E3 убиквитин лигазы, связанную с убиквитинизацией и протеасомной деградацией различных белков – компонентов сигнальных путей фоторецепторов (Ноеcker, 2017). Взаимодействие фотоактивированных криптохромов с белком SPA1 в комплексе CRY–COP1–SPA1 и подавление ими COP1–SPA1-лигазной активности обеспечивает стабилизацию транскрипционных факторов, таких как long hypocotyl 5 (HY5) и CO (Lian *et al.*, 2011). Один из предложенных механизмов инактивации криптохромом COP1–SPA1 заключается в диссоциации взаимодействия между этими белками.

Интересно, что CRY1 и CRY2 взаимодействуют с белком SPA1 разными структурными элементами. У CRY2 PHR-домен взаимодействует с киназным доменом SPA1 в ответ на синий свет, и это инициирует усиление CRY2–COP1-взаимодействия (Zuo *et al.*, 2011). Вопрос о том, как кон-

кретно взаимодействие CRY2 с белком SPA1 в комплексе COP1–SPA1 ингибирует убиквитинлигазную активность, остается пока нерешенным. В противоположность этому, у CRY1 CSE-домен взаимодействует с WD-40-доменом белка SPA1 в ответ на синий свет, и это приводит к подавлению взаимодействия COP1–SPA1 и, соответственно, к ингибированию лигазной активности (Lian *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Таким образом, CRY1 действует, очевидно, как светозависимый конкурентный ингибитор взаимодействия в комплексе COP1–SPA1 и его E3-лигазной активности.

Хотя о деталях сложных взаимодействий в тройном комплексе CRY–COP1–SPA1 пока известно мало, представляется очевидным, что криптохромы могут напрямую взаимодействовать с COP1 (возможно, независимо от света), тогда как их взаимодействие с белком SPA1 – процесс светозависимый. Необходимо, однако, отметить, что в растительных клетках определено светозависимое формирование комплекса CRY1–COP1 (Holtkotte *et al.*, 2017), объясняемое светозависимым CRY1–SPA1-взаимодействием *in vivo*. При взаимодействии CRY–SPA световой сигнал трансформируется в изменение тройного комплекса CRY–SPA–COP1, сопровождаемое подавлением убиквитин-лигазной активности, что лежит в основе регуляции стабильности сигнальных белков и экспрессии генов.

**Фотоолигомеризация криптохромов.** Как уже отмечалось, для функциональной активности криптохромных белков требуется их фотоолигомеризация. Однако ключевые детали структурных основ этого процесса не были точно определены. Особенно это касается структурных изменений в гомодимере криптохрома, на основании которых можно было бы его отличить от структуры мономера.

Для решения этого вопроса проведено генетическое изучение связи структуры и функции у криптохромов растений (Gao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Показано, что мутации остатков триптофана Три-триады у CRY1 или CRY2 блокируют каскад переноса электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, но не влияют на их физиологическую активность *in vivo*. Мутант Три374аланин (Ала) у CRY2 проявляет конститутивную, т.е. не зависящую от света, физиологическую активность. Используя преимущество этого мутанта, недавно определены структуры гомоолигомеров криптохромов. В отличие от дикого типа CRY2, который подвергается фотоолигомеризации, мутант Три374Ала CRY2 проявляет гомоолигомеризацию *in vitro*. Этот результат согласуется с данными о том, что фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRY2 и что мутант Три374Ала CRY2 конститутивно активен *in vivo* (Wang, Lin, 2020a).

Методом низкотемпературной электронной микроскопии с визуализацией выявлены конфигурации гомодимера и гомотетрамера мутанта Три374Ала CRY2, у которого эти олигомеры формируются посредством взаимодействий поверхностями PHR-доменов. Мутации в интерфейсе CRY2 приводили к уменьшению сродства гомодимера к сигнальному белку CIB1. На основании этого факта предположено, что CIB1 взаимодействует с CRY2 в интерфейсе гомодимера, и, вероятно, поэтому именно олигомеры, а не мономеры являются активными формами криптохромов (Shao *et al.*, 2020). Отметим, что большинство остатков, находящихся в одном из двух интерфейсов CRY-тетрамера, являются консервативными у криптохромов растений, но не у криптохромов животных. В этой связи было бы интересно определить, требуется ли гомоолигомеризация для функционирования данной группы криптохромов, которые могли развить иные структуры интерфейсов, или зависимый от димеризации механизм фотоактивации криптохромов растений уникален.

**Комплексы CRY–VIC и инактивация криптохромов.** Активированные светом криптохромы растений могут подвергаться инактивации путем спонтанной темновой реверсии гомоолигомеров в мономеры, взаимодействия с ингибиторами (VICs) и убиквитин-зависимого протеолиза. Среди этих механизмов только ингибирование криптохромов, вызываемое VICs, является светочувствительным процессом. Это предполагает, что взаимодействие CRY–VIC может играть более динамичную роль в регуляции активности криптохромов у растений, растущих на свету (Wang *et al.*, 2016).

Недавно проведенный анализ кристаллической структуры комплекса PHR CRY2 с VIC2 выявил два возможных механизма, проясняющих вопрос о том, как белки VIC могут инактивировать криптохромы растений (Ma *et al.*, 2020). Во-первых, VIC может ингибировать фотовосстановление ФАД. Порядка десяти остатков CRY2 находятся в непосредственной близости от ФАД. Связывание VIC2 с PHR CRY2 увеличивает расстояние между донором электрона (Три397) и акцептором (изоаллоказиновое кольцо ФАД) на 1 ангстрем, что может затруднить перенос электрона. Кроме того, такое связывание может привести к вращению карбоксильной боковой цепи предполагаемого донора протона (Асп393) на 50°, что увеличит расстояние между донором протона и акцептором протона в хромофоре на 5 ангстрем. Такое изменение делает протонирование практически невозможным. Соответственно, VIC2 может блокировать фотовосстановление ФАД в ФАД<sup>•-</sup> и его протонирование в сигнальную форму ФАДН<sup>•</sup>.

Во-вторых, VICs могут действовать как конкурентные ингибиторы гомоолигомеризации CRY2.

В комплексе PHR CRY2 с VIC2 фрагмент VIC2 проявляет структуру, определяющую его способность опоясывать паз между двумя субдоменами PHR-домена CRY2. PHR CRY2 и VIC2 имеют по 16 остатков, которые вовлекаются в формирование комплексов между ними. Индивидуальные мутации нескольких остатков в интерфейсе комплекса снижали выраженное сродство между PHR CRY2 и VIC2 *in vitro*. Интерфейсы гетеродимера CRY–VIC и гомодимера CRY–CRY содержат два остатка CRY2 – Три349 и аргинин (Арг208). В гетеродимере остаток Три349 гидрофобно взаимодействует с изолейцином (Иле57) VIC2, тогда как Арг208 формирует солевой мостик и водородную связь с глутамином (Глу50) VIC2. В гомодимере CRY2–CRY2 Три349 и Арг208 находятся в интерфейсе. Эти данные убеждают, что связывание VICs с CRYs конкурентно ингибирует фотоолигомеризацию CRY, блокируя тем самым его фотоактивацию (Wang, Lin, 2020a).

В соответствии с рассмотренными выше данными можно констатировать, что познание первичных механизмов восприятия света криптохромами растений и их перехода в фотоактивированное состояние значительно возросло за последние несколько лет. Достигнуты успехи и в изучении структурных основ трансдукции сигнала криптохромами. Они связаны главным образом с идентификацией и исследованием белков, взаимодействующих с фотоолигомерами криптохромных молекул. В результате таких взаимодействий изменяется активность сигнальных белков, что приводит к регуляции экспрессии генов и фотобиологическим ответам. Внимания заслуживают результаты исследования криптохромных фоторецепторов, выявленных у зеленой водоросли *C. reinhardtii* (CPH1, CraCRY). Эти фоторецепторы охарактеризованы в отношении структуры и функций; у них детально изучены фотоциклы флавиновых хромофоров, которые отличаются из-за природы и числа ароматических остатков и других аминокислот, участвующих в каскаде переноса электрона/протона при фотовосстановлении флавина (Petersen *et al.*, 2021). У криптохромов растений поглощение света хромофором инициирует перенос электрона к флавину через триаду триптофанов. У криптохрома CraCRY этот электронно-транспортный путь включает четвертый ароматический остаток – тирозин.

Несмотря на то, что механизм фотовосстановления ФАД детально изучен *in vitro*, вопрос о том, как конкретно перенос электрона к ФАД вовлекается в фотоактивацию криптохромов, остается нерешенным. Показано, что мутации остатков Три-триады у CRY1/CRY2, которые блокируют перенос электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, не влияют на их биохимическую и физиологическую активность *in vivo* (Gao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Иными словами, зависимое от Три-

триады фотовосстановление ФАД не требуется для функционирования криптохромов. Очевидно, для раскрытия механизма фотоактивации криптохромных белков необходимо дальнейшее исследование альтернативного пути переноса электрона с применением новых и инновационных подходов.

Другой вопрос, связанный с фотоциклом ФАД, относится к магниточувствительной функции криптохромов. Принято считать, что в основе магниточувствительности криптохромных белков лежит формирование радикальных пар, на которые могут влиять слабые магнитные поля (Hore, Mouritsen, 2016). Следствием этого может быть изменение химических констант скоростей редокс-реакций ФАД, создающее отличие в концентрации активированного состояния фоторецептора и, соответственно, измененную биологическую активность. Однако природа магниточувствительных радикальных пар и стадии, на которых они действуют в течение редокс-цикла криптохромов, пока точно не определены и являются предметом дискуссий. На основании большого числа экспериментальных и теоретических работ предложены две альтернативные модели формирования разных радикальных пар, определяющих магниточувствительность криптохромов.

Согласно модели 1, радикальная пара [ФАД<sup>•-</sup> Три<sup>•+</sup>] образуется путем иницирующей реакции переноса электрона к фотовозбужденному ФАД от остатка триптофана, включенного в триаду (тетраду) триптофанов. Эта радикальная пара подвергается магниточувствительной интерконверсии между синглетным состоянием и триплетным:  $^1[\text{ФАД}^{\bullet-} \text{Три}^{\bullet+}] \leftrightarrow ^3[\text{ФАД}^{\bullet-} \text{Три}^{\bullet+}]$ . При протонировании ФАД<sup>•-</sup> может переходить в форму ФАДН<sup>•</sup> и после фотовосстановления – в неактивную форму ФАДН<sup>-</sup> (Zoltowski *et al.*, 2019).

Темновое реокисление ФАДН<sup>-</sup> в реакции с кислородом принято за основу в модели 2, предполагающей, что интермедиатом в этом процессе может быть радикальная пара [ФАДН<sup>•</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup>]. Она также может подвергаться магниточувствительному взаимопревращению между синглетным состоянием и триплетным; при этом синглетное состояние переходит в исходную форму ФАД после высвобождения перекиси водорода, как показано на приведенной выше схеме редокс фотоцикла ФАД-хромософа (рис. 4).

В недавнем исследовании получено частичное подтверждение такого механизма (Roos *et al.*, 2019). Показано, что ответы CRY1 на свет *in vivo* усиливаются в магнитном поле, причем даже в случае его воздействия во время темновых интервалов между освещением. Поэтому считается, что магниточувствительная реакция в фотоцикле криптохрома происходит на стадии реокисления

ФАДН<sup>-</sup> и может вовлекать активные формы кислорода (АФК). Однако конкретная природа АФК пока не определена. Кроме того, в соответствии с данными теоретического анализа радикальная пара флавин/супероксид кислорода вряд ли может быть магниточувствительным интермедиатом у криптохромов из-за очень быстрой релаксации спина супероксида. Очевидно, для идентификации магниточувствительных интермедиатов требуются дальнейшие теоретические и экспериментальные исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ (121032500058-7).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вечтомова Ю.Л., Телегина Т.А., Крицкий М.С. Эволюция белков семейства ДНК-фотолиаз/криптохромов // *Успехи биол. химии*. 2020. Т. 85. С. 277–316.
- Фрайкин Г.Я. Белковые сенсоры света: фотовозбужденные состояния, сигнальные свойства и применение в оптогенетике. М.: АР-Консалт, 2018. 87 с.
- Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Рубин А.Б. Биологические фоторецепторы светозависимых регуляторных процессов // *Биохимия*. 2013. Т. 78. С. 1576–1594.
- Ahmad M. Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016. V. 33. P. 108–115.
- Chaves I., Pokorny R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L.O., van der Horst G.T., Batschauer A., Ahmad M. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. V. 62. P. 335–364.
- Chen Z., Li M., Liu S., Chen X., Zhang W., Zhu Q., Kohnen M.V., Wang Q. The function and photoregulatory mechanisms of cryptochromes from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) // *Front. Plant Sci.* 2022. V.3. 866057.
- Dasgupta A., Fuller K.K., Dunlap J.C., Loros J.J. Seeing the world differently: variability in the photosensory mechanisms of the model fungi // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. P. 15–20.
- Franz S., Ignatz E., Wenzel S., Zielosko H., Putu E., Maestre-Reyna M., Tsai M.-D., Yamamoto J., Mittag M., Essen L.-O. Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii* // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 8010–8022.
- Gao J., Wang X., Zhang M., Bian M., Deng W., Zuo Z., Yang Z., Zhong D., Lin C. Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of Arabidopsis CRY1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 9135–9140.
- Goett-Zink L., Kottke T. Plant cryptochromes illuminated: a spectroscopic perspective on the mechanism // *Front. Chem.* 2021. V. 9: 780199.
- Hense A., Herman E., Oldemeyer S., Kottke T. Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 1743–1751.

- Herbel V., Orth C., Wenzel R., Ahmad M., Bittl R., Batschauer A.* Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states *in vivo* // *Plant J.* 2013. V. 74. P. 583–592.
- Hoecker U.* The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017. V. 37. P. 63–69.
- Holtkotte X., Ponnu J., Ahmad M., Hoecker U.* The blue light-induced interaction of cryptochrome 1 with COP1 requires SPA proteins during Arabidopsis light signaling // *PLOS Genet.* 2017. V. 13: e1007044.
- Hore P.J., Mouritsen H.* The radical-pair mechanisms of magnetoreception // *Annu. Rev. Biophys.* 2016. V. 4. P. 299–344.
- Konig S., Juhas M., Jager S., Kottke T., Buchel C.* The cryptochrome-photolyase protein family in diatoms // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 217. P. 15–19.
- Kottke T., Oldemeyer S., Wenzel S., Zou Y., Mittag M.* Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 217. P. 4–14.
- Lacombat F., Espagne A., Dozova N., Plaza P., Muller P., Brettel K., Franz-Badur S., Essen L.-O.* Ultrafast oxidation of a tyrosine by proton-coupled electron transfer promotes light activation of an animal-like cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. P. 13394–13409.
- Lian H.L., He S.B., Zhang Y.C., Zhu D.M., Zhang J.Y., Jia K.P., San S.X., Li L., Yang H.Q.* Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 1023–1028.
- Liu B., Zuo Z., Liu H., Liu X., Lin C.* Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 1029–1034.
- Liu H., Su T., He W., Wang G., Lin C.* The universally conserved residues are not universally required for stable protein expression or functions of cryptochromes // *Mol. Biol. Evol.* 2019. V. 37. P. 327–340.
- Liu H., Yu X., Li K., Klejnot J., Yang H., Lisiero D., Lin C.* Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis // *Science.* 2008. V. 322. P. 1535–1539.
- Liu Q., Su T., He W., Ren H., Liu S., Chen Y., Gao L., Hu X., Lu H., Cao S., Huang Y., Wang X., Wang Q., Lin C.* Photooligomerization determines photosensitivity and photoreactivity of plant cryptochromes // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 398–413.
- Liu Y., Li X., Ma D., Chen Z., Wang J.W., Liu H.* CIB and CO interact to mediate CRY2-dependent regulation of flowering // *EMBO Rep.* 2018. 19: e45762.
- Losi A., Gartner W.* The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. V. 63. P. 49–72.
- Ma L., Wang X., Guan Z., Wang L., Wang Y., Zheng L., Gong Z., Shen C., Wang J., Zhang D., Liu Z., Yin P.* Structural insight into BIC-mediated inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. P. 472–479.
- Michael A.K., Fribourgh J.L., Van Gelder R.N., Partch C.L.* Animal cryptochromes: divergent roles in light perception, circadian timekeeping and beyond // *Photochem. Photobiol.* 2017. V. 93. P. 128–140.
- Muller P., Ahmad M.* Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 21033–21040.
- Oldemeyer S., Franz S., Wenzel S., Essen L.-O., Mittag M., Kottke T.* Essential role of an unusual long-lived tyrosyl radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome aCRY // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 14062–14071.
- Oldemeyer S., Haddad A.Z., Fleming G.R.* Interconnection of the antenna pigment 8-HDF and flavin facilitates red-light reception in bifunctional animal-like cryptochrome // *Biochemistry.* 2020. V. 59. P. 594–604.
- Ozturk N.* Phylogenetic and functional classification of the photolyase/cryptochrome family // *Photochem. Photobiol.* 2017. V. 93. P. 104–111.
- Paulus B., Bajzath C., Melin F., Heidinger L., Kromm V., Herkersdorf C., Benz U., Mann L., Stehle P., Hellwig P., Weber S., Schleicher E.* Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states // *FEBS J.* 2015. V. 282. P. 3175–3189.
- Petersen J., Rredhi A., Szyttenholm J., Oldemeyer S., Kottke T., Mittag M.* The world of algae reveals a broad variety of cryptochrome properties and functions // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 748760.
- Pooam M., Arthaut L.-D., Burdick D., Link J., Martino C.F., Ahmad M.* Magnetic sensitivity mediated by the Arabidopsis blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark // *Planta.* 2019. V. 249. P. 319–332.
- Schwinn K., Ferre N., Huix-Rotllant M.* UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. V. 22. P. 12447–12455.
- Sellaro R., Crepy M., Trupkin S.A., Karayakov E., Buchovsky A.S., Rossi C., Casal J.J.* Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. P. 401–409.
- Shao K., Zhang X., Li X., Hao Y., Huang X., Ma M., Zhang M., Yu F., Liu H., Zhang P.* The oligomeric structures of plant cryptochromes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. P. 480–488.
- Thoing C., Oldemeyer S., Kottke T.* Microsecond deprotonation of aspartic acid and response of the  $\alpha/\beta$  subdomain precede C-terminal signaling in the blue light sensor plant cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. P. 5990–5999.
- Wang Q., Lin C.* A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020a. V. 27. P. 401–403.
- Wang Q., Lin C.* Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2020b. V. 71. P. 103–129.
- Wang Q., Zuo Z., Wang X., Gu L., Koshizumi T., Yang Z., Yang L., Liu Q., Liu W., Han Y.J., Kim J.I., Liu B., Wohlschlegel J.A., Matsui M., Oka Y., Lin C.* Photoactivation and inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2 // *Science.* 2016. V. 354. P. 343–347.

- Wang Q., Zuo Z., Wang X., Liu Q., Gu L., Oka Y., Lin C. Beyond the photocycle – how cryptochromes regulate photoresponses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. V. 45. P. 120–126.
- Yang Z., Liu B., Su J., Liao J., Lin C., Oka Y. Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants // *Photochem. Photobiol.* 2017. V. 93. P. 112–127.
- Zhang M., Wang L., Zhong D. Photolyase: dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair // *Arch. Biochem. Biophys.* 2017. V. 632. P. 158–174.
- Zoltowski B.D., Chelliah Y., Wickramaratne A., Jarecha L., Karki N., Xu W., Mouritsen H., Hore P.J., Hibbs R.E., Green C.B., Takahashi J.S. Chemical and structural analysis of a photoactive vertebrate cryptochrome from pigeon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 19449–19457.
- Zoltowski B.D. Resolving cryptic aspects of cryptochrome signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 8811–8812.
- Zuo Z., Liu H., Liu B., Liu X., Lin C. Blue light dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COPI activity and floral initiation in Arabidopsis // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. P. 841–847.

## Photochemistry and Signaling Activities of Plant Cryptochromes. Review

G. Ya. Fraikin<sup>1</sup> and N. S. Belenikina<sup>1, #</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: nata.belenikina@ya.ru*

Cryptochromes compose the widespread class of blue-light sensory receptors that in plants regulate processes of development and circadian rhythm. These photoreceptors can also function as magnetoreceptors. Cryptochrome proteins bind flavin adenine dinucleotide (FAD) as a chromophore in the photolyase homology region (PHR) domain and contain the C-terminal extension (CCE) which is joined to PHR near the FAD-binding site. The cryptochrome activation is initiated by photochemical FAD conversions involving electron/proton transfer and the formation of redox forms. In plants, cryptochrome protein with photoreduced FAD undergoes conformational changes causing disengagement of the PHR domain and CCE that is accompanied by the formation of functionally active oligomers of cryptochrome molecules. Photooligomerization is considered as a key process necessary for cryptochrome signaling activity.

**Keywords:** cryptochromes, photoreceptors, FAD chromophore, photocycle, photoactivation, signaling properties

## МНОЖЕСТВЕННЫЙ ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ У МЫШОВОК ГРУППЫ *subtilis* (Rodentia, Dipodoidea, *Sicista* sp.) ИЗ САРАТОВСКОГО ПРАВОБЕРЕЖЬЯ

© 2023 г. М. И. Баскевич\*, @, М. Л. Опарин\*

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

@E-mail: mbaskevich@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

На основе цитогенетического анализа (рутинная, G-, C- и AgNOR окраски хромосом) приведены новые данные по хромосомному полиморфизму в выборке ( $n = 13$ ) из популяции *Sicista* sp. 1, вида-двойника мышовок группы *subtilis* из Саратовского Правобережья. Показано, что в исследованной полиморфной популяции из северной части ареала вида (Воскресенский р-н Саратовской обл.) число хромосом в кариотипах варьирует от  $2n = 22$  до  $2n = 24$ , число плеч аутосом от  $NFa = 39$  до  $NFa = 44$ ; всего обнаружено 6 вариантов кариотипа: с  $2n = 24$ ,  $NFa = 44$ ;  $2n = 24$ ,  $NFa = 43$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 40$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 41$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 39$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 40$ . С помощью G-окраски хромосом показано, что обнаруженный внутривидовой хромосомный полиморфизм у *Sicista* sp. 1 обусловлен наличием двух типов перестроек: тандемная транслокация, вовлекающая двуплечие аутосомы №№ 4 и 10 и перичентрическая инверсия в паре аутосом № 6. Выявлено устойчивое преимущество гетерозигот по обоим структурным хромосомным мутациям, а обнаруженный хромосомный полиморфизм характеризуется как сбалансированный или гетерозиготный. Обсуждается потенциальная роль выявленного хромосомного полиморфизма в хромосомной эволюции и адаптивной стратегии вида.

**Ключевые слова:** видообразование, кариотип, изменчивость, хромосомные перестройки, популяция, *Sicista*, млекопитающие

DOI: 10.31857/S1026347022700020, EDN: GZXQLR

Принято считать, что у млекопитающих кариотип является видовым признаком (Воронцов, 1958; Matthey, 1970; Орлов, 1974). Однако по мере накопления данных по кариологии этого класса позвоночных животных, стало очевидным, что это утверждение небесспорно. Так, к середине 1980-х гг., было известно о 4% кариологически полиморфных видов среди 1500 изученных (Тимофеев-Ресовский и др., 1977), а позднее к концу 1990-х гг. уже у 150 видов среди более чем 2100 кариологически исследованных видов млекопитающих был выявлен хромосомный полиморфизм, что составило величину порядка 7% (Раджабли, Графодатский, 1977; Орлов, Булатова, 1983; Иваницкая, 1990). В дальнейшем, главным образом, за счет представителей отряда Rodentia, число известных кариологически полиморфных видов млекопитающих возросло, а представления о степени хромосомной изменчивости у ранее изученных видов дополнены новыми сведениями (Ахвердян и др., 1999; Анискин и др., 2003; Huang *et al.*, 2006; Kartavtseva *et al.*, 2008; Баскевич и др., 2008; Romanenko *et al.*, 2019; Galindo *et al.*, 2021; Картавцева и др.,

2021; и др.). При этом у большинства кариологически полиморфных видов был выявлен и продолжает активно изучаться определенный тип хромосомных перестроек. Например, для обыкновенной буроzubки *Sorex araneus* характерен распространенный по всему ареалу вида Робертсоновский (Rb) полиморфизм (Щипанов, Павлова, 2016 и др.), у слепушонки *Ellobius tancrei* хромосомная изменчивость также связана с Rb полиморфизмом (Ляпунова и др., 1990; Baklushinskaya, Lyapunova, 1995; и др.). А например, хромосомный полиморфизм у африканской многососковой крысы *Mastomys erythroleucus* (Dobigny *et al.*, 2010) или же в ряде популяций с Кавказа (Ахвердян и др., 1999) и Русской равнины (Баскевич и др., 2008) алтайской полевки *Microtus obscurus*, или в некоторых популяциях степной мышовки *Sicista subtilis* s. str. (Kovalskaya *et al.*, 2011) связан с перичентрическими инверсиями. Полиморфизм по редким тандемным транслокациям, как правило, не в гетерозиготном состоянии, отмечен в природных популяциях млекопитающих pp. *Stenomys*, *Taterillus*, *Sicista*, *Uroderma*, *Muntiacus*, *Mazama*

(см. Dobigny *et al.*, 2017; Galindo *et al.*, 2021). В целом, имеющаяся по внутривидовому хромосомному полиморфизму информация пока немногочисленна и противоречива (Орлов, Булатова, 1983; Иваницкая, 1990; Гилева, 1990; Zima, 2000; Dobigny *et al.*, 2017), и некоторые вопросы в изучении этого явления, поставленные в ряде аналитических обзоров (Иваницкая, 1990; Гилева, 1990; Баклушинская, 2016; Dobigny *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2017; Damas *et al.*, 2021), по-прежнему ждут решения. Так, до сих пор остается открытым вопрос, почему в группах близкородственных видов млекопитающих одни виды имеют полиморфные кариотипы, тогда как у других – хромосомные наборы характеризуются мономорфизмом; не ясно, связаны ли системы внутривидовой хромосомной изменчивости с видообразованием или же с адаптивной стратегией видов, а главное, каковы причины возникновения и поддержания внутривидового хромосомного полиморфизма в популяциях млекопитающих. В отношении ответа на последний вопрос существует несколько гипотез. Так, предполагается, что хромосомный полиморфизм в каждом конкретном случае обусловлен разными причинами и имеет свою историю. Высказывалась точка зрения о хромосомном полиморфизме как возможном пути симпатрического видообразования (Matthey, 1970). Предложенные позднее гипотезы: историческая (=филогенетическая), расселения (=преадаптивная), как правило, основывались на аллопатрическом формообразовании, и скорее, имели отношение к межпопуляционной хромосомной изменчивости, чем к внутривидовому хромосомному полиморфизму (Загороднюк, 1991). Предполагалось также адаптивное значение для тех хромосомных перестроек (например, изменчивость по числу добавочных хромосом), которые не играют существенной роли в становлении изолирующих механизмов, поддерживая генетическое разнообразие в популяциях (Волобуев, 1981; Борисов, 2008; и др.). Адаптивное значение хромосомного полиморфизма по перестройкам, затрагивающим изменение положения генов: в частности, перисентрические инверсии (ПИ)), доказанное, в частности, для двукрылых насекомых (Dobzhansky, 1948; Ayala *et al.*, 2017), постулируется и для млекопитающих (Орлов, 1974). Сложнее обстоит дело с хромосомными перестройками, затрагивающими изменение числа хромосом: Rb (Робертсоновские), TT (тандемные транслокации), а также по количественным изменениям в хромосомах (делеции – дубликации) (Орлов, 1974). Следует упомянуть, что адаптивность хромосомного полиморфизма рассматривается в рамках популяционно-генетической гипотезы и не противоречит таковой мутационной (Загороднюк, 1991). Что касается попыток получить уточняющие ответы на два других, выше упомянутых вопроса: о связи систем внутривидового

хромосомного полиморфизма с хромосомной эволюцией и предполагаемых причинах существования полиморфных и мономорфных видов в группах близко родственных видов, очевидно, что особый интерес в этой связи представляет анализ внутривидового хромосомного полиморфизма в достаточно хорошо изученных в плане хромосомной дифференциации и филогении группах млекопитающих. Примером такой группы могут служить обитатели степных и пустынных ландшафтов Северной Палеарктики *Sicista* группы *subtilis* (= *Sicista subtilis* s. l.).

В ходе цитогенетического изучения политипического вида *Sicista subtilis* s. l. (= мышовки группы *subtilis*), представленной, как было принято считать в общепринятых таксономических сводках (Павлинов, 2003; Holden, Musser, 2005) двумя кариологически дискретными видами: *S. subtilis* s. str. и *S. severtzovi*, было обнаружено, что вариабельность кариотипа только по числу и морфологии хромосом у мышовок группы *subtilis* в значительной степени превосходит таковую у других представителей рода: число хромосом в группе колеблется от  $2n = 16$  до  $2n = 26$ , а число плеч хромосом от  $NF = 28$  до  $NF = 48$  (Баскевич, 2016). Использование методов дифференциальной окраски хромосом для представителей группы до последнего времени носило фрагментарный характер, позволяя уточнять лишь механизм хромосомных перестроек в кариотипах некоторых форм (Анискин и др., 2003; Баскевич и др., 2010; 2011). Однако последние хромосомные исследования мышовок группы *subtilis* на территории юго-восточной части Русской равнины в бассейне Среднего Дона с привлечением сравнительной *G*-окраски хромосом и филогенетического анализа матрицы хромосомных данных привели к обнаружению пяти в значительной степени дивергировавших хромосомных форм мышовок группы *subtilis*: *S. subtilis* s. str. ( $2n = 24$ ,  $NF = 40-46$ ), *S. severtzovi* ( $2n = 26$ ,  $NF = 48$ ), *Sicista* sp. 1 ( $2n = 22-26$ ,  $NF = 41-46$ ), *Sicista* sp. 2 ( $2n = 16-22$ ,  $NF = 28-31$ ), *S. nordmanni* ( $2n = 26$ ,  $NF = 48$ ) (Kovalskaya *et al.*, 2011). Все обнаруженные на Среднем Дону хромосомные формы мышовок группы *subtilis* аллопатричны, за исключением *S. subtilis* s. str. и *Sicista* sp. 1, чьи ареалы перекрываются в Правобережье Волгоградской обл. при отсутствии гибридизации в зоне контакта (Kovalskaya *et al.*, 2011). Этими же исследователями было показано, что кариотипы (*G*-banding) обнаруженных на Среднем Дону, видов мышовок группы *subtilis* (в т. ч. предполагаемых) отличаются друг от друга 10-29 структурными перестройками: робертсоновскими транслокациями (Rb), перисентрическими инверсиями (ПИ) и в меньшей степени тандемными транслокациями (TT). Таксономическая ревизия, основанная, преимущественно, на сравнительной кариологии пока не завершена, и найдены ее некоторые противоречия с

молекулярными реконструкциями группы (Русин и др., 2015; Lebedev *et al.*, 2019). В любом случае, полученные авторами этой интересной цитогенетической работы данные по межвидовой хромосомной дифференциации у степных мышовок могут быть использованы в ходе анализа внутривидового хромосомного полиморфизма у представителей группы.

В задачу настоящего исследования входил анализ внутривидового хромосомного полиморфизма у представителя *Sicista* группы *subtilis* из Саратовского Правобережья, относящегося в соответствии с современными взглядами к *Sicista* sp. 1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проанализировано 13 особей мышовок группы *subtilis* (= *Sicista* sp. 1) из Правобережья Саратовской области, (7 км к северу от с. Славянка Воскресенского р-на), отловленных в 2006 ( $n = 2$ ), 2008 ( $n = 6$ ), 2009 ( $n = 1$ ) и 2011 ( $n = 4$ ) годах.

Препараты метафазных хромосом получали из клеток костного мозга по общепринятой методике воздушно-высушенных препаратов с предварительным колхицинированием живых зверьков (Ford, Hamerton, 1956). Для получения G-исчерченных хромосом использовали метод Сибрайта (Seabright, 1971). Структурный гетерохроматин выявляли с помощью метода C-окраски хромосом (Sumner, 1972), а ядрышкообразующие районы — с использованием одной из последних методик серебрения (Howell, Black, 1980).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цитогенетический анализ выборки *Sicista* sp. 1 показал наличие 6 вариантов кариотипа: с  $2n = 24$ ,  $NFa = 44$ ;  $2n = 24$ ,  $NFa = 43$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 39$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 40$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 40$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 41$ , различающиеся как числом хромосом, так и морфологией некоторых пар аутосом (табл. 1). При этом половые хромосомы во всех кариотипических вариантах были одинаковы: X-хромосома — мелкий акроцентрик, Y-хромосома — мельчайший акроцентрический элемент набора (рис. 1, рис. 2, табл. 1). В первом варианте ( $2n = 24$ ,  $NFa = 44$ ) все аутосомы (11 пар), за исключением половых хромосом, представлены убывающими по величине двуплечими (субмета-, метацентрическими) элементами (все пары аутосом пронумерованы; рис. 1а). Такой хромосомный набор обнаружен у одного самца (табл. 1). Второй вариант ( $2n = 24$ ,  $NFa = 43$ ) отличается от первого только гетероморфизмом аутосомной пары № 6: один гомолог которой представлен мета-, а второй акроцентрическим элементом (рис. 1б). Он был выявлен у одной самки (табл. 1). В третьем, отмеченном у одной самки, варианте ( $2n = 22$ ,  $NFa = 39$ ) (табл. 1), с гетероморфной 6-й парой аутосом, в кариотипе

появляется крупнейшая в наборе мета-субметацентрическая пара (ей дано буквенное обозначение: TT), предположительно, гомеологичная субметацентрикам пары № 4 и метацентрикам пары № 10 после их тандемного слияния, которые, естественно, отсутствуют на рутинно окрашенной кариограмме (рис. 1в). Отличие четвертого варианта ( $2n = 22$ ,  $NFa = 40$ ) от третьего связано с вариабельностью морфологии 6-й пары аутосом, представленной у последнего двумя метацентрическими элементами (рис. 1г). Такой кариотип обнаружен у трех 22-хромосомных самок (табл. 1). В пятом 23-хромосомном варианте ( $2n = 23$ ,  $NFa = 40$ ), среди аутосом выделяются три непарных элемента: самая крупная, превосходящая по своим размерам другие элементы набора, мета-субметацентрическая хромосома (буквенное обозначение: T), средней величины субметацентриком (№ 4) и несколько меньшей величины среднеразмерный мета-субметацентриком (№ 10). Остальные аутосомы представлены сериями из девяти, плавно убывающих по величине пар хромосом, среди которых лишь одна акроцентрическая пара (№ 6) (рис. 2а, 2б). Такой вариант кариотипа найден у одного самца и одной самки (табл. 1). Шестой вариант кариотипа ( $2n = 23$ ,  $NFa = 41$ ), сходен с предшествующим, за одним исключением: он обладает гетероморфной парой № 6, представленной акроцентриком и метацентриком. Этот хромосомный набор обнаружен у четырех самок и одного самца (табл. 1).

Дифференциальная окраска хромосом была выполнена только для 23-хромосомных особей *Sicista* sp. 1. Так, гетерохроматин был отмечен исключительно в не вовлеченных в перестройки хромосомах: в прицентромерных районах пары № 7 и X-хромосомы, а также в полностью гетерохроматичной Y-хромосоме (рис. 2б). Аналогичная картина прослеживается при AgNOR-окрашивании, в частности, в кариотипе 23-хромосомной самки ( $2n = 23$ ,  $NFa = 40$ ) ядрышкового организатора (ЯО) локализован в интеркалярных районах мета-субметацентрической пары № 5, также не вовлеченной в формирование обнаруженного нами внутривидового хромосомного полиморфизма (рис. 2в). G-окраска хромосом, как и следовало ожидать, позволила выявить гомеологию крупнейшего непарного субметацентрического элемента (T) непарным аутосомам №№ 4 и 10, что подтверждает роль тандемной транслокации в его возникновении. Также показано, что гетероморфизм пары № 6 (acrocentрик — двуплечий элемент), зафиксированный в хромосомном наборе 23-хромосомной самки, обусловлен перичцентрической инверсией (рис. 2г, 3).

Исследованная нами выборка уточняет северную границу распространения *Sicista* sp. 1, расширяя ареал этого кариологически полиморфного узко ареального вида от бассейна Среднего Дона до Саратовского Правобережья, представляюще-

**Таблица 1.** Структура кариологически изученной выборки *Sicista* sp. 1 из полиморфной популяции в Саратовском Правобережье

№ п/п	Полевой номер зверька	Пол	$2n$	$NFa$	Изменчивость морфологии пары № 6 (ПИ)	Тандемная транслокация пар №№ 4–10
1	06-59	Самец	23	40	А-А	Гетерозигота
2	06-65	Самка	23	41	А-М	Гетерозигота
3	07-22	Самка	23	41	А-М	Гетерозигота
4	07-23	Самец	23	41	А-М	Гетерозигота
5	07-24	Самка	22	39	А-М	Гомозигота
6	07-25	Самка	24	43	А-М	–
7	07-28	Самка	23	41	А-М	Гетерозигота
8	07-54	Самка	22	40	М-М	Гомозигота
9	09-1	Самец	24	44	М-М	–
10	11-1	Самка	22	40	М-М	Гомозигота
11	11-2	Самка	23	41	А-М	Гетерозигота
12	11-3	Самка	23	40	А-А	Гетерозигота
13	11-5	Самка	22	40	М-М	Гомозигота

Примечание.  $2n$  – диплоидное число хромосом,  $NFa$  – число плеч аутосом; А – акроцентрическая, М – метацентрическая хромосома. Первых две цифры полевого номера зверька означают год сбора материала: 06 – 2006, 07 – 2007, 09 – 2009, 11 – 2011 гг.

**Таблица 2.** Распространение и географическая изменчивость кариотипа у *Sicista* sp. 1

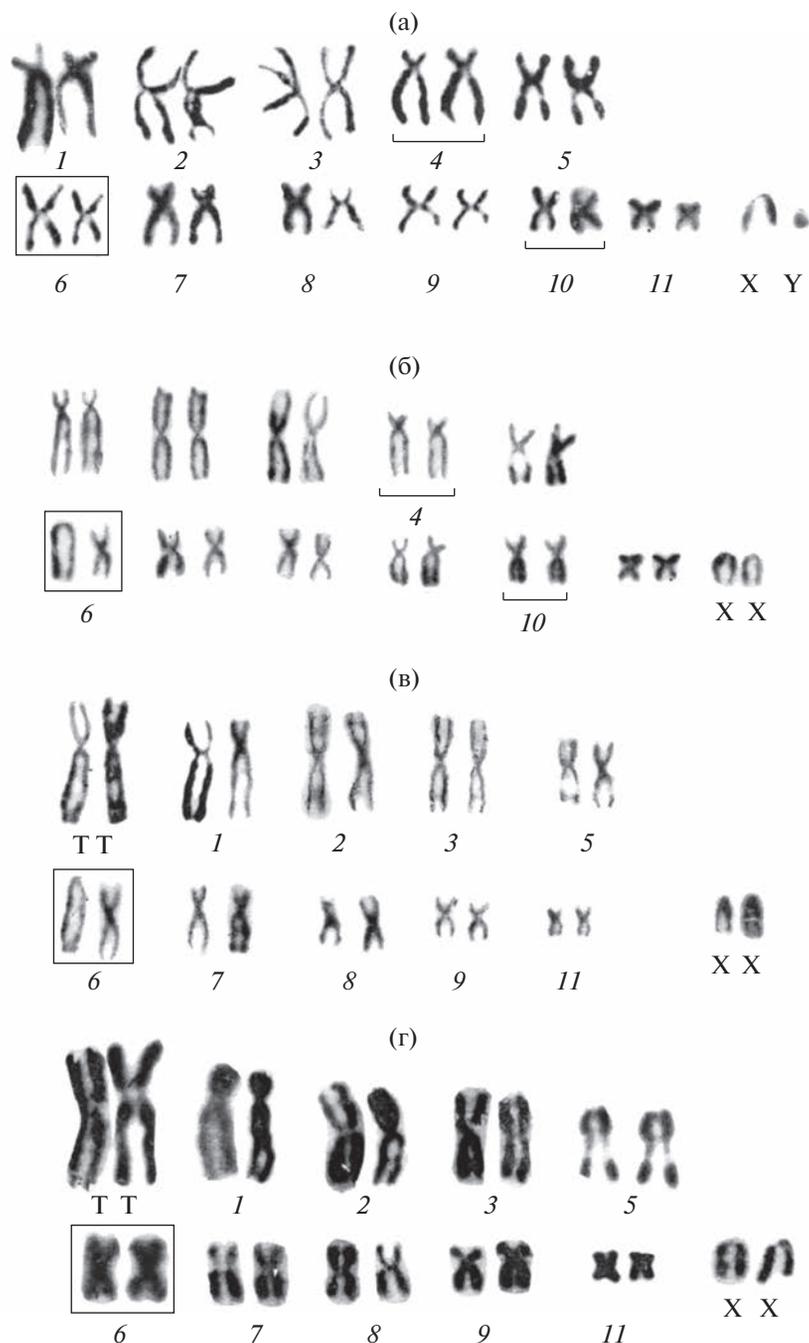
№ п/п	Место отлова	Географические координаты	Число экз.	$2n$	$NFa$	Источник
1	Саратовская обл. Правобережье р. Волга, (Воскресенский р-н), Славянка	51.84 N/46.25 E	13	22–24	39–44	Наши данные
2	Волгоградская обл. Левобережье р. Медведица	49.93N./43.20 E	1	22	39	Kovalskaya <i>et al.</i> , 2011
3	Арчединско-Донские пески. Север	49/65 N/42.72 E	1	23	42	»
4	Арчединско-Донские пески, Юг	49. 20 N/43.77 E	2	24	44	»
5	Окрестности с. Иловля. 10 км на Ю-В	49.25 N/44.12 E	1	24	44	»
6	Правобережье р. Медведица	49.65 N/42 62 E	3 1	26 25	44 42	» Анискин и др., 2003 Ковальская и др., 2000
7	Алексеевские Пески	50.20 N/42.30 E	1	26	44	Kovalskaya <i>et al.</i> , 2011

Примечание.  $2n$  – диплоидное число хромосом,  $NFa$  – число плеч аутосом. Нумерация в таблице соответствует номерам находок вида на рис. 4.

го собой периферическую часть области распространения вида (рис. 4, табл. 2).

Количественный анализ кариологически исследованной выборки *Sicista* sp. 1 показал, что среди 13 изученных экз. 7 особей гетерозиготны ( $2n = 23$ ), четыре – гомозиготны ( $2n = 22$ ) по тандемной транслокации (№№ 4–10), и две обладают

исходным 24-хромосомным кариотипом. Распределение связанных с ПИ пары №6 в исследованной нами выборке *Sicista* sp. 1 выглядит следующим образом: семь гетерозигот по варианту А-М, две гомозиготы по варианту А-А и четыре гомозиготы по варианту М-М (табл. 1, рис. 5, на котором соотношение разных хромосомных вариантов показано



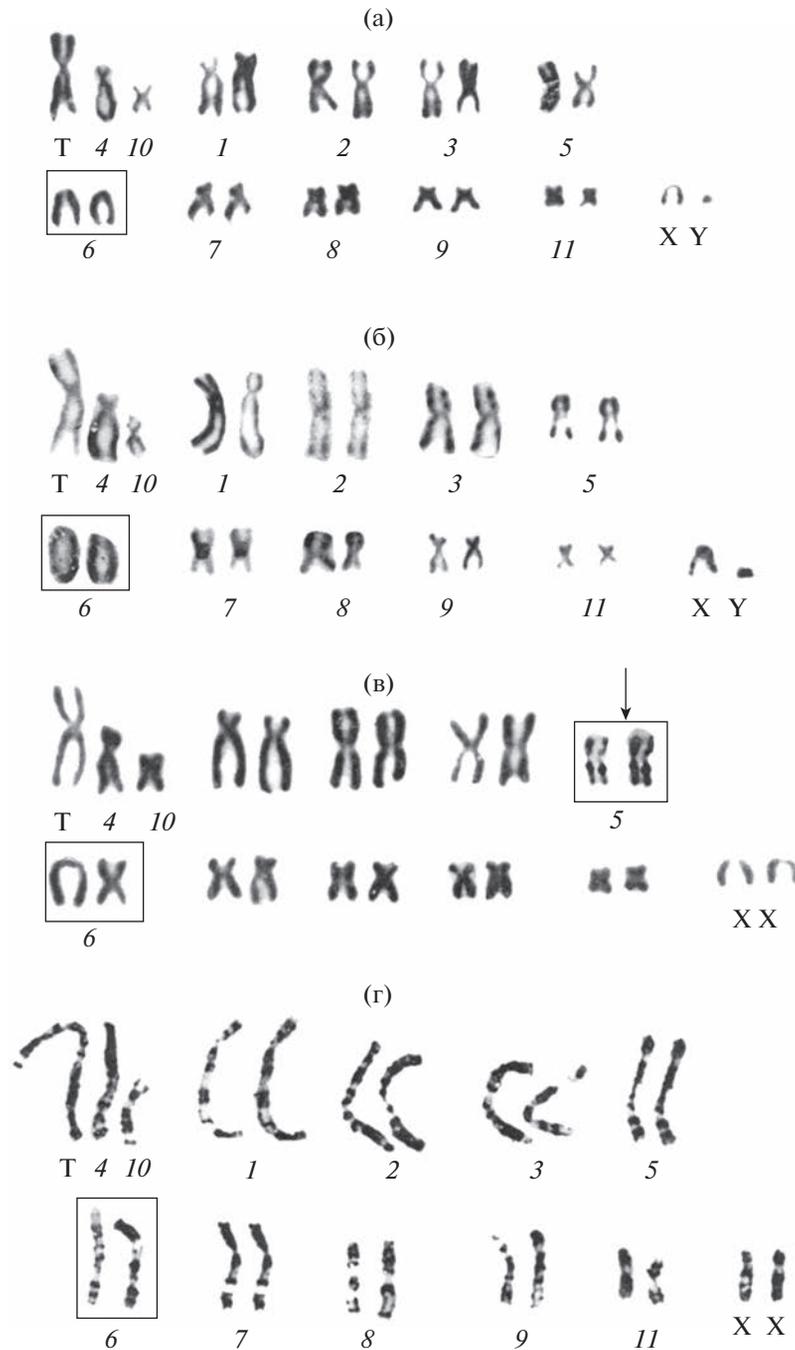
**Рис. 1.** Варианты рутинно окрашенных 24- и 22-хромосомных кариотипов в популяции *Sicista* sp. 1 из Саратовского Правобережья (окрестности пос. Славянка Воскресенского р-на): (а) – с  $2n = 24$ ,  $Nfa = 44$ , самец; (б) – с  $2n = 24$ ,  $Nfa = 43$ , самка; (в) – с  $2n = 22$ ,  $Nfa = 39$ , самка; (г) – с  $2n = 22$ ,  $Nfa = 40$ , самка.

в процентном отношении). В совокупной выборке отмечено преимущество гетерозигот по обеим структурным хромосомным мутациям (рис. 5).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внутрипопуляционный хромосомный полиморфизм в исследованной выборке *Sicista* sp. 1 из Саратовского Правобережья обусловлен наличием

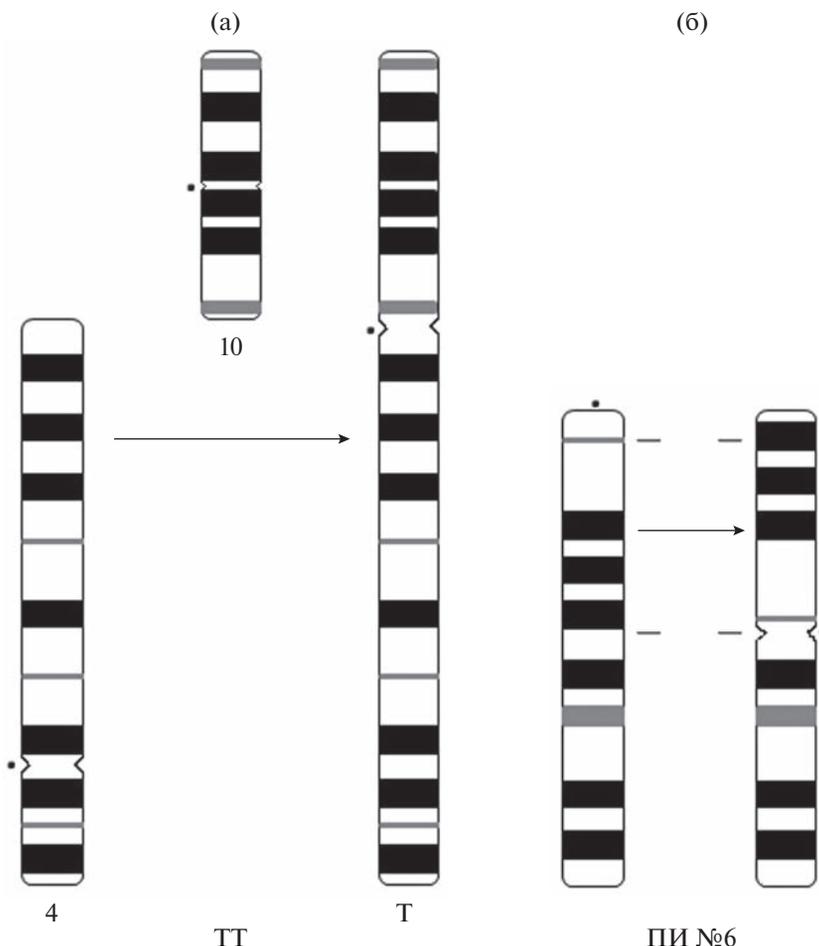
двух типов хромосомных перестроек: тандемная транслокация (ТТ) и перичентрическая инверсия (ПИ). С помощью G-окраски было показано, что перестройки затрагивают три, не маркируемые при C- и AgNOR окрасках, пары аутосом: это вовлекаемые в ТТ пары №№ 4 и 10 и изменяющая в результате ПИ свою морфологию пара № 6 (рис. 2, 3) (Баскевич и др., 2010; наши данные).



**Рис. 2.** Варианты 23-хромосомных кариотипов в популяции *Sicista* sp. 1 из Саратовского Правобережья (окрестности пос. Славянка Воскресенского р-на): (а) – с  $NFa = 40$ , самец, рутинная окраска хромосом; (б) – то же, C- banding; (в) –  $NFa = 41$ , самка, AgNOR-окраска хромосом; (г) – то же, G-banding. (Пронумерованы пары аутосом и две непарные аутосомы, крупнейшему в наборе субметацентрику дано буквенное обозначение).

Ранее у *Sicista* sp. 1. была выявлена географическая изменчивость кариотипа с вариабельностью числа хромосом в наборах от 22 до 26 (Kovalskaya *et al.*, 2011). При этом, 26-хромосомные особи были найдены в Алексеевских песках (№ 7 в табл. 2) и на правом берегу р. Медведица (№ 6 в табл. 2; здесь была найдена также одна 25-хромосомная

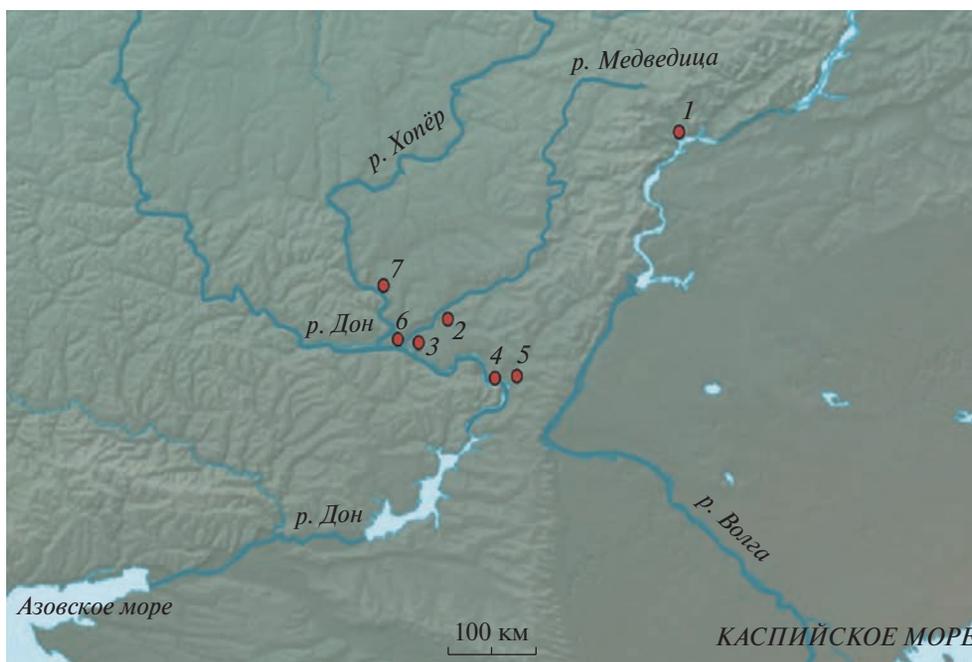
особь), 22-хромосомные – в левобережье Медведицы (№ 2 в табл. 2), 24-хромосомные – в окрестностях Иловли и в южной части Арчединско-Донских песков (соответственно №№ 5 и 4 в табл. 2), тогда как в их северной части (№ 3 в табл. 2) отмечены находки 23-хромосомных особей этого вида (Ковальская и др., 2000; Анискин и др., 2003; Koval-



**Рис. 3.** Схема хромосомных перестроек в популяции *Sicista* sp 1 из Саратовского Правобережья: (а) – тандемное слияние хромосом №№ 4 и 10; (б) – перичентрическая инверсия в хромосоме № 6. Точками отмечено положение центромера.

skaya *et al.*, 2011) (табл. 2, рис. 4). Использование методов дифференциальной окраски хромосом (*G*-banding) позволило уточнить механизмы географической изменчивости кариотипа у этого вида (Kovalskaya *et al.*, 2011). Было показано, что межпопуляционная изменчивость кариотипа у *Sicista* sp. 1 определяется тремя типами хромосомных перестроек: тандемное слияние (ТТ), Rb транслокация и перичентрическая инверсия (ПИ) при дефиците гетерозигот по хромосомным перестройкам (ТТ, ПИ) в совокупной выборке (Kovalskaya *et al.*, 2011): только две из восьми особей оказались гетерозиготами по ТТ и ПИ. Исследованная нами полиморфная выборка из северной части ареала вида (Воскресенский р-н Саратовской обл.), включающая 6 выше упомянутых вариантов кариотипа ( $2n = 24$ ,  $NFa = 44$ ;  $2n = 24$ ,  $NFa = 43$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 39$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 40$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 40$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 41$ ), напротив, характеризуется преимущественно гетерозигот по двум структурным хромосомным перестройкам (ТТ, ПИ), определившим генетическое разнообразие исследован-

ной популяции данного представителя мышовок группы *subtilis* (рис. 5, табл. 1). Известно, что ПИ проявляют себя в мейозе у гетерозигот путем “запирания кроссинговера”, что может играть важную роль в адаптации популяции к тем или иным условиям среды (Хвостова, Богданов, 1975; Vonvicino *et al.*, 2001). Этот же феномен (подавление кроссинговера) может проявляться и у гетерозигот по достаточно редким для млекопитающих хромосомным перестройкам, ТТ (Раджабли, Графодатский, 1977; Elder, 1980; Elder, Hsu, 1988; Иваницкая, 1990; Huang *et al.*, 2006; Kartavtseva *et al.*, 2008; Картавцева и др., 2021; Galindo *et al.*, 2021). Так, например, было показано, что гетерозиготность по ТТ приводит к нарушению конъюгации хромосом в мейозе и их последующему расхождению с образованием при конъюгации в профазе I мейоза не бивалента, а квадриллента. С одной стороны, это может приводить к понижению плодовитости у гетерозигот, а с другой стороны, из-за затруднений с плотной конъюгацией вблизи точек разрывов к подавлению кроссинговера в трансло-



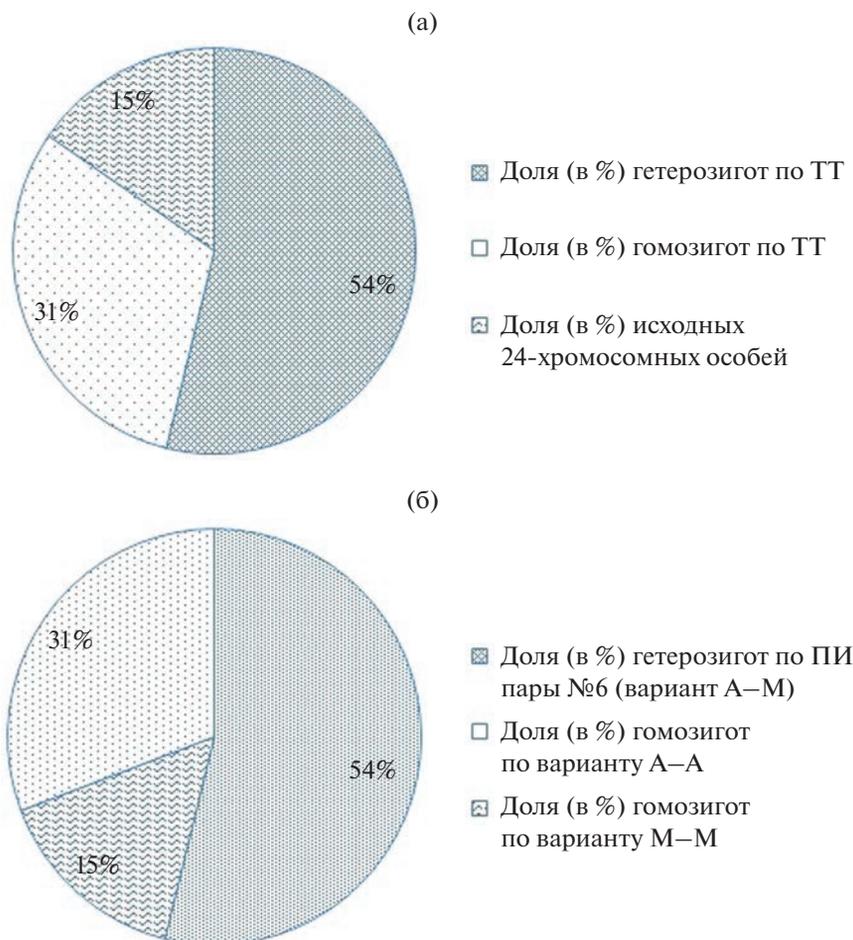
**Рис. 4.** Область распространения *Sicista* sp. 1, очерченная по результатам хромосомного типирования: 1 – пункт собственных сборов; 2–7 – места находок, известные по литературным данным (Ковальская и др., 2000; Анискин и др., 2003; Kovalskaya *et al.*, 2011). Номера находок соответствуют нумерации в табл. 2.

цированных участках, что на генетическом уровне в дальнейшем может определять адаптивные свойства популяции (Хвостова, Богданов, 1975).

Преимущество гетерозигот является одним из механизмов, поддерживающих разнообразие (Тимофеев-Ресовский и др., 1977; Patton *et al.*, 1980), и внутривидовой полиморфизм в данном случае может быть охарактеризован как сбалансированный. Стабильность такого внутривидового полиморфизма поддерживается сбалансированным или гетерозиготным отбором. При этом следует отметить, что существование хромосомного полиморфизма можно объяснить не только действием отбора, но и неселективными факторами: в малых демах это генетический дрейф (Kimura, 1985).

Проведенное нами на основе хромосомного анализа исследование генетической структуры популяции *Sicista* sp. 1 из северной части ареала вида, указывает на ее своеобразие, заключающееся в наличии множественного хромосомного полиморфизма (ГТ, ПИ), тогда как все другие популяции вида (при фрагментарности выборок) характеризуются мономорфизмом (Kovalskaya *et al.*, 2011), или же наличием только одной хромосомной перестройки: Rb-транслокации, обнаруженной в популяции из правобережья р. Медведица (Анискин и др., 2003; Kovalskaya *et al.*, 2011). При этом следует отметить, что межпопуляционная хромосомная изменчивость у *Sicista* sp. 1 определяется тем же спектром хромосомных мутаций (Rb, ПИ,

ГТ), которые выявляются на внутривидовом уровне. Обнаруженная нами значительная внутривидовая хромосомная изменчивость и отмеченная ранее на внутри- и межпопуляционном уровнях варибельность кариотипа у этого представителя *Sicista* группы *subtilis* (Анискин и др., 2003; Kovalskaya *et al.*, 2011), по-видимому, имеют исторические причины, связанные с пульсацией ландшафта и климата в регионе исследования. Так, по молекулярным данным отделение от общего ствола предка мышовок группы *subtilis* датируется рубежом плиоцена и плейстоцена, а диверсификация аллопатрических форм группы происходила во второй половине среднего плейстоцена (примерно 400–250 тыс. лет назад) (Lebedev *et al.*, 2019). Что касается истории исследуемого узко ареального вида, населяющего участки степи и пустыни в междуречье среднего Дона, Медведицы, Арчеды и Волги, то, по крайней мере, для Арчединско-Донских и Алексеевских песков, откуда известны находки вида, установлена связь с отложениями древнего Дона и его притоков и движением ледников в ледниковые периоды Днепровского и Московского оледенения (Богучарков, Князев, 2012), а для Нижнего Поволжья по данным споро-пыльцевого анализа показана неоднократная смена растительных поясов в плейстоцене в результате трансгрессий Каспия (Москвитин, 1962). Очевидно, что эти и другие события плейстоцена, связанные с чередованием процессов изоляции и расселения, а также возмож-



**Рис. 5.** Соотношение (в %) в совокупной выборке ( $n=13$ ) кариологически изученной популяции *Sicista* sp. 1 из Саратовского Правобережья: (а) – гетерозиготных (54%), гомозиготных (31%) по тандемной транслокации (ТТ) особей и обладающих исходным 24-хромосомным кариотипом (15%); (б) – вариантов кариотипа, связанных с вариабельностью морфологии пары № 6 (ПИ): гетерозигот по варианту А-М (54%), гомозигот по варианту А-А (15%), гомозигот по варианту (М-М) (31%).

ной гибридизации предковых форм, повлияли на формирование значительной внутривидовой хромосомной изменчивости этого вида, отмеченной как на меж-, так и на внутривидовом уровнях.

Высокий уровень внутривидовой хромосомной изменчивости у исследованного нами узко ареального представителя *Sicista* группы *subtilis* коррелирует с биогеографической гипотезой (Geographic Range Hypothesis) (Bonvicino *et al.*, 2001; Hooper, Price, 2015 – цит. по Martinez *et al.*, 2017), согласно которой у видов с ограниченным распространением отбор и генетический дрейф благоприятствуют более быстрой фиксации хромосомных перестроек и в конечном счете, благоприятствуют фиксации локальных адаптивных характеристик.

Хромосомный полиморфизм был выявлен и у других узко ареальных представителей *Sicista* группы *subtilis* из бассейна среднего Дона: у видов-двойников, относящихся по результатам секвенирования

двух генов (*cytb*, *COI*) мт ДНК к одной с *Sicista* sp. 1 филогруппе (*cimlanica*): *Sicista* sp. 2, *S. cimlanica* (Lebedev *et al.*, 2019). Этот результат согласуется с “законом гомологических рядов наследственной изменчивости”, в соответствии с которым у филогенетически близких форм проявляется параллелизм изменчивости, уменьшающийся с увеличением степени филогенетической дивергенции (Вавилов, 1920). Напомним, что остальные, входящие в состав *Sicista* группы *subtilis* виды: *S. nordmanni* (населяет южные степи Восточной Европы), *S. severtzovi* (известен только из типового местообитания), *S. trizona* (обитатель степных участков юго-западной Европы) характеризуются мономорфными кариотипами. Исключение представляет евроазиатский широко ареальный политипический вид *Sicista subtilis* s. str., у которого был выявлен полиморфизм и географическая изменчивость кариотипа, связанные с вариабельностью морфологии трех пар аутосом (№№ 6, 8, 10), механиз-

мом которых являются ПИ (Соколов и др., 1986; Баскевич и др., 2010; Kovalskaya *et al.*, 2011). Сравнительно исследованный нами случай внутривидового хромосомного полиморфизма у *Sicista* sp. 1 с кариологически полиморфными популяциями других представителей группы, следует отметить, что особенностью изученной нами выборки является множественный характер выявленных хромосомных перестроек и преимущество гетерозигот по ним. Такой характер генетической структуры данной популяции вероятно определяет ее адаптивность к конкретным условиям среды. Очевидно, что на данном этапе такая система сбалансированного хромосомного полиморфизма не может служить в качестве материала для хромосомной эволюции (Гилева, 1990), что отличает ее от кариологически полиморфных популяций большинства других видов *Sicista* группы *subtilis* (Соколов и др., 1986; Баскевич и др., 2011; Kovalskaya *et al.*, 2011).

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госзадания ИПЭЭ РАН (проект АААА-А18-118042490058-8).

**Благодарности.** За содействие в сборе полевого материала авторы выражают глубокую признательность сотруднице Саратовского филиала ИПЭЭ РАН А.А. Цветковой, а за консультативную помощь в подготовке иллюстративного материала благодарят своих коллег: Е.А. Авилкову и Д.С. Костина.

**Соблюдение этических норм.** Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анискин В.М., Богомолов П.Л., Ковальская Ю. М., Лебедев В.С., Суков А.В., Тихонов И.А. Кариологическая дифференциация мышовок группы “*subtilis*” (Rodentia, *Sicista*) на юго-востоке Русской равнины — Аверьянов А.О., Абрамсон Н.И. (ред.). Материалы международного совещания: систематика, филогения и палеонтология мелких млекопитающих. Санкт-Петербург: Зоологический институт РАН. 2003. С. 27–29.
- Ахвердян М.Р., Ляпунова Е.А., Воронцов Н.Н., Тесленко С.В. Внутривидовый аутоморфный полиморфизм обыкновенной полевки *Microtus arvalis* Закавказья // Генетика. 1999. Т. 35. № 12. С. 1687–1698.
- Баклушинская И.Ю. Хромосомные перестройки, реорганизация генома и видообразование // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 4. С. 376–393.
- Баскевич М.И., Опарин М.Л., Соколенко О.В., Авиллова Е.А. Новые данные по хромосомной изменчивости и распространению видов-двойников *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolinae) в Нижнем Поволжье // Зоол. журн. 2008. Т. 87. № 11. С. 1382–1390.
- Баскевич М.И., Опарин М.Л., Черепанова Е.В., Авиллова Е.А. Хромосомная дифференциация степной мышовки, *Sicista subtilis* (Rodentia, Dipodoidea) в Саратовском Поволжье // Зоол. журн. 2010. Т. 89. № 6. С. 749–757.
- Баскевич М.И., Сапельников С.Ф., Власов А.А. Новые данные по хромосомной изменчивости темной мышовки (*Sicista severtzovi*, Rodentia, Dipodoidea) из Центрального Черноземья // Зоол. журн. 2011. Т. 90. № 1. С. 59–66.
- Баскевич М.И. Систематика, эволюция и изменчивость р. *Sicista* (Rodentia, Dipodoidea): обзор кариологических и молекулярных данных // Аспекты биоразнообразия // Труды Зоол. музея МГУ им. М.В. Ломоносова. Т. 54. Ч. 1. М.: Т-во научн. изданий КМК. 2016. С. 191–228.
- Богучарсков В.Т., Князев Ю.П. Историко-географический анализ изучения ландшафтов бассейна Среднего и Нижнего Дона // Вестник ВГУ. Серия географическая. Геоэкология. 2012. № 2. С. 65–69.
- Борисов Ю.М. Процесс увеличения числа и вариантов системы В-хромосом мышей *Apodemus peninsulae* в популяции горного Алтая за 26-летний период // Генетика. 2008. Т. 44. № 9. С. 1227–1237.
- Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Доклад на III Всероссийском селекционном съезде в г. Саратове 4 июня 1920. 16 с.
- Волобуев В.Т. В-хромосомы млекопитающих // Успехи соврем. биологии. 1981. Т. 86. № 3. С. 387–402.
- Воронцов Н.Н. Значение изучения хромосомных наборов для систематики млекопитающих // Бюлл. Моск. обз-ва испыт. Природы. Отд. Биол. 1958. Т. 63. № 2. С. 5–36.
- Гилева Э.А. Хромосомная изменчивость и эволюция. М.: Наука. 1990. 141 с.
- Загороднюк И.В. Кариотипическая изменчивость 46-хромосомных форм полевки группы *Microtus arvalis* (Rodentia): Таксономическая оценка // Вестн. зоол. 1991. № 1. С. 36–45.
- Иваницкая Е.Ю. Существуют ли закономерности хромосомной эволюции млекопитающих // Эволюционные и генетические исследования млекопитающих. Материалы докладов Всесоюзного совещания. Владивосток: ДВО АН СССР. 1990. Ч. 1. С. 1–9.
- Картавецва И.В., Шереметьева И.Н., Павленко М.В. Множественный хромосомный полиморфизм хромосомной расы “эворон” эворонской полевки (Rodentia, Arvicolinae) // Генетика. 2021. Т. 57. № 1. С. 82–94.
- Ковальская Ю.М., Тихонов И.А., Тихонова Г.Н., Суков А.В., Богомолов П.Л., Новые находки хромосомных форм мышовок группы *subtilis* и описание *Sicista severtzovi cimlanica* subsp.n. (Mammalia, Rodentia) из среднего течения Дона // Зоол. журн. 2000. Т. 79. № 8. С. 954–964.
- Ляпунова Е.А., Баклушинская И.Ю., Коломиец О.Л., Мазурова Т.Ф. Анализ плодовитости гибридов разнохромосомных форм слепушонок надвида *Ellobius tancrei*, отличающихся по одной паре робертсоновских метацентриков // ДАН СССР. 1990. Т. 310. № 3. С. 721–723.

- Москвитин А.И., Плейстоцен Нижнего Поволжья // Тр. Геологического Ин-та АН СССР. 1962. Вып. 64. 279 с.
- Орлов В.Н. Кариосистематика млекопитающих. М.: Наука. 1974. 207 с.
- Орлов В.Н., Булатова Н.Ш. Сравнительная цитогенетика и кариосистематика млекопитающих. М.: Наука, 1983. 405 с.
- Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. Калякин М.В. (ред.) [Труды Зоологического Музея МГУ. Т. XLVI]. М.: Изд-во МГУ. 2003. 297 с.
- Раджабли С.И., Графодатский А.С. Эволюция кариотипа млекопитающих (структурные перестройки хромосом и гетерохроматина) // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа. Новосибирск: Наука. 1977. С. 231–248.
- Русин М.О., Шрамко Г., Черкес Т. Ревизия степных мышовок (*Sicista subtilis* s. l.) Европейской части ареала // Структура вида у млекопитающих. Материалы конференции, 21–23 окт. 2015 г., Москва. М.: Т-во научн. изданий КМК. 2015. С. 71.
- Соколов В.Е., Баскевич М.И., Ковальская Ю.М. Изменчивость кариотипа степной мышовки, *Sicista subtilis* Pallas (1778) и обоснование видовой самостоятельности *S. severtzovi* Ognev, 1935 (Rodentia, Zorodidae) // Зоол. журн. 1986. Т. 65. № 2. С. 1684–1692.
- Тимофеев-Ресовский, Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука. 1977. 302 с.
- Хвостова В.В., Богданов Ю.Ф. Цитология и генетика мейоза М.: Наука, 1975. 432 с.
- Щипанов Н.А., Павлова С.В. Многоуровневая подразделенность в группе видов “aganeus” рода *Sorex*. 1. Хромосомная дифференциация // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 2. С. 216–233.
- Ayala D., Pelayo Acevedo, Marco Pombi, I. Dia, D. Baccolini, C. Costantini, F. Simard, D. Fontenille. Chromosome inversions and ecological plasticity in the main African malaria mosquitoes // Evolution. 2017. V. 71. P. 686–701.
- Baklushinskaya I. Yu., Lyapunova E.A. Robertsonian translocations and origin of new forms in group *Ellobius tancredi* (Mammalia, Rodentia) // Chromosome Research. 1995. V. 3. P. 69–70.
- Bonvicino C., D’Andrea P., Borodin P. Pericentric inversion in natural populations of *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Sigmodontinae) // Genome. 2001. V. 4. P. 791–796.
- Damas J., Marco Corbo M., Lewin H.A. Vertebrate Chromosome Evolution // Annu. Rev. Anim. Biosci. 2021. V. 9. P. 1–27.
- Dobigny G., Catalan J., Gauthier P., O’Brien P.C.M., Brouat C., BÉA K., Tatar C., Ferguson-Smith M.A., Duplantier J.M., Granjon L., Britton-Davidian J. Geographic patterns of inversion polymorphisms in a wild African rodent, *Mastomys erythroleucus* // Heredity. 2010. V. 104. P. 378–386.
- Dobigny G., Britton-Davidian J., Robinson T.J., 2015. Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective // Biol. Reviews. 2017. V. 92. №1. P. 1–21. <https://doi.org/10.1111/brv.12213>
- Dobzhansky Th. Genetics of natural populations. XZVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis* // Genetics. 1948. V. 33. P. 158–176.
- Elder F.F.B. Tandem fusion, centric fusion, and chromosomal evolution in the cotton rats, genus *Sigmodon* // Cytogen. Cell Genet. 1980. V. 26. P. 199–210.
- Elder F.F.B., Hsu T.C. Tandem fusions in the evolution of mammalian chromosomes // The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements / Ed. Sandberg A.A. N.Y.: Alan R. Liss. 1988. P. 481–506.
- Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol. 1956. V. 31. P. 247–251.
- Galindo D.J., Martins G.S., Vozdova M., Cernohorska H., Kubickova S., Bernegossi A.M., Kadlcikova D., Rubes J., Duarte J.M.B. Chromosomal polymorphism and speciation: the case of the genus *Mazama* (Cetartiodactyla, Cervidae) // Genes. 2021. V. 12. P. 165. <https://doi.org/10.3390/genes12020165>
- Holden M.E., Musser G.G. Family Dipodidae. — Wilson D.E., Reeder D.M. (eds). Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. 3<sup>d</sup> ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2005. P. 21–42.
- Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // Experientia. 1980. V.36. P. 1014–1015.
- Huang L., Wang J., Nie W., Su W., Yang F. Tandem chromosome fusions in karyotypic evolution of *Muntiacus*: Evidence from *M. feae* and *M. gongshanensis* // Chromosome Res. 2006. V. 14. P. 637–647.
- Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Korobitsina K.V., Nemkova G.A., Konovalova E.V., Korablev V.P., Voita L.L. Chromosomal forms of *Microtus maximowiczii* (Schrenck, 1858) (Rodentia, Cricetidae): Variability in 2n and NF in different geographic regions // Russ. J. Theriology. 2008. V. 7. № 2. P. 89–97.
- Kimura M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge. 1985. 384 p.
- Kovalskaya Y.M., Aniskin V.M., Bogomolov P.L., Surov A.V., Tikhonov I.A., Tikhonova G.N., Robinson T.J., Volobuev V.T. Karyotype reorganization in the subtilis group of birch mice (Rodentia, Dipodidae, Sicista): unexpected taxonomic diversity within a limited distribution // Cytogenet. Genome Res. 2011. V. 132. № 4. P. 271–288.
- Lebedev V., Poplavskaya N., Bannikova A., Rusin M., Surov A., Kovalskaya Yu. Genetic variation in the *Sicista subtilis* (Pallas, 1773) species group (Rodentia, Sminthidae), as compared to karyotype differentiation // Mammalia, 2019. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2018-0216>
- Martinez P.A., Jacobina U.P., Fernandes R.V., Brito C., Pennone C., Amado T.F., Fonseca C.R., Bidau C.J. A comparative study on karyotypic diversification rate in mammals // Heredity. 2017. V. 118. P. 366–373.
- Matthey R. Caryotypes de murides et de dendromurides originaires de Republique Centrafricaine // Mammalia. 1970. V. 34. № 3. P. 459–466.
- Patton J.C., Baker R.J., Genoways H.H. Apparent chromosomal heterosis in a fossorial mammal // Mamm. Papers: Univ. Nebraska State Museum. 1980. P. 193–197.
- Romanenko S., Lyapunova E.A., Abdusator S. Saidov, O’Brien P.C.M., Serdykova N.A., Ferguson-Smith M.A.,

- Grafodatsky A.S., Baklushinskaya I. Chromosome translocations as a driver of diversification in mole voles *Ellobius* (Rodentia, Mammalia) // Int. J. Moll. Sci. 2019. V. 20. P. 4466.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184466>
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // Lancet. 1971. V. 11. P. 971–972.
- Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // Exp. Cell Res. 1972. V. 75. P. 304–306.
- Zima J. Chromosomal evolution in small mammals (Insectivora, Chiroptera, Rodentia) // Hystrix, (n.s.). 2000. V. 11. № 2. P. 5–15.

## Multiple Chromosomal Polymorphism in Birch Mice of the Subtilis Group (Rodentia, Dipodoidea, *Sicista*) from Saratov Right Bank

M. I. Baskevich<sup>1, #</sup> and M. L. Oparin<sup>1</sup>

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

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

Cytogenetic analysis (routine, *G*-, *C*-, *AgNOR*-chromosome banding) allowed to obtain new data on chromosomal polymorphism in the population ( $n = 13$ ) of *Sicista* sp. 1, representative of the *Sicista subtilis* group from the Saratov Region, right bank of Volga River. It was shown that in the studied polymorphic population of a species from the northern part of the species' range (Voskresensky district of the Saratov region) the diploid number of chromosomes varies from  $2n = 22$  to  $2n = 24$ , and the number of autosome arms from  $NFa = 39$  to  $NFa = 44$ , and the sample includes the following 6 karyotype variants: with  $2n = 24$ ,  $NFa = 44$ ;  $2n = 24$ ,  $NFa = 43$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 40$ ;  $2n = 23$ ,  $NFa = 41$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 39$ ;  $2n = 22$ ,  $NFa = 40$ . Based on *G*-banding method, the determined intrapopulation chromosomal polymorphism in *Sicista* sp. 1 was defined by two chromosomal rearrangements: tandem translocation involving two biarmed autosomes No 4 and 10 and a pericentric inversion of pair No 6. In the studied sample ( $n = 13$ ), a stable advantage of heterozygotes was revealed for both structural chromosomal mutations and the chromosomal polymorphism is characterized as balanced or heterozygous. The potential role of the identified polymorphism in chromosomal evolution and adaptive strategy of the species is discussed.

**Keywords:** speciation, karyotype, variability, chromosomal rearrangements, polymorphism, population, *Sicista*, mammals

УДК 579.2:592

## ЭКТОПАРАЗИТИЧЕСКИЕ КЛЕЩИ – ПЕРЕНОСЧИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ СРЕДИ НАСЕКОМЫХ

© 2023 г. Е. В. Шайкевич\*, @, А. А. Горбачева\*, Д. А. Романов\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, ул. Губкина, 3, Москва, 119333 Россия

@E-mail: elenashaikevich@mail.ru

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принята к публикации 05.10.2022 г.

Передающиеся по наследству эндосимбиотические бактерии из родов *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma* вызывают гибель потомства мужского пола у божьих коровок (Coleoptera, Coccinellidae). Как правило, бактерии передаются через цитоплазму материнской яйцеклетки потомству – по вертикали. В дополнение к вертикальной передаче, появляется все больше данных о горизонтальном переносе симбионтов между неродственными таксонами насекомых. Потенциальными переносчиками эндосимбиотических бактерий могут быть паразиты насекомых, например, клещи. Паразитический клещ божьих коровок *Coccipolipus hippodamiae* (McDaniel & Morrill, 1969) (Acarina: Podapolipidae) встречается в природных популяциях Coccinellidae. В данной работе впервые доказана способность *C. hippodamiae* заражаться *Wolbachia* и *Spiroplasma* от хозяев и распространять бактерии среди жуков-кокциnellид.

**Ключевые слова:** внутриклеточные симбиотические бактерии, горизонтальный перенос, насекомые

**DOI:** 10.31857/S1026347023700142, **EDN:** MUQTVС

Передающиеся по наследству эндосимбиотические бактерии повсеместно распространены в природных популяциях беспозвоночных. Для внутриклеточных бактериальных симбионтов насекомых характерен широкий спектр взаимодействий с хозяином, позволяющих оказывать влияние на экологию, эволюцию и репродуктивную биологию последних. Их исключительной особенностью является способность вызывать у своих хозяев ряд репродуктивных аномалий (цитоплазматическую несовместимость, андроид, феминизацию или партеногенез), повышающих долю зараженных самок в популяции и, соответственно, эффективность своей вертикальной передачи и распространения в популяции (Werren *et al.*, 1995).

У божьих коровок (Coleoptera, Coccinellidae) в России встречаются три наследуемых симбионта из родов *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*, вызывающие гибель потомства мужского пола – андроид (Shaikevich, Zakharov 2015; Горячева и др., 2015; Goryacheva *et al.*, 2018; Шайкевич и др., 2019). Частота встречаемости и географическое распределение симбионтов не одинаковы у разных видов. Для *Adalia decempunctata* характерно заражение *Rickettsia* (Шайкевич и др., 2019). У *Harmonia axyridis* обнаружены *Wolbachia*, *Rickettsia* и *Spiroplasma* (Горячева и др., 2015; Goryacheva

*et al.*, 2017, 2018; Li *et al.*, 2021). В популяции *Adalia bipunctata* в России наблюдалось географическое распределение симбиотических бактерий: в Санкт-Петербурге встречались *Rickettsia* и *Spiroplasma* в 1999 г. (Schulenburg *et al.*, 2002) и исключительно *Spiroplasma* в 2009 (Захаров, Шайкевич, 2011), а в Карелии и в Бурятии были обнаружены только *Rickettsia* (Шайкевич и др., 2012). У божьих коровок *A. bipunctata* в одной популяции в Москве в 2019–2020 выявлено заражение как минимум тремя штаммами *Wolbachia*, wAbi-1, wAbi-2 и wAbi-3 (Shaikevich *et al.*, 2021), два из которых не были обнаружены в популяции в 1999 (Schulenburg *et al.*, 2002). Долгосрочные наблюдения показывают, что состав симбионтов в популяциях божьих коровок может меняться во времени из-за потерь одних бактерий и приобретения других.

Внутриклеточные симбиотические бактерии инфицируют клетки зародышевой линии хозяина и передаются через цитоплазму яйцеклетки, т.е. трансвариально от матери потомству – по вертикали. В дополнение к вертикальной передаче, появляется все больше данных о горизонтальном переносе симбионтов между неродственными таксонами насекомых. Известны случаи заражения насекомых бактерией в результате прямых и косвенных контактов (как следствие обитания в

одной среде, контакта между хищником и жертвой, или через общий источник пищи) (цит. по Pietri *et al.*, 2016). На возможность горизонтальной передачи в природе также указывают филогенетические данные (O'Neill *et al.*, 1992; Baldo *et al.*, 2008; Gerth *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2016; Ilinsky, Kosterin, 2017 и др.).

Потенциальными переносчиками эндосимбиотических бактерий могут быть паразиты насекомых, например, клещи. Было показано, что эктопаразитические клещи *Macrocheles subbadius* после питания гемолимфой *Drosophila nebulosa*, инфицированных *Spiroplasma*, способны передавать инфекцию *Drosophila willistoni* (Jaenike *et al.* 2007). У пойманных в природе *Drosophila hydei* были обнаружены клещи *Macrocheles* sp., инфицированные *Spiroplasma*, идентичной симбионту хозяина (Osaka *et al.*, 2013). Совершенно другой механизм обнаружен в основе переноса *Wolbachia* между лабораторными популяциями дрозофилы через *Tyrophagus putrescentiae*: эти клещи поедают трупы дрозофилы, в том числе трупы, инфицированные *Wolbachia*, а личинки дрозофилы поедают клещей и таким образом инфицируются *Wolbachia* (Brown, Lloyd, 2015).

Паразитический клещ божьих коровок *Coccipolipus hippodamiae* (McDaniel & Morrill, 1969) (Acarina: Podapolipidae) встречается в природных популяциях Coccinellidae (Coleoptera), в которых он может достигать высокой численности (Webberley *et al.*, 2004). *C. hippodamiae* был обнаружен у разных видов кокцинеллид: *A. bipunctata*, *A. decempunctata*, *Oenopia conglobata*, *Calvia quatuordecimguttata*, *Coccinella magnifica*, *Harmonia quadripunctata*, *Halyridis*, *Hippodamia convergens*, *Exochomus fulvimanus*, *Exochomus concavus* (Knell, Webberley, 2004; Webberley *et al.*, 2004; Rhule *et al.*, 2010; Ceryngier *et al.*, 2012). Некоторые виды божьих коровок, видимо, не заражаются клещом *C. hippodamiae*: *Exochomus quadripustulatus*, *Coccinula quatuordecimpustulata*, *Propylea quatuordecimpunctata*, *Coccinella septempunctata* (Webberley *et al.*, 2004). На *C. septempunctata* паразитирует другой клещ – *Coccipolipus macfarlanei* (Эйдельберг, 1994; Захаров, Эйдельберг, 1997; Knell, Webberley, 2004). В Европе наибольшая инфицированность клещом *C. hippodamiae* (до 69.5%) наблюдалась у *A. bipunctata*, что позволяло считать этот вид коровок его основным хозяином (Webberley *et al.*, 2004). Однако ареал *C. hippodamiae* не совпадает с ареалом *A. bipunctata* (Захаров, Эйдельберг, 1997; Webberley *et al.*, 2006).

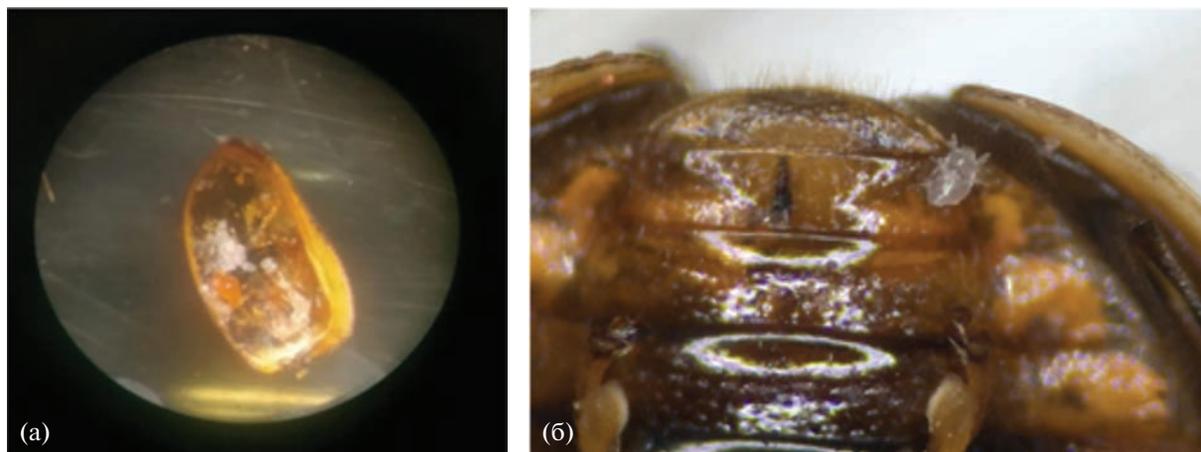
*C. hippodamiae* – эктопаразит, обитающий на нижней стороне надкрылий кокцинеллид и передающийся преимущественно при копуляции, а также в плотных скоплениях жуков, готовящихся к диапаузе (Webberley, Hurst, 2002). Взрослые самки клещей ведут неподвижный образ жизни: прикрепляются к надкрыльям, поглощают гемолимфу хозя-

ина и откладывают яйца, из которых выходят подвижные полупрозрачные беловатые личинки. Во время копуляции жуков личинки клещей мигрируют под надкрылья нового хозяина, где молодые самки начинают питаться гемолимфой и претерпевают метаморфоз, превращаясь в имаго. После этого взрослые самки перестают двигаться, со временем увеличиваются в размерах, приобретают желто-оранжевый цвет и начинают откладывать яйца. Оплодотворение самок клещей происходит на стадии нимфы (Ceryngier *et al.*, 2012). Распространение *C. hippodamiae* зависит, по большей части, от двух факторов: от выраженности промискуитета хозяев, способствующего передаче паразита между особями, и от продолжительности сосуществования разных поколений хозяев в периоды непрерывного размножения, т.к. это обеспечивает передачу *C. hippodamiae* между поколениями жуков (Webberley *et al.*, 2004). Распространение клещей между кокцинеллидами разных видов было обнаружено в природе в местах, где по крайней мере один вид кокцинеллид был заражен *C. hippodamiae* (Webberley *et al.*, 2004). В лабораторных экспериментах *C. hippodamiae* успешно размножались на незараженном прежде хозяине после полового контакта особей гетероспецифичных пар (Rhule *et al.*, 2010). Клещи способны адаптироваться к разным видам и родам божьих коровок, в экспериментах не наблюдалось существенной разницы во времени, необходимом для успешного размножения клещей на *H. axyridis* и на *A. bipunctata* (Rhule *et al.*, 2010).

Цель работы: исследовать, могут ли *C. hippodamiae* осуществлять горизонтальную передачу симбионтов между кокцинеллидами. Мы предположили, что клещ *C. hippodamiae* может приобретать симбионтов, поглощая гемолимфу инфицированного хозяина, и передавать бактерию потомству. Молодые нимфы таких клещей переползают под надкрылья новых хозяев и, приступив к питанию гемолимфой, могут заражать ранее неинфицированных жуков бактерией.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Имаго божьих коровок (*A. bipunctata* и *H. axyridis*) собирали в 2019–2021 гг. путем визуального обследования кустарниковой и древесной растительности (в теплое время года) или стен зданий (осенью), на которых могут быть найдены жуки, готовящиеся к диапаузе. Коровки *A. decempunctata*, использованные для эксперимента, были выведены из куколок, собранных в природе ранее (Романов, Матвейкина, 2021). Собранным жукам присваивали индивидуальные названия, в которых указывалось место сбора (М – город Москва) и порядковый номер собранного жука. В названиях коровок, относящиеся к видам *A. decempunctata* и *H. axyridis*, их видовая принадлежность ука-



**Рис. 1.** а: взрослая самка клеща *Coccipolipus hippodamiae* (желтый) и ее яйца (белые) в надкрылье божьей коровки *Adalia bipunctata*; б: подвижная нимфа (личинка) клеща.

звалась строчными латинскими буквами “d” и “a” после порядкового номера (например, M84d и M150a, соответственно). Жуки, собранные в природе и использовавшиеся для получения лабораторных линий, отмечались прописной латинской буквой Р (от слова “parenta” – родители). Их потомки отмечались прописной латинской буквой F (от слова “filii” – дети) с указанием номера поколения.

Взрослые самки клеща *C. hippodamiae* располагаются на внутренней стороне надкрылий божьих коровок (рис. 1а), поэтому их сбор с живого жука затруднен. Нимфы и, возможно, взрослые самцы клещей подвижны, эти формы отмечались нами на поверхности элитр зараженных жуков (рис. 1б). Поэтому мы предполагали, что нимфы клещей будут переползать с зараженных клещами особей божьих коровок на других жуков не только при копуляции (наиболее распространенный естественный тип передачи клещей), но и при совместном содержании. Это предположение подтвердилось, так как в нескольких чашках Петри, где находились исключительно самки божьих коровок, было отмечено заражение клещами подсаженных жуков. Заражение клещами диагностировалось визуально с помощью бинокулярного микроскопа МБС-10 по наличию на элитрах божьих коровок подвижных форм клещей и характеру откладываемых самками кокцинеллид яиц (у зараженных клещами самок божьих коровок яйца сморщиваются через несколько часов после откладывания; эффект начинает проявляться примерно через 3 нед. после заражения). В ряде случаев для проверки успешности заражения клещами божьих коровок усыпляли с помощью диэтилового эфира, под микроскопом аккуратно отгнали элитры и смотрели наличие клещей. Количество жуков, содержащихся в чашке Петри, зависело от ее диаметра: в чашках Петри диаметром 4 см находилось по 3–4 жука, в чашках Петри диаметром

8 см находилось по 6–8 жуков. Таким образом мы имитировали экологическую ситуацию в природе, где божьи коровки заражаются клещами при копуляции или в плотных скоплениях зимующих жуков. После смерти жука с надкрылий снимали индивидуальных клещей и выделяли ДНК из жука и из клещей (индивидуально и из групп по 2–8 клещей) для поиска симбионтов у хозяина и паразита методом ПЦР.

Выделение тотальной ДНК из индивидуальных особей клещей и их хозяев-кокцинеллид проводили с помощью набора DNA Prep (Изоген, Москва). Реакцию амплификации с каждым препаратом ДНК проводили в объеме 25 мкл с использованием универсального набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Москва) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Все реакции выполнялись на амплификаторе MiniAmp Plus (компания Applied Biosystems, США). Для амплификации участка гена *cox1* применялись универсальные праймеры: LCO1490 и HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994); условия амплификации: начальная денатурация – 4 мин 30 с при 94°C; затем 5 циклов: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 20 с при 45°C и полимеризация – 1 мин при 72°C; затем 35 циклов: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 20 с при 55°C и полимеризация – 1 мин при 72°C. ПЦР завершалась заключительной полимеризацией в течение 5 мин 72°C. Амплификация специфического фрагмента гена *cox1* жуков проводилась с праймерами C1-jF 5'-GCTG-GAATTTTCATCAATTTTAGG-3' и C1-nR 5'-GGA-AATCAATGAATAAATCCTGCT-3'. Условия ПЦР: первичная денатурация – 5 мин при 94°C; 38 циклов с использованием Encyclo полимеразы: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг при 59°C – 30 с, синтез при 72°C – 60 с; завершающий синтез при 72°C – 5 мин.

**Таблица 1.** Сборы клещей, паразитирующих на *A. bipunctata*, в Москве в 2019–2021 гг.

Время сбора (месяц, год)	Место сбора	Собрано жуков		Зараженность клещами (%)
		всего	с клещами	
10.2019	55°42'37" с.ш., 37°34'37" в.д.	35	12	34.3
06.2020	55°41'37" с.ш., 37°34'14" в.д.	21	10	47.6
06.2020	55°42'54" с.ш., 37°36'45" в.д.	42	32	76.2
05.2021	55°41'38" с.ш., 37°34'05" в.д.	44	5	11.4
05.2021	55°41'28" с.ш., 37°51'01" в.д.	49	5	10.2
Всего		191	64	33.5

Зараженность клещей и божьих коровок *Wolbachia* проверяли методом ПЦР согласно методике MLST анализа (<http://pubmlst.org/wolbachia>). Для проверки зараженности клещей бактериями *Spiroplasma* использовались праймеры Sp\_ApDnaA\_F1 5'-ATTCTTCAGTAAAATGCTTGGA-3' и Sp\_ApDnaA\_R1 5'-ACACATTTACTTCATGCTATTGA-3'; для *Rickettsia* RicF141 5'-TCGGTTCSTTTTCGGCATTTTA-3' и RicR548 5'-GCATATTATCACCGCTTCATT-3'. Условия амплификации: начальная денатурация – 4 мин 30 с при 94°C; затем 35 циклов: денатурация – 25 с при 94°C, отжиг – 20 с при 58°C и полимеризация – 35 с при 72°C. ПЦР завершалась заключительной полимеризацией в течение 5 мин 72°C. Анализ результатов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1.5% агарозном геле. Фрагменты амплификации генов *cox1* мтДНК и локусов *Wolbachia* и *Spiroplasma* секвенировали.

Хроматограммы нуклеотидных последовательностей анализировались с помощью комплекта программ DNASTAR Lasergene 6 (<https://www.dnastar.com/software/lasergene/seqman>). Для идентификации видов насекомых посредством сравнения полученных нами последовательностей с уже известными использовались международные базы данных Barcode of Life Database (BOLD) и GenBank. Локусы *Wolbachia* сравнивали в базе <http://pubmlst.org/wolbachia>. Вновь полученные последовательности гена *dnaA Spiroplasma* из *A. bipunctata* и *C. hippodamiae* зарегистрированы в GenBank под номерами ON382044 и ON382045, соответственно. Филогенетическая дендрограмма построена в программе MEGA V. 6 с использованием метода Maximum Likelihood, модели Tamura-Nei и бутстреп-поддержки 1000 реплик (Tamura *et al.*, 2013).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Заражение коровок клещами C. hippodamiae в природе и эффект клещей на плодовитость хозяев*

Сборы имаго *A. bipunctata* представлены в табл. 1. Зараженность популяций *A. bipunctata* клещами зависит от времени и локализации, варьируя от

10.2% до 76.2% (табл. 1). Сборы имаго *H. axyridis* производились только в августе 2020 г. в Москве (55°41'19" с.ш., 37°51'32" в.д.), когда было собрано 112 имаго, зараженных клещами среди них не было.

Для изучения влияния клещей на вылупляемость личинок *A. bipunctata* из яиц было проведено сравнение между двумя самками, заразившимися клещами примерно в одно и то же время (табл. 2). Первая M7(P)♀ не инфицирована симбиотической бактерией, вторая M14(P)♀ заражена *Wolbachia*. В потомстве последней наблюдалось вылупление половины яиц в течение первой недели, что соответствует проявлению андроида, вызванного *Wolbachia*. В потомстве незараженной симбионтом самки первые 9 дней клещи не оказывали никакого эффекта на вылупляемость личинок и внешний вид хориона яиц. Примерно на 11–12 день заражения произошло резкое увеличение числа недоразвитых яиц у обеих самок, после чего самки коровок стали полностью стерильными. Через неделю после проявления стерильности у самок, откладываемые ими яйца начинают сморщиваться.

### *Заражение клещей (взрослых самок) и жуков бактериальными симбионтами в сборах из природы*

Мы выделяли ДНК из самок клещей *C. hippodamiae* (рис. 1а), снятых из-под надкрылий жуков и из самих 12 жуков *A. bipunctata*, которые были собраны в природе в 2019 (табл. 1). *Wolbachia* была обнаружена с помощью ПЦР с праймерами для гена *ftsZ* бактерии у пары *A. bipunctata* и *C. hippodamiae* (образец M3). Позже, шесть генов *Wolbachia* из клеща и жука были секвенированы, последовательности всех генов (*gatB* MZ056866, *coxA* MZ056869, *hcpA* MZ056871, *fbpA* MZ056874, *ftsZ*-95 и *wsp*-392) идентичны у клеща и коровки и соответствуют штамму wAbi-1 (рис. 2). В 2020 не было обнаружено *C. hippodamiae*, зараженных симбионтами. В 2021 две самки *C. hippodamiae* были заражены *Wolbachia*; причем в случае *A. bipunctata* M109 заражены и клещ, и коровка, а в случае *A. bipunctata* M90 – только клещ. Были заложены

**Таблица 2.** Влияние клещей на вылупляемость личинок коровок из яиц

Линия божьих коровок	Дата	Число яиц		Число личинок
		отложенных	неразвившихся	
M7(P)♀W– заражение клещами было 06.06.2020	10.06	39	2	37
	12.06	9	4	5
	13.06	34	1	33
	14.06	26	2	24
	16.06	3	0	3
	17.06	5	1	4
	18.06	29	20	9
	20.06	19	19	0
	24.06	21	21*	0
M14(P)♀W+ заражение клещами было 07.06.2020	12.06	9	4	5
	13.06	30	13	17
	14.06	21	16	5
	16.06	4	2	2
	17.06	16	9	7
	18.06	23	20	3
	19.06	23	23	0
	20.06	19	19	0
	21.06	9	9	0
	24.06	3	3*	0

Знаком (\*) отмечены яйца, которые начали сморщиваться через несколько часов после откладки.

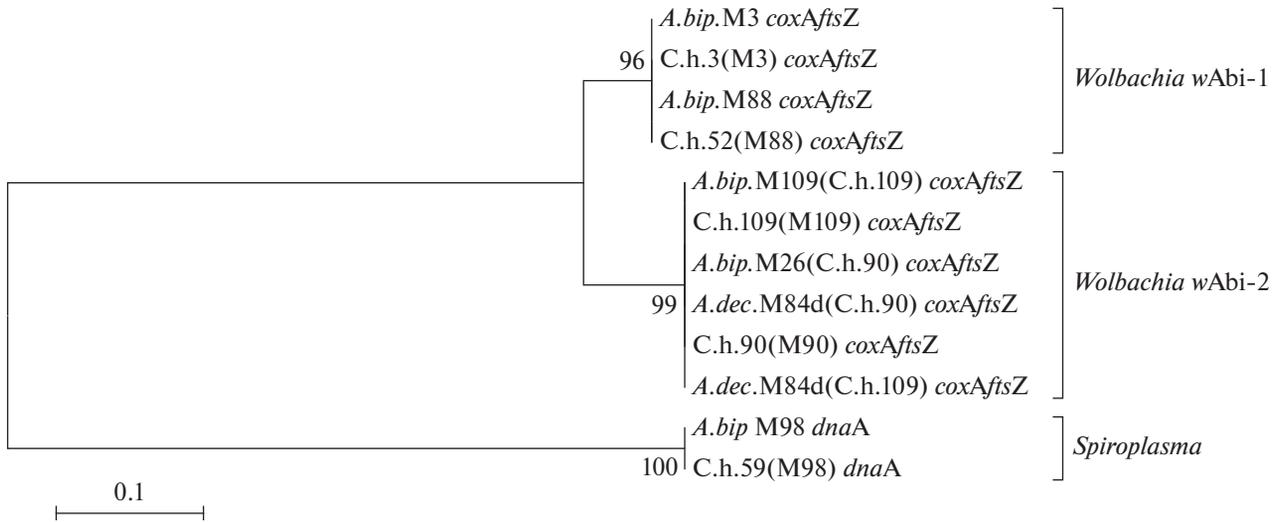
семь линий *C. hippodamiae*: две линии клещей, инфицированных *Wolbachia*, и пять линий, незараженных симбиотическими бактериями (табл. 3). *Spiroplasma* или *Rickettsia* у *C. hippodamiae* из природы не обнаружены.

Среди жуков из сборов 2021, в потомстве одной особи *A. bipunctata* M98 обнаружена *Spiroplasma* и заложена лабораторная линия жуков, инфицированных *Spiroplasma*. Также линия *A. bipunctata* M88, инфицированных *Wolbachia*, поддерживается в лаборатории от найденной в природе. Симбионты стабильно сохраняются в поколениях жуков в лаборатории в 2021–2022 гг., и получены жуки 3-го поколения в линиях M88 (с вольбахией) и M98 (со спироплазмой). Зараженность симбионтами проверяли с помощью ПЦР с праймерами к *ftsZ* и *coxA* генам *Wolbachia* и *dnaA* гена *Spiroplasma*.

Для проведения экспериментов в 2021 г. были заложены и поддерживались 8 линий божьих коровок: 1 линия *A. decempunctata* (M84d), 1 линия *H. axyridis* (M150a), 6 линий *A. bipunctata* – M88 (источник вольбахии), M98 (источник спироплазмы) и M19, M26, M69, M116 (свободные от

бактерий). В экспериментах также использовали 18 жуков, собранных в природе, которые не были выведены в линии (Приложение 1).

Для изучения способности клещей *C. hippodamiae* заражать разные виды божьих коровок был поставлен следующий эксперимент: к божьим коровкам *A. bipunctata*, инфицированным клещами, были подсажены незараженные коровки *A. decempunctata* и *H. axyridis*. Для изучения возможности заражения клещей *C. hippodamiae* бактерией *Wolbachia* или *Spiroplasma* в лабораторных условиях мы спланировали следующий эксперимент: в чашки Петри к жукам *A. bipunctata*, зараженным бактериальным симбионтом, но без клещей, были подсажены имаго *A. bipunctata*, инфицированные клещами. Для изучения способности клещей *C. hippodamiae* распространять бактериальных симбионтов среди божьих коровок был выполнен следующий эксперимент: к божьим коровкам *A. bipunctata*, инфицированным зараженными симбионтами клещами, были подсажены незараженные коровки *A. bipunctata*, *A. decempunctata* и *H. axyridis*.



**Рис. 2.** Дендрограмма сходства на основе сравнения соединенной последовательности генов *coxA-fisZ* *Wolbachia* и гена *dnaA* *Spiroplasma*. Обозначены хозяева симбионтов – жуки или клещи, гены бактерий и штаммы *Wolbachia* (справа). При обозначении клещей в скобках указаны коровки, с которых они были сняты: например, C.h.52 снят с коровки линии (M88).

*Экспериментальное доказательство заражения клещей симбионтами от коровок*

Для доказательства инфицирования клещей *C. hippodamiae* (C.h.) бактериями непосредственно от жуков-хозяев в чашки Петри к жукам *A. bipunctata* 1) из линии M88W+ (без клещей, но ис-

точник *Wolbachia*), 2) линии M98S+ (без клещей, но источник *Spiroplasma*) были подсажены имаго *A. bipunctata*, инфицированные клещами *C. hippodamiae* (C.h.+). В эти же чашки подсаживались жуки *A. decempunctata* и *H. axyridis* без клещей (C.h.-). Заражение жуков клещами диагностировалось по

**Таблица 3.** Эксперимент по переносу симбионтов через укусы клещей

Реципиент симбионта	Донор симбионта из природы			
	жуки		Клещи (жук-хозяин)	
	M88 W+ (C.h.-)	M98 S+ (C.h.-)	C.h.109 W+ (M109W+)	C.h.90 W+ (M90W-)
Клещи (жук-хозяин)				
C.h.52 W- (M52 W-)	W+			
C.h.68 W- (M68 W-)	W-			
C.h.59 S- (M59 S-)		S+		
C.h.85 S- (M85 S-)		S-		
C.h.99 S- (M99 S-)		S-		
Жуки				
M84d(F1-3) W- (C.h.-)				W+
M70 W- (C.h.-)				W-
M26(F1-4) W- (C.h.-)				W+
M26(F1-6) W- (C.h.-)			W-	
M84d(F1-8) W- (C.h.-)			W+	
M84d(F1-9) W- (C.h.-)			W-	
M19(F1-7) W- (C.h.-)			W-	
M116(F1-4)♀ W- (C.h.-)			W-	

C.h. – клещи *C. hippodamiae*, W – *Wolbachia*, S – *Spiroplasma*, “-” означает отсутствие заражения, “+” – присутствие заражения.

наличию подвижных форм *C. hippodamiae* на поверхности элитр хозяина; все виды кокцинелл заражались клещами *C. hippodamiae*. Заражение симбионтом проверяли методом ПЦР после смерти жука. Для проверки контаминации образцов ДНК клещей при выделении ДНК от хозяев-жуков мы ставили ПЦР с праймерами C1-jF и C1-nR, специфичными к ДНК только божьих коровок. В случае положительных сигналов с ДНК клещей, такой образец исключался из анализа. В результате мы получили доказательства, что клещи заразились *Wolbachia* и *Spiroplasma* (табл. 3). После анализа последовательностей генов *coxA*, *ftsZ* бактерии *Wolbachia* показано, что С.н.52 W+ и донор М88 W+ инфицированы штаммом wAbi-1 (рис. 2). Идентичные последовательности гена *dnaA Spiroplasma* получены для С.н.59 S+ и донора М98S+ (рис. 2).

Вновь инфицированные симбионтами клещи С.н.52 W+ и С.н.59 S+ сохраняли симбионтов при заражении ими других божьих коровок (М69, М151а и М47, М150а, М162а, соответственно) через подвижных нимф, что доказывает наследуемость приобретенных инфекций *Wolbachia* и *Spiroplasma* в клещах. Заражения симбионтами коровок М69, М151а от С.н.52 W+ и жуков М47, М150а, М162а от С.н.59 S+ не произошло. В линии клещей С.н.59 *Spiroplasma* передавалась на протяжении 3 поколений клещей, а в линии С.н.109 *Wolbachia* передавалась на протяжении 4 поколений клещей (Приложение 1). Число поколений клещей определяли по времени жизни жуков, зараженных клещами, сопоставляя его с датами подсаживания новых жуков. Так как взрослые самки клещей ведут неподвижный образ жизни, перебраться на нового жука могут только их потомки.

#### Экспериментальное доказательство заражения коровок через клещей

Для проверки способности клещей быть переносчиком симбиотических бактерий в чашки с 3) *A. bipunctata* М109W+, Ch109W+ (зараженной одновременно клещами С.н.109 и *Wolbachia*), 4) *A. bipunctata* М90W-, С.н.90W+ были подсажены жуки без симбионтов и клещей. Результаты, доказывающие способность кокцинелл заражаться *Wolbachia* через клещей, представлены в табл. 3. Для доказательства отсутствия следов ДНК жуков в образцах ДНК клещей мы ставили ПЦР с общими праймерами LCO и HCO с последующим секвенированием амплификатов. Хроматограммы не содержали двойных пиков. Последовательности мтДНК зараженных и незараженных *Wolbachia* клещей идентичны. Результаты сравнения последовательностей ДНК клещей и божьих коровок представлены на рис. 3. Идентичные последовательности генов *Wolbachia* (аллели *coxA*-1, *ftsZ*-3) получены для *A. bipunctata* М26(С.н.90)W+,

*A. decempunctata* М84d(F1-3)(С.н.90)W+ и донора С.н.90W+; *A. decempunctata* М84d(F1-8)(С.н.109)W+ и донора С.н.109W+ (табл. 3). В данных случаях инфицирование произошло штаммом wAbi-2 (рис. 2).

Всего 58 особей жуков (без клещей) содержались в чашках Петри с 7 клещевыми культурами (коровками, зараженными клещами) (Приложение 1). В табл. 3 показаны только случаи, когда жуки заразились клещами. В результате, клещи заразились *Wolbachia* и *Spiroplasma*; в трех случаях жуки, не инфицированные изначально *Wolbachia*, приобрели симбионта после укусов клещей.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клещи *C. hippodamiae* были найдены на имаго *A. bipunctata* в природных сборах в Москве, тогда как имаго *H. axyridis* оказались не заражены. Это свидетельствует о том, что именно *A. bipunctata* продолжает быть основным хозяином *C. hippodamiae* в Москве. Следует отметить высокий уровень зараженности, от 10.2 до 76.2% (табл. 1), в 1989–1997 гг. в Москве было заражено только 3.5% – 6.7% имаго *A. bipunctata* (Захаров, Эйдельберг, 1997; Webberley *et al.*, 2004). Увеличилось географическое распространение *C. hippodamiae* и в Европе. Ранее было обнаружено, что *C. hippodamiae* широко распространены в Центральной, Южной и Восточной Европе, но отсутствовали в северных и северо-западных популяциях *A. bipunctata* (Захаров, Эйдельберг, 1997; Webberley *et al.*, 2006). Позднее, *C. hippodamiae* были обнаружены среди *H. axyridis* в Польше (Rhule *et al.*, 2010). В популяции инвазивного вида божьих коровок *H. axyridis* в Нидерландах, *C. hippodamiae* не были обнаружены в 2003–2007, однако начиная с 2008 г. *C. hippodamiae* встречаются среди зимующих жуков *H. axyridis* (Raak-van den Berg *et al.*, 2014). Возможно, что на распространение и распространение *C. hippodamiae*, так же как и многих насекомых, влияет повышение среднегодовых температур.

Заражение кокцинелл клещами *C. hippodamiae* постепенно приводит к бесплодию самок-хозяев. Отложенные инфицированными самками яйца приобретают характерный сморщенный вид и высыхают в течение суток после откладки. Предполагается, что заражение клещами препятствует образованию хориона *A. bipunctata* и это приводит к сморщиванию яиц (Hurst *et al.*, 1995). В экспериментах было показано, что жизнеспособность яиц, откладываемых хозяевами *A. bipunctata* (Hurst *et al.*, 1995), *A. decempunctata* и *O. conglobata* (Webberley *et al.*, 2004), *H. axyridis* (Rhule *et al.*, 2010) заметно снижалась по мере развития клещевой инфекции. Наши результаты также показали, что сразу после заражения клещами большинство яиц, отложенных зараженной клещами самкой, оставалась оплодотворенными. Однако доля вылупившихся яиц начинала уменьшаться примерно

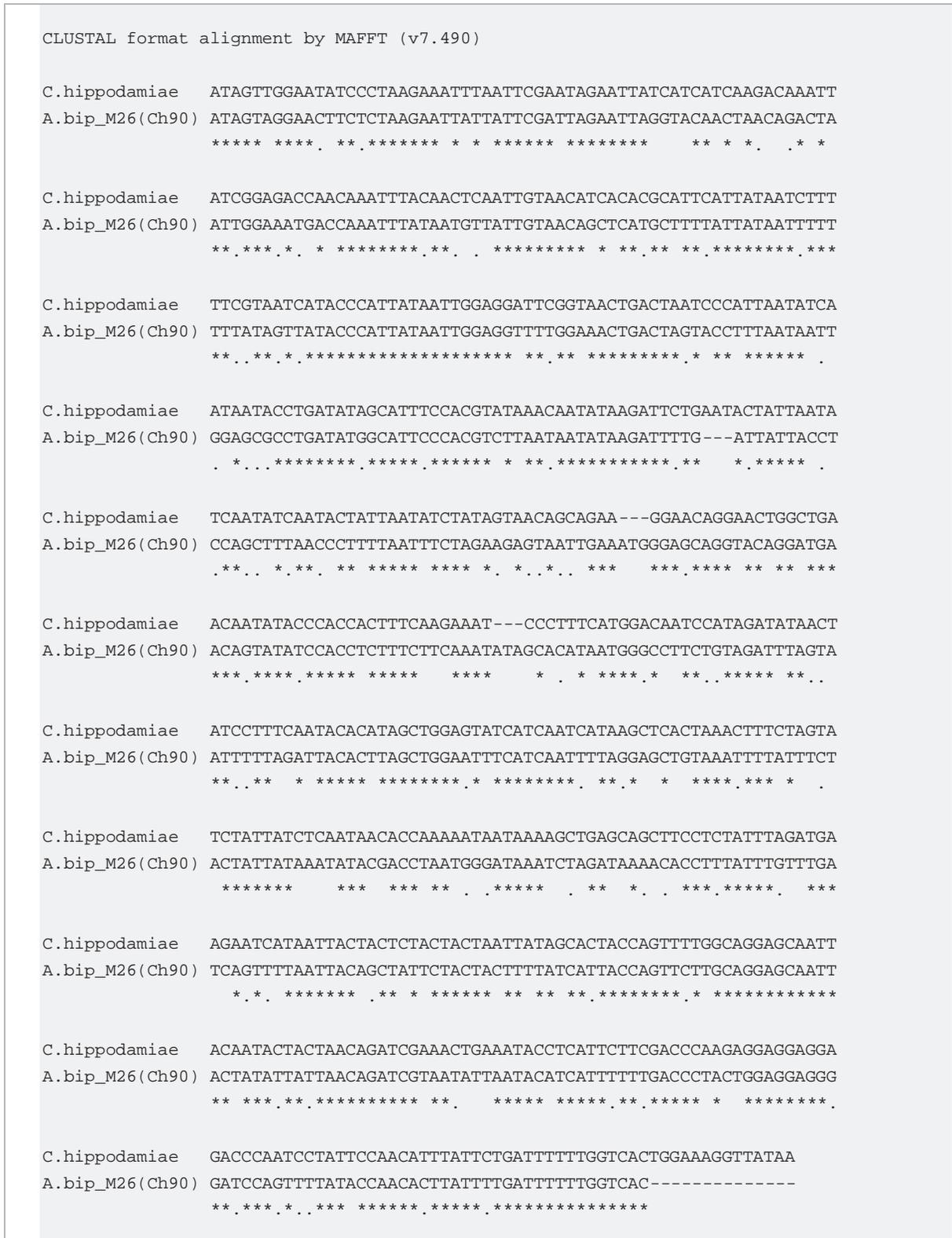


Рис. 3. Сравнение последовательностей генов *cox1* клеща *Coccipolipus hippodamiae* и *Adalia bipunctata*.

через 10 дней после заражения. Аналогичные результаты получены и в других исследованиях — снижение доли вылупившихся яиц на 10–15 день что, как правило, приводило к стерильности самок через три недели после заражения (Hurst *et al.*, 1995; Webberley *et al.*, 2004). В экспериментах на *H. axyridis* было показано, что в первые 5 дней после заражения клещами частота выхода личинок из яиц больше 70%, примерно на 19-й день происходит резкое снижение вылупляемости, на 30-й день частота вылупления в среднем составляет меньше 20% (Rhule *et al.*, 2010). Эти данные свидетельствуют о том, что заражение клещами снижает фертильность жуков, но не всегда приводит к абсолютной стерильности.

По нашим наблюдениям, заражение клещами самок *A. bipunctata* приводит к снижению фертильности, но не оказывает существенного влияния на продолжительность жизни жуков и на их способность к спариванию. Это также отмечали и другие исследователи (Webberley *et al.*, 2004; Hurst *et al.*, 1995). Таким образом, можно предполагать, что в отсутствие стрессовых условий клещи способны обитать под надкрыльями жуков продолжительное время и это дает возможность бактериальным симбионтам достигнуть высокой плотности.

Божьи коровки являются хозяевами трех наследственных симбиотических бактерий из рода *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*. Мы предположили, что эктопаразиты могут заражаться этими бактериями от жуков, что подтверждается результатами экспериментов и идентичностью секвенированных последовательностей генов бактерий *Wolbachia* и *Spiroplasma* из жуков-хозяев и их клещей. *Rickettsia* мы не обнаружили в сборах. Клещи заражаются, наследуют и сохраняют инфекцию как *Wolbachia*, так и *Spiroplasma* в поколениях при переходе подвижных нимф с первого жука-хозяина на других жуков. Мы наблюдали сохранение статуса инфицированности *Wolbachia* и *Spiroplasma* на протяжении, как минимум, трех жизненных циклов (поколений) *C. hippodamiae*.

Может ли клещ заразить самку божьей коровки микроорганизмом? Наши результаты показали, что божьи коровки из линий *A. bipunctata* и *A. decempunctata*, свободных от симбиотических бактерий, заражаются *Wolbachia* после укусов клещей. Нам не удалось обнаружить передачу *Wolbachia* потомству от этих жуков, так как их яйца оказались нежизнеспособны или сами жуки погибли, не отложив яиц. Однако, необходимо отметить, что фертильность яиц божьих коровок не всегда снижается до нуля. Кроме того, так как частота вылупления яиц снижается после заражения клещами постепенно, зараженная клещами самка успевает произвести потомство, пусть и не такое многочисленное в сравнении со здоровыми самками.

Также, самки кокцинеллид могут выздоравливать при гибели колонии клещей (Hurst *et al.*, 1995).

Эффективность распространения бактериальных симбионтов среди насекомых зависит от плотности и приспособленности эндосимбионтов внутри хозяев. Так, симбионты, вызывающие цитоплазматическую несовместимость, достигают, как правило, высокой плотности в популяции хозяев за счет очевидного преимущества зараженных самок. Бактерии, вызывающие гибель самцов (андроцид), дают преимущества инфицированным самкам, уменьшая инбридинг и предоставляя им возможность избежать голода, питаясь неразвивающимися яйцами, из которых должны были выйти самцы. Однако, незараженные самки и самцы всегда присутствуют в популяции. Динамика распространенности эндосимбионтов, убивающих самцов, гораздо более чувствительна к изменениям в точности передачи и относительной приспособленности. В естественных популяциях симбионты, вызывающие андроцид, демонстрируют гораздо большую временную и пространственную изменчивость распространенности инфекции, чем эндосимбионты, вызывающие цитоплазматическую несовместимость. Тем не менее, по нашим данным, зараженности *Wolbachia* и *Spiroplasma* стабильно сохранялись и наследовались на протяжении трех поколений как жуков, так и клещей.

Могут ли клещи быть векторами горизонтального переноса бактерий в природе? Штаммы *Wolbachia*, идентичные по последовательностям пяти генов, были обнаружены в *A. bipunctata* wAbi-3 и *H. axyridis* kl-34 (Shaikevich *et al.*, 2021). Мы наблюдали как *H. axyridis* заражались *C. hippodamiae* при совместном содержании от *A. bipunctata* в условиях экспериментов. Переносчиком симбионта между такими далекими в филогенетическом отношении видами могут быть паразиты, в том числе и *C. hippodamiae*. Эктопаразитические клещи *C. hippodamiae* изучались ранее только в связи с возможностью их использования для контроля численности инвазивных хищных кокцинеллид *H. axyridis* (Rhule *et al.*, 2010; Riddick, 2010). В данной работе впервые была изучена зараженность клещей божьих коровок *C. hippodamiae* симбионтами от хозяев и доказана их способность распространять бактерий среди жуков-кокцинеллид.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено, что эктопаразитические клещи *C. hippodamiae* заражаются бактериями *Wolbachia* и *Spiroplasma* от хозяев и способны инфицировать жуков. Взаимоотношения бактериальных симбионтов *Wolbachia* и *Spiroplasma* с насекомыми-хозяевами варьируют от паразитизма до мутуализма. Длительное сосуществование симбиотических бактерий и их хозяев представ-

ляет широкие возможности не только для совместного использования метаболических путей, но также и для горизонтального переноса генов бактерий в геномы насекомых. В свою очередь, горизонтальный приток генов через эндосимбиоз является источником новых функций и может сыграть роль в эволюции и симбиотической адаптации хозяев. В некоторых случаях заражение новыми бактериальными симбионтами приводит к образованию репродуктивных барьеров и, в конечном счете, к видообразованию. Таким образом, исследования путей и способов горизонтальных переносов наследуемых симбиотических бактерий среди животных имеет большое значение как для изученного, так и для других сообществ.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00739.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горячева И.И., Блехман А.В., Андрианов Б.В., Горелова Т.В., Захаров И.А. Генотипическое разнообразие *Wolbachia pipientis* в нативных и инвазивных популяциях *Harmonia axyridis* Pall., 1773 (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетика. 2015. Т. 51. № 8. С. 857–863.
- Захаров И.А., Эйдельберг М.М. Паразитический клещ *Coccipolipus hypodamia* McDaniel et Morrill (Tarsonemina, Podapolipidae) в популяциях двуточечной коровки *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae) // Энтомологическое обозрение. 1997. Т. 76. № 3. С. 680–683.
- Захаров И.А., Шайкевич Е.В. Полиморфизм мтДНК в петербургской популяции *Adalia bipunctata* и его связь с зараженностью симбиотической бактерией *Spiroplasma* // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 1. С. 27–31.
- Романов Д.А., Матвейкина Е.А. *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) в г. Москве и г. Ялте: ее конкуренция с нативными видами кокциnellид и влияние паразитоидов на ее численность // Российский журн. биологических инвазий. 2021. № 4. С. 114–133.
- Шайкевич Е.В., Захаров И.А., Хонек А. Экологическая генетика жуков рода *Adalia*: изменчивость и симбиотические бактерии в европейских популяциях десятиточечной божьей коровки *Adalia decempunctata* // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 4. С. 37–45.
- Шайкевич Е.В., Ившина Е.В., Захаров И.А. Полиморфизм митохондриальной ДНК и распространение цитоплазматических симбионтов в популяциях двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* // Генетика. 2012. Т. 48. № 5. С. 666–671.
- Эйдельберг М.М. Клещи семейства Podapolipidae (Heterostigmata, Tarsonemina) Украины и сопредельных территорий с описанием нового вида // Вестн. зоологии. 1994. № 1. С. 37–42.
- Ahmed M.Z., Breinholt J.W., Kawahara A.Y. Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths // BMC Evol. Biol. 2016. V. 16. P. 118.
- Baldo L., Ayoub N.A., Hayashi C.Y., Russell J.A., Stahlhut J.K., Werren J.H. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity // Mol Ecol. 2008. V. 17(2). P. 557–569.
- Brown A.N., Lloyd V.K. Evidence for horizontal transfer of *Wolbachia* by a *Drosophila* mite // Exp. Appl. Acarol. 2015. V. 63(3). P. 301–311.
- Ceryngier P., Roy H.E., Poland R.L. Natural enemies of ladybird beetles // In: Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae) / Ed. by Hodek I., van Emde H.F., Honek A. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. P. 375–443.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–299.
- Gerth M., Rötthe J., Bleidorn C. Tracing horizontal *Wolbachia* movements among bees (Anthophila): A combined approach using multilocus sequence typing data and host phylogeny // Molecular ecology. 2013. V. 22. <https://doi.org/10.1111/mec.12549>
- Goryacheva I., Blekhman A., Andrianov B., Zakharov I. Heritable bacterial endosymbionts in native and invasive populations of *Harmonia axyridis* // Biol. Invasions. 2017. V. 19. P. 493–502.
- Goryacheva I., Blekhman A., Andrianov B., Romanov D., Zakharov I. *Spiroplasma* infection in *Harmonia axyridis* – diversity and multiple infection // PLoS One. 2018. V. 13(5). e0198190.
- Hurst G.D.D., Sharpe R.G., Broomfield A.H., Walker L.E., Majerus T.M.O., Zakharov I.A., Majerus M.E.N. Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata* // Ecological Entomology. 1995. V. 20(3). P. 230–236.
- Ilinsky Y., Kosterin O.E. Molecular diversity of *Wolbachia* in Lepidoptera: prevalent allelic content and high recombination of MLST genes // Mol Phylogenet Evol. 2017. V. 109. P. 164–179.
- Jaenike J., Polak M., Fiskin A., Helou M., Minhas M. Interspecific transmission of endosymbiotic *Spiroplasma* by mites // Biol. Lett. 2007. V. 3(1). P. 23–25.
- Knell R.J., Webberley K.M. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour // Biological Reviews. 2004. V. 79(3). P. 557–581.
- Li H., Shu X., Meng L., Zhou X., Obrycki J.J., Li B. Prevalence in maternally-inherited bacteria in native and invasive populations of the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis* // Biol. Invasions. 2021. V. 23. P. 1461–1471.
- O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M., Karr T.L., Robertson H.M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89(7). P. 2699–2702.

- Osaka R., Watada M., Kageyama D., Nomura M. Detection of *Spiroplasma* from the mite *Macrocheles* sp. (Acari: Macrochelidae) ectoparasitic to the fly *Drosophila hydei* (Diptera; Drosophilidae): a possible route of horizontal transmission // *Symbiosis*. 2013. V. 60(2). P. 79–84.
- Pietri J.E., DeBruhl H., Sullivan W. The rich somatic life of *Wolbachia* // *MicrobiologyOpen*. 2016. V. 5(6). P. 923–936.
- Raak-van den Berg C.L., van Wielink P.S., de Jong P.W., Gort G., Haelewaters D., Helder J., van Lenteren J.C. Invasive alien species under attack: natural enemies of *Harmonia axyridis* in the Netherlands // *BioControl*. 2014. V. 59(2). P. 229–240.
- Rhule E.L., Majerus M.E.N., Jiggins F.M., Ware R.L. Potential role of the sexually transmitted mite *Coccipolipus hippodamiae* in controlling populations of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* // *Biological Control*. 2010. V. 53(2). P. 243–247.
- Riddick E.W. Ectoparasitic mite and fungus on an invasive lady beetle: parasite coexistence and influence on host survival // *Bulletin of Insectology*. 2010. V. 63(1). P. 13–20.
- Schulenburg J.H., Hurst G.D., Tetzlaff D., Booth G.E., Zakharov I.A., Majerus M.E. History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis // *Genetics*. 2002. V. 160. P. 1075–1086.
- Shaikevich E.V., Romanov D.A., Zakharov I.A. The diversity of *Wolbachia* in a single *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) population: correlations with host phylogeny and male-killing // *Symbiosis*. 2021. V. 85(2). P. 249–257.
- Shaikevich E.V., Zakharov I.A. Biodiversity in geographically remote natural populations of *Adalia* ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) // In: *Beetles: Biodiversity, Ecology and Role in the Environment* / Ed. by Stack C. Nova Science Publishers, Inc., 2015. P. 205–226.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Webberley K.M., Hurst G.D.D. The effect of aggregative overwintering on an insect sexually transmitted parasite system // *J. Parasitology*. 2002. V. 88(4). P. 707–712.
- Webberley K.M., Hurst G.D.D., Husband R.W., Schulenburg J.H.G.V.D., Sloggett J.J., Isham V., Buszko J., Majerus M.E.N. Host reproduction and a sexually transmitted disease: causes and consequences of *Coccipolipus hippodamiae* distribution on coccinellid beetles // *J. Animal Ecology*. 2004. V. 73(1). P. 1–10.
- Webberley K.M., Tinsley M.C., Sloggett J.J., Majerus M.E.N., Hurst G.D.D. Spatial variation in the incidence of a sexually transmitted parasite of the ladybird beetle *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) // *European J. Entomology*. 2006. V. 103(4). P. 793–797.
- Werren J.H., Zhang W., Guo L.R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods // *Proc. Biol. Sci.* 1995. V. 261(1360). P. 55–63.

## Exoparasitic Mites – Vectors of Bacterial Symbionts Among Insects

E. V. Shaikevich<sup>1, #</sup>, A. A. Gorbacheva<sup>1</sup>, and D. A. Romanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Gubkina str., 3, Moscow, 119333 Russia

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

Inherited endosymbiotic bacteria from the genera *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Spiroplasma* cause the death of male offspring in ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). As a rule, bacteria are transmitted through the cytoplasm of the mother's egg to offspring – vertically. In addition to vertical transfer, there is increasing evidence of horizontal transfer of symbionts between unrelated insect taxa. Insect parasites such as mites can be potential vectors of endosymbiotic bacteria. The parasitic mite *Coccipolipus hippodamiae* (McDaniel & Morrill, 1969) (Acarina: Podapolipidae) occurs in natural populations of Coccinellidae. In this work, the ability of *C. hippodamiae* to become infected with *Wolbachia* and *Spiroplasma* from hosts and to spread bacteria among coccinellid beetles was proven for the first time.

**Keywords:** intracellular symbiotic bacteria, horizontal transfer, insects

УДК 581.8+582.717.4

## АНАТОМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИСТА, СТЕБЛЯ И КОРНЯ ГОРТЕНЗИИ ДРЕВОВИДНОЙ (*HYDRANGEA ARBORESCENS* L.)

© 2023 г. Ф. К. Мурзабулатова\*, К. А. Пупыкина\*\*, Е. В. Красюк\*\*, Н. В. Полякова\*, @, З. Х. Шигапов\*

\*Южно-Уральский ботанический сад-институт – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, ул. Менделеева, д. 195, корп. 3, Уфа, 450080 Россия

\*\*Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования “Башкирский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Ленина, 3, Уфа, 450008 Россия

@E-mail: bloomerang11@gmail.com

Поступила в редакцию 17.01.2022 г.

После доработки 23.08.2022 г.

Принята к публикации 19.09.2022 г.

Актуальность исследования обусловлена недостаточной изученностью биологических особенностей гортензий. Целью исследований стало выявление анатомо-диагностических признаков, а также химического состава гортензии древовидной (*Hydrangea arborescens* L.) коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института УФИЦ РАН. В результате исследований установлено, что диагностически значимыми признаками листа данного вида гортензии являются строение клеток эпидермиса верхней и нижней стороны листа, наличие аномоцитного устьичного аппарата с нижней стороны листа, кристаллические включения оксалата кальция в виде рафидов с верхней и нижней стороны листа и простые волоски с грубо бородавчатой поверхностью, многоклеточным основанием, а также простые извилистые волоски с нижней стороны листа. Фитохимический анализ листьев, стеблей и корней подтвердил наличие в них кумаринов, аскорбиновой кислоты и дубильных веществ, а в листьях – флавоноидов. Установлено, что наибольшее содержание аскорбиновой кислоты ( $0.28 \pm 0.014\%$ ) и дубильных веществ ( $7.13 \pm 0.639\%$ ) наблюдается в листьях гортензии древовидной, кумаринов в пересчете на умбеллиферон – в корнях ( $0.41 \pm 0.007\%$ ), а содержание флавоноидов в листьях составило  $1.14 \pm 0.048\%$ .

**Ключевые слова:** гортензия древовидная, *Hydrangea arborescens* L., лист, стебель, корень, анатомия, кумарины, аскорбиновая кислота, дубильные вещества, флавоноиды

**DOI:** 10.31857/S1026347023700130, **EDN:** MULVYW

Гортензии (*Hydrangeaceae* Dumort.) – листопадные, иногда вьющиеся кустарники, редко деревья, с отслаивающейся корой, очередными, черешковыми листьями и щитковидными или метельчатыми соцветиями (Сааков, 1959; Reed, Rinehart, 2009). По последним данным, род включает около 200 видов (Карпун, 2005), распространенных преимущественно в умеренных, редко субтропических областях северного полушария (Русанов, 1955; Тахтаджян, 1987; Маляровская, 2011a). На территории Российской Федерации в естественных условиях произрастают 2 вида гортензии – метельчатая (*Hydrangea paniculata* Siebold) и черешковая (*Hydrangea petiolaris* Siebold et Zucc.) (Пилипенко, 1954; Путенихин, 2007).

Гортензии очень популярны в декоративном садоводстве, где ценятся за крупные красивые со-

цветия и продолжительный период цветения (Lancaster, Wesley, 2008; Conolly *et al.*, 2010; Коркуленко, 2012). Несмотря на высокую популярность и большое видовое разнообразие рода, некоторые биологические особенности гортензий пока остаются недостаточно изученными. В литературе имеются отрывочные данные по изучению начальных этапов индивидуального развития (Мазуренко, Хохряков, 1977; Мурзабулатова и др., 2021), микрореклонального и вегетативного размножения (Ахметова, Пирогова, 2016; Ахметова, Молканова, 2019), зимостойкости и фенологии гортензий в различных климатических зонах (Малюгин, 1981; Мартынов, 2009; Мурзабулатова и др., 2018). Наиболее полное описание морфологии гортензий дано в работах А. Редера (Rehder, 1940), Ф.С. Пилипенко (1954) и Е. Макклинток (McClintock, 1957). Что

касается анатомических исследований, то в одних случаях в литературе приводится подробное описание анатомии отдельных видов, в других – отдельных частей растений (Solreder, 1908; Burkett, 1931; Цырендоржиева, 2006; Маляровская, 2011б; Нехайченко и др., 2014; Манджиголадзе и др., 2016; Бойко, 2020). Кроме того, данных по изучению анатомического строения корней гортензий в литературе нет. Новейших публикаций по изучению морфологии гортензий также крайне мало (Кокшеева, Нехайченко, 2021).

Химический состав гортензии древовидной до конца не изучен и требует детальной доработки. По литературным данным, в растительном сырье гортензий содержатся следующие соединения: кумарины (умбеллиферон, гидрангетин); флавоноиды (кверцетин, лютеолин, кемпферол, цианидин, рутин); в семенах – алкалоид фебрифунгин; горькие гликозиды; витамины, сапонины, углеводы, эфирные масла (Растительные ресурсы СССР., 1987; Манджиголадзе и др., 2016; Манджиголадзе и др., 2019; Манджиголадзе, Кузнецова, 2021).

Гортензия древовидная не входит в Государственную Фармакопею и не используется в официальной медицине, однако, данный вид нашел широкое применение в народной медицине и гомеопатии. В лекарственных целях в качестве сырья используют листья, цветки и корни. Корни гортензии древовидной оказывают умеренное ранозаживляющее, мочегонное, противовоспалительное, противомикробное действие, способствует выведению токсинов из организма через почки (Манджиголадзе и др., 2016).

Для полного представления о систематике видов необходимы комплексные данные по изучению морфологии и анатомии всех частей растения. Данные по химическому составу различных частей растения позволяют дать научное обоснование применению данного вида в лекарственных и других целях. В связи с этим в задачи наших исследований входило изучить анатомическое строение листьев, стеблей и корней гортензии древовидной из коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института Уфимского федерального исследовательского центра РАН, а также провести исследования по изучению химического состава биологически активных веществ в надземных и подземных частях растения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования служили образцы сырья гортензии древовидной из коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института (ЮУБСИ).

**Гортензия древовидная** (*Hydrangea arborescens* L.) – листопадный кустарник; листья яйцевидные или эллиптические, на вершине остроконечные или

удлиненно-заостренные, с округлым или сердцевидным основанием, зубчатые, голые, реже снизу покрыты мелкими волосками. Стебли прямостоячие, округлые, ребристые, облиственные, светло-зеленого цвета, листорасположение супротивное. Корневая система мочковатая. Соцветие щитковидное, 5–15 см в диаметре; стерильные цветки белые, крупные, фертильные – мелкие, невзрачные, лепестки быстро опадающие. Семенная коробочка раскрывающаяся; семена мелкие, яйцевидно-эллипсоидальные. Область естественного распространения – Северная Америка. Коллекционные растения данного вида выращены из семян, полученных в 2006 г. из Ботанического сада г. Вакратот (Венгрия). Сбор образцов проведен в период цветения 20.07.2019 г.

Микроскопическое исследование образцов проводили на временных микропрепаратах, приготовленных по методике, приведенной в Государственной фармакопее ([http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_2/HTML/516/index.html#zoom=z.](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/516/index.html#zoom=z.)).

Корни предварительно замачивали в спирто-глицериновой смеси (1 : 1), стебли и листья кипятили в 5% растворе натрия гидроксида. Продольные и поперечные срезы стебля и корня окрашивали раствором флороглюцина с концентрированной хлористоводородной кислотой для выделения механических элементов тканей. Фотографии микропрепаратов выполнены с помощью микроскопа Микромед С-1 LED.

Определение содержания *кумаринов* в сырье гортензии древовидной проводили спектрофотометрическим методом: 1.0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия 1 мм, помещали в колбу вместимостью 50 мл, заливали 20 мл 96% спирта этилового, и экстрагировали 30 минут еще четыре раза, добавляя по 10 мл 96% спирта этилового, указанным выше способом. Спиртовые извлечения объединяли, и выпаривали до объема 5 мл. Далее полученное извлечение наносили на хроматографическую пластинку “*Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ*”, размером 15 × 15 см, высушивали на воздухе и помещали в камеру со смесью растворителей “бензол-этилацетат (2 : 1)”. Хроматографирование проводили восходящим способом. Когда фронт растворителей прошел около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимали из камеры, обрабатывали 5% спиртовым раствором калия гидроксида, высушивали при температуре 100–105°C 3–5 мин и просматривали в УФ-свете. Окрашенную зону сорбента вырезали, счищали, помещали в центрифужные пробирки на 10 мл, заливали 5 мл хлороформа и центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин, отделяли надосадочную жидкость и получали исследуемый раствор. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны

324 нм в кювете с толщиной слоя 10 см. В качестве раствора сравнения использовали хлороформ. Содержание суммы кумаринов в пересчете на умбеллиферон в абсолютно сухом сырье в процентах ( $X$ ) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times 5 \times 5 \times 100}{955.47m \times 0.05(100 - W)},$$

где:

$D$  – оптическая плотность исследуемого раствора;

955.47 – удельный показатель поглощения умбеллиферона в спирте этиловом при длине волны 324 нм;

$m$  – навеска сырья (г);

$W$  – потеря в массе при высушивании (%).

Определение содержания *аскорбиновой кислоты* проводили титриметрическим методом по методике, приведенной в Государственной фармакопее ([http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_2/HTML/516/index.html#zoom=z](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/516/index.html#zoom=z)), основанной на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия.

Определение содержания *дубильных веществ* проводили титриметрическим методом по методике, приведенной в Государственной фармакопее ([http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_2/HTML/516/index.html#zoom=z](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/516/index.html#zoom=z)), основанной на окислении дубильных веществ перманганата калия в кислой среде в присутствии индикатора и катализатора индигосульфокислоты.

Определение содержания *флавоноидов* проводили методом дифференциальной спектрофотометрии при добавлении комплексообразующей добавки – спиртового раствора алюминия хлорида и при аналитической длине волны 410 нм: 1.0 г (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия 1 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 100 мл 50% спирта этилового и взвешивали с точностью до  $\pm 0.01$  г. Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивали, доводили ее содержимое спиртом 50% до первоначальной массы, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр (исследуемый раствор А). 2.0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и 1 мл 3% уксусной кислоты, доводили объем раствора 70% спиртом этиловым до метки и перемешивали (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора Б измеряли через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл исследуемого раствора А, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30%, доведенный 70% спиртом

этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно, в тех же условиях, измеряли оптическую плотность раствора комплекса стандартного образца (СО) рутина с алюминия хлоридом: в две мерные колбы вместимостью 25 мл помещали по 2.0 мл раствора СО рутина, в одну колбу прибавляли 2 мл 5% спиртового раствора хлорида алюминия в 95% спирте, а в другую – 1 мл 3% уксусной кислоты и доводили соответствующим спиртом до метки, перемешивали и через 30 мин измеряли оптическую плотность.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах ( $X$ ) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{Aa_0 \times 100 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{A_0 a \times 100 \times 25 \times 2(100 - W)} = \frac{Aa_0 \times 100 \times 100}{A_0 a \times 2(100 - W)},$$

где

$A$  – оптическая плотность раствора Б исследуемого раствора;

$A_0$  – оптическая плотность раствора Б СО рутина;

$a$  – навеска сырья, г;

$a_0$  – навеска СО рутина, г;

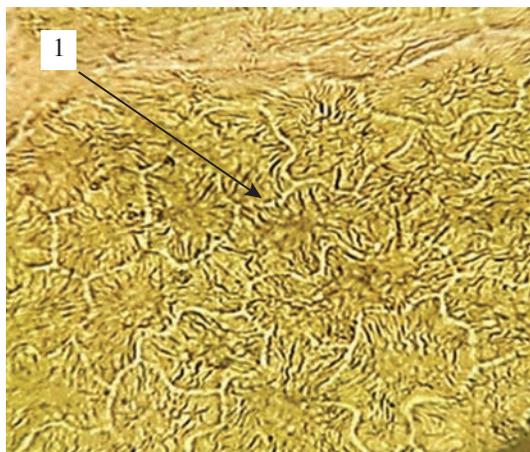
$W$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с применением программ “Excel 7.0”, “Statistica 5.0”, “Statistica 6.0” с использованием критерия Стьюдента ([http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_2/HTML/516/index.html#zoom=z](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/516/index.html#zoom=z)).

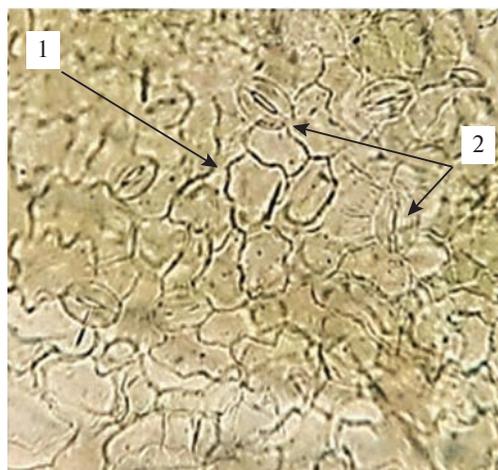
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Анатомическое строение листа, стебля и корня Hydrangea arborescens*

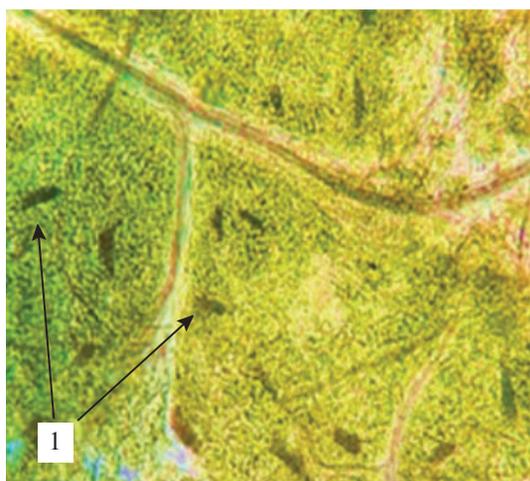
**Лист.** Микроскопический анализ листьев гортензии древовидной показал, что верхний эпидермис листовой пластинки состоит из многоугольных клеток, стенки которых слегка утолщены, нижний эпидермис представлен извилистыми клетками (рис. 1). Ранее другими авторами (Манджиголадзе и др., 2016) также указывалось, что строение верхней и нижней эпидермы листа гортензии древовидной различается. Устьичный аппарат аномоцитного типа (устьице окружено несколькими клетками), находится на нижней стороне листовой пластинки (рис. 2). На нижней и верхней стороне листовой пластинки расположены включения оксалата кальция в виде игольчатых кристаллов-рафидов, которые располагаются по всей поверхности листовой пластинки (рис. 3). Для гортензии древовидной характерно наличие одноклеточных



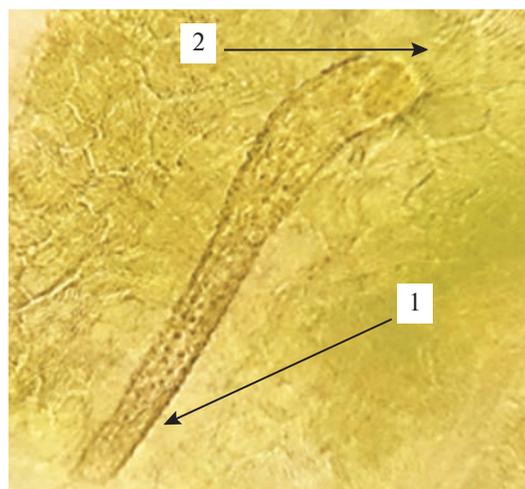
**Рис. 1.** Верхний эпидермис листа гортензии древовидной ( $\times 100$ ): 1 – многоугольные клетки со слегка утолщенными стенками.



**Рис. 2.** Нижний эпидермис листа гортензии древовидной ( $\times 100$ ): 1 – извилистые клетки эпидермиса; 2 – устьица аномального типа.



**Рис. 3.** Верхний эпидермис листа гортензии древовидной, включения ( $\times 100$ ): 1 – кристаллические включения в виде игольчатых кристаллов-рафидов.



**Рис. 4.** Нижний эпидермис листа гортензии древовидной ( $\times 100$ ): 1 – простой бородавчатый волосок, 2 – многоклеточное основание, образующее розетку.

волосков с грубо бородавчатой поверхностью, образующие на месте прикрепления розетку из шести клеток, а также изогнутых простых волосков. Волоски располагаются вдоль жилки (рис. 4, 5). По данным Т.Ю. Манджиголадзе с соавторами (2016), кроющие волоски являются выростами клеток эпидермиса. У других видов гортензии волосков подобного строения на листьях не обнаружено. Например, у гортензии метельчатой (*Hydrangea paniculata* Siebold) отмечаются одноклеточные хоботообразные волоски с шипиками по всей поверхности (Нехайченко и др., 2014).

**Стебель.** На поперечном срезе стебля гортензии древовидной отмечается вторичное строение, пучковый тип, открытые коллатеральные пучки,

кора и центральный цилиндр. Кора состоит из покровной ткани – эпидермы, колленхимы и клеток паренхимы. В работе Т.Ю. Манджиголадзе с соавторами (2016) уточняется, что кора стебля гортензии древовидной состоит из уголкового колленхимы, хлоренхимы (овальные клетки с хлоропластами) и столбчатых одревесневших клеток паренхимы. Центральный цилиндр состоит из элементов флоэмы, слоя камбия, вторичной и первичной ксилемы, клеток паренхимы сердцевины (рис. 6).

**Корень.** Литературных данных по изучению анатомического строения корня гортензии древовидной нами не найдено. По нашим исследованиям, строение корня – вторичное, кора состоит



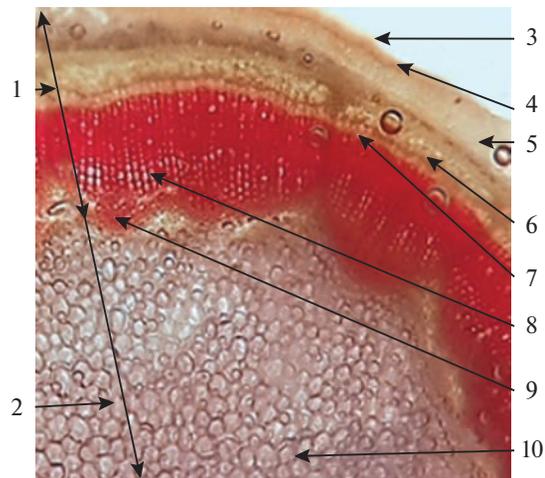
**Рис. 5.** Нижний эпидермис листа гортензии древовидной ( $\times 100$ ): 1 – простые изогнутые волоски, 2 – кристаллические включения оксалата кальция в виде игольчатых кристаллов-рафидов.

из покровной ткани, представленной перидермой и клетками паренхимы. Центральный цилиндр состоит из элементов проводящей системы, представленной вторичной флоэмой, первичной и вторичной ксилемой, разделенных камбием, а также содержит сердцевинные лучи (рис. 7).

Анатомическое строение стебля и корня гортензии древовидной характеризуется как типичное для древесных растений, никаких особенностей в процессе изучения не выявлено.

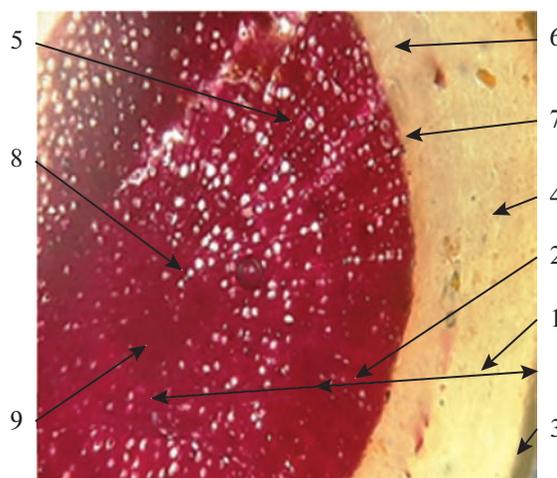
**Содержание биологически активных веществ в *Hydrangea arborescens*.** Анализ литературы показал, что в предыдущих фитохимических исследованиях сырья гортензии древовидной были задействованы, в основном, качественные методы, позволяющие обнаружить наличие тех или иных биологически активных веществ в различных частях растения (Манджиголадзе и др., 2016, 2019; Манджиголадзе, Кузнецова, 2021). Литературных данных по количественному составу сырья практически нет, за исключением работы Т.Ю. Манджиголадзе и Л.С. Кузнецовой (2021), где определено содержание флавоноидов в пересчете на рутин в лекарственной форме – гранулах с экстрактом жидким гортензии древовидной. Наши исследования, которым посвящена данная работа, направлены на определение количества биологически активных веществ в листьях, стеблях и корнях гортензии древовидной.

**Кумарины.** Для исследования содержания кумаринов в сырье гортензии древовидной использовали методику спектрометрического определения. Из исследуемого сырья получали спиртовые вытяжки, далее растворы наносили на пластинки и хроматографировали восходящим способом в



**Рис. 6.** Поперечный срез стебля, вторичное строение стебля, пучкового типа ( $\times 100$ ): 1 – кора, 2 – центральный цилиндр, 3 – эпидерма, 4 – колленхима, 5 – паренхима, 6 – флоэма, 7 – камбий, 8 – вторичная ксилема, 9 – первичная ксилема, 10 – паренхима сердцевины.

системе растворителей, полученные пятна счищали и растворяли в хлороформе. Полученные растворы спектрофотометрировали при длине волны 324 нм (рис. 8). Содержание суммы кумаринов определяли в пересчете на умбеллиферон. Результаты исследования количественного содержания кумаринов представлены в табл. 1. Проведенный анализ показал, что в корнях содержание кумаринов в пересчете на умбеллиферон составляет  $0.41 \pm 0.007\%$ , стеблях –  $0.25 \pm 0.002\%$ , в листьях –  $0.22 \pm 0.002\%$ . Наибольшее содержание



**Рис. 7.** Поперечный срез корня, вторичное строение ( $\times 100$ ): 1 – кора, 2 – центральный цилиндр, 3 – перидерма, 4 – паренхима, 5 – сердцевинный луч, 6 – вторичная флоэма, 7 – камбий, 8 – вторичная ксилема, 9 – первичная ксилема.

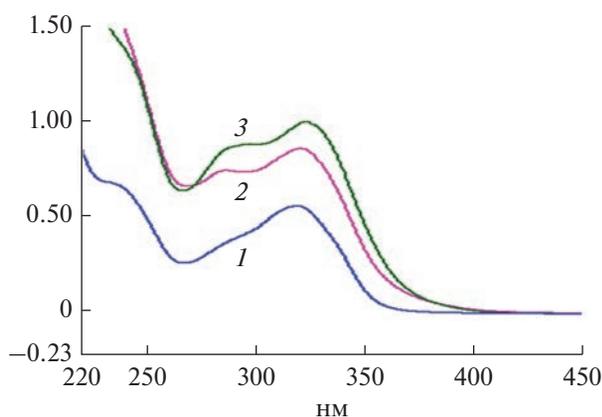


Рис. 8. Спектры хлороформных извлечений гортензии при  $\lambda_{\text{max}} = 324$  нм: 1 – листья; 2 – стебли, 3 – корни.

кумаринов наблюдается в корнях гортензии древовидной.

Метрологическая характеристика методики количественного определения кумаринов в сырье гортензии древовидной показала, что при трех независимых выборках ошибка среднего результата листьев не превышает 4.88%, стеблей – 5.12%, корней – 4.92%.

**Аскорбиновая кислота.** Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты проводили методом окислительно-восстановительного титрования. В качестве титранта использовали 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия. В точке эквивалентности наблюдали изменение окраски раствора в розовый цвет за счет восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия в кислой среде. Результаты определения количества аскорбиновой кислоты представлены в табл. 2.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что наибольшее содержание аскорбиновой кислоты наблюдали в листьях –  $0.28 \pm 0.014\%$ , наименьшее в корнях –  $0.20 \pm 0.014\%$ .

Количественное определение аскорбиновой кислоты в сырье гортензии древовидной показало, что при трех независимых выборках ошибка среднего результата приблизительно одинакова и не превышает 5.33% в листьях, 5.85% в стеблях и 6.84% в корнях.

**Дубильные вещества.** Определение содержания дубильных веществ проводили титриметрическим методом окислительно-восстановительного титрования раствором калия перманганата (0.02 моль/л) в присутствии индикатора индигосульфокислоты до золотисто-желтого окрашивания. Результаты определения представлены в табл. 3.

Проведенный анализ показал, что наибольшее содержание дубильных веществ наблюдается в листьях  $7.13 \pm 0.639\%$ , наименьшее в корнях –  $0.50 \pm 0.048\%$ .

Метрологическая характеристика методики количественного определения дубильных веществ в сырье гортензии древовидной показала, что при трех независимых выборках ошибка среднего результата листьев не превышает 8.96%, стеблей – 8.13%, корней – 9.63%.

**Флавоноиды.** Проведенные предварительно хроматографические и денситометрические методы исследования показали, что корни и стебли не содержат флавоноидов, поэтому количественное определение данной группы биологически активных веществ проводили только в листьях. Для количественного определения флавоноидов в листьях гортензии древовидной использовали метод, основанный на образовании комплекса флавоноидов со спиртовым раствором алюминия

Таблица 1. Результаты определения кумаринов в сырье гортензии древовидной

Сырье	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>X</i>	$X_{\text{cp}}$	$S_x$	<i>P</i> , %	<i>t</i> ( <i>P</i> , <i>f</i> )	$\Delta X$	$\epsilon$ , %
Листья	1	2	0.235	0.22	0.0028	95	4.30	0.0023	4.88
	2		0.200						
	3		0.225						
Стебли	1	2	0.245	0.25	0.010	95	4.30	0.0028	5.12
	2		0.253						
	3		0.243						
Корни	1	2	0.412	0.41	0.009	95	4.30	0.0079	4.92
	2		0.398						
	3		0.405						

Примечание: *n* – число измерений; *f* – число степеней свободы ( $f = n - 1$ ); *X* – показатель содержания кумаринов для каждого измерения;  $X_{\text{cp}}$  – среднее значения содержания кумаринов для трех измерений;  $S_x$  – стандартное отклонение; *P* – доверительная вероятность (95%); *t* (*P*, *f*) – критерий Стьюдента;  $\Delta X$  – доверительный интервал;  $\epsilon$ , % – относительная ошибка. Для табл. 1–4.

**Таблица 2.** Результаты определения аскорбиновой кислоты в сырье гортензии древовидной

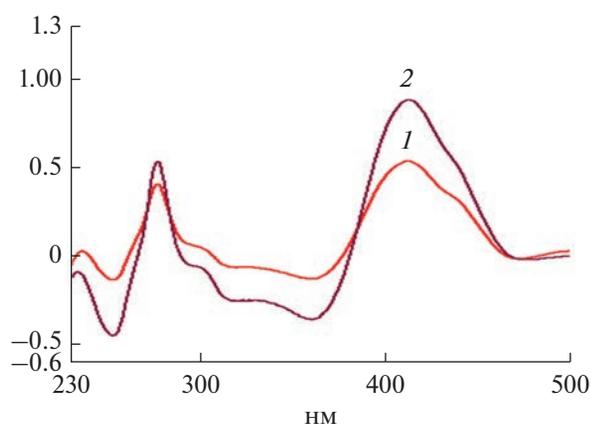
Сырье	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>X</i>	<i>X</i> <sub>ср</sub>	<i>S</i> <sub><i>x</i></sub>	<i>P</i> , %	<i>t</i> ( <i>P</i> , <i>f</i> )	$\Delta X$	$\epsilon$ , %
Листья	1	2	0.272	0.28	0.0034	95	4.30	0.0147	5.33
	2		0.299						
	3		0.258						
Стебли	1	2	0.233	0.24	0.0032	95	4.30	0.014	5.85
	2		0.240						
	3		0.247						
Корни	1	2	0.210	0.20	0.0032	95	4.30	0.013	6.84
	2		0.196						
	3		0.205						

**Таблица 3.** Результаты определения дубильных веществ в сырье гортензии древовидной

Сырье	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>X</i>	<i>X</i> <sub>ср</sub>	<i>S</i> <sub><i>x</i></sub>	<i>P</i> , %	<i>t</i> ( <i>P</i> , <i>f</i> )	$\Delta X$	$\epsilon$ , %
Листья	1	2	7.578	7.13	0.1486	95	4.30	0.639	8.96
	2		7.132						
	3		6.988						
Стебли	1	2	3.106	2.66	0.0503	95	4.30	0.216	8.13
	2		2.662						
	3		2.319						
Корни	1	2	0.220	0.50	0.0111	95	4.30	0.048	9.63
	2		0.650						
	3		0.421						

**Таблица 4.** Результаты определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях гортензии древовидной

Сырье	<i>n</i>	<i>f</i>	<i>X</i>	<i>X</i> <sub>ср</sub>	<i>S</i> <sub><i>x</i></sub>	<i>P</i> , %	<i>t</i> ( <i>P</i> , <i>f</i> )	$\Delta X$	$\epsilon$ , %
Листья	1	2	1.102	1.14	0.0113	95	4.30	0.048	4.31
	2		1.119						
	3		1.115						



**Рис. 9.** Дифференциальные спектры спиртовых извлечений из листьев гортензии древовидной (1) и СО рутина (2)  $\lambda_{\text{max}} = 410$  нм.

хлорида(III) и наличием характерных максимумов поглощения. При измерении оптической плотности исследуемого раствора в области 410 нм наблюдался максимум поглощения, который совпадал с максимумом поглощения стандартного образца раствора рутина с алюминия хлоридом (рис. 9). Результаты определения представлены в табл. 4. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило  $1.14 \pm 0.048\%$ . Как указывалось выше, в литературе есть данные по определению суммы флавоноидов в пересчете на рутин в лекарственном препарате – гранулах с жидким экстрактом гортензии древовидной (Манджиголадзе, Кузнецова, 2021). Там эта сумма составила 0.0225%.

Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в листьях гортензии древовидной показала, что при

трех независимых выборках ошибка среднего результата листьев не превышает 4.31%.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анатомическом изучении листа, стебля и корня гортензии древовидной выявлены диагностически значимые признаки, позволяющие отличать данный вид гортензии от других, а именно: для верхней стороны листовой пластинки гортензии древовидной характерны многоугольные утолщенные клетки эпидермиса, для нижней стороны листа — извилисто-стенный эпидермис, аномоцитный тип устьичного аппарата, простые волоски с грубо бородавчатой поверхностью и многоклеточным основанием, простые извилистые волоски, а также как с верхней, так и с нижней стороны листа — наличие включений оксалата кальция в виде игольчатых кристаллов-рафидов. В анатомическом строении стебля и корня у данного вида нет особенностей, структура их имеет черты, характерные для древесных растений.

Фитохимическое изучение листа, стебля и корня гортензии древовидной позволило установить присутствие кумаринов, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ, а в листьях — флавоноидов. Наибольшее содержание аскорбиновой кислоты ( $0.28 \pm 0.014\%$ ), дубильных веществ ( $7.13 \pm 0.639\%$ ) наблюдается в листьях гортензии древовидной, а содержание кумаринов в пересчете на умбеллиферон в корнях —  $0.41 \pm 0.007\%$ . Содержание рутина в листьях гортензии древовидной составило  $1.14 \pm 0.048\%$ .

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахметова Л.Р., Молканова О.И. Особенности клонального микроразмножения представителей *Hydrangea macrophylla* Thunb // Научный альманах. 2019. № 1–3(51). С. 119–122.
- Ахметова Л.Р., Пирогова К.И. Особенности размножения коллекции гортензии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева // Вестник ландшафтной архитектуры. 2016. С. 6–10.
- Бойко В.И. Внутренняя структура однолетнего стебля гортензии крупнолистной // Актуальные проблемы лесного комплекса: сб. науч. трудов / Под общ. ред. Е.А. Памфилова. Брянск: БГИТУ, 2020. Вып. 56. С. 107–110.
- Государственная фармакопея. Издание XIV. Том II. Методы анализа растительного лекарственного сырья. Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. [http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_2/HTML/516/index.html#zoom=z](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/516/index.html#zoom=z).
- Карпун Ю.Н. Декоративная дендрология Северного Кавказа. С-Пб: БИН, 2005. 391с.
- Кокшеева И.М., Нехайченко Д.В. Модульная структура соцветий двух видов рода *Hydrangea* L // Изв. РАН. Серия биол. 2021. № 1. С. 44–54.
- Коркуленко О.М. Біоекологічні особливості видів роду *Hydrangea* L. та перспективи їх використання в озелененні м. Києва: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Київ. 2012. 22 с.
- Мазуренко М.Т., Хохряков А.П. Структура и морфогенез кустарников. М.: Наука, 1977. 159 с.
- Малюгин И.Е. Интродукция гортензии в Донбассе // Растительные ресурсы. 1981. Т. 17. Вып. 2. С. 263–266.
- Маляровская В.И. Изменчивость морфо-анатомических признаков листьев *Hydrangea macrophylla* в зависимости от условий местообитания // Субтропическое и декоративное садоводство. 2011б. № 45. С. 225–229.
- Маляровская В.И. Историко-систематический обзор представителей рода *Hydrangea* // Вестник ИрГСХА. 2011а. № 44–8. С. 75–79.
- Манджиголодзе Т.Ю., Романцова Н.А., Арчинова Т.Ю., Елисеева Л.М., Шукина А.Н. Морфолого-анатомический и фитохимический анализ гортензии древовидной травы // Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии. Матер. всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной памяти выдающегося ученого, засл. деят. науки РФ, д. ф. н., проф. И.А. Муравьева. 2016. С. 74–81.
- Манджиголодзе Т.Ю., Арчинова Т.Ю., Кузнецова Л.С., Кузнецов В.А. Исследования по разработке ресурсосберегающей технологии гортензии древовидной травы экстракта жидкого // Журн. науч. ст. Здоровье и образование в XXI в. 2019. Т. 21. № 2. С. 21–24.
- Манджиголодзе Т.Ю., Кузнецова Л.С. Разработка состава, технологии и анализ гранул с гортензии древовидной экстрактом жидким // Медико-фармацевтический журн. “Пульс”. 2021. Т. 23. № 1. С. 28–33.
- Мартынов Л.Г. Интродукция гортензии метельчатой формы крупноцветковой (*Hydrangea paniculata* f. *Grandiflora* Siebold) в Республике Коми // Вестник Института Биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. 2009. № 2. С. 11–14.
- Мурзабулатова Ф.К., Полякова Н.В., Жигунов О.Ю. Интегральная оценка перспективности интродукции гортензий в Башкирском Предуралье. // Аграрная Россия. 2018. № 8. С. 12–15.
- Мурзабулатова Ф.К., Шигапов З.Х., Полякова Н.В. Начальные этапы онтогенеза представителей рода *Hydrangea* L. в условиях культуры // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 2. С. 137–145.
- Нехайченко Д.В., Кокшеева И.М., Кислов Д.Е. Изменчивость эпидермальных структур листа *Hydrangea paniculata* (Hydrangeaceae) в условиях культуры // Вестник КрасГАУ. 2014. № 12. С. 52–57.
- Пилипенко Ф.С. Род 5. Гортензия — *Hydrangea* L. // Деревья и кустарники СССР. М.—Л., 1954. Т. 3. С. 162–172.
- Путенихин В.П. Дендрология с основами декоративного садоводства: Ч. 2. Учебное пособие. Уфа: РИЦ БашГУ, 2007. 242 с.

- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hydrangeaceae – Haloragaceae.* Л.: Наука, 1987. 326 с.
- Русанов Ф.Н. Деревья и кустарники Ботанического сада Академии Наук Узбекской ССР. Североамериканские деревья и кустарники. Ч 1. Ташкент: Изд. Акад. Наук УзССР, 1955. С. 33–34.
- Сааков С.Г. Гортензии. Перово: Изд-во Мин. ком. хоз. РСФСР, 1959. 20 с.
- Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. Л.: Наука, 1987. 439 с.
- Цырендоржиева О.Ж. Анатомия стебля лиан Сахалина и Курил: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Бурятский государственный университет. Улан-Удэ, 2006.
- Burkett G.W. Anatomical studies within the genus *Hydrangea* // Proc. Ind. Acad. Sci. 1931. V. 41. P. 83–96.
- Conolly N.B., Bassuk N.L., MacRae Jr. P.F. Response of five *Hydrangea* species to foliar salt spray // J. Environ. Hort. 2010. V. 28. № 3. P. 125–128.
- Lancaster N., Wesley W. *Hydrangea paniculate* // RHS Plant Trials Bulletin. 2008. V. 2. P. 2–15.
- McClintock E. *Hydrangeas* // The National Horticultural Magazine. 1957. V. 36. № 3. P. 270–280.
- Reed S.M., Rinehart T.A. Simple-sequence repeat marker analysis of genetic relationships within *Hydrangea paniculate* // HortScience. 2009. V. 44. № 1. P. 27–31.
- Rehder A. Manual of cultivated trees and shrubs. 1940. MacMillan Pub Co. Reprint of 2nd Revised edition. P. 285–291. MacMillan Pub Co; 2nd Revised edition
- Solreder H. Systematics Anatomy of the Dicotyledons. The Clarendon Press. 1908. Oxford. London. P. 58–67.

## Anatomical Structure and Phytochemical Analysis of the Leaf, Stem and Root of *Hydrangea* Tree (*Hydrangea arborescens* L.)

F. K. Murzabulatova<sup>1</sup>, K. A. Pupykina<sup>2</sup>, E. V. Krasnyuk<sup>2</sup>, N. V. Polyakova<sup>1, #</sup>, and Z. Kh. Shigapov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Ural Botanical Garden-Institute – a separate structural unit of the Federal State Budget Scientific Institution Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Mendeleeva street, the house 195, building 3, Ufa, 450080 Russia

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Institution of Higher Education “Bashkir State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, st. Lenina, 3, Ufa, 450008 Russia

#e-mail: bloomerang11@gmail.com

The relevance of the study is due to insufficient knowledge of the biological characteristics of hydrangeas. The aim of the research was to identify the anatomical and diagnostic features, as well as the chemical composition of the arborescent hydrangea (*Hydrangea arborescens* L.) from the collection of the South Ural Botanical Garden-Institute of the Ural Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. As a result of the research, it was found that the diagnostically significant features of the leaf of this type of hydrangea are the structure of the cells of the epidermis of the upper and lower sides of the leaf, the presence of an anomocytic stomatal apparatus on the lower side of the leaf, crystalline inclusions of calcium oxalate in the form of raphids on the upper and lower sides of the leaf, and simple hairs with coarse warty surface, multicellular base, as well as simple sinuous hairs on the underside of the leaf. Phytochemical analysis of leaves, stems and roots confirmed the presence of coumarins, ascorbic acid and tannins in them, and flavonoids in leaves. It has been established that the highest content of ascorbic acid ( $0.28 \pm 0.014\%$ ) and tannins ( $7.13 \pm 0.639\%$ ) is observed in the leaves of *Hydrangea arborescens*, coumarins in terms of umbelliferone in the roots ( $0.41 \pm 0.007\%$ ), and the content of flavonoids in the leaves was  $1.14 \pm 0.048\%$ .

**Keywords:** *Hydrangea arborescens* L., leaf, stem, root, anatomy, coumarins, ascorbic acid, tannins, flavonoids

## ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ РАЗНОГО СПЕКТРА НА РАЗВИТИЕ САЛАТА ЛИСТОВОГО (*LACTUCA SATIVA*)

© 2023 г. О. В. Наконечная\*, @, А. С. Холин\*\*, Е. П. Субботин\*\*,  
Е. В. Бурковская\*, Ю. А. Хроленко\*, И. В. Гафицкая\*, И. Ю. Орловская\*,  
М. Л. Бурдуковский\*, А. В. Михеева\*, Ю. Н. Кульчин\*\*

\*Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,  
просп. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022 Россия

\*\*Институт автоматизации и процессов управления Дальневосточного отделения  
Российской академии наук, Владивосток Россия

@E-mail: markelova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Исследовано влияние 5 спектров светодиодных (СД) светильников на растения *L. sativa* сорта “Афицион”, выращиваемых в условиях закрытого почвогрунта. Для контроля использовали теплый белый свет WW (соотношение долей синего, зеленого и красного света – 14% : 48% : 38%). Максимальные значения размеров листьев и сырой массы надземной части выявлены у группы RGB (сине-зеленый-красный – 32% : 19% : 49%), по значениям сухой массы и золы – у группы FS (сине-зеленый-красный 27% : 11% : 62%). Плотность распределения устьиц и их размер на нижней стороне листа была максимальной у растений SB (сине-зеленый-красный 33% : 41% : 38%). Это наиболее эффективное сочетание параметров в плане архитектоники листа. Увеличение доли красного света в спектре при снижении доли зеленого света положительно влияет на развитие растений *L. sativa*, в то же время увеличение доли зеленого света в спектре положительно отражается на формировании устьичного аппарата.

**Ключевые слова:** *Lactuca sativa*, спектр света, устьичный аппарат, светодиоды

**DOI:** 10.31857/S1026347022600406, **EDN:** MIAMUV

Интенсивность и спектральный состав света являются факторами, регулируемыми как ростовые, так и фотосинтетические реакции в системе целого растения (Протасова, 1987; Frąszczak, Kula–Maximenko, 2021). Понимание процессов передачи сигналов и формирование адаптационного ответа позволит выработать механизмы управления потенциалом развития растений. Интерес к тематике возрастает при выращивании сельскохозяйственных культур. Одной из них является салат (*Lactuca sativa* L.). В растении присутствуют полиненасыщенные жирные кислоты, которые важны для здоровья человека (Kaur *et al.*, 2014). Основными жирными кислотами в салате являются  $\alpha$ -линоленовая кислота и линолевая кислота, составляющие 60 и 20% от общего количества жирных кислот, соответственно (Le Guedard *et al.*, 2008). Кроме того, в листьях содержатся такие элементы как Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (Kawashima, Soares, 2003; Моц, 2005; Koudela and Petříková, 2008; Baslam *et al.*, 2013), витамин С, Е, В<sub>9</sub> (Kim *et al.*, 2016), каротиноиды (Моц, 2005) и др. Наличие

клетчатки в растениях салата при употреблении в пищу способствует снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, развития рака толстой кишки (Kim *et al.*, 2016; Shimokawa *et al.*, 2014).

Исследования влияния спектров света и интенсивности на разные сорта салата начались в конце прошлого столетия. К настоящему времени механизмы воздействия света изучены более чем на 40 сортах. Было определено, что в зависимости от сорта реакция растений на разный спектр не всегда была одинаковой – изменялся синтез веществ или параметры роста (Hunter, Burritt, 2004; Caldwell, Britz, 2006; Stutte *et al.*, 2009; Shimokawa *et al.*, 2014; Bantis *et al.*, 2016).

При изучении влияния красного света (R, 660 нм) на развитие проростков салата выявлено сильное вытягивание растений. Добавление синих фотонов (B, 435–470 нм) к красному спектру привело к минимальному удлинению гипокотилей и черешков листьев (Hoenecke *et al.*, 1992). Инги-

бирующее действие на рост побегов салата при использовании синего света и стимулирующее процессы развития у красного света подтверждено позднее (Hunter, Burritt, 2004). При постоянном воздействии увеличение доли синего света способствует изменению фотосинтетических характеристик и росту из-за стимулирования морфологических и физиологических реакций (Wang *et al.*, 2016). Синие светодиоды (440 нм) регулируют метаболические пути, ведущие к увеличению концентрации антиоксидантов в тканях листьев салата (Stutte *et al.*, 2009).

Определенное влияние на развитие растений оказывает ультрафиолет. Показано, что дополнительное УФ-облучение увеличивало концентрацию каротиноидов и хлорофилла в зеленом листовом салате, одновременно снижая уровни этих соединений в красном листовом салате (Caldwell, Britz, 2006). Добавление 1% ультрафиолета привело к увеличению показателей общей массы, соотношению корень/побег и общему содержанию фенола (Han *et al.*, 2017).

Исследовано сочетание спектров света разных длин волн. Так, чередование красного и синего света значительно ускоряло рост растений салата и увеличивало накопление сырой массы в 1.6 раза, чем при одновременном облучении, и почти в два раза – при флуоресцентном освещении (Shimokawa *et al.*, 2014). Аналогичные результаты были получены при использовании четырех режимов освещения с различными интервалами свечения красного (R) и синего (B) света (Chen *et al.*, 2017). Было показано, что спектры R/V (8 ч) и R/V (1 ч) привели к более высокой урожайности, в то время как R/V (4 ч) и R/V (2 ч) дали более высокую питательную ценность по сравнению с растениями, выращенными под постоянным RB светом (Chen *et al.*, 2017).

Изучение влияния зеленого света на рост растений салата рассмотрено в нескольких работах (Kim *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c, 2005, 2006; Johkan *et al.*, 2012; Мишанов и др., 2015). Авторы использовали зеленые светодиоды с разной длиной волны (G510, G520, G530) и интенсивности (плотность потока фотонов в видимом спектре (ППФ) – 100 и 300). Развитие растений, культивируемых под G510 при ППФ 300, было самым интенсивным (Johkan *et al.*, 2012). Изменение доли зеленого света в спектре может влиять на морфометрические показатели в растениях салата (Kim *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c; Мишанов и др., 2015).

Несмотря на разнообразные исследования по влиянию спектров на развитие салата, формирование адаптационных реакций у растений остается в полной мере не изучено. Кроме того оптимизация режимов освещения для получения максимальных

морфометрических показателей растений при сохранении качества продукции актуальна. Цель данной работы – выявление морфофизиологического отклика растений салата (*Lactuca sativa*) сорта “Афицион” при их развитии в условиях применения светодиодных источников полихромных спектров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали салат (*Lactuca sativa*) сорта “Афицион”. Семена для эксперимента предоставлены ФГУП “Дальневосточное” Суражским тепличным комбинатом. Для культивирования растений использовали пластиковые контейнеры объемом 10 см<sup>3</sup> и почвогрунт “Универсальный” с содержанием элементов: азот – 160–240 мг/л, фосфор – 145–215 мг/л, калий – 180–290 мг/л, магний – 135 мг/л, гуминовые вещества – 35 мг/л, pH водного раствора – 5.5–7 (ООО “Терра мастер”, Новосибирск).

Через 3 дня после посева пластиковые контейнеры (КВ9М 0.5 л, ООО “Джетта”, Россия) с проросшими семенами поместили в боксы экспериментальной установки, расположенной в Лазерном центре Института автоматизации и процессов управления Дальневосточного отделения Российской академии наук (ЛЦ ИАПУ ДВО РАН). Установка представляла собой 5 боксов, обтянутых внутри светоотражающим материалом, в верхней части которых располагали светодиодные (СД) светильники с разными спектрами освещения (рис. 1, табл. 1). Специализированные источники света были сконструированы и изготовлены в ИАПУ ДВО РАН. В источниках света применялись матрицы с набором светодиодов фирмы Chanzon (China) мощностью 3 Вт и силой тока 700 мА каждый. Светильник со спектром теплого белого света с цветовой температурой 3500К (WW) использовали как контроль. ППФ составляла 150 мкмоль/с м<sup>2</sup>. Для создания одинакового уровня освещенности подбирали мощность излучения каждого светильника с помощью световых драйверов (EUM-150S105DG, Китай). Уровень освещенности контролировали спектрофотометром “ТКА-Спектр” (НТП “ТКА”, Россия). В боксах поддерживали температуру 21°C днем и 18°C ночью, влажность воздуха 75%, световой режим 16/8. Продолжительность экспериментов составила 35 сут. Эксперимент проводили в трех повторностях.

По завершению эксперимента у 20 растений из каждого бокса измерены: число листьев, длина и ширина первых трех листьев в розетке, сырая и сухая массы надземной части растения и корней. Для определения процента золы (зольности) использовали общую навеску из всех исследованных растений в каждом эксперименте. После сушки в

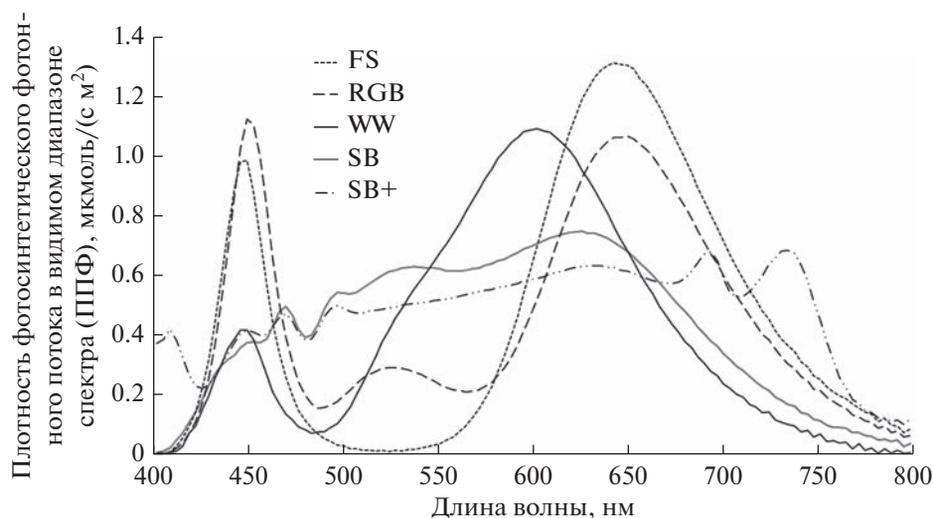


Рис. 1. Сводные спектры излучения источников света с одинаковой облученностью 150 мкмоль/с м<sup>2</sup>.

электрошкафу (СНОЛ–3,5.5.3,5/3,5–И5, Россия) образцы измельчали в лабораторной зерновой мельнице (ЛЗМ–1, Россия) и озоляли в муфельной печи (ЭКПС–10, Россия) при 450°C в течение 8 ч.

Изучение устьиц листьев проводилось на препаратах, приготовленных согласно общепринятым методикам с некоторыми модификациями применительно к данному объекту (Khrolenko *et al.*, 2012). Слепки эпидермы просматривали и фотографировали под микроскопом AxioScop-40 с помощью встроенной видеокамеры AxioCam HRC (Zeiss,

Germany). Длину замыкающих клеток устьиц и их число на условную единицу площади (1 см<sup>2</sup>) на обеих сторонах листовой пластинки определяли в 50-кратной повторности для каждого экземпляра, выращенного при различных световых режимах. Подсчет проводили на микрофотографиях, полученных с препаратов слепков эпидермы листа, при помощи программы Axio Vision версии 4.8.3. (для регистрации, обработки и анализа изображений). Область подсчета числа устьиц ограничивали площадью круга  $S = \pi r^2$  с радиусом  $r = 178.46 \mu\text{m}$ .

Таблица 1. Спектральные характеристики источников света

Параметр	Единица измерения	Тип светильника				
		WW	SB	RGB	FS	SB+
Максимальная облученность в диапазоне длин волн	$E_{e\max}$ (мВт/м <sup>2</sup> )	219	145	301	264	123
Общая ФАР облученность (400–700 нм)	$E_e$ (PAR) (Вт/м <sup>2</sup> )	31	33	32	32	33
	PPFD (мкмоль/с м <sup>2</sup> )	150	155	153	154	152
	%	100	100	100	100	100
	Спектральная облученность / PPFD					
Синий (400–500 нм)	$E_e$ (PAR) (Вт/м <sup>2</sup> )	5	8	10	9	10
	PPFD (мкмоль/с м <sup>2</sup> )	17	33	39	32	38
	%	14	25	32	27	31
Зеленый (500–600 нм)	$E_e$ (PAR) (Вт/м <sup>2</sup> )	15	14	6	3	11
	PPFD (мкмоль/с м <sup>2</sup> )	70	63	29	16	53
	%	48	41	19	11	35
Красный (600–700 нм)	$E_e$ (PAR) (Вт/м <sup>2</sup> )	12	11	16	20	11
	PPFD (мкмоль/с м <sup>2</sup> )	63	59	86	107	61
	%	38	33	49	62	34

**Таблица 2.** Морфометрические параметры растений *Lactuca sativa*, выращенного при разных условиях светодиодного освещения

	WW	SB	RGB	FS	SB+
Число листьев, шт	6.24 ± 0.20	6.41 ± 0.33	6.61 ± 0.30	6.29 ± 0.34	5.5 ± 0.15**
Сырая масса надземной части, г	1.98 ± 0.24	2.54 ± 0.33	3.73 ± 0.59*	3.47 ± 0.45**	1.88 ± 0.21
Сырая масса корней, г	0.49 ± 0.36	0.36 ± 0.07	0.36 ± 0.07	0.41 ± 0.08	0.13 ± 0.02
Соотношение корней к общей массе растения, %	8.18 ± 0.48	16.12 ± 1.27	9.51 ± 0.57	11.44 ± 1.07	7.54 ± 0.49
Сухая масса надземной части, г	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02*	0.15 ± 0.02**	0.19 ± 0.03**	0.07 ± 0.01
Сухая масса корней, г	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.004**	0.02 ± 0.003**	0.02 ± 0.004**	0.01 ± 0.001
Зола, %	82.713	84.530	82.739	89.583	82.217

Примечание. \* – достоверность  $P < 0.05$  по отношению к контролю; \*\* – достоверность  $P < 0.01$  по отношению к контролю.

При заданных условиях значения равнялись  $n \times 10^3/\text{см}^2$ .

Все полученные результаты обработаны статистически с использованием пакета “Statistica” версии 13.3. Диаграммы построены на основе средних арифметических значений измеренных параметров со стандартной ошибкой. Сравнение средних данных для растений разных вариантов с контролем проводили попарно, используя  $t$ -критерий Стьюдента. Критический уровень значимости принимали равным 0.05.

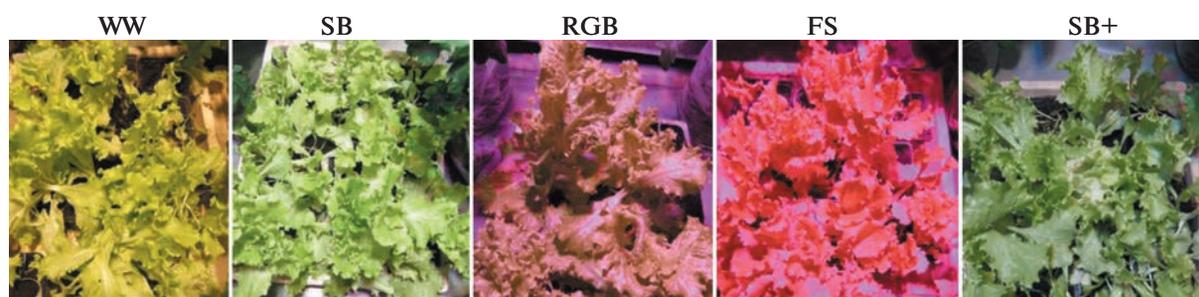
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внешний вид растений и значения морфометрических параметров растений приведены в табл. 2 и на рис. 2 и 3. При анализе полученных результатов выявлена тенденция к увеличению размеров и числа листьев в розетках у растений группы RGB. Наименьшее значение числа листьев отмечено в группе SB+. Первый лист был достоверно длиннее у растений групп RGB, FS и SB+, по длине и шире – у групп SB, RGB и FS (рис. 3). По длине второго и третьего листа достоверных отличий нет. По ширине второго листа значимые различия вы-

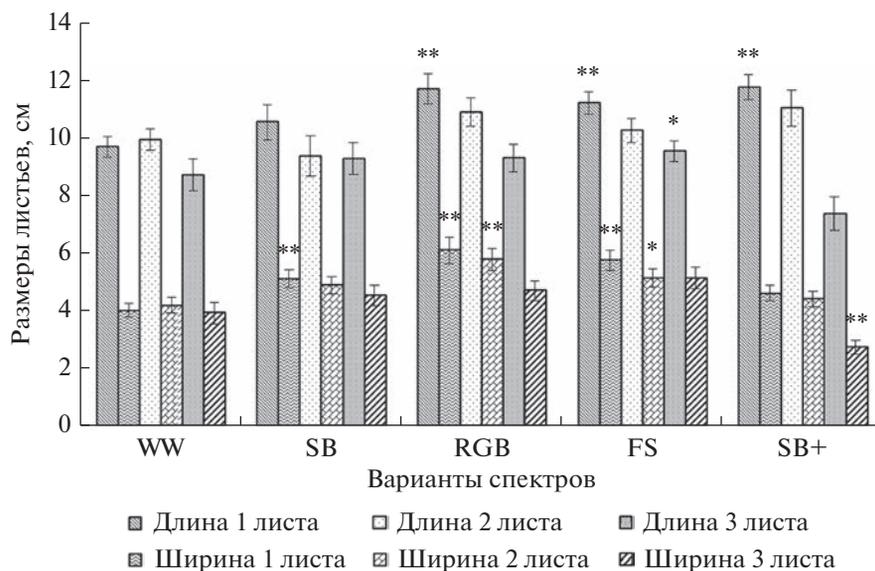
явлены у растений RGB и FS групп по сравнению с контролем (рис. 3). Достоверно меньше была ширина третьего листа у растений группы SB+ (рис. 3).

Максимальные значения показателей сырой массы надземной части отмечены у растений группы RGB (табл. 2), минимальные – у растений SB+ и контрольной (WW) групп. В то же время сырая масса корней больше у растений контроля, однако, значимых отличий от растений других групп не выявлено. Растения группы FS характеризовались близкими к максимальным значениями сырой массы надземной части, и максимальными значениями сухой массы надземной части и корней, золы. Минимальные значения параметров отмечены у растений групп SB+ и WW (контроль).

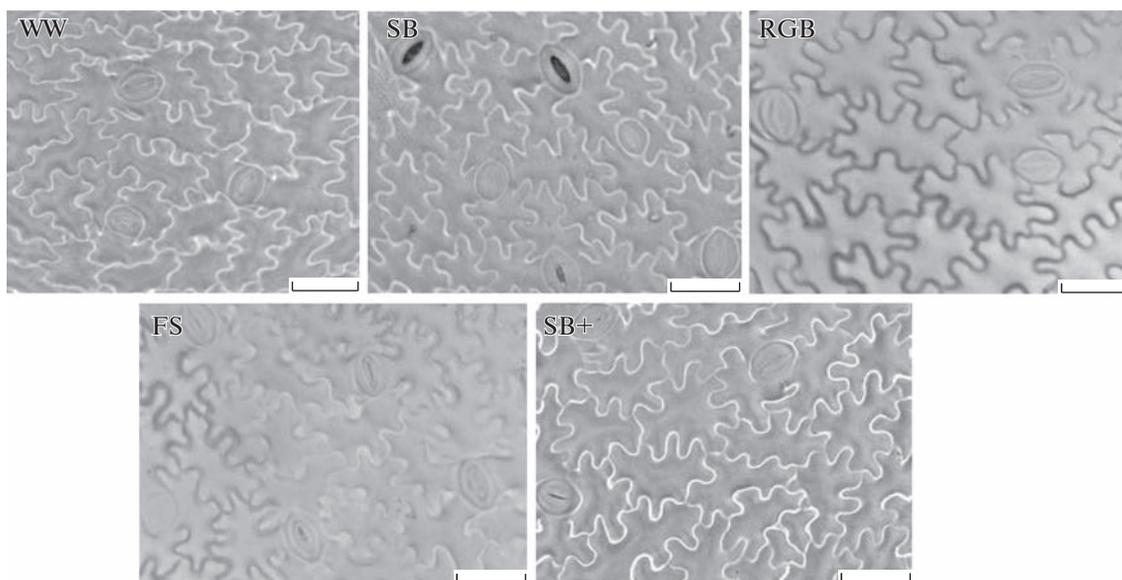
Установлено, что листья *L. sativa* дорзовентральные, амфистоматные, тип устьиц аномоцитный. Крупноклеточная нижняя эпидерма однослойная, с извилистыми антиклинальными стенками (рис. 4). Количественные показатели устьичного аппарата листа растений салата, выращенных при разных режимах полихроматического светодиодного освещения, представлены на рис. 5.



**Рис. 2.** Растения *Lactuca sativa* сорт “Афицион” после 35 дней роста при разном освещении.



**Рис. 3.** Размеры листьев растений *Lactuca sativa*, выращенного при разных условиях светодиодного освещения. \* – достоверность  $P < 0.05$  по отношению к контролю; \*\* – достоверность  $P < 0.01$  по отношению к контролю.

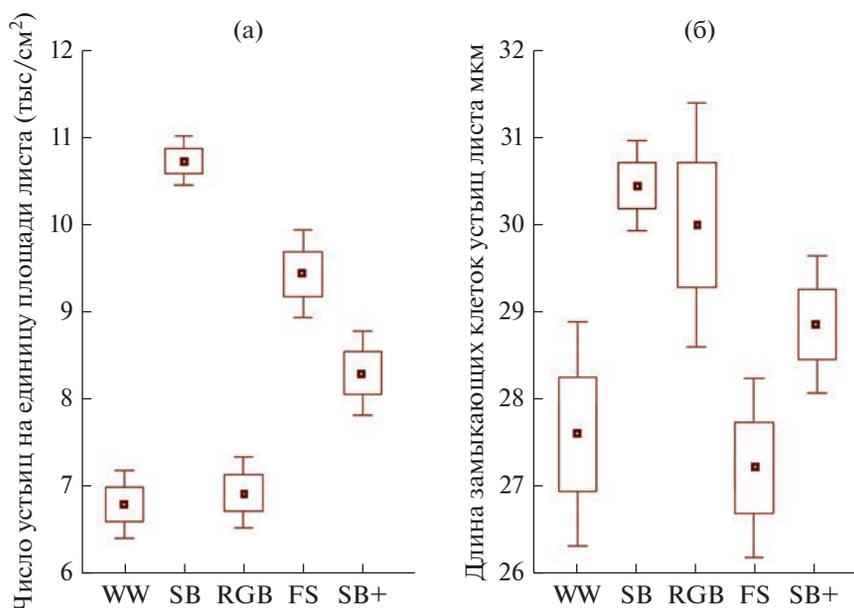


**Рис. 4.** Строение нижнего эпидермиса *Lactuca sativa*, выращенного при разных условиях светодиодного освещения. Масштабная линейка 50 мкм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Спектры света, при которых у растений наблюдали наибольшие значения исследованных морфометрических показателей (число, длина и ширина листьев, сырая и сухая массы надземной части и корней), содержат наибольшую долю красного света (49% у RGB спектра, 62% – у FS) и наименьшую долю зеленого света (19% у RGB спектра, 11% у FS). Минимальные значения морфометрических параметров отмечены у растений

групп SB+ и WW (контроль). Форма спектра светильника SB+ способствовала вытягиванию листьев растений, что в свою очередь повлияло на минимальное накопление массы у растений *L. sativa* и меньший процент золы, полученный с данной экспериментальной пробы. У спектров SB+ и WW доли красного света меньше, чем у RGB и FS, и составляют (34% у SB+, 38% у WW), а доли зеленого света выше – 35 и 48% соответственно. Так, для выращивания растений салата сорта “Афици-



**Рис. 5.** Изменение количественных параметров устьиц нижнего эпидермиса *Lactuca sativa*, выращенного при разных условиях светодиодного освещения: а – число устьиц на единицу площади листа (тыс./см<sup>2</sup>); б – длина замыкающих клеток устьиц листа, мкм; □ – среднее значение; □ – среднее значение ± SE; I – среднее значение ± 1.96 SE. Варианты освещения: WW – теплый белый; SB – солнечный спектр; RGB – красный-зеленый-синий; FS – красно-синий, SB+ – измененный солнечный спектр.

он” доля зеленого в спектре, вероятно, должна быть до 20%, а доля красного в два раза больше.

Аналогичные результаты были получены ранее (Kim *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c; Мишанов и др., 2015). Так при изучении влияния двух спектров выявлено, что изменение соотношения зеленого и красного света в спектре излучателя в сторону уменьшения зеленого ведет к увеличению накопления сухого и органического веществ в растениях *L. sativa* (Мишанов и др., 2015). Американскими учеными (Kim *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c) при выращивании растений *L. sativa* “Waldmann’s Green” под светодиодами с красным, синим и зеленым светом было выявлено, что 24% зеленого света в спектре способствовали получению более высоких показателей сырой и сухой массы и большей площади листьев, чем у растений, выращенных под люминесцентными лампами со спектром холодного белого (CWF, 51% зеленого) или флуоресцентного синего (0% зеленого) света. Избыток (86%) зеленого света в спектре привел к получению наименьшей массы растений. Позднее те же авторы показали, что источники света, имеющие в спектре более 50% зеленого, вызывают снижение скорости роста растений, тогда как комбинации, включающие до 24% зеленого, ускоряют рост (Kim *et al.*, 2005, 2006).

Наиболее узкие листья отмечены в группе контроля (WW). В этом спектре доля синего света минимальна и составляет 14%, в то время как во всех

других спектрах его доля выше – 26–32% (табл. 1). Ранее при изучении влияния синего в сравнении с красным светом высокой интенсивности (500 и 1000 ммоль/с м<sup>2</sup>) выявлено, что изменение доли синего света (от 0 до 6%) способствовало увеличению площади листьев. Данный факт авторы объясняли увеличением размеров клеток в 3.1 раза и частоты деления клеток в 1.6 раза (Dougher, Bugbee, 2004).

Спектральный состав света влияет на фотосинтез и проводимость устьиц. Так было показано, что скорость фотосинтеза листьев и проводимость устьиц были выше у растений, выращенных под белыми флуоресцентными лампами (CWF), чем у растений, выращенных под красными светодиодами с дополнительным синим светом или без него (Yorio *et al.*, 2001).

В нашем эксперименте при исследовании устьичного аппарата листьев выявлено, что суммарная поверхностная плотность распределения устьиц на единицу площади листа находилась в пределах от 12 тыс./см<sup>2</sup> (SB+) до 19 тыс./см<sup>2</sup> (SB). Эти значения попадают в диапазон, характерный для сциофитных растений – типичных представителей подлеска. Это также встречается у мезофитных и хозяйственно-ценных видов растений, как нами было показано ранее (Наконечная и др., 2022).

В данной работе выявлено статистически достоверное ( $p < 0.01$ ) увеличение поверхностной плотности распределения устьиц на нижней стороне листа у SB, SB+ и FS вариантов (рис. 5а). У растений RGB группы изменение по этому показателю статистически не достоверно по сравнению с контролем. Подобные результаты были получены китайскими авторами. При культивировании микрорастений картофеля под светом FL (Fluorescent white light) наблюдали увеличение плотности распределения устьиц на нижней стороне листа (Ma *et al.*, 2015). У листьев растений салата (*Lactuca sativa* L.), выращенных при соотношении красного и синего спектра (R/B = 1) значительно увеличилась поверхностная плотность распределения устьиц при небольшом уменьшении размеров самих устьиц и, как следствие, эти растения имели самую высокую скорость фотосинтеза (Wang *et al.*, 2016).

Размеры замыкающих клеток устьиц у групп SB+ и FS соответствовали контролю (различия не достоверны) или немного были выше такового. Интересен тот факт, что самые крупные устьица в опыте наблюдали у образцов SB варианта (различия с контролем достоверны  $p < 0.01$ ) (рис. 5б) при наибольшей плотности распределения устьиц на листе. Это, вопреки ожидаемому, не подтверждает известную для растений закономерность — наличие отрицательной корреляции между длиной замыкающих клеток устьиц и их числом (Jones *et al.*, 1987). Однако сочетание параметров устьичного аппарата, как выявлено у группы растений SB, является наиболее эффективным с точки зрения архитектоники фотосинтезирующего листа.

Сопrotивление диффузии газа в лист складывается из устьичного и мезофильного сопротивлений. Устьичное сопротивление определяется такими факторами как степень открытия устьиц, число устьиц на единицу площади листа и др. Увеличение поверхностной плотности распределения устьиц должно позволить растениям в условиях достаточного увлажнения усилить проводимость газообмена листа и, таким образом, избежать ограничения фотосинтеза (Мокронос, Гавриленко, 1992). В литературе нет четких доказательств корреляции между определенными спектрами и параметрами устьиц растений. Так японские авторы установили, что под влиянием синего спектра увеличивается поверхностная плотность распределения устьиц микрорастений разных сортов винограда, а изменение размеров замыкающих клеток устьиц под этим спектром выявило сортовую специфичность (Poudel *et al.*, 2008). В то же время китайские авторы показали, что самая высокая плотность распределения устьиц на листе и самые крупные устьица у микрорасте-

ний хлопка были при обработке красным и синим спектром (Li *et al.*, 2010).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании влияния 5 спектров светодиодных светильников на морфологию растений *L. sativa* сорта “Афицион”, выращиваемых в условиях закрытого почвогрунта, выявлено, что доля света определенной длины волны, а также соотношение долей длин волн в спектре светильников, могут влиять на развитие растений. Для получения развитых растений *L. sativa* в спектре освещения доля зеленого света не должна быть выше 20%, доля красного — 50–60%, доля синего около — 30%. Увеличение доли зеленого и снижение доли синего света в спектре вызывает вытягивание растений. В результате проведенного исследования было выявлено, что влияние спектрального состава света SB+, SB и FS стимулировало образование устьиц. Закономерное уменьшение длины замыкающих клеток устьиц выявлено в тех же вариантах, за исключением SB, у которого наблюдали самые крупные устьица с максимальной плотностью распределения их на листе. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что растения вариантов SB+, SB и FS обладают наименьшей устьичной проводимостью, и, соответственно, потенциально более высоким уровнем фотосинтеза.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031000144-5), поддержана грантом Российской академии наук № 20-16-00016.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мишанов А.П., Маркова А.Е., Ракутько С.А., Бровцин В.Н., Ракутько Е.Н. Влияние соотношения долей зеленого и красного излучения на биометрические показатели салата // Сб. науч. трудов. ИАЭП. 2015. Вып. 87. С. 264–271.
- Мокронос А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М.: МГУ, 1992. 319 с.
- Наконечная О.В., Холин А.С., Субботин Е.П., Грищенко О.В., Бурковская Е.В., Хроленко Ю.А., Бурдуковский М.Л., Кульчин Ю.Н., Журавлев Ю.Н. Развитие растений томатов под светом различного спектрального состава // Физиол. раст. 2022. Т. 69. № 5. С. 472–479.
- Протасова Н.Н. Светокультура как способ выявления потенциальной продуктивности растений // Физиол. раст. 1987. Т. 34. № 4. С. 812–822.
- Bantis F., Ouzounis T., Radoglou K. Artificial LED lighting enhances growth characteristics and total phenolic content of *Ocimum basilicum*, but variably affects trans-plant success // Sci. Hortic. 2016. V. 198. P. 277–283.

- Baslam M., Morales F., Garmendia I., Goicoechea N.* Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads // *Sci. Hort.* 2013. V. 151. P. 103–111.
- Caldwell C.R., Britz S.J.* Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars // *J. Food Compos. Anal.* 2006. V. 19. № 6–7. P. 637–644.
- Chen X.L., Yang Q.C., Song W.P., Wang 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.
- Dougher T.A., Bugbee B.* Long-term blue light effects on the histology of lettuce and soybean leaves and stems // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2004. V. 129. № 4. P. 467–472.
- Frąszczak B., Kula-Maximenko M.* The preferences of different cultivars of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.) for the spectral composition of light // *Agronomy.* 2021. V. 11. № 6. P. 1211.
- Han T., Vaganov V., Cao S., Li Q., Ling L., Cheng X., Peng L., Zhang C., Yakovlev A.N., Zhong Y., Tu M.* Improving “color rendering” of LED lighting for the growth of lettuce // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 45944.
- Hoenecke M.E., Bula R.J., Tibbitts T.W.* Importance of ‘blue’ photon levels for lettuce seedlings grown under red-light-emitting diodes // *HortScience.* 1992. V. 27. № 5. P. 427–430.
- Hunter D.C., Burritt D.J.* Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 2004. V. 40. № 2. P. 215–220.
- Johkan M., Shoji K., Goto F., Hahida S.N., Yoshihara T.* Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa* // *Environ. Exp. Bot.* 2012. V. 75. P. 128–133.
- Jones H.G., Farquar G.D., Cowan I.R.* Breeding for stomatal characters // *Stomatal function.* Eds. Zeiger E., Farquhar G.D. Cowan I.R. Stanford (CA): Stanford University Press. 1987. P. 431–443.
- Kaur N., Chugh V., Gupta A.K.* Essential fatty acids as functional components of foods – a review // *J. Food Sci. Technol.* 2014. V. 51. № 10. P. 2289–2303.
- Kawashima L.M., Soares L.M.V.* Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil // *J. Food Compos. Anal.* 2003. V. 16. № 5. P. 605–611.
- Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., Sager J.C.* A comparison of growth and photosynthetic characteristics of lettuce grown under red and blue light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental green LEDs // *Acta Hort.* 2004a. V. 659. P. 467–475.
- Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., Sager J.C.* Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and bluelight-emitting diodes // *HortScience.* 2004b. V. 39. P. 1617–1622.
- Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., Sager J.C.* Stomatal conductance of lettuce grown under or exposed to different light qualities // *Ann. Bot. (Lond.)* 2004c. V. 94. P. 691–697.
- Kim H.H., Wheeler R.M., Sager J.C., Gains G.D., Naikane J.H.* Evaluation of lettuce growth using supplemental green light with red and blue light-emitting diodes in a controlled environment—a review of research at Kennedy Space Center // *In V International Symposium on Artificial Lighting in Horticulture.* 2005. V. 711. P. 111–120.
- Kim H.H., Wheeler R.M., Sager J.C., Goins G.D., Norikane J.H.* Evaluation of lettuce growth using supplemental green light with red and blue light-emitting diodes in a controlled environment – A review of research at Kennedy Space Center // *Acta Hort.* 2006. V. 711. P. 111–119.
- Kim M.J., Moon Y., Tou J.C., Mou B., Waterland N.L.* Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *J. Food Compos. Anal.* 2016. V. 49. P. 19–34.
- Khrolenko Yu.A., Burundukova O.L., Burkovskaya E.V., Zhuravlev Yu.N.* Mesophyll structure and chloroplast density in *Panax ginseng* leaves from the Sikhote-Alin Mts // *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.* 2012. V. 54. № 2. P. 54–60.
- Koudela M., Petříková K.* Nutrients content and yield in selected cultivars of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) // *Hortic.Sci.* 2008. V. 35. № 3. P. 99–106.
- Le Guedard M., Schraauwers B., Larrieu I., Bessoule J.-J.* Development of a biomarker for metal bioavailability: the lettuce fatty acid composition // *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. V. 27. № 5. P. 1147–1151.
- Li H., Xu Z., Tang C.* Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro* // *PCTOC.* 2010. V. 103. № 2. P. 155–163
- Ma X., Wang Y., Liu M., Xu J., Xu Z.* Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro* // *Sci. Hortic.* 2015. V. 190. P. 104–109.
- Mou B.* Genetic variation of beta-carotene and lutein contents in lettuce // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2005. V. 130. № 6. P. 870–876.
- Poudel P.R., Kataoka I., Mochioka R.* Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes // *Plant cell, tissue and organ culture.* 2008. V. 92. № 2. P. 147–153.
- Shimokawa A., Tonooka Y., Matsumoto M., Ara H., Suzuki H., Yamauchi N., Shigyo M.* Effect of alternating red and blue light irradiation generated by light emitting diodes on the growth of leaf lettuce // *bioRxiv.* 2014. P. 003103.
- Stutte G.W., Edney S., Skerritt T.* Photoregulation of bioprotectant content of red leaf lettuce with light-emitting diodes // *HortScience.* 2009. V. 44. № 1. P. 79–82.
- Wang J., Lu W., Tong Y., Yang Q.* Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light // *Frontiers in Plant Science.* 2016. V. 7. P. 64–73.
- Yorio N.C., Goins G.D., Kagie H.R., Wheeler R.M., Sager J.C.* Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation // *HortScience.* 2001. V. 36. № 2. P. 380–383.

## The Influence of LED Lights of Different Spectrum on the Development of *Lactuca sativa*

O. V. Nakonechnaya<sup>1, #</sup>, A. S. Kholin<sup>2</sup>, E. P. Subbotin<sup>2</sup>, E. V. Burkovskaya<sup>1</sup>, Yu. A. Khrolenko<sup>1</sup>,  
I. V. Gafitskaya<sup>1</sup>, I. Yu. Orlovskaya<sup>1</sup>, M. L. Burdukovsky<sup>1</sup>, A. V. Mikheeva<sup>1</sup>, and Yu. N. Kulchin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok, Russia

<sup>2</sup> Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

<sup>#</sup>e-mail: markelova@biosoil.ru

The effect of light-emitting diode (LED) lamps with 5 different spectra on *L. sativa* plants (variety 'Aficion') grown in protected soil conditions was studied. Warm white light (WW) was used as a control (the ratio of blue, green and red portions in the spectrum was 14% : 48% : 38%). The maximum values of leaf size and fresh weight of the aerial parts were found in the RGB group (blue-green-red ratio 32% : 19% : 49%), highest values of dry weight and ash content – in the FS group (blue-green-red ratio 27% : 11% : 62%). Stomatal size and density on the abaxial leaf's side was the highest in SB plants (blue-green-red ratio 33% : 41% : 38%). This was the most effective combination of parameters in terms of leaf architectonics. An increase in the portion of red light in the spectrum with a decrease in the portion of green light had a positive effect on the development of *L. sativa* plants, while an increase in the portion of green light in the spectrum positively affected the stomatal apparatus formation.

*Keywords:* *Lactuca sativa*, light spectrum, stomatal apparatus, LEDs

УДК 575.22:599.74.4

Посвящение  
Виктору Николаевичу Орлову, одному из основоположников  
русской школы кариологии в зоологических исследованиях, к юбилею.

## ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАРИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СОБОЛЯ (*MARTES ZIBELLINA*) И ДРУГИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *MARTES* (CARNIVORA, MAMMALIA)

© 2023 г. В. М. Малыгин\*, Л. Д. Сафронова\*\*, Е. Г. Сергеев\*\*\*, @, Е. С. Левенкова\*\*

\*МГУ им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, 1/12, Москва, 119992 Россия

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

\*\*\*ФГБНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева,  
ул. Трудовая, б, п. Родники, Московская обл., 140143 Россия

@E-mail: seg06@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

На основании обзора публикаций и дополнительного собственного материала проведена ревизия первоописания кариотипа соболя *Martes zibellina*, представлены данные о митотических метафазных хромосомах самки и самца этого вида и сравнение их наборов с таковыми у близко родственных видов рода *Martes*. Также приведено описание синаптонемного комплекса (СК) в ранней – средней профазе мейоза сперматоцитов соболя. Сравнительный анализ подтвердил основные цитогенетические показатели соболя и куниц ( $2n = 38$ ,  $NF_a = 64–68$ ,  $X$  – средней величины субметацентрик, а  $Y$  – самый мелкий акро- субмета- или метацентрик). Эти характеристики мало пригодны для разработки внутривидовой таксономии соболя, однако могут быть использованы для выявления филогенетических связей на видовом и родовом уровнях, а также для выяснения последствий природной гибридизации близких видов рода *Martes*.

**Ключевые слова:** соболя, куницы, кариотип, митоз, мейоз, синаптонемный комплекс, систематика

**DOI:** 10.31857/S1026347022600765, **EDN:** MJYDJC

Соболь, *Martes zibellina* L., 1758, пушной зверь семейства кунцеобразных, обитает на огромной лесной территории Евразии. В России – от Предуралья на восток до Камчатки и от северной границы тайги до Южного Приморья, на Алтае и Южном Урале от юга таежной зоны Сибири до лесостепи Казахстана (Гептнер и др., 1967). В связи с изменяющимся спросом на шкурки соболя на международном рынке наблюдаются значительные колебания цены на них. По данным ООО “Союзпушнина” на Международном пушном аукционе в Санкт-Петербурге стоимость шкурки в 1987 г. достигала 268.5 \$, в последующие годы отмечено ее снижение с 199.0 \$ в 2012 г. до 43.2 \$ в 2020 г. (<https://sojuzpushnina.ru/>). Считается, что наиболее ценным мехом обладают особи с темным окрасом, которые в основном поступают из Забайкалья (Баргузинский кряж) и с Енисея, доля таких зверьков из этих мест составляет более половины в добыче охотников.

Однако, как показал анализ открытых источников, особи с темным мехом поступают на рынки пушнины и из других частей ареала соболя, в том числе в количестве от одного до десяти процентов из юго-восточных окраин, включая островные популяции Сахалина (Левенкова, Каштанов, 2019). Это свидетельствует, с одной стороны, о единстве вида, а с другой – указывает на мозаику фенотипической изменчивости по всему ареалу, что создает трудности для подвидовой таксономии. Так, в сводке В.Г. Монахова (Monachov, 2011) приведены данные о выделении в разных источниках от 2 до 30 подвидов соболя. Внутривидовая систематика соболя также осложнена тем, что после периода чрезмерного промысла было проведено несколько этапов его масштабной реинтродукции, для которой были использованы в первую очередь особи с ценным мехом из Прибайкалья. Эти меры, наряду с ограничением промысла, привели к увеличению численности вида, а его

способность к значительным естественным миграциям и благоприятные климатические факторы – к восстановлению непрерывного ареала и даже расширению его границ (Захаров, Сафронов, 2012; Сафронов, 2016; Каштанов и др., 2022). Генетический анализ с применением молекулярных маркеров обнаружил, при значительной вариабельности аллельных вариантов, генетическое сходство популяций центральной части ареала, что может быть обусловлено расселением и перемещением аборигенных соболей с потомками интродуцентов. Наибольшее своеобразие выявили у краевых или тех, чьи места обитания отделены крупными естественными преградами (Пищулина, 2013; Каштанов и др., 2015а; 2022).

Несмотря на наличие новых подходов к изучению генетической структуры вида, кариотип с середины XX столетия до сих пор остается универсальным как интегральным, так и дифференцирующим признаком в систематике млекопитающих (Орлов, Булатова, 1983). Соболю – один из первых видов, с изучения кариотипа которых начиналась отечественная кариосистематика. Первое описание кариотипа соболя (Орлов, Малыгин, 1969) было опубликовано в сборнике, подготовленном к II Всесоюзному совещанию по млекопитающим, включавшему серию сообщений по цитогенетике млекопитающих в стране. Так оказалось, что для первоописания и последующих исследований по ходу развития методов цитогенетики (Графодатский и др. 1977; Графодатский, Раджабли, 1988 и т.д.) материалы по кариотипу соболя были получены не непосредственно из природных популяций, а от животных из звероферм, и до сих пор данные по кариотипической характеристике подвидов отсутствуют. Однако проведение сравнительных исследований кариотипов соболя и родственных таксонов дает достаточные основания для рассмотрения вопросов если не внутривидовой таксономии, то межвидовых отношений линеевского вида *Martes zibellina* L.

### Подвиды соболя и положение в системе

Пока нет единого понимания систематики соболя на видовом и внутривидовом уровнях. В первом случае это касается в основном таксономического положения краевых популяций, тогда как ревизия внутривидовых форм должна затрагивать в целом ареал этого вида. Так, в сводке В.Г. Гептнера с соавторами (1967) для Советского Союза приведено 17 подвидов, которые объединены в 7 групп (больших популяций): тобольскую, алтайскую, саянскую, енисейскую, забайкальскую, сахалинскую и камчатскую. Выделение двух последних отражает своеобразие островных и полуостровных популяций, что генетически подтверждено обнаружением уникальных тандемных повторов в ядерной

ДНК у особей на периферии ареала (Пищулина, 2013; Каштанов и др., 2015а).

В мировой сводке по млекопитающим признаются также 17 подвидов соболя (Wozencraft, 2005), но по всему ареалу. Однако, исследуя большие выборки соболей по особенностям экстерьера, окраске шкурок и краниальным промерам, было подтверждено существование всего 4 подвидов: *averini*, *sahalinensis*, *kamtshadalica* и *zibellina* (Монахов с соавторами 1976; 2020; Монахов и др., 2021). В монографии Н.Н. Бакеева с соавторами (2003) подтверждено только 4 реально существующих подвида соболя, имеющих достаточно четкие морфологические различия и обитающих на относительно изолированных территориях: алтайский, тобольский, сахалинский и камчатский соболю, те же которые перечислялись ранее (Монахов, 1976). В пределах современной России другие исследователи рассматривают до 8 подвидов: *zibellina*, *yenisseensis*, *averini*, *princeps*, *schantaricus*, *sahaliensis*, *kamtshadalica*, *brachyura* (Аристов, Барышников, 2001).

Молекулярно-генетический анализ митохондриальной и ядерной ДНК предоставил новые возможности ревизии вида и внутривидовых форм русского соболя и других представителей рода *Martes* (Kyle *et al.*, 2003; Рожнов и др., 2010, 2013; Ishida *et al.*, 2013; Kinoshita *et al.*, 2015; Каштанов и др., 2015а, 2015б; 2018; и др.).

Как отмечено выше, в связи с перепромыслом и резким сокращением численности соболей, в СССР проводились мероприятия по реинтродукции. Всего с 1901 по 1970 гг. было выпущено 19 тыс. зверьков, но в 1970 г. работы по расселению соболей были прекращены (Бобров и др., 2008). Однако, несмотря на антропогенное вмешательство в структуру вида (промысел и реинтродукция), а также на процессы миграции, отмеченные для соболя в течение разных промысловых сезонов, методом анализа микросателлитов ядерной ДНК выявлено своеобразие популяций из разных частей ареала (Пищулина, 2013; Каштанов и др., 2015б), что указывает на возможность ревизии вида и внутривидовых форм с помощью генетических методов.

За пределами России, соболю встречается в Казахстане, Китае, Монголии, в Корее и Японии. На севере Японских островов представлены следующие подвиды: на Хоккайдо – *M. z. brachyura*; а на Хонсю (Хондо), Сикоку и Кюсю – японский соболю, *M. z. melampus*; на острове Цусима в Корейском проливе – *M. z. tsuensis*; а на Корейском полуострове – *M. z. koreensis* (синоним, *hamgyensis*) (Гептнер и др., 1967). На западе ареала соболю контактирует с лесной куницей (желтодушкой), *Martes martes* родственным видом, в результате чего в ловушки промысловиков попадают межвидовые гибриды – кидусы (или кидасы).

В Неарктике представлено 2 вида рода *Martes* — илька (куница-рыболов), *M. pennanti* с 3-я подвидами, и американская куница, *M. americana* с 14-ю подвидами (Hall, 1981). В подроковой характеристике *Martes* наблюдается морфологическая и генетическая близость *M. americana* и группы евразийских видов (*Martes/zibellina/melampus*), которые иногда объединялись в единый “надвид” (Павлинов, Лисовский, 2012). Другой американский вид рассматривают как подрод рода *Martes*, либо как отдельный род *Pekaria*, аргументируя это молекулярно-генетической обособленностью — *Pekaria pennanti* (ASM Mammal Diversity Database). <https://www.mammaldiversity.org/explore.html#species-id=1005825>).

Благодаря ценному меху и в связи с резким сокращением численности, в начале 30-х годов прошлого века соболя начали разводить в клетках (Портнова, 1941) и смогли создать технологию производства этого вида в звероводческих хозяйствах (Казакова и др. 1986). К настоящему времени в России насчитывается 11 зверохозяйств по разведению соболя с общим маточным поголовьем 45.2 тыс. самок (Сводка ..., 2021).

Так, с 1931 г. соболей разводят в зверосовхозе “Пушкинский” Московской области. Первоначально завезли более 100 животных, отловленных на воле и принадлежащих к различным кряжам: баргузинскому, амурскому, енисейскому, алтайскому, минусинскому и тобольскому (Павлов, Балиева, 1941). Позднее завозили соболей из Забайкалья и Сахалина (Каштанов и др., 2016). С 1948 г. соболя разводят в зверосовхозе “Салтыковский” Московской области, причем первые 35 самок и 20 самцов были завезены из зверосовхоза “Раисино” Московской области. Но, к сожалению, не установлены места отловов этих зверьков (Каштанов и др., 2020). Разнообразие исходных мест отлова соболей, смешивание и длительность их разведения позволяют предположить, что генетические показатели, у особей из разных зверосовхозов, вряд ли могут быть использованы в построении внутривидовой структуры представительной рода *Martes*.

Попытки разведения соболя были предприняты в Китае (Монахов, Ли 2013). Исследования по соболю, кроме России, проводят в Китае, Японии, США и других странах, особенности морфологии и биологии этого вида относительно хорошо изучены (Мартынов, 1987; Monachov, 2011; Сергеев, 2016).

Таксономическая обособленность рода *Martes*, представленного 3 или 2 подродами и 6 или 8 видами, общепризнана (Гептнер и др., 1967, Павлинов, 2006), однако есть расхождения в трактовке видового статуса и состава подродов. В.Г. Гептнер, проводя ревизию куницеобразных, придерживался широкой трактовки рода *Martes*, поэтому

рассматривал таксономическую обособленность харзы, *Martes flavigula* и ее викариата — южноиндийской харзы, *M. gwatkinsii* (раса харзы) только на уровне подрода *Charronia* (Гептнер и др., 1967), тогда как возможно выделение харзы в отдельный род *Charronia* (Аристов, Барышников, 2001). Возможно, последняя трактовка более объективна, так как кариотип харзы ( $2n = 40$ ;  $NF_a = 68$ ; Fredga, 1966; Atlas of Mammalian Chromosomes, 2020) отличен от остальных видов рода *Martes* (Орлов, Булатова, 1983). Выделение в отдельный род, но на основе молекулярно-генетических данных, предложено и для североамериканского вида *M. pennanti* (см. выше). В России род *Martes* представлен 4 видами — три вида включены в подрод *Martes* s.str. (*M. zibellina*, *M. foina*, *M. martes*), один, *M. flavigula*, выделен в подрод (возможно, род) *Charronia*.

Анализ генетических маркеров обнаружил общие закономерности у видов рода *Martes* — огромное разнообразие гаплотипов, максимальное для материковых популяций соболя, лесной и американской куниц, несоответствие их генотипической и фенотипической изменчивости, вместе с тем своеобразие популяций по генетическим маркерам, наиболее выраженное для островных популяций на краю ареалов (Kyle *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2015).

Однако отметим, что даже с использованием современных молекулярно-генетических методов затруднено точное картирование генов без их привязки к цитогенетическим картам (Рубцов, Карамышева, 1999).

Вопросы генетической связи и таксономических различий подвидов соболя *M. zibellina*, межвидовые отношения в подроде *Martes* и между подродами рода остаются актуальными и ждут решения в комплексе новых и классических подходов.

#### Цитогенетические характеристики таксонов рода *Martes*

С 60-х годов исследователи заинтересовались генетикой соболя. Первой из методически доступных в это время характеристик генома стало описание кариотипа (табл. 1). Впоследствии были проведены биохимические (в основном иммунохимические; Беляев и др., 1980, 1984), а в настоящее время — молекулярно-генетические исследования (Hosoda *et al.*, 1999; Kurose *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2010; Пищулина, 2013; Рожнов и др., 2013; Kinoshita *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021 и др.).

Первое упоминание о кариотипе вида из рода *Martes* было дано Эрлихом (Ehrlich, 1949), который обнаружил в соматических клетках каменной куницы, *M. foina*, 19 пар хромосом. А.С. Графодатский с соавторами (1982а) исследовали современными методами кариотип самки *M. foina* (фермерского содержания), а Р.И. Дзюев с соавто-

Таблица 1. Кариотипы видов р. *Martes*

Виды и подвиды	Район исследования	2n	NF <sub>a</sub>	AA	X	Y	Метод	Литература
<i>M. foina</i>	Швейцария	38	—	—	—	—		Ehrlich, 1949
<i>M. foina</i>	Новосибирск, Экспер. база Биолог. ин-та	38	66	3	Sm	—	G, C, NOR	Графодатский и др., 1982б
<i>M. foina</i>	Линия фибробластов из банка Куньминь, Китай	38	66	3	M	a	G+	Nie et al. 2002, 2012
<i>M. foina nehringi</i>	Северный Кавказ, села Безенги, Терскол	38	66	3	M	a		Дзуев и др., 2020
<i>M. martes</i>	Швеция	38	—	—	—	—		Fredga, 1967
<i>M. martes</i>	Новосибирск, Экспер. база Биолог. ин-та	38	68	4	Sm	m	G+, C, NOR	Графодатский и др., 1982а
<i>M. martes larezi</i>	Центральный Кавказ, хутор Сарский, село Аргудан	38	64	4	Sm	m		Дзуев и др., 2013
<i>M. americana</i>	США	38	66	4	Sm	sm		Wurster, Benirschke, 1967, 1968
<i>M. zibellina</i>	Москва, Салтыковский зверосовхоз	38	64	3	M	m		Орлов, Малыгин, 1969
<i>M. zibellina</i>	Новосибирск, Экспер. ферма Биолог. ин-та	38	66	4	Sm	a	G+, C, NOR	Графодатский и др., 1977
<i>M. zibellina brachyura</i>	Япония, о-в Хоккайдо	38	66	4	M	a		Obara, 1982
<i>M. melampus melampus</i>	Япония, о-в Shikoku	38	68	3	M	a		Tsuchiya, 1979
<i>M. melampus melampus</i>	Япония, префектура Aichi	38					G+	Graphodatsky et al. 2002
<i>M. pennanti</i>	США	38	64	4	Sm	sm		Benirschke, Yong, 1966; Wurster, Benirschke, 1967, 1968

Примечание. 2n – число хромосом в диплоидном наборе; NF<sub>a</sub> – число плеч аутосом; X- и Y-хромосомы: M, m – мета-, Sm, sm – субмета- и а – акроцентрики, AA – число пар акроцентриков. Метод: G-, C- или AgNOR- дифференциальной окраски; G+ – хромосомный пэинтинг.

рами (2013, 2020) практически повторил это описание для самки и двух самцов *M. foina nehringi* из природы, из двух пунктов на Кавказе (табл. 1). К 1967 г. относится первое упоминание о диплоидном числе (2n = 38) лесной куницы *M. martes* (Fredga, 1967; Wurster, Benirschke, 1967), а полное описание кариотипа самца было приведено в работе (Графодатский с соавторами (1982а). Сходный кариотип обнаружен у трех куниц, *M. martes larezi* (2n = 38), отловленных в 2-х местах Северного макросклона Центрального Кавказа (табл. 1; Дзуев и др., 2013). Описание кариотипа американской куницы, *M. americana* (Wurster, Benirschke,

1968) оказалось близким с данными по кариотипу соболя *M. zibellinae* (Орлов, Малыгин, 1969).

Таким образом, был сделан вывод о сходстве и стабильности кариотипов видов рода *Martes* и, соответственно, об отсутствии перспектив использования цитогенетических показателей для сравнительных таксономических исследований видов этого рода (Графодатский и др., 1976, 1977).

Однако уже первые сравнительные изучения хромосом соболя и родственных видов обнаруживали признаки полиморфизма, природа которого требовала дальнейших цитогенетических исследований (Графодатский и др. 1977, 1982а, 1982б).

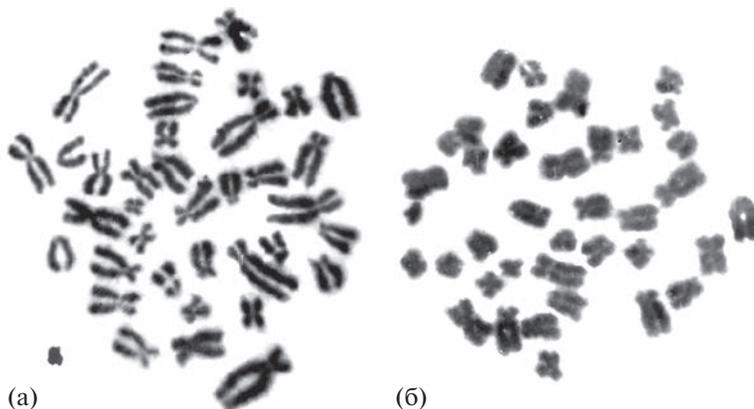


Рис. 1. Метафазные пластинки (ув.  $\times 100$ ) самки (а) и самца (б) соболя, *Martes zibellina*.

В настоящей работе мы обобщили сведения по цитогенетике русского соболя и сравнили показатели его кариотипа с таковыми у близко родственных видов рода *Martes*, что актуально, особенно в связи с тем, что на современных Интернет-ресурсах почти невозможно найти иллюстративные данные к описаниям кариотипов *Martes*, опубликованные в конце прошлого столетия.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все сведения по цитогенетике соболя в нашей стране были получены из разволок зверосовхозов Московской обл. “Салтыковский” (исследовано 6 самцов и 2 самки; Орлов, Малыгин, 1969) и “Пушкинский” (10 самцов: Сафронова и др., 2018), а также экспериментальной фермы Института цитологии и генетики СО АН СССР и Биологического института (Новосибирск; 1 самец и 2 самки; Графодатский и др., 1977). Соответственно, отсутствуют конкретные данные о географической привязке исследованных животных, вероятность смешанного происхождения этих зверей от прародителей, отловленных в разных сибирских популяциях.

В данной статье мы приводим уточненные данные по кариотипу самки и самца соболя из зверосовхоза “Салтыковский”, откуда кариотип соболя был описан впервые, без подробностей в отношении морфологии хромосом (Орлов, Малыгин, 1969).

Препараты соматических хромосом были приготовлены из костного мозга по обычным методикам (Ford, Hamerton, 1956). Для обработки фотографических изображений использовали инструменты фоторедактора Photoshop CC (бесплатная пробная версия Adobe Creative Cloud).

Для анализа мейотических хромосом использовали семенники 10 половозрелых самцов из популяции зверохозяйства “Пушкинский”. Методика анализа синаптонемных комплексов (СК)

описана ранее (Moses *et al.*, 1977; Сафронова и др., 2018). Длины СК аутосомных и половых бивалентов сперматоцитов измеряли с помощью программы Leica Application Suite V3 на цифровых микрофотографиях. Нумерацию СК бивалентов в кариотипе проводили в порядке убывания их линейных размеров.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В диплоидном наборе исследованных нами самки и самца по 38 хромосом (рис. 1), из них 18 пар аутосом и половые хромосомы, у самки по уточненным данным они представлены пятой по величине парой метацентриков (рис. 2а), у самца – X- такая как у самок, Y-хромосома – самый мелкий акроцентрик (рис. 2б).

Для ранжировки пар рутинно окрашенных элементов мы сопоставили промеры плеч хромосом, выполненные нами ранее на 10 метафазных пластинках у самца и самки соболя, с аналогичными промерами линейкой Photoshop CC, и выделили условно гомологичные пары. Согласно классификации Левана с соавторами (Levan *et al.*, 1964) распределили их по положению центromеры в три морфологические группы: среди аутосом оказалось 7 пар мета-, 7 пар субмета- и 4 пары акроцентриков. В группе метацентриков соотношение плеч хромосом составило от 1.0 до 1.3, субметацентриков – от 1.5 до 3.34, акроцентриков – более 3.40.

Самой крупной оказалась пара субметацентрических хромосом, еще одна пара субмета- и две пары метацентриков близки к ней по размеру, что отличает их от остальных хромосом набора. Также выделяется самая мелкая пара метацентриков, остальные аутосомы плавно убывают по величине (рис. 1, 2). Из акроцентриков самый крупный соответствует седьмой по величине паре аутосом, остальные мельче акроцентриков. Y-хромосома – мелкий акроцентрик, по величине



Рис. 2. Кариотип самки (а) и самца (б) соболя, *Martes zibellina*, где М – мета-, Sm – субмета- и А – акроцентрики.

сходен с 18-й парой самых мелких метацентриков (рис. 26).

Впервые основные показатели кариотипа ( $2n$  и NF) соболя были определены в кратком сообщении и в качестве иллюстрации был приведен только кариотип самки (Орлов, Малыгин, 1969), но в тексте указано, что Y-хромосома представлена самым мелким метацентриком. Однако в последующих описаниях кариотипа этого вида, в том числе с дифференцировано, С- и G-окрашенными хромосомами, Y-хромосома выявлена, как самый мелкий, полностью С-позитивный, акроцентрик набора (Графодатский и др., 1977; Графодатский, Раджабли, 1988; Iwasa, Hosoda, 2002). Пересмотр наших данных подтвердил это описание Y-хромосомы (рис. 26).

Отметим, что самая мелкая акроцентрическая аутосома гетероморфна, по-видимому, один или оба гомолога, несут вторичную перетяжку (рис. 2), что впервые отметил А.С. Графодатский с соавторами (1977). При значительной спирализации рутинная окраска делает эту аутосому сходной с двуплечим элементом.

В целом представленные нами кариотипы соболя сходны с таковыми, описанными А.С. Графодатским с соавторами (1977). Авторы распределили дифференциально окрашенные (G-окраска) аутосомы только в две группы: двуплечие (соответствует нашим мета- и субметацентрикам) и 4 пары одноплечих акроцентриков. Как мы отметили выше, несовпадения описаний связаны с интерпретацией морфологии хромосом, а не с изменчивостью кариотипа.

Мы согласны с высказанным предположением А.С. Графодатского с соавторами (1978) о консерватизме в строении X-хромосомы, как крупного

субметацентрика. Хотя авторы привели сведения по кариотипам 7 видов куницеобразных (Mustelidae), в которые не вошли представители рода *Martes*, но в других публикациях А.С. Графодатского с соавторами (1977, 1982а, 1982б, 1985, Графодатский, Раджабли, 1988), а также в статьях японских коллег (Tsuchiya, 1979; Obara, 1982; 1991; Iwasa, Hosoda, 2002) были выявлены такие же по морфологии X-хромосомы.

Японские исследователи дали описание кариотипа этого вида (*M. z. brachyura*) с острова Хоккайдо, префектура Government, а хромосомы изучали в культуре фибробластов 2-х самцов (Iwasa, Hosoda, 2002). В этой публикации дана сравнительная характеристика дифференциально окрашенных (использованы 2 флуоресцентных красителя – QM и СМАЗ) препаратов *M. z. brachyura* и близко родственного вида – японского соболя, *Martes melampus melampus* (самец из Shikoku). Отметим, что в монографии В. Г. Гептнера с соавторами (1967) этот вид рассмотрен как один из островных подвидов соболя – *M. z. melampus*.

Кариотипы всех перечисленных зверьков оказались сходными (Obara, 1982, 1991; Iwasa, Hosoda, 2002), за малым исключением. В кариотипе *M. z. brachyura* число плеч аутосом (FN = 66), такое же, как у сибирских соболей, но отличается от такового японского соболя (FN = 68) (Tsuchiya, 1979; Obara, 1982). У последнего вида в кариотипе представлены короткие плечи хромосом в мелкой (14-й) паре. Такое различие не влияет на посткопулятивные изолирующие механизмы этих видов (Iwasa, Hosoda, 2002).

Отметим, что анализ митохондриальных и ядерных маркеров у соболей из разных районов материка Евразия, полуострова Камчатка, островных популяций Курильской гряды, о. Сахалин и о. Хоккайдо, обнаружил как родство русского и японского соболей, так и своеобразие гаплотипов соболей – эндемиков этих островов (Ishida et al., 2013; Kinoshita et al. 2015).

Подробное описание кариотипа лесной куницы и его сравнение с сободем было дано А.С. Графодатским с соавторами (1982б). Исследован самец с экспериментальной базы Биологического института, Новосибирск, но, к сожалению, авторы в статье не указали место его отлова. Отметим, что родство соболя и лесной куницы отражено в совпадении практически всех элементов диплоидного набора хромосом, за одним исключением. У соболя Y-хромосома, самый мелкий акроцентрик, а у куницы – наименьший двуплечий элемент набора. Такие же показатели кариотипа приведены у *M. martes lorenzi* с Центрального Кавказа (Дзюев, 2013). Кроме того, отмечено незначительное отличие в величине и распределении гетерохроматина, а также расположении ядрышкообразующих районов, выявляемых с помощью С-

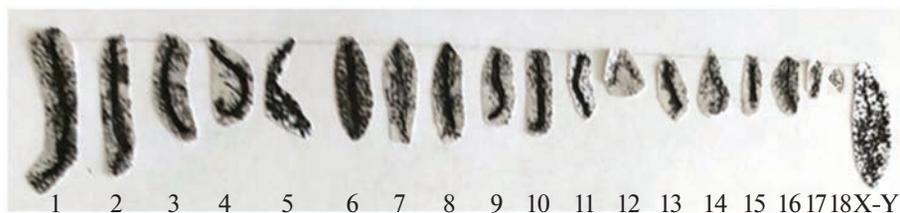


Рис. 3. СК-кариотип самца соболя, *Martes zibellina*.

и AgNOR- окрасок (Графодатский и др., 1977, 1982а, 1982б). Поэтому не удивительно, что на Урале, в местах перекрывания ареалов этих видов происходит их гибридизация.

Вероятно, относительно небольшое количество гетерохроматина в кариотипе соболя коррелирует с низким содержанием ДНК ( $82.2 \pm 3.3\%$  от генома человека) на диплоидную клетку среди всех исследованных видов куницеобразных (Графодатский и др., 1977). По митохондриальной и микросателлитам ядерной ДНК соболя более разнообразен, чем лесная куница (Пищулина, 2013).

Число СК в клетке соответствует числу хромосом в гаплоидном наборе, а относительные длины СК аутосом и половых хромосом коррелируют с относительными длинами соответствующих хромосом в митотическом кариотипе (Демин и др., 1984; Богданов и др., 1996).

В ранней и средней профазе мейоза сперматоцитов четко прослеживается корреляция с митотическим кариотипом. В СК-кариотипе представлено 18 бивалентных элементов аутосом, постепенно убывающих по величине и половой (X-Y) бивалент, по длине соответствующий 9-й–10-й паре. В средней профазе длина оси X в 3 раза превосходит длину оси Y-хромосомы и эти оси синаптируют по всей своей длине (рис. 3).

В настоящее время нам известно только еще одно описание СК у представителя семейства Mustelidae – американкой норки, *Neovison vison* (Koykul, Basrug, 1995). В профазе мейоза половые элементы ведут себя сходным образом, что не удивительно, так как сравнительный анализ кариотипов нескольких видов куницеобразных по G-окраске показал на сходство у них структуры X-хромосомы (Графодатский и др., 1976, 1985).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Те немногие данные о характеристиках кариотипа видов р. *Martes*, что получены за более чем полувековой период с начала их изучения, с учетом диплоидных чисел и гомологии по G-окраске, действительно, свидетельствуют о консервативности хромосомных наборов у видов этого рода.

Мы выяснили, что по цитогенетическим показателям (2n, NF, форме X-хромосомы, G-и

S-окраскам, а также по особенностям СК) соболя либо совпадает с кариотипами других видов рода *Martes s. str.* (например, с лесной куницей), либо весьма близок к ним. Небольшие различия затрагивают две пары акроцентриков, а также Y-хромосому, которые могут быть представлены одно- или двуплечими элементами (табл. 1). По-видимому, эти различия обусловлены наличием вторичных перетяжек и положением центромер. Отметим, что в отличие от представителей других родов, в хромосомах видов рода *Martes* мало гетерохроматина, накопление или утрата которого часто вызывает хромосомный полиморфизм.

Поскольку наши и литературные данные подтверждают стабильность кариотипов в роде *Martes*, использование кариологических особенностей для выяснения внутривидовой системы соболя, на наш взгляд, мало перспективно. Однако отметим, что кариология соболя по ареалу изучена фрагментарно и весьма неполно. Наличие полиморфизма, по которому могут быть диагностированы близкие виды – соболя и куница, возможно, затрагивает не все их популяции. Тем не менее, эти показатели различий могут быть применены для филогенетических построений на видовом, родовом уровнях. Кроме того, они могут быть использованы как дополнительный маркер для выявления кидусов при молекулярно-генетических исследованиях и взаимоотношении этих близких видов рода *Martes*.

Мы надеемся, что эта публикация будет востребована как в современных исследованиях для решения проблем филогении, систематики, биоразнообразия русского соболя, так и для решения практических задач при его разведении и селекции.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Нине Шамилиевне Булатовой за ценные советы и корректуру микрофотографий кариотипа соболя.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аристов А.А., Барышников Г.Ф. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Хищные и ластоногие. Санкт-Петербург. 2001. С. 210–225.

- Бакеев Н.Н., Монахов Г.И., Синицын А.А. Соболь. Вятка. 2003. 2-изд. 336 с.
- Беляев Д.К., Баранов О.К., Терновская Ю.Г., Терновский Д.В. Сравнительное иммунохимическое исследование сывороточных белков у *Mustelidae (Carnivora)* // Зоол. журн. 1980. Т. 59. № 2. С. 254–260.
- Беляев Д.К., Баранов О.К., Фомичева И.И., Смирных С.И., Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Межвидовая антигенная изменчивость сывороточных белков в семействе *Mustelidae (Carnivora)* // Зоол. журн. 1984. Т. 63. № 6. С. 912–922.
- Бобров В.В., Варшавский А.А., Хляп Л.А. Чужеродные виды млекопитающих в экосистемах России. М.: Тов-во науч. изд. КМК. 2008. С. 123–126.
- Богданов Ю.Ф., Гришаева Т.М., Коломиец О.Л., Федотова Ю.С. Цитогенетические закономерности синнапсиса мейотических хромосом у животных и растений // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1471–1493.
- Гептнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон П.Б., Слудский А.А., Чиркова А.Ф., Банников А.Г. Млекопитающие Советского Союза. М. 1967. Т. 2. Ч. 1. С. 507–553.
- Графодатский А.С., Волобуев В.Т., Терновский Д.В., Раджабли С.И. G-дифференциальная окраска хромосом семи видов куньих (*Mustelidae, Carnivora*) // Зоол. журн. 1976. Т. 55. № 11. С. 1704–1709.
- Графодатский А.С., Лушикова Т.П., Ромащенко А.А., Раджабли С.И. Распределение структурного гетерохроматина и повторяющихся последовательностей ДНК на хромосомах ряда видов кунцеобразных (*Carnivora, Mustelidae*) // Генетика. 1985. Т. 21. С. 147–152.
- Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных животных. Атлас. Новосибирск: Наука. 1988. С. 108–109.
- Графодатский А.С., Терновская Ю.Г., Терновский Д.В. Дифференциальная окраска хромосом каменной куницы *Martes foina (Carnivora, Mustelidae)* // Зоол. журн. 1982а. Т. 61. № 10. С. 1607–1608.
- Графодатский А.С., Терновская Ю.Г., Терновский Д.В. Дифференциальная окраска хромосом лесной куницы (*Martes martes*) // Зоологический журн. 1982б. Т. 61. № 2. С. 313–314.
- Графодатский А.С., Терновская Ю.Г., Терновский Д.В., Раджабли С.И. G- и C-окраска хромосом и количество ДНК у соболя // Цитология и генетика. 1977. Т. 10. № 6. С. 483–490.
- Демин Ю.С., Сафронова Л.Д., Черепанова Л.В., Сафронов В.А. Исследование синаптонемных комплексов у млекопитающих. Сообщение 1. Природа и механизм образования центральных слияний хромосом (Робертсоновских транслокаций) // Генетика. 1984. Т. 20. № 9. С. 1499–1506.
- Дзуев Р.И., Сухомесова М.В., Шарибова А.Х., Чепракова А.А. 2013. Хромосомный набор кавказской лесной куницы (*Martes martes lorenzi* Ogn., 1926) на Северном Кавказе // Изв. Горского гос. агр. ун-та. 2013. Т. 50. № 3. С. 312–315.
- Дзуев Р.И., Сабанова Р.К., Евгажукова А.А., Иругова Э.З., Дзуев А.Р. Хромосомный набор, распространение, численность и биотопическая приуроченность каменной куницы (*Martes foina nehringi Satunin*, 1905) на Северном Кавказе. Полевой ж. биолога. 2020. Т. 2. № 2. С. 132–142. <https://doi.org/10.18413/2658-3453-2020-2-2-132-142>
- Захаров Е.С., Сафронов В.М. Экология соболя (*Martes zibellina* L.) в западной Якутии // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. 2012. Т. 1. № 17. С. 73–84.
- Казакова Г.П., Снытко Э.Г., Гладилов Ю.И., Павлюченко С.В., Куличков А.Б., Сергеев Е.Г., Аулова С.В. Технология производства шкурки соболя (Наставление) // НИИПЗК. 1986. 42 с.
- Каштанов С.Н., Свищева Г.Р., Пищулина С.Л., Лазебный О.Е., Мещерский И.Г., Симакин Л.В., Рожнов В.В. Географическая структура генофонда соболя (*Martes zibellina* L.): данные анализа микросателлитных локусов // Генетика. 2015а. Т. 51. № 1. С. 21–33.
- Каштанов С.Н., Свищева Г.Р., Лазебный О.Е., Колобков Д.С., Пищулина С.Л., Мещерский И.Г., Рожнов В.В. Влияние антропогенных факторов на генетическое разнообразие вида соболя (*Martes zibellina* L.) // Молекулярная Биология, 2015б. Т. 49. № 3. С. 449–454.
- Каштанов С.Н., Сулимова Г.В., Шевырьков В.Л., Свищева Г.Р. Селекция соболя России: этапы промышленной доместикизации и генетической изменчивости // Генетика. 2016. Т. 52. № 9. С. 1001–1011.
- Каштанов С.Н., Столповский Ю.А., Мещерский И.Г. и др. Таксономический статус и генетическая идентификация соболя Алтая (*Martes zibellina averini* Vazhanov, 1943) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1327–1337. <https://doi.org/10.1134/S0016675818110073>
- Каштанов С.Н., Кирилушкин К.И., Федорова О.И. Новое селекционное достижение в звероводстве – “Салтыковская серебристая” // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2020. № 9. С. 85–91.
- Каштанов С.Н., Захаров Е.С., Белецов О.А., Свищева Г.Р., Рычков С.Ю., Филимонов П.А., Онохов А.А., Левенкова Е.С., Мещерский И.Г., Рожнов В.В. Экспансия соболя (*Martes zibellina* L.) севера среднесибирского плоскогорья в экосистемы тундры // Генетика. 2022. Т. 58. № 8. С. 933–944.
- Левенкова Е.С., Каштанов С.Н. Фенотипическая и генотипическая изменчивость русского соболя *Martes zibellina* L. // Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции: Мат. VIII межд. науч.-практ. конф. Ростов-на-Дону, Таганрог. 2019. С. 168–169.
- Мартынов В.Ф. Соболь: Библиографический указатель 1586–1985 гг. // ВАСХНИЛ. ВНИИБТЖ. Новосибирск. 1987. 380 с.
- Монахов Г.И. Географическая изменчивость и таксономическая структура соболя фауны СССР // Тр. ВНИИ охот. х-ва и звероводства. 1976. Вып. 26. С. 54–86.
- Монахов В.Г., Ли Б. Современное состояние, охрана и использование ресурсов соболя *Martes zibellina* в России и в Китае // Вестник охотоведения. 2013. Т. 10. № 2. С. 192–197.
- Монахов В.Г. Видоспецифичность строения фронтальной части черепа у соболя (*Martes zibellina*) и куницы лесной (*Martes martes*) // Зоол. журн. 2020. Т. 99.

- № 11. С. 12–98–1306.  
<https://doi.org/10.31857/S0044513420080073>
- Монахов В.Г., Раниук М.Н., Модоров М.В. Популяционная структура соболя Байкальской горной страны: анализ генетических и фенотипических характеристик // Экология. 2021. № 2. С. 143–152.  
<https://doi.org/10.31857/S0367059721020074>
- Орлов В.Н., Булатова Н.Ш. Сравнительная цитогенетика и кариосистематика млекопитающих. М.: Наука. 1983. 405 с.
- Орлов В.Н., Малыгин В.М. Хромосомный набор соболя, *Martes zibellina* L. Млекопитающие: Эволюция, кариология, таксономия, фаунистика. Тез. II Всес. сов. по млекопитающим. Новосибирск: Сибирское отд. Акад. наук СССР. 1969. С. 22.
- Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. М.: Зоологический музей МГУ. 2006. 297 с.
- Павлинов И.Я., Лисовский А.А. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. М.: Т-во науч. изд. КМК. 2012. 604 с.
- Павлов М.К., Балиева И.В. Племенная работа в соболеводстве // Кролиководство и звероводство. 1941. № 6. С. 15–19.
- Пищулина С.Л. Взаимодействие популяций лесной куницы и соболя в зоне симпатрии: генетический аспект. Авт. канд. дис. к. б. н. М. 2013. 24 с.
- Портнова А.Т. Опыт работы соболиной фермы Пушкинского звероводческого совхоза // Кролиководство и звероводство. 1941. № 6. С. 20–22.
- Рожнов В.В., Мецкерский И.Г., Пищулина С.Л., Симакин Л.В. Генетический анализ популяций соболя (*Martes zibellina*) и лесной куницы (*M. martes*) в районах совместного обитания на Северном Урале // Генетика. 2010. Т. 46. № 4. С. 553–557.
- Рожнов В.В., Пищулина С.Л., Мецкерский И.Г., Симакин Л.В., Лазебный О.Е., Каушанов С.Н. Генетическая структура соболя (*Martes zibellina* L.) Евразии – анализ распределения митохондриальных линий // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 251–258.
- Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В. Статья 5: Многоцветие современной цитогенетики, или Multicolor FISH today. // Вавиловский Вестник ВОГиС 1999. № 11. С. 1–16.
- Сафронов В.М. Изменение климата и млекопитающие Якутии // Зоологический журн. 2016. Т. 95. № 12. С. 1459–1474.  
<https://doi.org/10.7868/S004451341612014X>
- Сафронова Л.Д., Черепанова Е.В., Малыгин В.М., Сергеев Е.Г. Атлас синаптонемных комплексов (СК-картиотипов) некоторых видов млекопитающих. М. Товарищество научных изданий КМК. 2018. С. 11–12.
- Сводка НАЦ. Показатели воспроизводства клеточных пушных зверей в РФ по состоянию на 01.07.2021 г. (оперативные данные). 2021. 6 с. (рукопись)
- Сергеев Е.Г. Собрать. Библиографический указатель 1986–2014 гг. Методическое пособие. Научная библиотека. 2016. М. 140 с.
- Atlas of mammalian chromosomes (2nd edition). eds. *Graphodatsky AS, Perelman PL, O'Brien SJ*. Wiley-Blackwell, USA, 2020, 1008 p.
- Benirschke K., Yang E.* Chromosomes of the fisher (*Martes pennanti*) // Mammal Chromosomes Newsletter. 1966. № 21. P. 150.
- Ehrlich I.* Uber chromozenzahl, hodenzyklen und brunft bei *Martes foina* Erxl. // Revue suisse de zoologie. Geneve. 1949. V. 56. № 34. P. 621–626.
- Ford C.E., Hamerton J.L.* A colchicine hypotonic citrate squash sequences for mammalian chromosomes // Stain. Technol. 1956. V. 31. P. 247–251.
- Fredga K.* Chromosome studies in six species of Mustelidae and one of Procyonidae // Mammal. Chromosomes Newsletter. 1966. № 21. P. 145.
- Fredga K.* Comparative chromosome studies of the family Mustelidae // Heredite. 1967. V. 57. № 4. P. 295.
- Graphodatsky A.S., Yang F., Perelman P.L., O'Brien P.C., Serdukova N.A., Milne B.S., Biltueva L.S., Fu B., Vorobieva N.V., Kawada S.I., Robinson T.J., Ferguson-Smith M.A.* Comparative molecular cytogenetic studies in the order Carnivora: mapping chromosomal rearrangements onto the phylogenetic tree. Cytogenet Genome Res. 2002. V. 96(1–4). P. 137–45. PMID: 12438790.  
<https://doi.org/10.1159/000063032>
- Hall E.R.* The Mammals of North America. N.-Y.—Tor. 1981. V. 2. P. 981–987.
- Hosoda T., Suzuki H., Iwasa M.A., Hayashida H., Watanabe S., Tatara M., Tsuchiya K.* Genetic relationships within and between two Japanese species, the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *M. zibellina*, based on variation of mitochondrial DNA and nuclear ribosomal DNA // Mammal Study. 1999. V. 24. P. 25–33.
- Inoue T., Murakami T., Abramov A.V., Masuda R.* Mitochondrial DNA control region variations in the sable *Martes zibellina* of Hokkaido Island and the Eurasian Continent, compared with the Japanese marten *M. melampus* // Mammal Study. 2010. V. 35. P. 145–155.
- Ishida K., Sato J.J., Kinoshita G., Hosoda T., Kryukov A.P., Suzuki H.* Evolutionary history of the sable (*Martes zibellina brachyura*) on Hokkaido inferred from mitochondrial Cytb and nuclear Mc1r and Tcf25 gene sequences // Acta Theriol. 2013. V. 58. P. 13–24.  
<https://doi.org/10.1007/s13364-012-0103-z>
- Iwasa M.A., Hosoda T.* A note on the karyotype of the sable, *Martes zibellina brachyura*, in Hokkaido, Japan // Mammal Study. 2002. V. 27. P. 83–86.
- Kinoshita G., Sato J.J., Meschersky I.G., Pishchulina S.L., Simakin L.V., Rozhnov V.V., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Denisova G.A., Frisman L.V., Kryukov A.P., Hosoda T., Suzuki H.* Colonization history of the sable *Martes zibellina* (Mammalia, Carnivora) on the marginal peninsula and islands of northeastern Eurasia // Journal Mammal. 2015. V. 96. № 1. P. 172–184.  
<https://doi.org/10.1093/jmamma/gyu021>
- Koykul W., Basrur P.K.* The XY pair of the mink (*Mustela vison*) during different periods of testicular activity // Hereditas. 1995. V. 122. № 2. P. 169–176.
- Kurose N., Masuda R., Siraaroort B., Yoshida M.C.* Intra-specific variation of mitochondrial cytochrome b gene sequences of the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *Martes zibellina* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia) in Japan // Zool. Science. 1999. V. 16. P. 693–700.
- Kyle C.J., Davison A., Strobeck C.* Genetic structure of European pine martens (*Martes martes*), and evidence for

- introgression with *M. americana* in England // Conservation Genetics. 2003. V. 4. P. 179–188.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. 1964. V. 52. P. 201–220.
- Li B., Lu J., Monakhov V., Kang H., Xu Y., An B., Ghani M.U., Li M., Peng W., Ma X. Phylogeography of subspecies of the sable (*Martes zibellina* L.) based on mitochondrial genomes: implications for evolutionary history. Mammalian Biology 2021. doi.org/10.1007/s 42991-020-00092-0
- Moses M.J., Slatton G.H., Gambling T.M., Starmer C.F. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). III. Quantitative evaluation // Chromosoma (Berl.). 1977. V. 60. № 4. P. 345–375.
- Monachov V.G. *Martes zibellina* (Carnivora: Mustelidae) Mammalian Species. 2011. V. 43. № 876. P. 75–86. <https://doi.org/10.1644/876.1>
- Nie W., Wang J., Su W., Wang D., Tanomtong A., Perelman P.L., Graphodatsky A.S., Yang F. Chromosomal rearrangements and karyotype evolution in carnivores revealed by chromosome painting. Heredity (Edinb). 2012. V. 108(1). P. 17–27. Epub 2011 Nov 16. PMID: ; PMCID: PMC3238119. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.10722086079>
- Nie W., Wang J., O'Brien P.C., Fu B., Ying T., Ferguson-Smith M.A., Yang F. The genome phylogeny of domestic cat, red panda and five mustelid species revealed by comparative chromosome painting and G-banding. Chromosome Res. 2002. V. 10(3). P. 209–22. PMID: 12067210. <https://doi.org/10.1023/a:1015292005631>
- Obara Y. C- and G-banded karyotypes of the Japanese marten, *Martes melampus melampus* // Chromosome Information Service. 1982. № 33. P. 21–23.
- Obara Y. Karyosystematics of the mustelid carnivores of Japan // Honyurui Kagaku [Mammalian Science] 1991. V. 30. P. 197–220 (in Japanese with English abstract).
- Tsuchiya K. A contribution to the chromosome study in Japanese mammals // Proceedings of the Japan Academy. 1979. V. 55 (B). P. 191–195.
- Wozencraft W.C. Order Carnivora. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (eds. D.E. Wilson and D.M. Reeder), 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 2005. P. 532–628.
- Wurster D.H., Benirschke K. Chromosome numbers in thirty species of Carnivores // Mammal. Chromosomes Newsletter. 1967. № 8. P. 195.
- Wurster D.H., Benirschke K. Comparative cytogenetic studies in the order Carnivora // Chromosoma. 1968. V. 24. № 3. P. 336–382.

## Taxonomic Assessment of the Karyological Characteristics of Sable (*Martes zibellina*) and Other Representatives of the Genus *Martes* (Carnivora, Mammalia)

V. M. Malygin<sup>1</sup>, L. D. Safronova<sup>2</sup>, E. G. Sergeev<sup>3, #</sup>, and E. S. Levenkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Moscow State University, Vorobyovy Gory, 1/12, Moscow, 119992 Russia

<sup>2</sup> Institute of Problems of Ecology and Evolution named after A.N. Severtsov Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect, 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>3</sup> FGBNU Research Institute of fur farming and rabbit breeding named after V.A. Afanasiev, st. Trudovaya, 6, Rodniki Settlement, Moscow Region, 140143 Russia

#e-mail: seg06@rambler.ru

A revision of the original description of the karyotype of the sable *Martes zibellina* was carried out, data on the mitotic metaphase chromosomes of the female and male of this species and a comparison of their sets with those of closely related species of the genus *Martes* are presented. We also provide a description of the synaptonemal complex (SC) in the early – middle prophase of meiosis in sable spermatocytes. Comparative analysis confirmed the stability and similarity of the main cytogenetic parameters of sables and martens ( $2n = 38$ , NFa = 64–68, X is the average submetacentric, and Y is the smallest meta-, submeta-, or acrocentric). A small polymorphism associated with the representation of one- or two-armed smallest elements of the diploid set of chromosomes was revealed. These features are of little use for the development of intraspecific taxonomy of sable, but can be used to reveal phylogenetic relationships at the species and generic levels, as well as to identify the consequences of natural hybridization of closely related species of the genus *Martes*.

**Keywords:** sable, martens, karyotype, chromosome, mitosis, meiosis, synaptonemal complex, systematic

ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 599.325:591.32

РАЗМЕРЫ ТЕЛА И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА У МЕЛКИХ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ-ФИТОФАГОВ: ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ  
И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

© 2023 г. Е. И. Наумова\*, @, Т. Ю. Чистова\*, Г. К. Жарова\*

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

@E-mail: einaumova@gmail.com

Поступила в редакцию 25.10.2022 г.

После доработки 14.11.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Рассмотрен вопрос о размерном соотношении тела и пищеварительного тракта (ПТ) у мелких млекопитающих-фитофагов на примере песчанок (Gerbillidae) – группе грызунов, исключительно удобной для изучения подобных зависимостей в связи с существенными различиями в массе тела и морфологической однородности ПТ. Мы проанализировали весовые соотношения размеров тела и ПТ, сырой массы содержимого и тканей ПТ у 6 видов песчанок с 10-кратным диапазоном массы тела (в среднем от 18 до 175 г), сосуществующих в пустыне Негев – *Psammomys obesus*, *Meriones crassus*, *Gerbillus pyramidum*, *Gerbillus allenbyi*, *Gerbillus dasyurus*, *Gerbillus henleyi*. В ряду исследованных видов мелких млекопитающих с массой тела менее 0.5 кг не обнаружено линейной зависимости между размерами тела и ПТ. Аллометрия рассмотренных показателей обусловлена главным образом экологическими и физиологическими факторами.

**Ключевые слова:** мелкие млекопитающие-фитофаги, пищеварительный тракт, масса тела, аллометрия, песчанки

**DOI:** 10.31857/S1026347022600832, **EDN:** MJZEFJ

Структура и размеры пищеварительного тракта (ПТ) млекопитающих-фитофагов неизбежно сопряжены с размерами тела животных. В исследованиях размерных эффектов взаимодействия массы тела и ПТ основное внимание исследователей привлекали крупные фитофаги (Janis, 1976; Demment, 1982; Demment, Van Soest, 1985; Hofmann, 1989). Этот интерес обусловлен традиционным представлением о лучшей адаптации крупных млекопитающих к потреблению волокнистых кормов по сравнению с мелкими (Bell, 1971; Jarman, 1974). Его суть заключается в том, что высокое содержание в растительных кормах структурных углеводов требует увеличения объема пищеварительного тракта для осуществления длительной микробной ферментации. Это, в свою очередь, влечет за собой увеличение размеров тела, что приносит дополнительную выгоду – уменьшение удельных энергетических потребностей в соответствии с правилом Клайбера (Kleiber, 1961). В соответствии с этими взглядами малые размеры тела и ферментативных камер ПТ не позволяют млекопитающим, в том числе грызунам, быть успешными потребителями бедных кормов, требующих длительной микробной ферментации (Parra, 1978; Demment, 1982; Demment, van Soest, 1985; Foley, Cork, 1992; Hume,

2002; Langer, 2002). Тем не менее, среди мелких млекопитающих известны виды, высоко специализированные к питанию вегетативными частями растений (Hammond, Wunder, 1991; Justice, Smith, 1992; Castle, Wunder, 1995). В разных группах млекопитающих формирование связи размеров тела и пищеварительного тракта реализуется по-разному в зависимости от таксономической принадлежности, экологических, физиологических и морфологических факторов (McArtur, 2014; Наумова и др., 2021). Маскирующее влияние этих факторов на размерные взаимодействия в наибольшей мере проявляется у мелких травоядов, способность которых питаться целлюлозосодержащими кормами не безусловна, но в ряде случаев реализуема.

На основании статистического анализа взаимодействий размеров тела, размеров и функций пищеварительного тракта у почти 100 видов фитофагов с большим диапазоном массы тела, сгруппированных по морфофизиологическим признакам, была установлена изометрическая связь размерных показателей тела и ПТ (Clauss *et al.*, 2007). Ранее изометрическое соотношение размеров тела и ПТ было обнаружено на межвидовом уровне у отдельных групп млекопитающих (Demment, Van

Soest, 1985; Illius, Gordon, 1992; Clauss, Hammel, 2005). Однако включение в исследование физиологических показателей, таких как потребление корма, уровень метаболизма, переваримость и длительность ферментации выявили их аллометрическую зависимость от размеров тела (Clauss *et al.*, 2007, 2013; Muller *et al.*, 2013; McArthur, 2014; Steuer *et al.*, 2014). Полученные результаты привели исследователей к выводу, что увеличение размеров тела не дает фитофагам заметных преимуществ в усвоении бедных кормов.

Изометрическая зависимость между массой тела и объемом ПТ была зафиксирована и у ряда мелких млекопитающих-фитофагов, хотя неоднократно были отмечены внутривидовые вариации массы ПТ как ответ на качество диеты (Gross *et al.*, 1985, Stevens, 1988; Hammond, Wunder, 1991; Foley, Cork, 1992; Pei *et al.*, 2001a, 2001b). Все же эмпирических данных по структуре и размерам тела и органов пищеварения у мелких фитофагов, необходимых для детального количественного и функционального анализа, немного. Кроме того, данные разных авторов часто оказываются несопоставимыми ввиду использования разных приемов получения весовых характеристик (только содержимое в сухом, или сыром весе, сухая масса тканей ПТ, сырая масса ПТ в целом) у грызунов в условиях клеточного содержания на разных экспериментальных кормовых рационах. На данный момент условия подобных опытов и детали обработки материала не стандартизированы, тогда как однозначная интерпретация особенностей размерных взаимодействий у мелких млекопитающих может быть выполнена только на основании сопоставления родственных видов с разной массой тела, а не разрозненных данных по отдельным видам.

Мы предположили, что масса ПТ, освобожденного от содержимого, в большей степени скоординирована с массой тела, чем масса наполненного кормом пищеварительного тракта. В этом случае взвешивание интактных органов ПТ отразит характер взаимодействия уровня наполнения ПТ и массы тела.

Рассмотренное в работе сообщество песчанок, населяющих пустыню Негев – морфологически и экологически компактная группа мелких млекопитающих-фитофагов, удобная для рассмотрения взаимосвязи размеров тела и функций пищеварения и питания. Исследованные виды, обитающие в сходных условиях (Kam *et al.*, 1997; Degen *et al.*, 1998; Khokhlova *et al.*, 2005), характеризуются разной пищевой специализацией, 10-кратным диапазоном размеров тела и однородной морфологией ПТ (Naumova *et al.*, 2019). Последнее обстоятельство позволяет исключить из функционального анализа влияние структурных особенностей ПТ на соотношение размеров тела и ПТ у песчанок.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получены весовые показатели пищеварительного тракта у следующих видов песчанок, населяющих пустыню Негев (Израиль): *Psammomys obesus*, *Meriones crassus*, *Gerbillus pyramidum*, *Gerbillus allenbyi*, *Gerbillus dasyurus*, *Gerbillus henleyi*. Материалом для работы послужили грызуны, содержащиеся в лабораторных условиях на разных травах (по 24 взрослых особи *P. obesus* и *M. crassus*, и по 6 особей *G. pyramidum* и *G. dasyurus*), а также отловленные в природе (по 4–5 особей *P. obesus*, *G. allenbyi*, *G. dasyurus*, *G. henleyi*). *P. obesus* питается исключительно зелеными частями растений, и характеризуется высокой переваримостью волокнистых элементов растений (Degen *et al.*, 2000). Остальные виды преимущественно семяноядных песчанок в природе также периодически употребляют в пищу травянистые корма. Кормовые рационы *P. obesus* (4 экспериментальных группы по 6 особей в каждой) состояли из зеленых частей следующих кормовых растений: *Atriplex halimus*, *Sueda monoica*, *Anabasis articulata*, *Salsola tetrandra*. Четыре группы *M. crassus* кормили теми же растениями, за исключением *A. articulata*, которая была заменена *S. tetrandra* в стадии раннего плодоношения (*S. tetrandra* 2). По шесть особей *G. pyramidum* и *G. dasyurus* содержали только на плодоносящей *S. tetrandra*.

Декапитацию большей части песчанок осуществляли в вечерние часы (19–20 ч). Это позволило оценить наполнение ПТ за время дневной активности грызунов. Для выяснения уровня наполнения ПТ в ночное время 6 особей *M. crassus* анатомированы в 8 ч утра. Кроме того, были обследованы песчанки, отловленные в природе в утренние часы. Взвешивание производили с точностью до 0.01 г после вскрытия по завершении экспериментальной части работы (Naumova *et al.*, 2019, 2021; Наумова и др., 2021). Массу сырого содержимого ПТ и отдельных органов определяли как разницу между массой наполненного и освобожденного от содержимого ПТ. У двух видов *G. henleyi* и *G. allenbyi* взвешивали только наполненный ПТ. Количественный анализ всех показателей выполняли относительно массы тела. Полученные данные были обработаны методами непараметрической статистики (Statistica 12).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Масса тела и всего пищеварительного тракта.** *P. obesus* – самый крупный вид из населяющих пустыню Негев грызунов и единственный зеленоядный представитель этого сообщества. Масса тела экспериментальных и отловленных животных в среднем составила 175 г. У самого мелкого вида – *G. henleyi* – средняя масса тела составила 18.8 г. Среди рассматриваемых видов наибольшая относительная масса всего желудочно-кишечного тракта

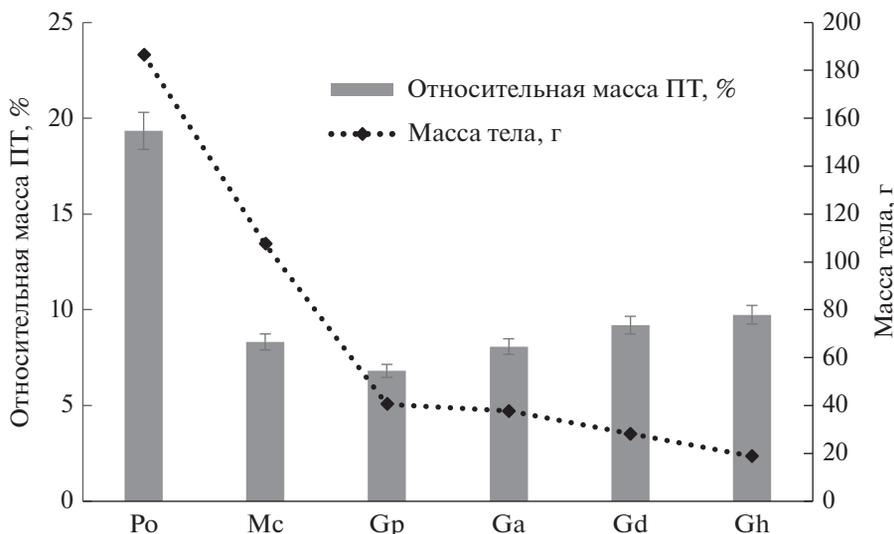


Рис. 1. Относительная масса ПТ у песчанок. Po – *P. obesus*, Mc – *M. crassus*, Gp – *G. pyramidum*, Ga – *G. allenbyi*, Gd – *G. dasyurus*, Gh – *G. henleyi*.

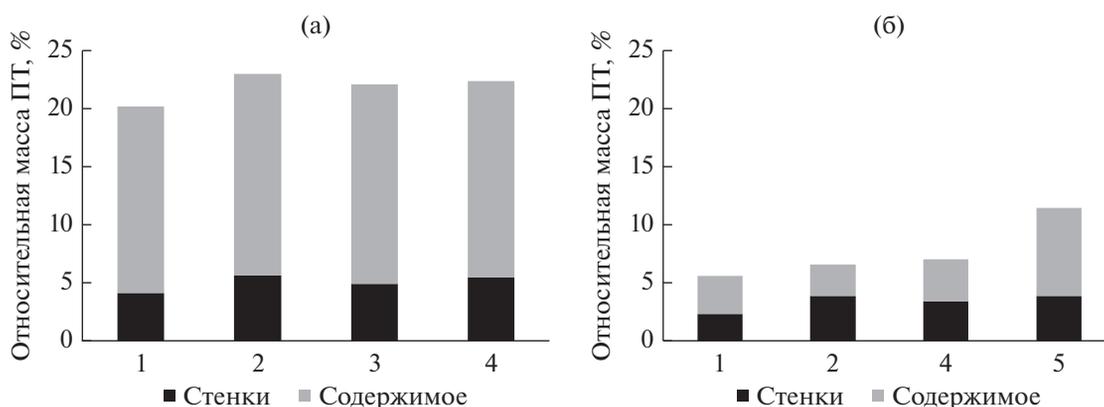


Рис. 2. Относительная масса тканей и содержимого ПТ у *P. obesus* (а) и *M. crassus* (б) при содержании на разных кормах.

(22%) была зафиксирована для *P. obesus*, значительно меньшие показатели (6–9%) были получены для представителей родов *Meriones* и *Gerbillus* (рис. 1). У разных видов *Gerbillus* просматривается обратная зависимость между массами тела и всего пищеварительного тракта. Минимальные значения доли пищеварительного тракта в массе тела – 6% были отмечены для *G. pyramidum*, тогда как у самого мелкого вида *G. henleyi* это значение достигает почти 10%.

Содержание на разных кормовых объектах не отразилось существенно на массе пищеварительного тракта *P. obesus*, но сказалось на весовых показателях у *M. crassus* (рис. 2.) У *P. obesus* наблюдались незначительные колебания массы ПТ в пределах 20–23% при содержании на разных травах, причем заметна тенденция к увеличению массы всего ПТ при кормлении песчанок *S. monoica*. У *M. crassus*

эти колебания более существенны: при содержании животных на рационе, состоящем из *S. tetrandra* с незрелыми семенами, относительная масса ПТ увеличилась примерно вдвое по сравнению с особями, потреблявшими *A. halimus* (от 5.5 до 11.5%).

**Относительная масса разных отделов ПТ.** У мелких фитофагов основную функциональную нагрузку, связанную со спецификой питания, несут локусы ферментации – преджелудок, слепая кишка и ободочная спираль. Поэтому именно эти отделы, отвечающие за усвоение структурных углеводов с помощью микробных ферментов, можно считать наиболее показательными при рассмотрении взаимосвязи размеров тела и органов пищеварения.

Самая большая доля преджелудка в массе тела вполне ожидаемо оказалась у *P. obesus*, как у исключительно зеленоядного вида (до 3.3%). У всех

**Таблица 1.** Относительная масса отделов ПТ у песчанок при содержании на разных кормах

Вид	Корм	Желудок	Преджелудок	Железистый желудок	Тонкий кишечник	Слепая кишка	Ободочная кишка
<i>P. obesus</i>	<i>A. halimus</i>	5.6 ± 2.221	3.41 ± 1.809	2.19 ± 0.446	3.83 ± 1.096	6.4 ± 0.647	4.16 ± 0.344
	<i>S. monoica</i>	5.7 ± 1.471	2.7 ± 1.55	3.01 ± 0.237	4.7 ± 0.72	8.25 ± 0.336	3.61 ± 0.572
	<i>A. articulata</i>	5.76 ± 1.133	3.03 ± 1.038	2.73 ± 0.336	4.66 ± 0.817	6.97 ± 1.371	4.42 ± 0.512
	<i>S. tetrandra</i>	5.37 ± 2.102	2.87 ± 1.838	2.5 ± 0.601	4.81 ± 0.98	7.32 ± 1.857	4.58 ± 0.867
<i>P. obesus*</i>		4.5 ± 0.615	2.58 ± 0.37	1.91 ± 0.29	2.75 ± 0.237	6.02 ± 1.053	3.09 ± 0.232
<i>M. crassus</i>	<i>A. halimus</i>	1.19 ± 0.2445	0.53 ± 0.156	0.66 ± 0.112	1.90 ± 0.366	1.32 ± 0.504	1.09 ± 0.38
	<i>S. monoica</i>	1.3 ± 0.373	0.63 ± 0.248	0.67 ± 0.129	2.03 ± 0.401	1.85 ± 0.531	1.22 ± 0.131
	<i>S. tetrandra 1</i>	1.39 ± 0.273	0.72 ± 0.177	0.67 ± 0.101	2.61 ± 0.463	1.48 ± 0.117	1.09 ± 0.239
	<i>S. tetrandra 2</i>	2.52 ± 0.888	1.35 ± 0.534	1.16 ± 0.438	3.52 ± 0.772	3.64 ± 1.121	1.62 ± 0.313
<i>M. crassus*</i>		3.04 ± 0.99	1.97 ± 0.822	1.07 ± 0.181	3.35 ± 0.476	1.51 ± 0.399	1.31 ± 0.313
<i>G. dasyurus</i>	<i>S. tetrandra 2</i>	1.6 ± 0.559	0.78 ± 0.305	0.81 ± 0.274	2.36 ± 0.686	1.96 ± 0.734	0.78 ± 0.203
<i>G. dasyurus*</i>		3.25 ± 1.157	2.22 ± 1.083	1.03 ± 0.089	3.88 ± 1.156	1.52 ± 0.599	1.01 ± 0.146
<i>G. pyramidum</i>	<i>S. tetrandra 2</i>	1.9 ± 0.442	0.97 ± 0.397	0.93 ± 0.144	2.58 ± 0.431	1.39 ± 0.272	0.65 ± 0.142
<i>G. allenbyi*</i>		2.16 ± 0.043	1.25 ± 0.049	0.91 ± 0.092	2.7 ± 0.164	1.47 ± 0.058	0.74 ± 0.16
<i>G. henleyi*</i>		2.69 ± 0.834			3.05 ± 0.389	1.52 ± 0.249	0.89 ± 0.054

Примечание. \* – зверьки из природы.

исследованных видов наблюдались значительные колебания этого признака, (табл. 1). Относительная масса всего желудка у *P. obesus* колебалась от 4.5 до 5.8%. У *M. crassus* масса всего желудка и отделено преджелудка была существенно меньше, чем у *P. obesus* и составила в среднем 2.3 и 1.4% соответственно. У песчанок рода *Gerbillus* масса желудка колебалась в районе 2%, причем максимальным (2.6%) это значение было отмечено для самого мелкого вида – *G. henleyi*, минимальным – для *G. pyramidum* (1.9%). В соответствии с этими показателями была и масса преджелудка.

Масса тонкого кишечника также оказалась вариативной. У *P. obesus* она оказалась самой большой и колебалась при содержании на разных кормах от 3.8 до 4.8%; у *M. crassus* масса тонкого кишечника в среднем составила 2.9%. У песчанок рода *Gerbillus* максимальная масса тонкого кишечника была у *G. dasyurus* (3.1%). Наименьшая относительная масса тонкого кишечника была отмечена для *G. pyramidum* (2.6%).

Различия между видами по весовым показателям слепой кишки, являющейся у грызунов основным ферментативным органом, оказались более существенными. Самая большая по относительной массе слепая кишка (в среднем 6.6%) характерна для *P. obesus*, что соответствует статусу строго зеленоядного вида. Однако колебания массы слепой кишки в зависимости от кормового рациона очень значительны и создают разницу почти в 2% (от 6 у отловленных в природе до 8.2% потреблявших *S. monoica*). Очень большой диапазон колебаний относительной массы слепой кишки наблю-

дался у *M. crassus*. Максимальная масса этого органа оказалась почти втрое выше при содержании на *S. tetrandra 2* (3.6%), чем при кормлении грызунов *A. halimus* (1.3%) и особей, отловленных в природе (1.5%). У песчанок рода *Gerbillus* масса слепой кишки колебалась от 1.4 до 2.0%.

У всех исследованных видов песчанок наблюдалась очень высокая вариативность относительной массы ободочной кишки, главным образом за счет ее проксимальной части. По убыванию массы ободочной кишки исследованные виды располагаются в следующем порядке: *P. obesus*, *M. crassus*, *G. dasyurus*, *G. henleyi*, *G. allenbyi*, *G. pyramidum*.

**Относительная масса тканей ПТ.** Вклад массы собственно тканей ПТ в массу наполненных кормом органов у разных видов песчанок неодинаков (табл. 2). У *P. obesus* масса стенок ПТ составляет около 5% массы тела. Значимой зависимости этого показателя от кормового рациона не наблюдается. Масса стенок отдельных органов также относительно постоянна при содержании на разных травах. Только при кормлении *S. monoica* отмечено увеличение массы тонкого кишечника и слепой кишки.

У *M. crassus* относительная масса стенок всего ПТ заметно меньше (в среднем 3.4%), чем у *P. obesus*, но вариативность по этому показателю в зависимости от кормления несколько больше – от 2.2% массы тела при содержании на *A. halimus*, до 3.8% при содержании на *S. monoica* и *S. tetrandra 2* (рис. 2). Эти различия возникают в основном за счет изменения массы тканей тонкого кишечни-

**Таблица 2.** Относительная масса стенок отделов ПТ при содержании песчанок на разных кормах

Вид	Корм	Желудок	Тонкий кишечник	Слепая кишка	Ободочная кишка
<i>P. obesus</i>	<i>A. halimus</i>	0.71 ± 0.155	0.72 ± 0.216	0.92 ± 0.227	1.08 ± 0.173
	<i>S. monoica</i>	0.84 ± 0.115	1.50 ± 0.199	1.33 ± 0.202	1.14 ± 0.093
	<i>A. articulata</i>	0.79 ± 0.05	0.80 ± 0.115	0.92 ± 0.164	1.16 ± 0.119
	<i>S. tetrandra 1</i>	0.81 ± 0.181	1.07 ± 0.383	0.99 ± 0.341	1.35 ± 0.229
<i>M. crassus</i>	<i>A. halimus</i>	0.54 ± 0.092	0.60 ± 0.179	0.28 ± 0.089	0.34 ± 0.094
	<i>S. monoica</i>	0.70 ± 0.072	1.47 ± 0.323	0.45 ± 0.092	0.56 ± 0.093
	<i>S. tetrandra 1</i>	0.59 ± 0.021	1.20 ± 0.344	0.44 ± 0.081	0.58 ± 0.159
	<i>S. tetrandra 2</i>	0.81 ± 0.242	1.21 ± 0.251	0.49 ± 0.10	0.55 ± 0.114
<i>G. dasyurus</i>	<i>S. tetrandra 2</i>	0.66 ± 0.113	1.28 ± 0.381	0.51 ± 0.138	0.44 ± 0.108
<i>G. pyramidum</i>	<i>S. tetrandra 2</i>	0.90 ± 0.310	1.29 ± 0.267	0.42 ± 0.043	0.46 ± 0.084

**Таблица 3.** Относительная масса содержимого ПТ песчанок при содержании на разных кормах

Корм		<i>P. obesus</i>	<i>M. crassus</i>	<i>G. dasyurus</i>	<i>G. pyramidum</i>
Экспериментальные корма	<i>A. halimus</i>	16.03 ± 1.117 (12.69–20.86)	3.32 ± 0.383 (2.42–4.70)		
	<i>S. monoica</i>	17.35 ± 0.916 (16.2–21.0)	2.67 ± 0.225 (1.99–3.32)		
	<i>A. articulata</i>	17.16 ± 0.892 (14.73–20.82)			
	<i>S. tetrandra 1</i>	16.91 ± 1.611 (12.28–21.74)	3.62 ± 0.308 (2.23–4.43)		
	<i>S. tetrandra 2</i>		7.60 ± 0.993 (3.85–11.0)	3.34 ± 0.660 (1.73–6.23)	2.84 ± 0.347 (1.72–3.92)
Естественный корм		11.80 ± 0.59 (10.43–13.47)	5.62 ± 0.648 (3.85–8.19)	5.65 ± 0.756 (3.79–7.13)	
Среднее		15.94 ± 0.601 (10.43–21.74)	4.56 ± 0.410 (1.99–11.0)	4.27 ± 0.60 (1.73–7.13)	2.84 ± 0.347 (1.72–3.92)

ка – от 0.7% при потреблении грызунами *A. halimus* почти до 1.7% при поедании *S. monoica*.

У *G. pyramidum* – наиболее крупного представителя рода *Gerbillus* (средняя масса тела 40 г), доля тканей ПТ достигает 4%, что составляет более половины всей массы заполненных кормом органов. При этом тонкий кишечник по массе стенок превышает как желудок, так и толстый отдел кишечника (слепую и ободочную кишки). Несколько меньший по размерам *G. dasyurus* имеет сходную с *G. pyramidum* относительную массу тканей отдельных органов ПТ.

**Наполнение кормом ПТ.** *P. obesus* выделяется среди прочих песчанок высоким уровнем наполнения ПТ кормом, которое у этого вида достигает

15–16% (табл. 3). В самом вместительном органе ПТ – слепой кишке у *P. obesus* содержится до одной трети всего содержимого, достигающей 7% массы тела (рис. 3). У остальных песчанок масса всего содержимого не достигает 5% массы тела, а органом, сопоставимым по вместительности со слепой кишкой, в некоторых случаях оказывается тонкий кишечник. Максимальное значение массы содержимого у *M. crassus* составляет 7.6%, а у *G. dasyurus* 5.7%, *G. pyramidum* – около 3% массы тела. Наполнение ПТ у *P. obesus* при питании разными травами оказалось сходным, а у *M. crassus* различалось более чем вдвое при потреблении *S. monoica* и *S. tetrandra 2*. Неодинаковым было наполнение также у клеточных и свободно живущих зверьков.

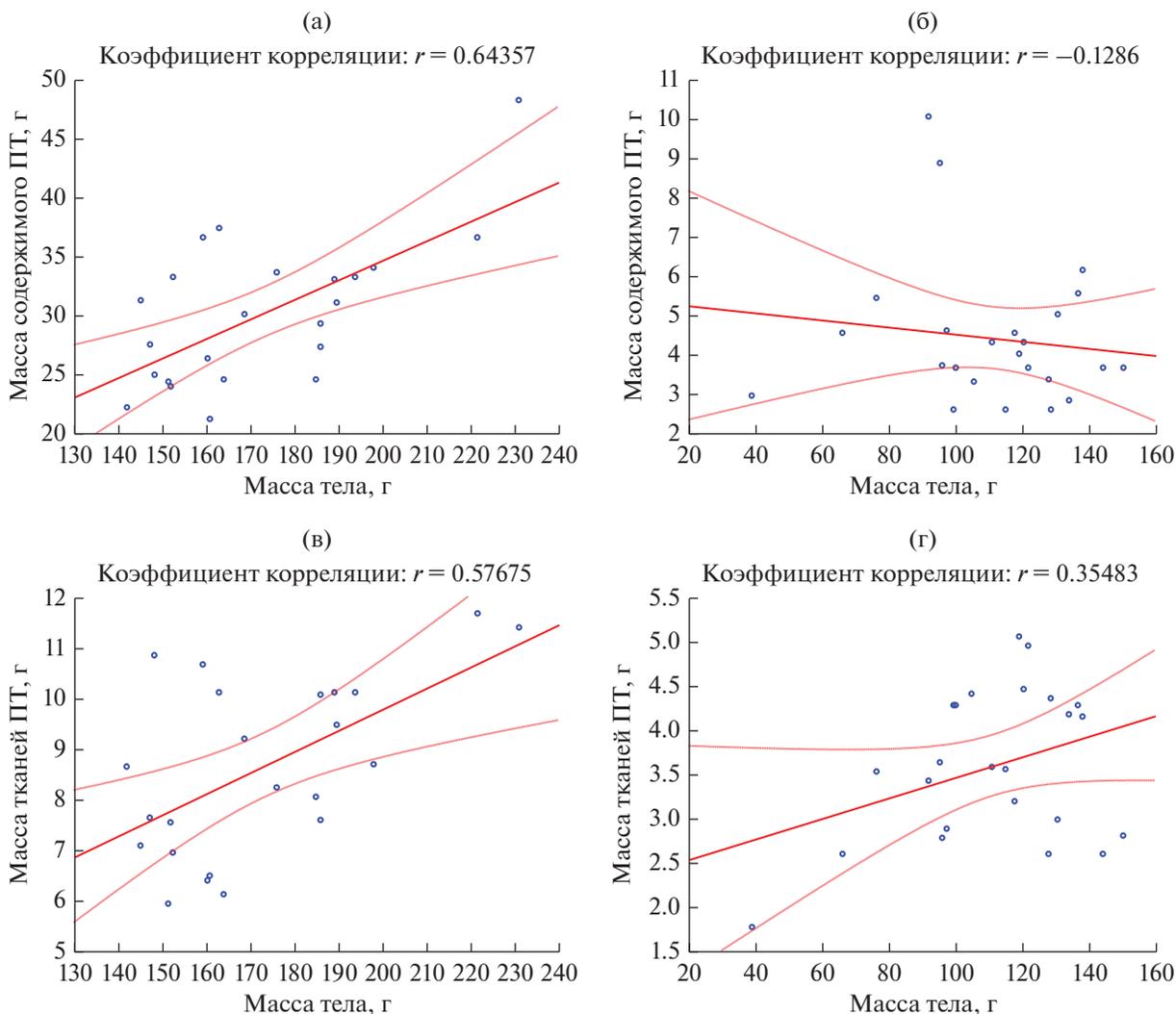


Рис. 3. Корреляция: между массой содержимого ПТ и тела in *P. obesus* (а) и *M. crassus* (б); между массой тканей ПТ и тела у *P. obesus* (в) and *M. crassus* (г).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе органной композиции млекопитающих в зависимости от размеров тела оказалось, что в пределах класса не наблюдается пропорционального увеличения масс ПТ и тела: у животного массой 7 г доля желудка и кишечника составляет 10%, а у 6.6-тонного зверя она достигает лишь 4% (Calder, 1984). Эти данные были получены для ряда млекопитающих, масса тела которых различалась более чем в 900000 раз. Однако в пределах таксонов млекопитающих более низкого ранга было выявлено изометрическое изменение размеров ПТ относительно массы тела (Parra, 1978; Demment, 1982; Clauss *et al.*, 2005).

Более детальное исследование показало, что у мелких фитофагов, таких как грызуны, наблюдаются иные зависимости во взаимосвязи размеров тела и органов ПТ. Так, в исследованном ряду

11 видов *Muroidea*, относящихся к 7 родам, не было обнаружено однозначной прямой связи между размерами тела и органов ПТ (Варшавский и др., 2017). Аллометрия наиболее четко проявилась при сравнении представителей более крупных таксонов – *Murinae* и *Arvicolinae*. Решающим фактором в этих случаях оказалась пищевая специализация и соответствующая ей структура ПТ. У зеленоядных полевок относительная масса ПТ достигала 30%, причем с преимуществом массы хорошо развитого и сложно организованного толстого отдела кишечника, тогда как у семяядных мышей масса всего ПТ составила в среднем 17% с преобладанием массы желудка и тонкого отдела кишечника. При сравнении травоядных полевок, имеющих разные размеры тела, но сходные пищевую специализацию и стратегию пищеварения, просматривается изометрия масс слепой кишки и тела. Так, водяная и серые полки близки по от-

носительной массе слепой кишки (11.5 и 9%); при сравнении норвежского и лесного леммингов также проявляется изометрия размеров слепой кишки (2.2 и 2.3%) (Варшавский и др., 2017). Песчанки отличаются от полевок по размерным соотношениям тела и ПТ.

В ряду исследованных нами видов песчанок масса тела различается в 10 раз, а в ряду преимущественно семеноядных *Meriones* и *Gerbillus* — в 6 раз. В рассматриваемом ряду близких по питанию песчанок, масса тела которых находилась в диапазоне от 18 до 111 г, не выявлено линейной зависимости между массами тела, ПТ и его отдельными органами.

*P. obesus* выделяется из всех песчанок большой массой желудочно-кишечного тракта, достигающей около 20% массы тела, при этом масса желудка колеблется в диапазоне 4.5–6%, а масса слепой кишки достигает 8%. У исследованных видов родов *Meriones* и *Gerbillus* относительная масса пищеварительного тракта составляет около 10%; при этом относительная масса слепой кишки во всех случаях едва достигает 2%. У самого мелкого вида *G. henleyi* относительная масса ПТ оказалась выше, чем у *M. crassus*. То есть, в этой группе семеноядных видов изометрического изменения массы ПТ и тела не наблюдается: у *M. crassus*, потребляющих кроме семян и зеленые корма, ПТ имеет относительно меньшую массу, чем у мелких семеноядных *G. henleyi*, у которых с уменьшением массы тела заметна тенденция к увеличению относительной массы желудочно-кишечного тракта.

Если сравнить зеленоядные виды полевок и песчанок с близкими размерами тела, то очевидно, что доля ПТ в массе тела существенно больше у полевок — 30% против 20% у песчанок. У семеноядных песчанок относительная масса ПТ также меньше, чем у других грызунов с аналогичной пищевой специализацией (Варшавский и др., 2017). Среди песчанок рода *Gerbillus* наблюдается тенденция к отрицательной корреляции масс тела и ПТ.

**Как влияет доля тканей в массе ПТ на оценку соотношения масс интактного ПТ и тела.** Масса всего ПТ и его отдельных органов складывается из масс собственно стенок ПТ и содержимого. Чтобы правильно оценить уровень наполнения ПТ кормом важно проанализировать следующие показатели: массу тканей относительно массы заполненных кормом органов и тела. У песчанок при недостаточном заполнении ПТ кормом масса стенок достигает половины всей массы органов, в условиях насыщения кормом около четверти ее массы. То есть масса сырого содержимого существенно ниже значений, полученных взвешиванием всего ПТ, или его отдельных органов. Часто используемые данные, полученные путем расчета объема кишечника как

трубы могут исказить реальные значения, особенно это касается мелких млекопитающих.

Соотношение масс содержимого и стенок ПТ неодинаково у исследованных песчанок (рис. 3). У более крупных песчанок *P. obesus* и *M. crassus* наблюдается положительная корреляция массы тканей ПТ с размерами тела, в отличие от массы содержимого. Относительная масса тканей ПТ менее изменчива, чем наполненного пищеварительного тракта. Вариативность может быть обусловлена методической погрешностью — тщательностью освобождения полостей ПТ от содержимого. У трех видов семеноядных песчанок — *M. crassus*, *G. pyramidum* и *G. dasiurus* с разной массой тела (в среднем 108, 40 и 30 г соответственно) доля тканей ПТ находится в диапазоне 3.5–4% массы тела, то есть наблюдается изометрия между этими показателями. У *P. obesus* относительная масса стенок пищеварительного тракта несколько больше и составляет около 5% массы тела. При условии незначительной изменчивости массы тканей ПТ показатели массы интактного ПТ отражают уровень наполнения отдельных органов и всего ПТ у разных видов.

**Влияние экологических и физиологических факторов.** Масса тканей отдельных органов коррелирует со степенью развития слизистой оболочки. В желудке у всех видов преобладает масса правой железистой части, стенка которой заметно толще, чем в безжелезистом преджелудке. У крупных зеленоядных песчанок преобладающим по массе органом является слепая кишка. Масса тканей и содержимого этого органа у *P. obesus* положительно коррелирует с размерами тела, тогда как у семеноядных песчанок (*M. crassus*) такой связи нет (рис. 4). У песчанок, относящихся к родам *Meriones* и *Gerbillus*, тонкий кишечник превосходит по массе остальные органы ПТ. Эти особенности в целом соответствуют пищевой специализации этих видов (Degen *et al.* 1997; Kam *et al.*, 1997). Масса тканей ободочной спирали достигает значимых величин только у *P. obesus*, что обеспечено ее значительной длиной (она образует W-образную форму) и высокими косыми складками слизистой, заполняющими просвет кишки (Naumova *et al.*, 2019). Эта часть ободочной кишки у всех исследованных песчанок редко была заполнена хитином в силу ее функциональных особенностей.

Потребление разных кормовых объектов у *P. obesus* не отразилось существенно на относительной массе ПТ и слепой кишки. У этого вида наблюдались незначительные колебания массы пищеварительного тракта в пределах 20–23% при содержании на разных травах. С наибольшей охотой *P. obesus* поедали *S. monoica* и *A. articulata*, что отразилось, прежде всего на наполнении слепой кишки. Одновременно наблюдалась и выраженная в увеличении массы некоторая гипертрофия стенок кишечника,

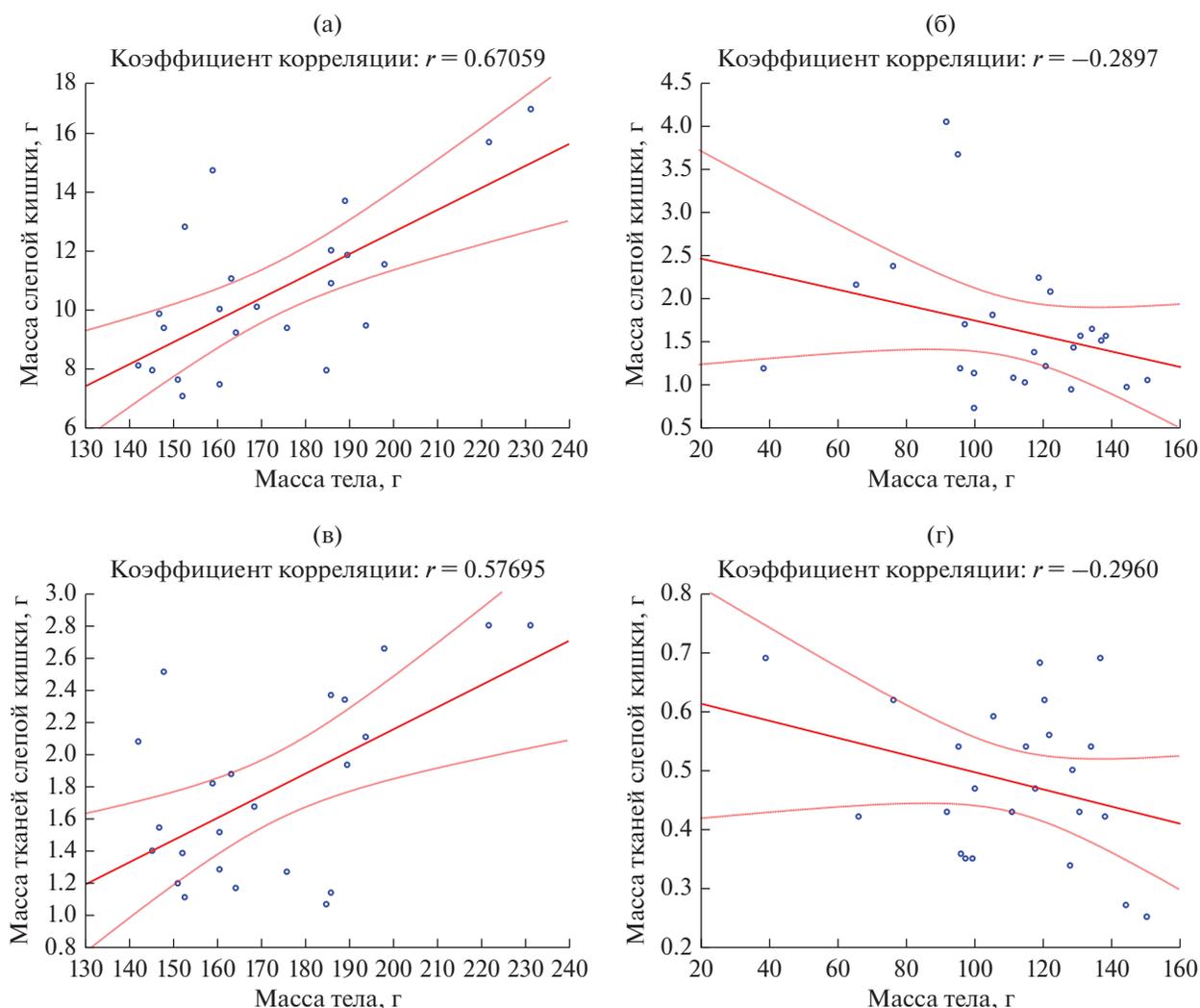


Рис. 4. Корреляция: между массой содержимого слепой кишки и тела у *P. obesus* (а) и *M. crassus* (б); между массой тканевой слепой кишки и тела in *P. obesus* (в) and *M. crassus* (г).

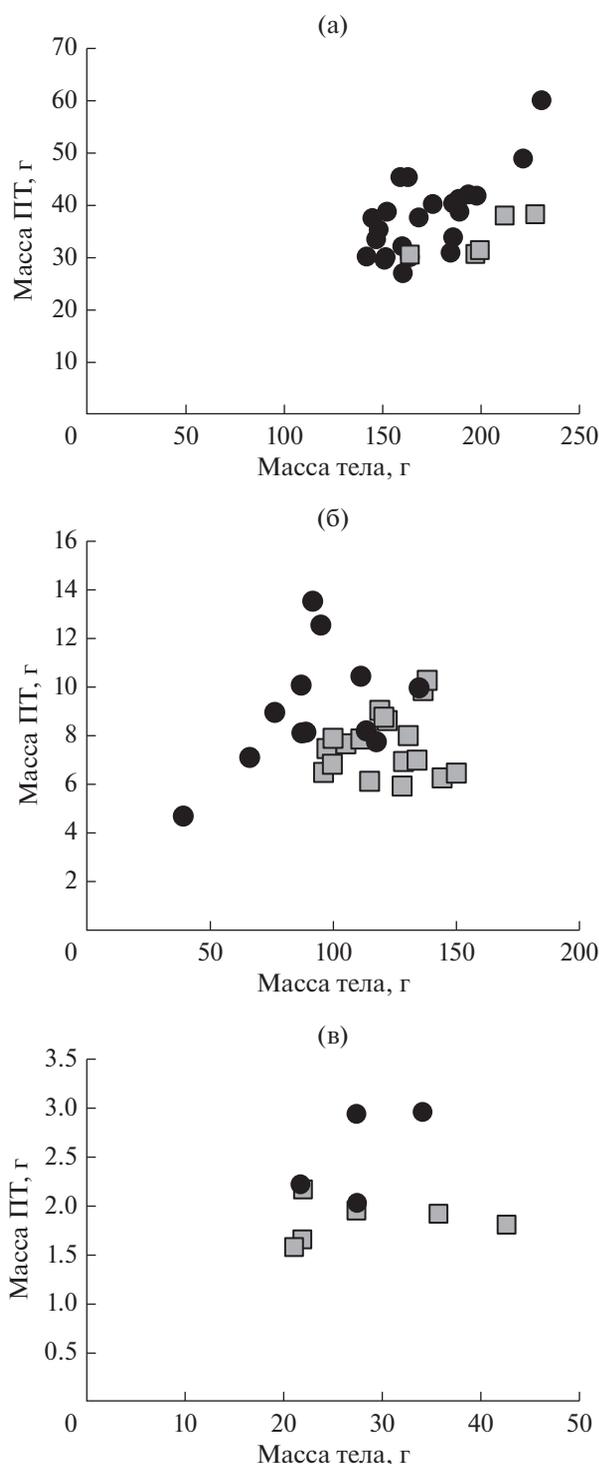
что возможно было связано с биохимической спецификой этих растений.

У *M. crassus* зарегистрирована четкая зависимость относительной массы желудочно-кишечного тракта от кормового рациона. Из предложенных трав *M. crassus* предпочитали *S. tetrandra* с завязями семян, что и отразилось на наполнении слепой кишки. Относительная масса слепой кишки у этого вида в среднем составила 3.6%, преджелудка — 1.4% массы тела. При потреблении песчанками вегетативных частей *S. tetrandra* с незрелыми семенами масса всего ПТ увеличилась вдвое, и почти в три раза возросла относительная масса слепой кишки. В проведенных нами экспериментах различия в наполнении ПТ в зависимости от состава кормового рациона у *P. obesus* составили около 2%, а у *M. crassus* 4% массы тела.

В действительности трудно ожидать четких зависимостей между размерами тела и ПТ у животных, у

которых относительная масса ПТ может увеличиваться в два раза, как мы наблюдали у *M. crassus* в наших опытах и как это было показано ранее на примере полевок (Hammond, Wunder, 1991; Lee, Houston, 1993) и *Meriones unguiculatus* (Pei et al., 2001a). Эти различия обусловлены в основном разным уровнем потребления предлагаемых растений, что отразилось на наполнении ПТ.

Различия в массе содержимого между экспериментальными и добытыми в природе зверьками мы рассматриваем как следствие различий в потреблении и качестве экспериментального рациона и естественных кормов, а также условий клеточного содержания и условий обитания в природе. При этом уровень наполнения ПТ у грызунов, анатомированных до начала или после кормовой активности, может отличаться более чем вдвое. Именно в лабильности вместительности ПТ у мелких грызунов заключается важнейшая адап-



**Рис. 5.** Корреляция между массой наполненного кормом ПТ и тела в зависимости от кормовой активности. а – *P. obesus*; б – *M. crassus*; в – *G. dasyurus*. Светлые значки – до кормовой активности, темные значки – после кормовой активности.

тивная способность к изменению кормового рациона в связи с сезонной, или годовой сменой качества кормовой базы.

Анализ размерных соотношений ПТ и тела в группе грызунов со сходной морфологией ПТ позволил выявить влияние на эту взаимосвязь некоторых экологических и физиологических факторов. Существенные сезонные изменения массы тела, сопряженные со снижением уровня метаболизма у песчанок были показаны в ряде исследований в лабораторных и полевых условиях (Degen *et al.*, 1998). Очевидно, масса ПТ у пустынных песчанок может закономерно изменяться и в природе от сезона к сезону в связи со сменой кормовой базы, а также уровнем метаболизма и его колебаниями. Самые заметные колебания размеров ПТ нами были отмечены для *M. crassus*: значительное увеличение массы ПТ, и особенно слепой кишки при содержании на *S. tetrandra 2* по сравнению с животными, потреблявшими *A. halimus*. Причиной такого сильного увеличения массы ПТ послужило не только качество кормового рациона, но и кормовая активность. *M. crassus* – ночные грызуны, поэтому данные по наполнению, полученные в утреннее время в конце периода кормовой активности, заведомо должны быть выше, чем данные, полученные после периода покоя. По-видимому, результаты по мелким песчанкам, ведущим ночной образ жизни, полученные в вечернее время до начала кормовой активности, не отражают возможностей максимального наполнения кормом ПТ этих грызунов. Напротив, у ведущей дневной образ жизни *P. obesus* относительная масса ПТ, добытых в утренние часы меньше, чем у экспериментальных животных (рис. 5). У других ночных песчанок, добытых утром после насыщения кормом во время ночной активности, масса ПТ была больше, чем у экспериментальных грызунов.

Способность мелких грызунов к существенным вариациям объема ПТ неизбежно влечет за собой оптимизацию физиологии пищеварения, что неоднократно было продемонстрировано на разных грызунах. Прежде всего, это уровень потребления корма, скорость его прохождения по ПТ и переваримость, а также особенности бактериальной ферментации в преджелудке и слепой кишке (Lee, Houston, 1993; Penry, Jumars, 1986; Pei *et al.*, 2001a, 2001b; Hume *et al.*, 2002; Наумова и др., 1921).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для исследованных видов песчанок получены неоднозначные результаты по взаимодействию масс тела, ПТ и его наполнения кормом. При значительном, 10-кратном различии в массе тела исследованных 6 видов песчанок крайние значения относительной массы их ПТ различались примерно втрое. Линейная зависимость этих показателей была нарушена следующими факторами.

Первый из этих факторов вполне очевидный — пищевая специализация, которая в общих чертах соответствует весовым показателям органов ПТ и тела. Зеленоядный вид — *P. obesus* имеет самую большую массу ПТ, составляющую 20% массы тела. Семеннаяядные виды могут замещать семенные корма зелеными, увеличивая при этом массу ПТ за счет потребления объемного корма. Масса их ПТ не достигает значений, характерных для зеленоядных видов, но все же может увеличиваться значительно. И еще один фактор, который следует учитывать — это естественные суточные колебания наполнения ПТ, обусловленные кормовой активностью. Ночные грызуны, такие как *M. crassus* и *Gerbillus*, за время кормовой активности могут вдвое повысить относительную массу ПТ, что проблематично для крупных фитофагов с длительным периодом ферментации. У *M. crassus* по нашим наблюдениям, масса ПТ может колебаться от 4.3 до 14.7%, а масса слепой кишки от 0.9 до 4.8%. У других видов, в том числе и у *P. obesus* также заметны существенные колебания массы ПТ в зависимости от кормовой активности. По-видимому, эта особенность характерна для всех мелких фитофагов. Например, рыжая полевка (*Myodes glareolus*), по неопубликованным данным Т.Ю. Чистовой, только за одну фазу кормовой активности может поглотить около 2 г сырой массы зеленых частей растений, что заметно увеличивает массу ПТ.

И, наконец, масса собственно тканей ПТ, вариативность которой определяется не только методической погрешностью, но и физиологическим состоянием ПТ в момент добычи животного, может достигать половины всей массы ПТ. Все перечисленные факты иллюстрируют отсутствие прямой связи между размерами тела и ПТ у мелких растительноядных грызунов. В отличие от крупных млекопитающих-фитофагов, у которых изометрия между размерами ПТ и тела сохраняется в условиях диверсификации физиологических процессов, у грызунов размерные взаимодействия между этими показателями как правило, сопряжены, и отражают возможность смены кормового режима у отдельных видов. Эти взаимодействия затрагивают, прежде всего, вариативность наполнения ПТ в зависимости от качества кормов, что определяет скорость прохождения корма и его переваримость, а также цикличность кормовой активности.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Варшавский Ал.А., Наумова Е.И., Жарова Г.К., Чистова Т.Ю., Варшавский Ан.А. Взаимосвязь размеров тела и органов пищеварительного тракта у

- некоторых *Myomorpha*: изометрия, или аллометрия? // Изв. РАН. Сер. биол. 2017. № 4. С. 534–540.
- 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.
- Bell R.H.V. A grazing ecosystem in the Serengeti // *Sci. Amer.* 1971. V. 225. № 1. P. 86–93.
- Calder W.A. *Size, Function, and Life History*. Harvard University Press. Cambridge. MA. 1984. 431 p.
- Castle K.T., Wunder B.A. Limits to food intake and fiber utilization in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*: effects of food quality and energy need // *J. Comparative Physiology B*. 1995. V. 164. № 8. P. 609–617.
- Clauss M., Hummel J. The digestive performance of mammalian herbivores: why big may not be that much better // *Mammal Rev.* 2005. V. 35. № 2. P. 174–187.
- Clauss M., Schwarm A., Ortmann S., Streich W.J., Hummel J. A case of non-scaling in mammalian physiology? Body size, digestive capacity, food intake, and ingesta passage in mammalian herbivores // *Comp. Biochem. Physiol. A*. 2007. V. 148. № 2. P. 249–265.
- Clauss M., Steuer P., Müller D.W.H., Codron D., Hummel J. Herbivory and body size: Allometries of diet quality and gastrointestinal physiology, and implications for herbivore ecology and dinosaur gigantism // *PLoS ONE*. 2013. V. 8(10): e68714.
- Degen A.A., Khokhlova I.S., Kam M., Nagy K.A. Body size, granularity and seasonal dietary shifts in desert gerbilline rodents. *Funct. Ecology*. 1997. V. 11. P. 53–59.
- Degen A.A., Kam M., Khokhlova I.S., Krasnov B.R., Barraclough T.G. Average daily metabolic rate of rodents: habitat and dietary comparisons // *Funct. Ecol.* 1998. V. 12. P. 63–73.
- Degen A.A., Kam M., Khokhlova I.S. Fiber digestion and energy utilization of fat sand rats (*Psammomys obesus*) consuming the chenopod *Anabasis articulata* // *Physiol. Biochem. Zool.* 2000. V. 73. № 5. P. 574–580.
- Demment M.W. The scaling of ruminoreticulum size with body weight in East African ungulates // *Afr. J. Ecol.* 1982. V. 20. № 1. P. 43–47.
- Demment M.W., Van Soest P.J. A nutritional explanation for body-size patterns of ruminant and nonruminant herbivores // *Amer. Natur.* 1985. V. 125. № 5. P. 641–672.
- Foley W.J., Cork S.G. Use of fibrous diets by small herbivores: how far the rule be “bent”? // *Trends Ecol. Evol.* 1992. V. 7. № 5. P. 159–162.
- Gross J.E., Wang Z., Wunder B.A. Effect of food quality and energy needs: changes in gut morphology and capacity of *Microtus ochrogaster* // *J. Mammal.* 1985. V. 66. P. 661–667.
- 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. Digestive strategies of mammals // *Acta Zoologica Sinica*. 2002. V. 48. № 1. P. 1–19.
- Hofmann R.R. Evolutionary steps ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative

- view of their digestive system // *Oecologia*. 1989. V. 78. P. 443–457.
- Janis C. The evolutionary strategy of the Equidae and the origins of rumen and caecal digestion. // *Evolution*. 1976. V. 30. № 4. P. 757–774.
- Jarman P.J. The social organisation of antelope in relation to their ecology // *Behaviour*. 1974. V. 48. № 1. P. 215–267.
- Justice K.E., Smith F.A. A model a dietary fiber utilization by small mammalian herbivores, with empirical results for *Neotoma* // *The Amer. Naturalist*. 1992. V. 139. № 2. P. 398–416.
- Kam M., Khokhlova I.S., Degen A. Granivory and plant selection by desert gerbils of different body size // *Ecology*. 1997. V. 78. № 7. P. 22–29.
- 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* // *Mammalia*. 2005. V. 69. № 1. P. 1–11.
- Kleiber M. *The Fire of Life: An Introduction to Animal Energetics*. N.Y. Wiley. 1961. 454 p.
- Langer P. The digestive tract and life history of small mammals // *Mammal Rev.* 2002. V. 32. № 2 P. 107–131.
- Lee W.B., Houston D.C. The effect of diet quality on gut anatomy in British voles (*Microtinae*) // *J. Comp. Physiol. B.* 1993. V. 163. P. 337–339.
- McArthur C. Do we ditch digestive physiology in explaining the classic relationship between herbivore body size diet and diet quality? // *Funct. Ecol.* 2014. V. 28. № 5. P. 1059–1060.
- Muller D.W., Codron D., Mелоrо C., Munn A., Schwarm A., Hummel J., Clauss M. Assessing the Jarman–Bell principle: scaling of intake, digestibility, retention time and gut fill with body mass in mammalian Herbivores // *Comp. Biochem. Physiol. A.* 2013. V. 164. № 1. P. 129–140.
- 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.
- 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 // *J. Comp. Physiol. B.* 2021. V. 191. P. 831–841.
- Parra R. Comparison of foregut and hindgut fermentation in herbivores. In: *Montgomery, G.G* (Ed.). *The ecology of Abooreal Folivores*. Smithsonian Institution Press. Washington DC. 1978. P. 205–229.
- 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*. 2001a. V. 74. № 5. P. 742–749.
- Pei Y.-X., Wang D.-H., Hume I. Selective digesta retention and coprophagy in Brandt's vole (*Microtus brandti*) // *J. Comp. Physiol. B.* 2001b. V. 171. P. 457–464.
- Penry D.L., Jumars D.A. Chemical reactor analysis and optimal digestion // *Bioscience*. 1986. V. 36. P. 310–315.
- Stevens C.E. *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*. Cambridge: Cambr. Univ. Press. 1988. 300 p.
- Steuer P., Sudekum K.-H., Tutken T., Muller D.W.H., Kaandorp J., Bucher M., Clauss M., Hummel J. Does body mass convey a digestive advantage for large herbivores? // *Funct. Ecol.* 2014. V. 28. № 5. P. 1127–1134.

## Body and Digestive Tract Sizes in Small Phytophagous Mammals: Influence of Ecological and Physiological Factors

E. I. Naumova<sup>1, #</sup>, T. Yu. Chistova<sup>1</sup>, and G. K. Zharova<sup>1</sup>

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

<sup>#</sup>*e-mail: einaumova@gmail.com*

The question of the size ratio of the body and the digestive tract (DT) in small phytophagous mammals is considered on the example of gerbils (*Gerbillidae*), a group of rodents that is exceptionally convenient for studying such relationships due to significant differences in body weight and morphological homogeneity of the DT. We analyzed the weight ratios of body size and DT, wet weight of contents and tissues of DT in 6 species of gerbils with a 10-fold body weight range (average 18 to 175 g) coexisting in the Negev desert – *Psammomys obesus*, *Meriones crassus*, *Gerbillus pyramidum*, *Gerbillus allenbyi*, *Gerbillus dasyurus*, *Gerbillus henleyi*. In a number of studied species of small mammals weighing less than 0.5 kg, no linear relationship was found between body size and DT. The allometry of the considered indicators is mainly due to environmental and physiological factors.

*Keywords:* small phytophagous mammals, digestive tract, body weight, allometry, gerbils

ФИЗИОЛОГИЯ  
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.8:612.014

ИСХОДНЫЙ ТИП ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОПРЕДЕЛЯЕТ  
РАЗВИТИЕ ИНФАРКТА У КРЫС В МОДЕЛИ НЕОБРАТИМОЙ  
ИШЕМИИ МИОКАРДА

© 2023 г. М. П. Морозова\*, @, А. Д. Куренкова\*\*, Ю. Л. Волкова\*\*\*, А. Б. Бердалин\*\*\*\*, Е. Н. Банзелюк\*, Б. А. Умарова\*\*\*\*\*, **Е. В. Лукошкова**\*\*\*\*\*, С. А. Гаврилова\*

\*Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*\*Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

\*\*\*Институт Физиологии, Университет Цюриха, Цюрих, 8057 Швейцария

\*\*\*\*ФГБУ “Федеральный центр мозга и нейротехнологий” ФМБА, Москва, 117513 Россия

\*\*\*\*\*Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

\*\*\*\*\*ФГБУ “НМИЦ кардиологии Министерства здравоохранения РФ”, Москва, 121552 Россия

@E-mail: [mormasha@gmail.com](mailto:mormasha@gmail.com)

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 25.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Методом анализа variability ритма сердца (BPC) у крыс оценивали связь исходного уровня общей BPC и регуляторные изменения в работе сердца до и на 1, 3 и 28 сут после моделирования необратимой ишемии (НИ). По уровню общей BPC выделили две группы крыс: с исходно “низким” и “высоким” уровнем BPC – группы НВ ( $SD_{RR} = 5.0$  мс) и ВВ ( $SD_{RR} = 8.2$  мс). НВ и ВВ крысы по-разному реагировали на холодовую пробу до и после НИ. Через 3 сут после НИ у НВ крыс была лучшая сохранность вегетативной регуляции сердца, а через 28 сут – меньший размер поражения миокарда и смертность. У ВВ крыс в очаге ишемии было выше число тучных клеток, а в зоне, незатронутой ишемией, – выше доля дегранулированных клеток, чем у НВ крыс. Таким образом, исходное состояние вегетативной нервной системы определяет развитие инфаркта миокарда у крыс.

**Ключевые слова:** вегетативная нервная система, variability ритма сердца, необратимая ишемия, инфаркт, тучные клетки

**DOI:** 10.31857/S102634702270007X, **EDN:** HAPЕFA

По анализу variability ритма сердца (BPC) и соотношению вкладов парасимпатического и симпатического отделов ВНС (пВНС и сВНС) в управление ритмом сердца можно определить тип вегетативной регуляции функций в организме (Giuliano *et al.*, 2018, Морозова и др., 2020). Так, в популяции здоровых людей выделяют лиц ваготоников, характеризующихся преобладанием вклада пВНС в регуляцию хронотропной функции сердца, симпатикотоников – с преобладанием вклада сВНС – и нормотоников – с примерно одинаковым участием пВНС и сВНС в сопровождении работы сердца (Kotenko *et al.*, 2014). В зависимости от типа вегетативной регуляции люди могут иметь различный адаптационный потенциал в условиях стресса: от способности достигать результатов в определенных видах спорта (Aubert *et al.*, 2003, Шлык, Зуфарова, 2013) до эмоциональной чувствительности к изменениям жизненных обстоятельств (Luecken, Appelhans, 2006).

Мы предполагаем, что исходные особенности влияния ВНС на работу сердца могут определять адаптационный потенциал организма не только к предъявлению мягких стрессорных воздействий, но и при развитии патологии.

Патогенез инфаркта миокарда сопровождается гибелью части сердечной мышцы, сильным болевым синдромом и падением насосной функции сердца. Это приводит к запуску стресс-реакции, заключающейся в компенсаторной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) и усилению влияния сВНС на работу сердца для поддержания достаточного уровня перфузии тканей организма (Ciarra *et al.*, 2008; Goldberger *et al.*, 2019). В клинической практике на основании анализа многочисленных данных показано, что снижение BPC (в частности, параметра  $SD_{NN}$  ниже 50 мс) после инфаркта миокарда сильно коррелирует с риском повторных сердечно-сосудистых событий и неблагоприятным про-

гнозом на продолжительность жизни (Kleiger *et al.*, 1987; Carpeggiani *et al.*, 2004; Huikuri, Stein, 2012; Goldberger *et al.*, 2019).

Кроме того, вегетативная нервная система оказывает регуляторное воздействие на реализацию иммунных функций в организме, что привело к появлению понятия “воспалительного рефлекса” (Tracey *et al.*, 2002). Высвобождение цитокинов и других медиаторов воспаления макрофагами, дендритными клетками и другими иммунными клетками воспринимается местными афферентными волокнами, которые в составе блуждающего нерва несут информацию в продолговатый мозг, в ГНС, в передний мозг и на эфферентные преганглионарные нейроны пВНС. Через высвобождение ацетилхолина и его взаимодействие с  $\alpha 7nAChR$  происходит подавление экспрессии и высвобождения провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Borovikova *et al.*, 2000), а также переключение провоспалительного ответа на процессы пролиферации. Тучные клетки являются важными участниками воспалительного ответа, поскольку сопровождают все стадии его развития, от альтерации до пролиферации. Интересно, что тучные клетки экспрессируют на своей поверхности целый спектр рецепторов к ацетилхолину: как инотропные, так и метаболитные изоформы (Radosa *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2017). Мы предполагаем, что связь вегетативного типа регуляции и функциональных последствий развития воспалительного процесса в сердце после инфаркта миокарда в определённой степени опосредована тучными клетками.

В клинических условиях, в ситуации развития фатальных кардиологических событий у пациента проверка данных гипотез невозможна. Лечащий врач не имеет возможности узнать исходный тип вегетативной регуляции пациента, ни сопоставить его с последствиями инфаркта миокарда, эффективностью и безопасностью назначаемых терапевтических мероприятий. Однако в эксперименте на лабораторных животных данные предположения можно проверить.

Целью данного исследования было изучение связи между исходным типом вегетативной регуляции у крыс, функциональной активностью тучных клеток миокарда и динамикой изменения вегетативной регуляции после моделирования необратимой ишемии миокарда.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Исследование выполняли на самцах белых беспородных крыс ( $n = 350 \pm 25$  г), которых содержали в условиях вивария с регулируемым световым режимом: 12 ч — день, 12 ч — ночь, со свободным доступом к воде и пище — стандартному гранулированному корму для разведения и содержания лабораторных жи-

вотных. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г. “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”. На проведение опытов получено разрешение комиссии по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

Перед началом эксперимента всех животных приучали к рукам, взвешивали и оценивали параметры variability ритма сердца.

**Регистрация ЭКГ и расчёт параметров ВРС.** Для оценки типа вегетативной регуляции методом анализа ВРС у бодрствующих крыс регистрировали ЭКГ в 1-м отведении 20 мин в состоянии спокойного бодрствования и 10 мин после холодовой пробы (ХП) до моделирования инфаркта и на 1, 3 и 28 сут после ишемии. Для выполнения ХП животных переносили в стеклянный куб на пакет со снегом ( $t = +4^\circ\text{C}$ ) на 3 мин.

За сутки до регистрации ЭКГ у крыс удаляли шерсть с верхней части спины с помощью машинки для стрижки животных. В день опыта на оголенные части спины крысы накладывали электроды (Skintact F-301, “Leonhard Lang GmbH”, Австрия), фиксировали их ремненным жилетом. Затем животных адаптировали к условиям эксперимента в стеклянном кубе с затемненными стенками в течение 1 ч.

Сигнал с накожных электродов регистрировали с частотой оцифровки 2 кГц с помощью многоканальной системы ECGA (“Hugo Sachs Elektronik”, Германия), подсоединенной через аналогово-цифровой преобразователь E14-140 (“L-CARD”, Россия) к персональному компьютеру, и программы PowerGraph (Россия). Для обработки полученных записей использовали адаптированное для крыс программное обеспечение LabVIEW (“National Instruments”, США), которое обеспечивает как определение длительностей RR-интервалов, предоставляя оператору возможность удалять эктопические комплексы и артефакты, так и последующий расчет необходимых статистических (во временной области) параметров.

По 5-минутным фрагментам записи ЭКГ определяли медиану значений мгновенной ЧСС (HR, уд./мин), и медиану длительности RR-интервалов (RR, мс). Из параметров ВРС, определяемых во временной области, рассчитывали показатели, характеризующие: 1) общую ВРС — стандартное отклонение для RR-интервалов ( $SD_{RR}$ , мс) и для ЧСС ( $SD_{HR}$ , уд./мин); 2) наиболее быстрые изменения ритма сердца, интерпретируемые как вклад пВНС в общую ВРС — квадратный корень из среднего квадрата разностей величин длительности смежных RR-интервалов синусового происхождения (RMSSD, мс), процент RR-интервалов синусового происхождения, отличающихся от

предыдущего более чем на 3 мс – рNN3; 3) относительно медленные изменения ритма, интерпретируемые как вклад сВНС в общую ВРС – SDARR и SDAHR, т.е. стандартные отклонения средних значений RR-интервалов и ЧСС, вычисленных по 1 минутным сегментам записи, аналогичного принятого для человека показателя SDANN, рассчитываемого по 5-минутным сегментам.

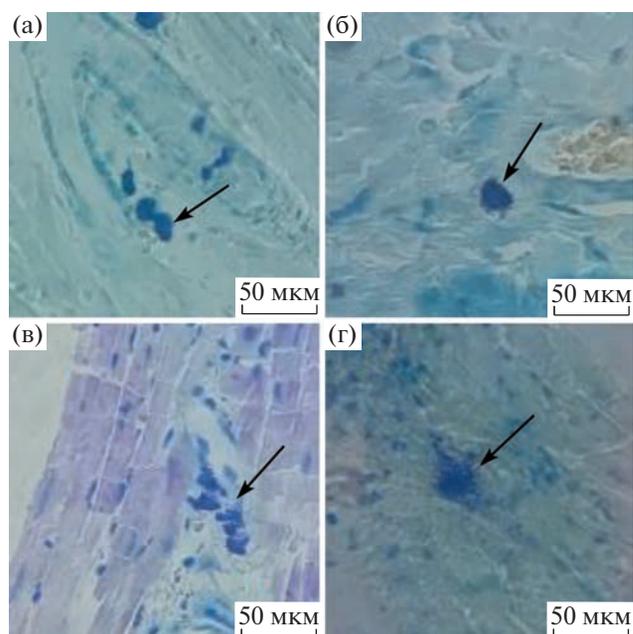
Перед моделированием необратимой ишемии у всех крыс регистрировали ЭКГ и вычисляли параметры ВРС. После этого по значению показателя общей ВРС,  $SD_{RR}$ , с помощью кластеризации методом  $k$ -средних животные были разделены на подгруппы с исходно высоким (ВВ) и исходно низким (НВ) уровнем общей ВРС.

**Моделирование инфаркта.** Инфаркт моделировали у крыс через прокол в межреберье без искусственной вентиляции легких и вскрытия грудной клетки под общей анестезией хлоралгидратом (в/б 400 мг/кг). Необратимую ишемию (НИ) миокарда выполняли перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии (Selye *et al.*, 1960, Гаврилова и др., 2017). Результаты исследования были объединены и оценены в трех сериях экспериментов.

**Характеристика поражения сердца.** Через 28 сут после моделирования инфаркта миокарда у эвтаназированных крыс извлекали сердце и по фиброзному кольцу удаляли сосуды и предсердия. Для оценки веса частей сердца последовательно по внутренним границам отделяли правый желудочек, межжелудочковую перегородку (не затрагивая внешнюю стенку левого желудочка). Из передне-боковой стенки левого желудочка вырезали рубец (белесая ткань) и взвешивали правый желудочек, межжелудочковую перегородку, рубец и оставшуюся живую ткань левого желудочка без перегородки и рубца.

**Морфофункциональная характеристика тучных клеток миокарда.** На 1, 3 и 28 сут опыта крысам под общим наркозом через катетер промывали сердце раствором 4%-ного формалина в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4). Образцы ткани сердца инкубировали в 10%-ного раствора формалина в фосфатно-солевом буфере в течение 1 сут и промывали проточной водой в течение 7 ч. С помощью прибора Лаборант (Россия) осуществляли стандартную гистологическую проводку препаратов последовательно через следующие растворы: 50%-ный этиловый спирт – 6 ч, 70%-ный этиловый спирт – 6 ч, 96%-ный этиловый спирт – дважды по 6 ч, 100%-ный этиловый спирт – 6 ч, спирт : : хлороформ 1:1 – 6 ч, хлороформ – 6 ч, хлороформ : : парафин 1:1 – 6 ч, парафин – 5 ч.

Парафиновые срезы толщиной 5 мкм получали на микротоме Microm HM 3559 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Гидратацию и дегидратацию осу-



**Рис. 1.** Репрезентативные микрофотографии тучных клеток разной степени дегрануляции. Условные обозначения: (а) – недегранулированные клетки; (б, в) – слабо и сильно дегранулированные клетки; (г) – очень сильно дегранулированные клетки.

ществляли по стандартной методике с использованием толуола и этанола разной концентрации.

Срезы окрашивали 0.1%-ным раствором толуидинового синего по модифицированному протоколу (Puebla-Osorio *et al.*, 2017). Анализ проводили на микроскопе Imager A1 Axio (Zeiss, Германия).

На срезах миокарда определяли количество тучных клеток в пяти полях зрения при увеличении  $\times 400$  в трех зонах: передней стенке, межжелудочковой перегородке и задней стенке, не менее чем в четырех кольцевых срезах средней части сердца. Оценивали степень дегрануляции тучных клеток в различных зонах, не менее 8 клеток на зону в разных кольцевых срезах, по баллам: 0 – недегранулированные клетки (рис. 1а); 1 и 2 – слабо и сильно дегранулированные клетки, соответственно (рис. 1б, 1в); 3 – очень сильно дегранулированные клетки, вплоть до потери очертаний (рис. 1г).

**Статистическую обработку** результатов проводили с использованием программного пакета SPSS Statistics версии 23.0 (“IBM”, США). Нулевую гипотезу отвергали при  $p < 0.05$ . Для описания количественных переменных применяли медиану и квартили, для качественных – частоту и долю (в процентах).

Соответствие распределения количественных переменных нормальному проверяли методом построения частотных гистограмм и тестом Шапиро–Уилка. Для качественных зависимых пере-

**Таблица 1.** Исходные значения параметров ВРС у крыс с исходно высоким и низким уровнем ВРС

Параметры ВРС	Крысы с исходно низким уровнем ВРС ( <i>n</i> = 109)	Крысы с исходно высоким уровнем ВРС ( <i>n</i> = 99)
RR, мс	175 (165; 187)	174 (160; 186)
HR, уд./мин	343 (321; 364)	345 (324; 376)
SD <sub>RR</sub> , мс	5.0 (4.2; 5.8)	8.2 (7.3; 8.9)****
SD <sub>HR</sub> , уд./мин	9.5 (7.9; 11.4)	16.9 (14.5; 20.0)****
RMSSD, мс	3.1 (2.3; 4.4)	4.3 (3.0; 5.5)****
pNN3, %	33 (17; 49)	40 (25; 55)*
SDARR, мс	2.6 (1.8; 5.2)	5.3 (2.8; 8.7)****
SDAHR, уд./мин	5.2 (3.4; 10.2)	10.6 (5.0; 20.2)****

Условные обозначения: \* –  $p < 0.05$ ; \*\*\*\* –  $p < 0.00001$  – статистически значимые различия между НВ и ВВ группами.

менных сравнения частот между категориями группирующих переменных выполняли посредством критерия  $\chi^2$  Пирсона или точного критерия Фишера. Для сравнения нескольких связанных групп использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями. Последующие попарные сравнения проводили с помощью *t*-критерия для зависимых выборок с поправкой Бонферрони. При изучении корреляций между количественными переменными использовали метод расчета коэффициента корреляции по Пирсону. С помощью кластерного анализа методом *k*-средних экспериментальных животных разделяли на высоковариабельных и низковариабельных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Характеристика крыс в зависимости от их исходного уровня ВРС.** Перед моделированием инфаркта миокарда у крыс регистрировали ЭКГ и анализировали параметры ВРС в состоянии покоя. С помощью кластерного анализа методом *k*-средних популяцию животных разделили на крыс с исходно условно низким уровнем ВРС (НВ; SD<sub>RR</sub> = 5.0 ± 0.8 мс) и исходно условно высоким уровнем ВРС (ВВ; SD<sub>RR</sub> = 8.2 ± 0.8 мс). Абсолютные значения медиан показателей ВРС у крыс, полученные в начале эксперимента, представлены в табл. 1.

У НВ крыс все показатели ВРС были значимо меньше по сравнению с животными из группы ВВ. При этом ЧСС и длительность RR-интервалов между группами животных не различались.

После выполнения холодной пробы (ХП) как у НВ, так и у ВВ животных наблюдали увеличение ЧСС на 15% и соответствующее уменьшение на 13% длительности RR-интервалов. Реакция параметров ВРС на предъявление ХП различалась. Так, НВ животные реагировали на ХП увеличением всех показателей общей ВРС: SD<sub>RR</sub> и SD<sub>HR</sub>

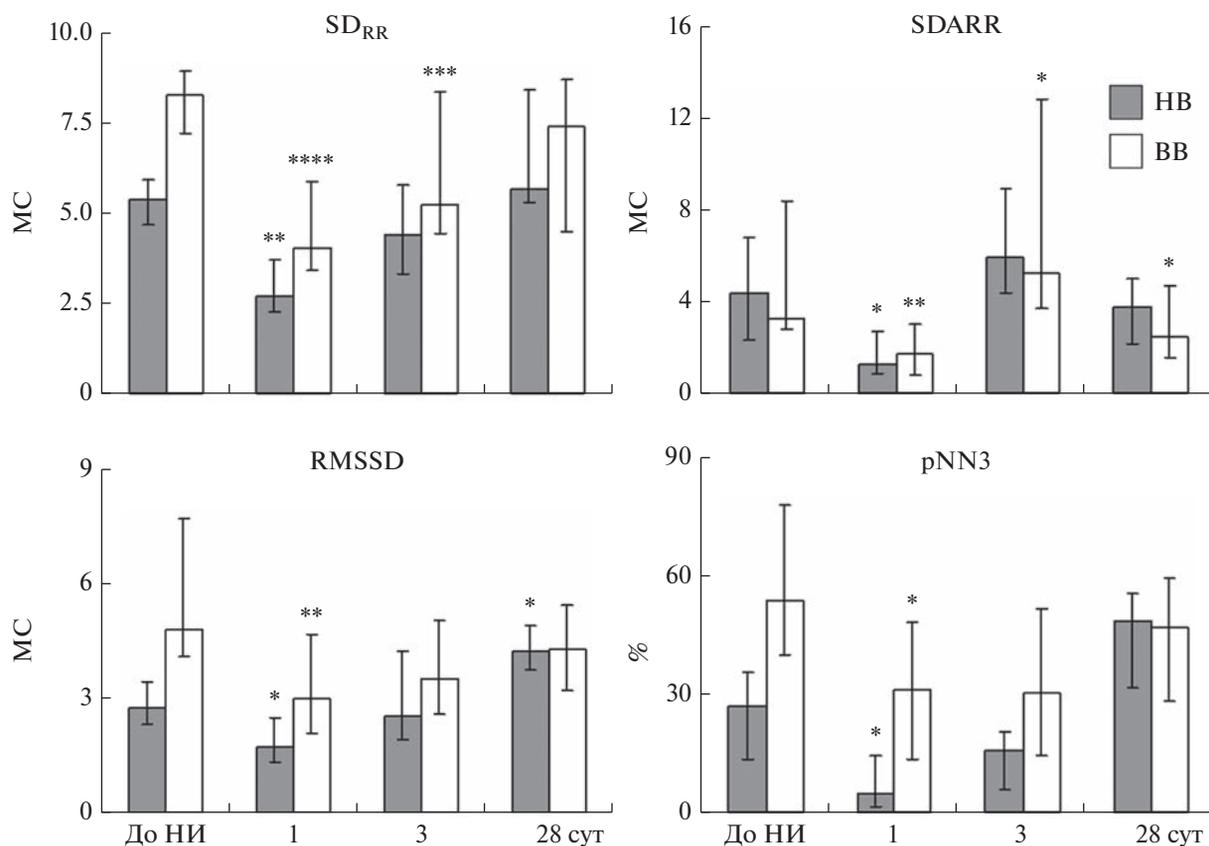
увеличивались на 22 и 84% соответственно. Параметры RMSSD и pNN3, характеризующие вклад парасимпатического отдела ВНС в общую ВРС, уменьшались на 12 и 28% соответственно. А показатели SDARR и SDAHR, характеризующие вклад симпатического отдела ВНС в общую ВРС, напротив, возрастали в 1.8 и 3.3 раза.

Для ВВ крыс после ХП было показано значимое снижение на 13% показателя SD<sub>RR</sub> и увеличение на 14% – SD<sub>HR</sub>. Показатели RMSSD и pNN3 уменьшались на 24 и 34%, что по степени реакции значимо не отличалось от группы НВ. Параметры SDARR и SDAHR возрастали на 96 и 109% соответственно, что гораздо менее выражено, чем у НВ крыс.

Таким образом, у ВВ крыс все значения параметров ВРС были значимо выше, чем у НВ животных. В ответ на мягкое стрессорное воздействие показатели вклада парасимпатического отдела изменялись сходным образом, в то время как показатели сВНС у НВ животных реагировали с большей амплитудой.

**Влияние инфаркта на ЧСС у крыс с разным исходным уровнем ВРС.** Через 1 сут после моделирования необратимой ишемии у крыс развивалась тахикардия: уровень ЧСС увеличивался на 17–26% в популяциях НВ и ВВ крыс. Значимых отличий по степени выраженности тахикардии между группами показано не было. С 3 по 28 сут опыта в обеих группах животных наблюдали восстановление уровня ЧСС к доинфарктным значениям, за исключением того, что у НВ крыс к 28 сут эксперимента появилась тенденция к развитию брадикардии: произошло уменьшение на 5% ЧСС ( $p = 0.058$ ).

После моделирования НИ выполнение теста с холодным воздействием показало, что через 1 сут у НВ крыс параметр ЧСС реагирует значимым увеличением на 7%, а через 3 и 28 сут на уровне тенденции возрастает примерно в 2 раза ( $p = 0.08$ ). У ВВ крыс на всех сроках после моделирования НИ



**Рис. 2.** Параметры ВРС у HB и BB крыс до и на 1, 3, 28 сут после моделирования НИ. Условные обозначения: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ , \*\*\*\* –  $p < 0.0001$  – статистически значимые отличия от показателя до моделирования НИ в соответствующей группе.

ответ параметров ЧСС сохранялся на доинфарктном уровне.

#### *Динамика параметров ВРС в модели необратимой ишемии миокарда*

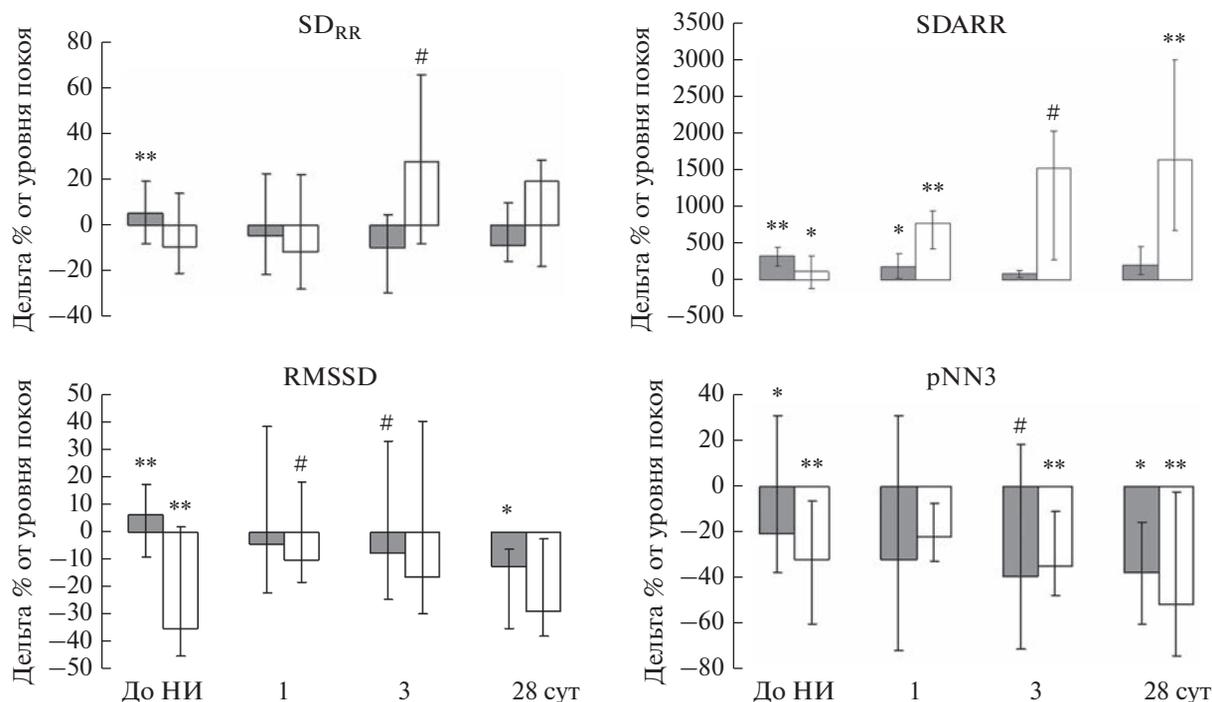
**В состоянии спокойного бодрствования.** Через 1 сут после развития инфаркта у HB крыс наблюдали уменьшение на 25–43% всех показателей общей ВРС. Значения параметров RMSSD и pNN3 уменьшились на 32–74%, а параметров SDARR и SDAHR – на 60–69%. На 3 сут опыта все показатели ВРС у HB крыс не отличались от исходных значений. Через 28 сут после НИ значения показателей RMSSD значимо возросли в 2 раза по сравнению с исходным уровнем, тогда как показатели общей ВРС и параметры SDARR и SDAHR не отличались от исходной нормы (рис. 2).

У BB крыс через 1 сут после моделирования НИ наблюдали снижение всех показателей ВРС: SD<sub>RR</sub>, SD<sub>HR</sub> – на 26–47%, показателей RMSSD и pNN3 – на 55 и 48%, SDARR и SDAHR – на 66 и 56%, соответственно. К 3 сут опыта параметры RMSSD и pNN3 восстанавливались до исходного уровня, тогда как показатели общей ВРС и вклада

сВНС в общую ВРС оставались все еще сниженными на уровне 1 сут после операции. К 28 сут эксперимента наблюдали восстановление структуры ВРС, за исключением сниженных на 36 и 53% значений параметров SDARR и SDAHR (рис. 2).

**Реакция на ХП.** Через 1 сут после НИ предъявление ХП сопровождалось увеличением в 2 и 1.5 раза параметров SDARR и SDAHR у HB крыс. Остальные параметры ВРС в ответ на ХП не изменялись, что отличалось от реакции параметров ВРС до моделирования инфаркта. Через 3 и 28 сут развития НИ подобная картина ответа показателей ВРС на ХП сохранялась, однако отмечена тенденция к возвращению чувствительности показателей RMSSD и pNN3: они отвечали снижением своего уровня на 13% ( $p = 0.06$ ) и 37% ( $p < 0.008$ ) соответственно (рис. 3).

Выполнение ХП через 1 сут после НИ у BB крыс не выявило значимого изменения показателей общей ВРС. После теста наблюдали тенденцию к уменьшению на 18% параметра pNN3, что в 2 раза меньше, чем было исходно до инфаркта. Однако SDARR и SDAHR после ХП были увеличены в 6.7 и 8.7 раза соответственно, т. е их чувствительность к функциональному тесту была



**Рис. 3.** Реакция параметров ВРС на предъявление ХП до и на 1, 3, 28 сут после моделирования НИ у НВ и ВВ крыс. Условные обозначения: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$  – статистически значимые отличия ответа в дельта % от уровня покоя – ось X; # –  $p < 0.1$  – тенденция к отличию от уровня покоя.

увеличена трехкратно по сравнению с доинфарктной степенью реакции. Через 3 сут после операции выполнение ХП у ВВ крыс приводило к увеличению показателей общей ВРС  $SD_{RR}$  и  $SD_{HR}$  на 43 ( $p = 0.09$ ), и 84% соответственно, что существенно отличается от реакции до операции и реакции параметров через 1 сут после НИ. Детальное рассмотрение ответа на ХП показало, что параметр  $pNN3$  значимо снижался на 27%, тогда как для  $SD_{ARR}$  и  $SD_{AHR}$  наблюдали тенденцию к увеличению в 9.7 ( $p = 0.07$ ) и 16 раз ( $p = 0.07$ ) соответственно. Через 28 сут после моделирования НИ у ВВ крыс реакция на ХП не затрагивала показатели общей ВРС, но выявляла снижение на 62% ответа  $pNN3$  и рост в 11.4 и 17.3 раза параметров  $SD_{ARR}$  и  $SD_{AHR}$  (рис. 3).

Таким образом, у НВ животных изменение вегетативной регуляции работы сердца после инфаркта наблюдали преимущественно в острые сроки опыта и оно не затрагивало влияния симпатического отдела ВНС. У ВВ крыс наблюдали более длительный период ремоделирования вегетативной регуляции, которая не завершилась к окончанию срока наблюдения и сопровождалась сильными изменениями в реактивности симпатического отдела ВНС.

**Морфофункциональный анализ популяции тучных клеток сердца.** Поскольку подсчет числа тучных клеток и оценка их дегрануляции происходи-

ли в остром эксперименте, то каждой временной точке соответствует отдельная группа животных, а для оценки функционального состояния тучных клеток во временной точке “до операции” забор гистологического материала производили у интактных животных.

У интактных НВ и ВВ крыс не наблюдали различий в количестве и степени дегрануляции тучных клеток во всех отделах сердца.

Моделирование НИ приводило к увеличению числа тучных клеток в передней стенке миокарда – зоне, непосредственно затронутой ишемией (табл. 2). При этом у ВВ животных количество тучных клеток в передней стенке на 3 и 28 сут опыта было значимо больше по сравнению с НВ крысами. На протяжении всех сроков эксперимента в передней стенке обнаруживались сильно и очень сильно дегранулированные клетки, хотя значимых отличий между НВ и ВВ животными по функциональному статусу тучных клеток не обнаружено (рис. 4).

Количество тучных клеток в задней стенке и межжелудочковой перегородке также возрастало в острый период после инфаркта миокарда, но к 28 сут не отличалось от значений у интактных животных (табл. 2). В перегородке через 1 и 3 сут увеличивалось количество очень сильно и сильно дегранулированных тучных клеток. В эти же сроки в задней стенке возрастал процент сильно и слабо

**Таблица 2.** Число тучных клеток в различных зонах сердца

День опыта	Уровень ВРС	Передняя стенка	Межжелудочковая перегородка	Задняя стенка
До	НВ	4.0 (3.5; 4.0)	1.0 (1.0; 1.5)	3.0 (2.5; 3.0)
	ВВ	3.0 (3.0; 3.0)	1.0 (1.0; 1.5)	3.0 (2.5; 3.0)
1 сут	НВ	6.0 (4.5; 8.3)*	2.0 (1.3; 2.8)*	4.5 (2.5; 5.75)*
	ВВ	7.0 (5.0; 8.0)*	4.0 (3.0; 5.0)*	5.0 (5.0; 6.0)*
3 сут	НВ	7.0 (5.8; 9.3)*	3.5 (2.8; 4.5)*	5.0 (3.75; 6.0)*
	ВВ	11.0 (9.5; 12.3)*\$	6.0 (4.8; 6.5)*	5.0 (4.75; 5.25)*
28 сут	НВ	26.0 (26.0; 26.0)**	1.5 (1.3; 1.8)	1.5 (1.25; 1.75)
	ВВ	32.5 (27.8; 37.3)**\$	3.5 (2.3; 4.8)	2.5 (2.25; 2.75)

Условные обозначения. \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$  – статистически значимые отличия по сравнению с интактными крысами до операции; \$ –  $p < 0.05$  – статистически значимые различия между НВ и ВВ группами на данном сроке.

**Таблица 3.** Характеристика поражения сердца на 28 сут после инфаркта

Характеристики сердца	НВ	ВВ
Рубец, мг	162 (98; 188)*	200 (192; 268)
Правый желудочек, мг	167 (163; 200)	198 (179; 227)
Межжелудочковая перегородка, мг	246 (198; 288)	245 (228; 306)
Левый желудочек, мг	281 (244; 346)#	172 (124; 224)
Сердце, мг	929 (728; 1035)	867 (836; 902)
Рубец/левый желудочек, %	35 (25; 39)*	58 (46; 65)
Рубец/сердце, %	18 (16; 19)*	24 (22; 30)

Условные обозначения. \* –  $p < 0.05$  – статистически значимые отличия параметра НВ крыс, по сравнению с ВВ группой; # –  $p = 0.07$  – тенденция к отличию.

дегранулированных клеток. К 28 сут степень дегрануляции в целом уменьшалась, но не достигала соотношения интактного контроля (рис. 4). Разницы между НВ и ВВ крысами в количестве тучных клеток в непосредственно не затронутых ишемией участках сердца не было. Однако, в отличие от НВ, у ВВ животных присутствовали сильно дегранулированные клетки через 28 сут (рис. 4).

В целом, несмотря на схожее распределение по дегрануляции, количество тучных клеток у НВ животных в зоне ишемии было значимо ниже по сравнению с ВВ. Более того, у НВ крыс наблюдали более быстрое восстановление популяции недегранулированных тучных клеток в зонах, непосредственно не затронутых ишемией: задней стенке миокарда и межжелудочковой перегородке.

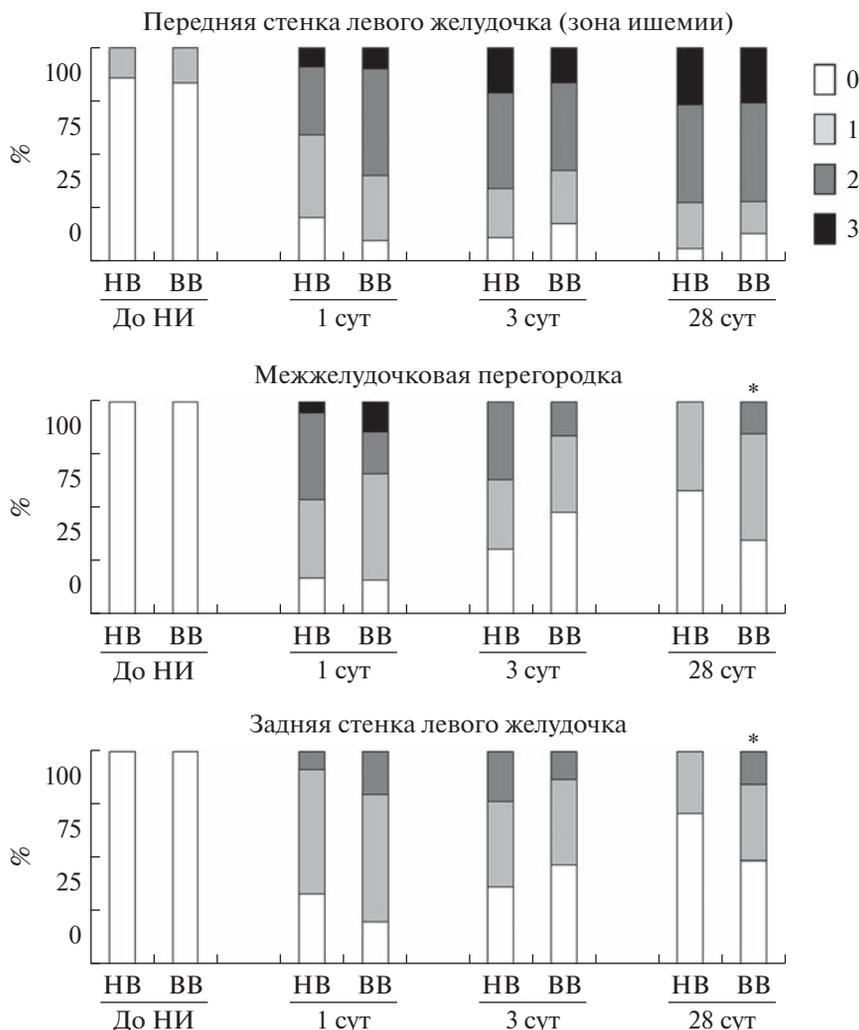
**Оценка размера поражения миокарда после инфаркта и выживаемости крыс.** Через 28 сут после моделирования НИ у ВВ животных были значимо больше абсолютные значения массы сформированного рубца, а также массы рубца, нормированные на массу всего левого желудочка и массу всего сердца (табл. 3). При этом масса левого желудочка у НВ крыс на уровне тенденции ( $p = 0.07$ )

была выше, чем в ВВ группе, а абсолютные значения масс стенки правого желудочка, межжелудочковой перегородки не отличались (табл. 3).

Выживаемость в группе НВ животных к 28 сут составила 70%, а среди ВВ крыс – 53%, т.е. у ВВ животных к 28 сут наблюдали тенденцию ( $p = 0.067$ ) к большей смертности (рис. 5). Стоит отметить, что основная гибель ВВ крыс наблюдалась в основном в оставленные сроки, после 3 сут эксперимента.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Исходно популяция крыс неоднородна по уровню ВРС.** Результаты исследования показали, что животные изначально неоднородны по уровню абсолютных значений показателей ВРС. По значению параметра  $SD_{RR}$  можно различить крыс с разным типом вегетативной регуляции: относительно низким и высоким уровнем общей вариабельности ритма сердца. Было показано, что при равной длительности RR интервала и ЧСС все параметры ВРС значительно ниже у крыс НВ группы, по сравнению с ВВ животными. Реакции в разных группах на мягкое стрессорное воздей-



**Рис. 4.** Соотношение тучных клеток в разном функциональном состоянии до и на 1, 3 и 28 сут после моделирования необратимой ишемии миокарда. Условные обозначения: 0 – доля недегранулированных тучных клеток; 1 – доля слабодегранулированных тучных клеток; 2 – сильно дегранулированные тучные клетки; 3 – очень сильно дегранулированные тучные клетки. Условные обозначения. \* – отличия в структуре популяции тучных клеток между NB и BB крысами на данном сроке опыта.

ствии ХП также различаются. NB животные на тест холодом реагируют увеличением уровня общей ВРС прежде всего за счет более выраженного роста показателей симпатического отдела ВНС, на фоне снижения параметров парасимпатического вклада ВНС в общую ВРС. BB крысы в период восстановления после ХП демонстрируют незначительные, противоположно направленные колебания параметров общей ВРС. Отсутствие реакции, по всей видимости, обусловлено компенсированным снижением показателей парасимпатического вклада ВНС и сопоставимым ростом параметров симпатического вклада ВНС в общую ВРС. Различия в уровне ВРС и реакции на ХП указывают на то, что вегетативное сопровождение сердца организовано по-разному у NB и BB

крыс, что может влиять на адаптационные возможности животного в стрессорных условиях.

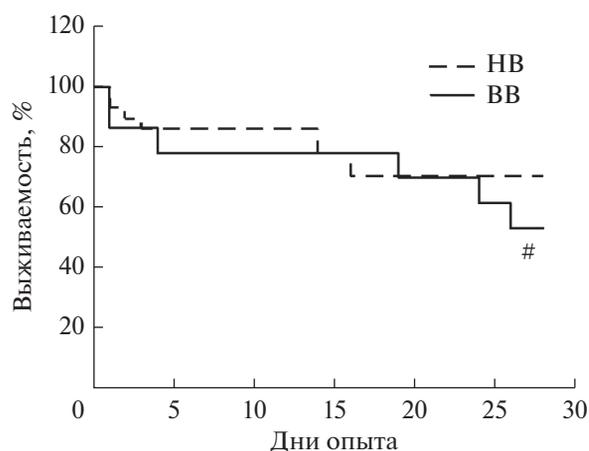
Известно, что популяция здоровых людей может сильно различаться по показателям ВСП, реакциям параметров ВСП на раздражители и соотношению влияний пВНС и сВНС на ритм сердца (Baevsky *et al.*, 2007; Golosheykin *et al.*, 2017; Tegegne *et al.*, 2018; Giuliano *et al.*, 2018; Spangler *et al.*, 2018). Согласно двухконтурной модели регуляции сердечного ритма, предложенной Р.М. Баевским, пейсмекерная активность синусного узла сердца находится под воздействием системы иерархически организованных влияний ВНС, в которой выделяют автономный и центральный контуры управления (Баевский и др., 2001). Считается, что автономный контур регуляции отвечает за цикличность ритма сердца, связанную с дыхательными

движениями, обеспечиваемую на уровне синусного узла, вегетативных ганглиев, расположенных внутри грудной клетки, блуждающего нерва и его ядер в продолговатом мозге. Центральный контур регуляции отвечает за цикличность, связанную с влиянием звеньев подкорковых структур продолговатого мозга, гипоталамо-гипофизарного уровня и коры головного мозга, и обеспечивается симпатoadреналовыми воздействиями (Heart rate variability, 1996; Шлык, Зуфарова, 2013).

По оценке выраженности влияний автономного и центрального контуров регуляции ритма сердца (Baevsky *et al.*, 2007) и их реактивности можно судить о возможности к оптимизации функций в организме человека в покое, возможности их мобилизации и способности к быстрому и полноценному восстановлению после нее (Lima-Borges *et al.*, 2018). Предполагается, что при преобладании центрального типа регуляции ритма сердца организм людей затрачивает больше усилий на контроль его работы, чем у лиц с автономным типом регуляции. Однако при центральном типе регуляции ниже функциональные и адаптационные возможности организма, а при автономном типе — выше уровень саморегуляции, что позволяет достигать оптимума работы системы без перенапряжения системы управления (Шлык, Зуфарова, 2013). В связи с этим можно сделать предположение о различии возможностей регуляторных систем адаптации к внешним воздействиям и путей их реализации у НВ и ВВ лиц (Максимов и др., 2015; Сокрыт и др., 2016, Ефремова, Спицин, 2017).

По всей видимости, организация вегетативного контроля может определять патогенез различных заболеваний. Так встречаются единичные сообщения о том, что в зависимости от типа вегетативной регуляции у пациентов могут реализовываться разные патогенезы заболеваний суставов (Сокрыт и др., 2016). Обнаружено, что среди пациентов, страдающих ревматоидным артритом, преобладают лица с преобладанием центрального контура регуляции, т.е. НВ субъекты, а среди лиц с хроническим подагрическим артритом и остеоартритом — люди с преобладанием автономного контура регуляции ритма сердца (Сокрыт и др., 2016). Авторы исследования, на основании данных ведения 643 больных, указывают, что эффективность реабилитационных мероприятий у пациентов может зависеть от типа их вегетативной регуляции (Сокрыт и др., 2016).

В условиях клиники, на людях не проводилось исследований влияния типа вегетативной регуляции на последующее восстановление хронотропной функции сердца после фатальных кардиологических событий. Крысы являются удобным экспериментальным объектом для моделирования отдельных звеньев патогенеза заболеваний человека, в том



**Рис. 5.** Выживаемость НВ и ВВ крыс к 28 сут после моделирования необратимой ишемии миокарда. Условные обозначения: # —  $p = 0.067$  — тенденция к отличию между группами НВ и ВВ.

числе патологий сердечно-сосудистой системы, поэтому целесообразно перенести подходы к измерению ВРС, а также типизации животных на субпопуляции по типу вегетативной регуляции функций. В нашем исследовании крысы с исходно низким уровнем ВРС, соответствуют людям с преобладанием центрального контура регуляции ритма сердца, а животные с высоким уровнем ВРС — людям с преобладанием автономного контура регуляции (Морозова и др., 2020).

**Исходный уровень ВРС определяет развитие и исход инфаркта миокарда у крыс.** Выполнение необратимой окклюзии левой ветви коронарной артерии приводит к формированию очага некроза в передней стенке левого желудочка сердца крыс. Аfferентная информация от болевых рецепторов в сердце, механорецепторов, регистрирующих изменение геометрии и падение силы сокращения сердца, барорецепторов в сосудистом русле по нервным путям достигает ядра солитарного тракта в продолговатом мозге, важного распределительного информационного центра (Goldberger *et al.*, 2019). В результате серии переключений в нейронных сетях информация достигает ГНС и происходит активация сВНС (Ciarka *et al.*, 2008). Это направлено на компенсаторное увеличение сердечного выброса и поддержание артериального давления на исходном уровне, однако впоследствии может приводить к ухудшению сердечной функции (Triposkiadis *et al.*, 2009). Длительная гиперактивация сВНС снижает порог возникновения фибрилляции и повышает вероятность развития угрожающих жизни аритмий, в то время как воздействие пВНС на сердце повышает этот порог и защищает от аритмий (Schwartz *et al.*, 1992; Ciarka *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2019). Оценка параметров ВСР в эксперименте позволила деталь-

но изучить состояние парасимпатических и симпатических регуляторных влияний, участвующих в адаптации работы сердца крыс после развития инфаркта.

У всех животных в острые сроки после НИ в состоянии покоя наблюдали падение всех параметров ВРС, однако у НВ крыс они возвращались на доинфарктный уровень уже к 3 сут наблюдения. У ВВ крыс процесс восстановления регуляторных влияний ВНС на ритм сердца был замедленным: нормализация показателей общей ВРС и параметров вклада пВНС в нее была завершена к концу сроков наблюдения, тогда как значения параметров вклада сВНС не восстановились к 28 дню эксперимента. Выполнение пробы с холодным воздействием показало, что состояние регуляторных контуров у НВ животных более сохранно: несмотря на изменение чувствительности параметров общей ВРС и вклада пВНС только на ранних сроках после инфаркта, влияния на сердце со стороны сВНС оставались на доинфарктном уровне на всем постоперационном периоде наблюдения. У ВВ животных после моделирования необратимой ишемии миокарда наблюдали более выраженные колебания отдельных параметров ВРС, на фоне развития все возрастающей чувствительности сВНС к холодному воздействию. Последний факт можно интерпретировать как развитие гиперчувствительности со стороны сВНС (Ciarcka *et al.*, 2008), что может приводить к необратимым последствиям для жизни: гиперсенситизация миокарда к влияниям сВНС вместе с попыткой восстановить достаточный уровень кровообращения будет дополнительно изнашивать условно “интактный” миокард инфарктных животных. Эта гипотеза подтверждается увеличением размера рубца и тенденцией к более высокой смертности в группе ВВ-крыс. Увеличение активности сВНС в отставленные сроки после инфаркта может быть связано с разрастанием нервных окончаний в выживших зонах миокарда и его большей чувствительностью к катехоламинам (Jardine *et al.*, 2005; Гаврилова и др., 2017).

Результаты нашего исследования только частично согласуются с данными других исследователей, поскольку ранее никто не делил популяцию животных по исходному типу вегетативной регуляции. Как и в нашем исследовании, в работе Kolettis и соавторов показано развитие тахикардии в покое, увеличение показателей вклада сВНС и снижение показателей вклада пВНС в общую ВРС в течение первых 24 ч после необратимой ишемии миокарда у крыс (Kolettis *et al.*, 2018). Интересно, что исследователи обнаружили, что показатели RMSSD у крыс с повышенной двигательной активностью были выше, чем у менее подвижных животных (Kolettis *et al.*, 2018). Вероятно, это может служить косвенным признаком неоднородности популяции крыс и их способности адаптировать

вегетативную регуляцию сердца после инфаркта миокарда. В других исследованиях динамики показателей ВРС у крыс после инфаркта также наблюдалась тахикардия на 1-й, 3-й и 7-й день эксперимента, которая к 28 дням возвращалась к уровню ложнооперированных животных (Aires *et al.*, 2017). Методами спектрального анализа ВРС в исследовании Aires и соавт. у инфарктных крыс показано снижение на 1 и 3 сут опыта параметра HF, отражающего влияние пВНС на сердце, тогда как через 7 и 28 сут наблюдения было зарегистрировано восстановление нормального уровня мощности показателя HF. Общая мощность спектра, TP, была снижена у крыс, на 1 сутки после необратимой ишемии, что согласуется со снижением абсолютных значений временных параметров  $SD_{RR}$  и  $SD_{HR}$  в нашем исследовании. Тем не менее, никаких существенных изменений в абсолютных значениях показателя LF, характеризующих вклад сВНС в общую ВРС, после инфаркта не наблюдали. Показатель баланса LF/HF достоверно не изменялся у крыс с инфарктом (Aires *et al.*, 2017).

В клинических исследованиях было показано, что восстановление показателей ВРС у пациентов наблюдается уже через 6 недель после инфаркта миокарда (Lampert *et al.*, 2003). В нашем эксперименте на крысах динамика временных параметров ВРС в целом соответствовала клиническим данным.

**Значение тучных клеток в вегетативной регуляции работы сердца.** Развитие воспалительной реакции в миокарде крыс после моделирования необратимой ишемии имеет свою хронологию: 1–3 сут наблюдения соответствуют острой стадии воспаления, а 28 день после операции характеризуется завершением процессов ремоделирования миокарда и формированием рубца (Гаврилова и др., 2017). В динамике развития воспалительной реакции отдельные регуляторное значение имеют влияния ВНС (Tracey *et al.*, 2002) и отзывчивость на ее стимулы иммунных клеток-эффекторов (Borovikova *et al.*, 2000, Radosa *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2017). Тучные клетки играют особенную роль в реализации воспалительного ответа, т.к. сопровождают его на всем протяжении от стадии альтерации до пролиферации и могут выделять как провоспалительные, так и противовоспалительные факторы. На ранних сроках воспаления тучные клетки высвобождают провоспалительные цитокины и хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в зону ишемии. На поздних сроках воспаления тучные клетки выступают источником ростовых факторов (VEGF, bFGF) и могут участвовать в заживлении и формировании сосудистых коллатералей после ишемии. Таким образом, эффекты тучных клеток зависят от времени, прошедшего с момента инициации воспаления, а также их количества и уровня функциональной активности самих кле-

ток. Вероятно, отдельное влияние на состояние тучных клеток оказывает ВНС, т.к. на их клеточных мембранах обнаружена экспрессия целого спектра рецепторов к ацетилхолину (Radosa *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2017).

Результаты нашего исследования показывают, что после моделирования инфаркта на всех сроках опыта количество тучных клеток отличалось у крыс с разным типом вегетативной регуляции: у ВВ крыс число тучных клеток особенно в зоне ишемии сердца было выше, чем в НВ подгруппе. И если по степени дегенерации распределение тучных клеток в ишемизированной области было примерно одинаковым у НВ и ВВ животных, то в зонах условно интактного миокарда показана более быстрая нормализация состава тучных клеток у крыс с преобладанием автономного типа вегетативной регуляции.

Гистамин — один из главных медиаторов тучных клеток — участвует не только в организации локального и системного воспалительного ответа, но и способен оказывать свои эффекты на пейсмейкерные клетки синусного узла, клетки проводящей системы сердца, а также афферентные и эфферентные нервные волокна, иннервирующие миокард.

В экспериментах на овцах показано, что гистамин может увеличивать длительность фазы плато потенциала действия кардиомиоцитов (Thome *et al.*, 1992), и, следовательно, повышать риск кальциевой перегрузки клеток и вероятность их гибели. Уменьшение длительности потенциала действия будет приводить к тахикардии, что соотносится с результатами нашего исследования в 1 сут после операции. Развитие тахикардии сопровождается и уменьшением длительности фазы диастолы, а именно в этот период происходит восстановление кислородного и питательного резерва миокарда. Таким образом, развитие тахикардии в инфарктном сердце будет дополнительно потенцировать риск ишемического повреждения условно сохранного миокарда, на который перераспределится нагрузка по перекачке крови (Thome *et al.*, 1992). Кроме того, через Н1-рецепторы гистамин снижает скорость проведения импульса через атриоventрикулярный узел и повышает его пейсмейкерную активность, что, в конечном счете, будет приводить к электрической нестабильности миокарда и возникновению фатальных для жизни аритмий (Wolff, Levi, 1986). Результаты нашего исследования косвенно согласуются с этими данными: ВВ крысы были больше подвержены смертности после НИ, что также может быть связано с негативными эффектами гистамина на хронотропную функцию сердца.

Кроме того, известно, что гистамин может оказывать свои эффекты через Н3-рецепторы, расположенные непосредственно на постгангли-

онарных симпатических нервных волокнах, иннервирующих сердце. Их активация ингибирует высвобождение норадреналина и, следовательно, уменьшает его кардиостимулирующий эффект (Lokhandwala, 1978; Malinowska *et al.*, 1998). Этот факт может объяснять возрастающую чувствительность параметров вклада сВНС в общую ВРС после НИ в холодном тесте у ВВ крыс. Кроме того, в экспериментах на кошках, обнаружено, что гистаминовые рецепторы экспрессируются и на афферентных окончаниях чувствительных нейронов сердца, а значит, через этот путь возможна передача информации об изменении не только механических свойств сердца, но и химического окружения нервных окончаний, вызванном ишемией (Nishi *et al.*, 1977). Позже было показано, что стимуляция сенсорных С-волокон сердца высвобождает пептид, связанный с геном кальцитонина, который увеличивает частоту сердечных сокращений, сократительную способность и коронарный кровоток, а гистамин через пресинаптические Н3-рецепторы модулирует высвобождение CGRP в сердце (Imamura *et al.*, 1996) и, вероятно, также опосредует развитие тахикардии в острые сроки развития инфаркта.

Таким образом, опираясь на результаты нашего исследования и данные других исследователей, можно заключить, что от активности тучных клеток зависит характер афферентной информации, поступающей в сердечно-сосудистый центр продолговатого мозга, и степень модуляции эфферентных влияний со стороны по крайней мере сВНС на сердце после моделирования необратимой ишемии миокарда у крыс. Количественное содержание и выраженность доли функционально активных тучных клеток определяются исходным типом вегетативной регуляции животного уже после развития необратимой ишемии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индивидуальный подход и концепция “персонализированной медицины” требуют составления базы данных на каждого пациента и предполагают учет его биологических и психосоциальных особенностей. Мы полагаем, что одной из важных физиологических характеристик индивидуальности пациента может стать тип вегетативной регуляции, оцененный по вариабельности ритма сердца.

Настоящее исследование показало, что деление популяции крыс по уровню общей ВРС, определенному по значению показателя  $SD_{RR}$ , позволяет выявить различия в адаптивных возможностях ВНС на предъявление холодной пробы и моделирование необратимой ишемии миокарда. Также были продемонстрированы различия в количественном и качественном составе тучных клеток, участвующих в координации воспалительного ответа не только в зоне ишемии, но и областях услов-

но интактного миокарда. Таким образом, предположение о возможности использования типа вегетативной регуляции в качестве одной из физиологических характеристик для описания индивидуальных особенностей человека в концепции персонафицированной медицины получило предварительное подтверждение в экспериментах на крысах. Оценка параметров ВРС может стать обязательной процедурой в программе регулярного медицинского осмотра.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В., Гаврилушкин А.П., Довгалецкий П.Я., Кукушкин Ю.А., Миrows Т.Ф., Прилуцкий Д.А., Семенов Ю.Н., Фёдоров В.Ф., Флейшман А.Н., Медведев М.М. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем // Вест. аритмологии. 2001. Т. 24. С. 65–87.
- Гаврилова С.А., Марков М.А., Бердалин А.Б., Куренкова А.Д., Кошелев В.Б. Изменение симпатической иннервации сердца крысы при экспериментальном инфаркте миокарда; влияние пептида Семакс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 5. С. 570–574.
- Ефремова Р.И., Спицин А.П. Особенности устойчивости симпатотонического типа вегетативной регуляции у юных лыжников под действием тренировочных и соревновательных нагрузок // Журн. медико-биологических исследований. 2017. Т. 5. № 4. С. 90–92.
- Максимов А.Л., Лоскутова А.Н., Аверьянова И.В. Информативность показателей вариабельности кардиоритма при оценке адаптированности юношей призывного возраста к условиям Северо-Востока России // Журн. медико-биологических исследований. 2015. № 4. С. 66–79.
- Морозова М.П., Евсеев А.М., Прохорова А.В., Миронова О.Г., Банзлюк Е.Н., Гаврилова С.А. Связь вегетативного тонуса девушек и юношей с их психологическим профилем личности // Физиология человека. 2020. Т. 46. № 5. С. 15–26.
- Сокрут В.Н., Сокрут О.П., Синяченко О.В. “Вегетативный паспорт” и реабилитационный диагноз в артериальной практике // Боль. Суставы. Позвоночник. 2016. № 1(21). С.45–51.
- Шлык Н.И., Зуфарова Э.И. Нормативы показателей вариабельности сердечного ритма у исследуемых 16–21 года с разными преобладающими типами вегетативной регуляции // Вестник Удмуртского университета. Сер. “Биология. Науки о Земле”. 2013. № 4. С. 96–105.
- Aires R., Pimentel E.B., Forechi L., Dantas E.M., Mill J.G. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with myocardial infarction // Braz J Med Biol Res. 2017. V. 50. № 1. P. e5511.
- Aubert A.E., Seps B., Beckers F. Heart rate variability in athletes // Sports Med. 2003. V. 33. № 12. P. 889–919.
- Baevsky R.M., Baranov V.M., Funtova I.I., Diedrich A., Pashenko A.V., Chernikova A.G., Drescher J., Jordan J., Tank J. Autonomic cardiovascular and respiratory control during prolonged spaceflights aboard the International Space Station // J. Appl. Physiol. 2007. V. 103. № 1. P. 156–161.
- Borovikova L.V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R., Wang H., Abumrad N., Eaton J.W., Tracey K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. // Nature. 2000. V. 405. № 6785. P. 458–462.
- Carpeggiani C., Landi P., Michelassi C., Raciti M., Macerata A., Emdin M. Early assessment of heart rate variability is predictive of in-hospital death and major complications after acute myocardial infarction // Int J Cardiol. 2004. V. 96. № 3. P. 361–368.
- Ciarka A., van de Borne P., Pathak A. Myocardial infarction, heart failure and sympathetic nervous system activity: new pharmacological approaches that affect neurohumoral activation // Expert Opin Investig Drugs. 2008. V. 17. № 9. P. 1315–1330.
- Giuliano R.J., Karns C.M., Bell T.A., Petersen S., Skowron E.A., Neville H.J., Pakulak E. Parasympathetic and sympathetic activity are associated with individual differences in neural indices of selective attention in adults // Psychophysiology. 2018. V. 55. P. e13079.
- Goldberger J.J., Arora R., Buckley U., Shivkumar K. Autonomic Nervous System Dysfunction: JACC Focus Seminar // J. Am. Coll Cardiol. 2019. V. 73. N. 10. P. 1189–1206.
- Golosheykin S., Grant J.D., Novak O.V., Heath A.C., Anokhin A.P. Genetic influences on heart rate variability // Int. J. Psychophysiol. 2017. V. 115. P. 65–73.
- Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology // Eur. Heart J. 1996. V. 17. № 3. P. 354–381.
- Huikuri H.V., Stein P.K. Clinical application of heart rate variability after acute myocardial infarction // Front Physiol. 2012. V. 3. P. 41.
- Imamura M., Smith N.C., Garbarg M., Levi R. Histamine H3-receptor-mediated inhibition of calcitonin gene-related peptide release from cardiac C fibers. A regulatory negative-feedback loop // Circ Res. 1996. V. 78. № 5. P. 863–869.
- Jardine D.L., Charles C.J., Ashton R.K., Bennett S.I., Whitehead M., Frampton C.M., Nicholls M.G. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model // J. Physiol. 2005. V. 565. Pt. 1. P. 325–333.
- Kleiger R.E., Miller J.P., Bigger J.T., Moss A.J. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction // Am. J. Cardiol. 1987. V. 59. № 4. P. 256–262.
- Kolettis T.M., Kontonika M., Lekkas P., Vlahos A.P., Baltogiannis G.G., Gatzoulis K.A., Chrousos G.P. Autonomic responses during acute myocardial infarction in the rat model: implications for arrhythmogenesis // J. Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. 2018. V. 29. № 4. P. 339–345.
- Kotenko M.A., Smelishva L.N., Kuznetsov A.P., Kiseleva M.M. Stress-induced indicators of hydrolytic function of the stomach and the pancreas in persons with various type of autonomic nervous system // Vopr Pitan. 2014. V. 83. № 6. P. 18–24.
- Lampert R., Ickovics J.R., Viscoli C.J., Horwitz R.I., Lee F.A. Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the beta-blocker heart attack trial // The American J. Cardiology. 2003. V. 91. № 2. P. 137–142.

- Lima-Borges D.S., Martinez P.F., Vanderlei L.C.M., Barbosa F.S.S., Oliveira-Junior S.A.* Autonomic modulations of heart rate variability are associated with sports injury incidence in sprint swimmers // *Phys Sportsmed.* 2018. V. 46. № 3. P. 374–384.
- Lokhandwala M.F.* Inhibition of sympathetic nervous system by histamine: studies with H1- and H2-receptor antagonists // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1978. V. 206. № 1. P. 115–122.
- Luecken L.J., Appelhans B.M.* Early parental loss and salivary cortisol in young adulthood: the moderating role of family environment // *Dev. Psychopathol.* 2006. V. 18. № 1. P. 295–308.
- Malinowska B., Godlewski G., Schlicker E.* Histamine H3 receptors—general characterization and their function in the cardiovascular system // *J. Physiol Pharmacol.* 1998. V. 49. № 2. P. 191–211.
- Nishi K., Sakanashi M., Takenaka F.* Activation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers of the cat by pain producing substances and by noxious heat // *Pflugers Arch.* 1977. V. 372. № 1. P. 53–61.
- Puebla-Osorio N., Sarchio S.N.E., Ullrich S.E., Byrne S.N.* Detection of Infiltrating Mast Cells Using a Modified Toluidine Blue Staining // *Methods Mol Biol.* 2017. V. 1627. P. 213–222.
- Radosa J., Dyck W., Goerdts S., Kurzen H.* The cholinergic system in guttate psoriasis with special reference to mast cells // *Exp. Dermatol.* 2011. V. 20. № 8. P. 677–679.
- Qin M., Zeng C., Liu X.* The cardiac autonomic nervous system: A target for modulation of atrial fibrillation // *Clin Cardiol.* 2019. V. 42. № 6. P. 644–652.
- Schwartz P.J., La Rovere M.T., Vanoli E.* Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification // *Circulation.* 1992. V. 85. 1 suppl. P. 177–191.
- Selye H., Bajusz E., Grasso S., Mendell P.* Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat // *Angiology.* 1960. V. 11. P. 398–407.
- Shi L., Xu H., Wu Y., Li X., Zou L., Gao J., Chen H.* Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors involve the imidacloprid-induced inhibition of IgE-mediated rat and human mast cell activation // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 51896–51906.
- Spangler D.P., Gamble K.R., McGinley J.J., Thayer J.F., Brooks J.R.* Intra-individual variability in vagal control is associated with response inhibition under stress // *Front Hum Neurosci.* 2018. V. 12. P. 475.
- Teegene B.S., Man T., van Roon A.M., Riese H., Snieder H.* Determinants of heart rate variability in the general population: the lifelines cohort study // *Heart Rhythm.* 2018. V. 15. № 10. P. 1552–1558.
- Thome U., Berger F., Borchard U., Hafner D.* Electrophysiological characterization of histamine receptor subtypes in sheep cardiac Purkinje fibers // *Agents Actions.* 1992. V. 37. № 1–2. P. 30–38.
- Tracey K.J.* The inflammatory reflex // *Nature.* 2002. T. 420. № 6917. P. 853–859.
- Tripsodiadis F., Karayannis G., Giamouzis G., Skoularigis J., Louridas G., Butler J.* The sympathetic nervous system in heart failure: physiology, pathophysiology, and clinical implications // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009. V. 54. № 19. P. 1747–1762.
- Wolff A.A., Levi R.* Histamine and cardiac arrhythmias // *Circ. Res.* 1986. V. 58. № 1. P. 1–16.

## The initial of Autonomic Tone Determines the Development of Irreversible Myocardial Ischemia in Rats

M. P. Morozova<sup>1</sup>, A. D. Kurenkova<sup>2</sup>, Ju. L. Volkova<sup>3</sup>, A. B. Berdalin<sup>4</sup>, E. N. Banzeluk<sup>1</sup>, B. A. Umarova<sup>5</sup>,  
E. V. Lukoshkova<sup>6</sup>, and S. A. Gavrilova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow University, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Institute of Regenerative Medicine, Sechenov Moscow Medical University, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup> University of Zurich, Institute of Physiology, Zürich, 8057, Winterthurerstrasse 190 Switzerland

<sup>4</sup> Federal State Budgetary Institution “Federal center of brain research and neurotechnologies” of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 117513 Russia

<sup>5</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow University, Moscow, 119234 Russia

<sup>6</sup> Federal State Budgetary Institution National medical research center of cardiology Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia

#e-mail: mormasha@gmail.com

The method of HRV analysis in rats was used to evaluate the relationship between the initial level of total HRV and regulatory changes in the work of the heart before and on days 1, 3, and 28 after the modeling of irreversible ischemia (II). According to the level of total HRV, rats were divided into two groups: with initially “low” and “high” levels of HRV, the LV ( $SD_{RR} = 5.0$  ms) and HV ( $SD_{RR} = 8.2$  ms) groups. LV and HV rats reacted differently to the cold test before and after II. Three days after II, LV rats had a better preservation of the autonomic regulation of the heart, and 28 days later, a smaller size of myocardial damage and mortality. In HV rats, the number of mast cells in the ischemic focus was higher, and in the zone unaffected by ischemia, the proportion of degranulated cells was higher than in LV rats.

**Keywords:** autonomic nervous system, heart rate variability, irreversible ischemia, infarction, mast cells

УДК 574.2+57.045

## МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ФОРМИРОВАНИЯ УРОЖАЯ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ПОЧВЕННОЙ ВЛАГИ

© 2023 г. А. Л. Бакунов\*, Н. Н. Дмитриева\*, С. Л. Рубцов\*, А. В. Милехин\*, В. Н. Нестеров\*\*, Е. С. Богданова\*\*, О. А. Розенцвет\*\*, @

\*Самарский ФИНЦ РАН НИИ сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова,  
ул. Карла Маркса, 41, Безенчук, 446254 Россия

\*\*Самарский ФИНЦ РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН,  
ул. Комзина, 10, Тольятти, 445003 Россия

@E-mail: olgarozen55@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2022 г.

После доработки 25.04.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2022 г.

Исследован вклад морфо-физиологических параметров листьев и клубней 22 сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в формирование урожайности в условиях недостаточного увлажнения почвы и высоких температур воздуха. Дискриминантным анализом установлено, что размеры устьиц (12%), содержание хлорофилла (10%), количество клубней (29%) и средний вес клубня (21%) определяли градицию растений по урожайности. Наибольший вклад в дискриминацию по отношению к экологической пластичности вносят такие параметры как удельная поверхностная плотность листьев (38%), содержание хлорофилла (13%), каротиноидов (13%) и площадь листа (12%). Ключевыми характеристиками, определяющими высокую урожайность и адаптационную способность картофеля, являются число устьиц в единице площади листа, удельная поверхностная плотность листа и содержание фотосинтетических пигментов.

**Ключевые слова** *Solanum tuberosum* L., площадь листа, урожайность, устьица, хлорофилл, экологическая пластичность

DOI: 10.31857/S1026347022700019, EDN: GZWLXU

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из основных незерновых сельскохозяйственных культур, которая играет важную роль в обеспечении продовольственной безопасности и улучшении питания людей во многих странах мира (George *et al.*, 2018). Согласно данным по глобальному возделыванию картофеля, он выращивается на всех континентах, кроме Антарктиды (Rowe, Powelson, 2002). Показано, что повышение температуры воздуха, прогнозируемое различными сценариями изменения климата, приведет к снижению урожайности картофеля на 18–25%, что может обострить мировые экономические и социальные проблемы (Hijmans, 2003).

Картофель является культурой умеренно-прохладного климата. Эффективным диапазоном температур воздуха для роста его надземной массы является 18–25°C, а оптимальная температура почвы для роста клубней составляет 17–19°C (Давыденко, Лопух, 2019). Картофель является также одним из наиболее чувствительных видов к дефициту влаги в почве (Monneveux *et al.*, 2013; Zarzynska *et al.*, 2017). Засуха значительно снижает основные

физиологические и биохимические процессы. Это приводит к снижению продуктивности надземной массы растений (Deblonde, Ledent, 2001), укорачивает цикл роста (Kumar *et al.*, 2007) и снижает количество (Eiasu *et al.*, 2007) и размер клубней (Gervais *et al.*, 2021). В связи с изменением климата картофель все чаще выращивают в районах, подверженных засухе (Evers *et al.*, 2010; Raymundo *et al.*, 2014; Aliche *et al.*, 2018). В этой связи существует необходимость в совершенствовании процесса создания сортов картофеля в направлении ресурсосбережения, биологизации и экологизации (Ashraf, 2010).

Выведение новых сортов требует времени. Одним из подходов наряду с традиционными селекционными программами может стать отбор сортов по ключевым характеристикам, важным для урожайности в неоптимальных условиях выращивания (Raggy *et al.*, 2005). Для этого необходимо идентифицировать признаки растений, которые придают толерантность или устойчивость к дефициту воды, высоким температурам воздуха и другим абиотическим факторам, а также установить

взаимосвязь между этими характеристиками и урожайностью клубней (Schafleitner *et al.*, 2007; Raymundo *et al.*, 2014).

Урожайность является главным хозяйственно-ценным признаком сельскохозяйственных растений. Показателями, характеризующими адаптивные свойства сортов и селекционного материала картофеля, служат параметры пластичности ( $b_i$ ) и стабильности ( $Si^2$ ) урожайности (Eberhart, Russel, 1966). Формирование урожая осуществляется в ходе продукционного процесса – сложной и интегрированной функции растений, в основе которой лежат генетически детерминированные процессы роста и развития. Морфологические параметры листовой поверхности – одна из важных предпосылок накопления экономически полезной биомассы и формирования урожая картофеля – тесно связаны с физиологическими функциями (Головкин, Табаленкова, 2019; Deblonde, Ledent, 2001). Содержание пигментов отражает фотосинтетическую способность листьев, а их пластичность – устойчивость к факторам среды (Lawlor, Tezara, 2009; Karoor *et al.*, 2020; Plich *et al.*, 2020).

Проводимость устьиц регулирует поглощение  $CO_2$  и потерю воды через транспирацию и зависит от плотности и размера устьиц. Полагают, что растения, которые могут поддерживать адекватное содержание воды в течение длительного периода времени под воздействием неблагоприятных условий, будут иметь наибольшую вероятность продолжения метаболического функционирования и выживания (George *et al.*, 2018). Например, сорта картофеля с более высокой устойчивостью к засухе способны поддерживать более высокую клеточную гидратацию (van Loon, 1981; Obidiegwu *et al.*, 2015).

Таким образом, как морфологические так и физиологические параметры листьев важны в формировании урожая картофеля и зависят от генотипа и экологических факторов. В ряде работ сообщается о корреляции морфологических и биохимических признаков с урожайностью картофеля (Mahgoub *et al.*, 2015; Alam *et al.*, 2020). Вместе с тем использование листовых параметров и их взаимосвязи с урожайностью клубней в программах отбора сортов остается в значительной степени нереализованным.

Следует добавить, что оптимальный подбор сортимента для каждого конкретного региона является одним из основных факторов, влияющих на увеличение продуктивности и повышение качества продовольственного и семенного картофеля (Попова и др., 2021). В условиях Средневолжского региона РФ вегетационный период картофеля характеризуется повышенной стрессовой нагрузкой на растения; почвенной и воздушной засухой, повышенным температурным режимом, что приводит

к снижению урожаев сельскохозяйственных культур, в том числе картофеля (Рубцов и др., 2019).

Цель настоящего исследования – выявить вклад морфо-физиологических параметров листьев и клубней в формирование урожайности растений картофеля различного генетического происхождения в условиях недостаточного увлажнения почвы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили листья и клубни 22 сортов картофеля (*S. tuberosum*) различных групп спелости и генетического происхождения. Исследования проводили на опытном участке Самарского НИИСХ им Н.М. Тулайкова – филиала СамНЦ РАН в 2019–2021 гг. Высадку клубней проводили во второй декаде мая. Растения высаживали в четырех повторностях по 50 клубней каждая и выращивали без орошения; почва: чернозём террасовый, обыкновенный, малогумусный, среднемошный, тяжелосуглинистый.

Фенологические наблюдения и учеты продуктивности проводили согласно методическим указаниям (Симаков и др., 2006).

Отбор проб листьев проводили на десяти случайно выбранных растениях одного сорта в период полного цветения (июль). Для биохимических анализов из усредненной массы боковых долей листа составляли навески 0.1–0.5 г в трех повторностях для каждого вида анализа. Пробы листьев отбирали в первой половине дня.

Уборку урожая осуществляли одновременно для всех сортов картофеля в конце августа. Урожайность каждого сорта определяли в т на 1 га, количеству клубней на одно растение (шт.) и среднему весу одного клубня (г). Коэффициенты  $b_i$  и  $Si^2$  определяли по формулам S. Eberhart, W. Russel (1966) в изложении В.З. Пакудина и Л.М. Лопатиной (1984):

$b_i = Y_{ij}I_j / \sum I_j^2$ , где  $Y_{ij}$  – урожай  $i$ -того сорта в  $j$ -году,  $I_j$  – индекс условий выращивания как отклонение среднего урожая в данном году от среднего значения в опыте;  $Si^2 = [\sum \delta_{ij}^2 / (n - 2)]$ , где  $\delta_{ij}$  – отклонение фактических урожаев от теоретических,  $n$  – число степеней свободы.

Линейные размеры и площадь листа измеряли в 10 боковых долях листа у 5 растений каждого сорта. Удельную поверхностную плотность листьев (УППЛ) рассчитывали как отношение сухой массы листа (мг) к площади поверхности листа ( $cm^2$ ).

Для подсчета числа устьиц и определение их длины листа предварительно фиксировались в 3.5%-ном глутаровом альдегиде, приготовленном на фосфатном буфере. Подсчет числа устьиц проводили на нижней стороне листа с помощью све-

**Таблица 1.** Агроклиматические условия в период проведения экспериментов

Месяц	Год		
	2019	2020	2021
	Среднемесячная температура, °С		
Июнь	20.6 (19.7)	18.2 (19.7)	22.0 (19.7)
Июль	20.1 (21.4)	23.8 (21.4)	23.1 (21.7)
Август	17.9 (19.3)	18.5 (19.3)	24.2 (19.7)
	Среднемесячное количество осадков, мм		
Июнь	6.0 (54)	40.0 (54)	71.0 (46)
Июль	64.0 (53)	8.0 (53)	31.0 (47)
Август	42.0 (42)	29.0 (42)	6.0 (35)
	Влажность почвы на глубине 20 см, %		
На глубине 20 см	18.3	13.5	13.3

Примечание. В скобках указана климатическая норма по данным о погоде метеорологической станции Безенчук (Самарская область, Россия) с 1904 г.

тового микроскопа не менее чем в пяти полях зрения для каждой поверхности листа и выражали в шт. на см<sup>2</sup> листа. Одновременно с подсчетом устьиц определяли их длину и рассчитывали среднее значение (мкм).

Содержание воды в листьях рассчитывали после высушивания сырой массы (сыр. м.) листьев до постоянного веса при температуре 60°C и выражали в % от сыр. м.

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в ацетоновом экстракте (90%) при λ – 662, 645 и 470 нм. Расчет концентрации хлорофиллов (Хл) *a*, *b* и каротиноидов (Кар) проводили в соответствии с рекомендациями Lichtenthaler (1987). Листья (0.5 г сыр. м.) гомогенизировали в фарфоровой ступке вручную с 5 мл ацетона. Все операции проводили при температуре 4°C. Пигменты экстрагировали до полного обесцвечивания навески и фильтровали через стеклянный фильтр. Конечный объем экстракта составлял 50 мл. Количество Хл выражали как сумму Хл *a* + *b*.

Результаты представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок, в отдельных случаях был рассчитан коэффициент вариации (*c<sub>v</sub>*). Взаимосвязь между показателями урожайности и условиями вегетации устанавливали с помощью корреляционного анализа Спирмена.

Для доказательства значимых различий между средними значениями морфо-физиологических показателей при нормальном распределении данных применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием поправки Бонферрони, а при отклонении от нормального распределения – критерий Краскела–Уоллиса. Для установления различий между вычлененными группами растений картофеля по экологиче-

ским или экономическим (урожайность) признакам был использован дискриминантный анализ. Расчеты выполняли, используя программы Statistica 6.0 for Windows, Past 3, Statgraphics Centurion XVI и Microsoft Excel 2007.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Климатические условия периода вегетации картофеля 2019–2021 гг. отличались неоднородностью. В 2019 г. период всходов, нарастания надземной массы растений и начала цветения (первая декада июня) характеризовался высокими температурами воздуха и недостаточностью увлажнения. Так, средняя температура июня была на 0.9°C выше среднего многолетнего значения, при этом за декаду выпало лишь 6 мм осадков, что было ниже климатической нормы в 9 раз (табл. 1).

Средняя температура воздуха в июле, напротив, была ниже нормы на 1.3°C, а осадков выпало на 11 мм больше. В августе средняя температура составила 17.9°C, что на 1.4°C было ниже нормы, однако осадков выпало в соответствии со средними многолетними значениями. Климатические условия вегетационного периода 2020 г. были крайне неблагоприятными для роста и развития растений картофеля. В периоды завязывания клубней и нарастания их массы – в июне и июле – осадков выпало ниже нормы на 26 и 85%, соответственно. При этом температура воздуха в июле была выше средних многолетних значений на 2.4°C, а в первой и второй декадах температура воздуха составила в среднем 25.1 и 24.9°C соответственно, что выше средних многолетних значений на 4.3 и 4.0°C. Вегетационный период 2021 г. в целом характеризовался более высокими температурами летних месяцев как по отношению к норме, так и по отношению к 2019 и 2020 гг. Кроме того, более

**Таблица 2.** Характеристика урожайности сортообразцов растений картофеля в период 2019–2021 гг.

Сорт	Урожайность т/га	Количество клубней на 1 растение, шт.	Средний вес клубня, г	bi	Si
Ранние сорта					
Удача	19.7 ± 3.7 (33)*	5.5 ± 0 (6)	83.6 ± 20.5 (40)	1.96	0.05
Барин	14.7 ± 4.5 (53)	4.0 ± 0.6 (27)	80.5 ± 24.1 (52)	2.30	6.12
Среднеранние сорта					
Гранд	18.9 ± 2.8 (25)	6.9 ± 0.7 (24)	61.7 ± 11.8 (33)	0.05	45.68
Дебют	25.0 ± 3.9 (27)	8.5 ± 0.6 (11)	68.6 ± 13.4 (34)	1.69	26.88
Калибр	15.0 ± 2.3 (27)	5.4 ± 0.3 (9)	65.7 ± 13.1 (35)	1.06	7.05
Красавчик	19.6 ± 3.6 (32)	5.8 ± 0.2 (6)	77.0 ± 20.0 (45)	1.82	5.30
Краса Мещеры	30.1 ± 2.2 (12)	8.7 ± 0.6 (12)	86.0 ± 7.5 (15)	1.09	2.29
Нарымская ночка	15.1 ± 2.2 (26)	6.9 ± 1.9 (48)	56.6 ± 13.0 (40)	0.21	31.56
Сердолик	20.1 ± 3.7 (32)	5.9 ± 0.5 (13)	77.5 ± 14.9 (33)	1.52	29.84
Сударыня	23.0 ± 5.0 (37)	9.1 ± 1.2 (23)	57.6 ± 12.4 (37)	2.00	59.06
Третьяковка	13.5 ± 2.4 (30)	3.8 ± 0.3 (14)	78.4 ± 12.8 (28)	1.22	2.22
Эликсред	18.4 ± 4.0 (37)	7.4 ± 0.4 (10)	58.6 ± 17.6 (52)	2.07	0.33
Среднеспелые сорта					
Жигулевский	20.4 ± 5.6 (48)	5.0 ± 0.7 (24)	89.0 ± 21.7 (42)	2.94	0.26
Августин	15.6 ± 3.9 (43)	5.8 ± 2.1 (62)	65.2 ± 8.1 (22)	1.71	33.14
Брусника	14.3 ± 2.5 (30)	6.5 ± 1.2 (33)	55.1 ± 16.0 (50)	0.78	6.57
Варяг	21.0 ± 3.2 (26)	7.4 ± 0.3 (8)	65.2 ± 14.2 (38)	1.67	0.02
Кумач	22.2 ± 1.7 (17)	6.5 ± 0.6 (15)	76.8 ± 5.3 (12)	0.97	6.72
Северное Сияние	12.8 ± 2.4 (33)	4.9 ± 0.5 (19)	61.2 ± 16.4 (46)	0.59	28.34
Сиверский	29.0 ± 5.5 (33)	9.0 ± 0.8 (17)	71.1 ± 10.7 (26)	2.07	88.61
Сигнал	21.2 ± 3.0 (24)	7.1 ± 0.8 (20)	66.4 ± 5.4 (14)	1.36	12.38
Утро	22.5 ± 7.7 (59)	8.0 ± 0.5 (11)	62.3 ± 21.8 (60)	3.89	22.59
Казачок	14.6 ± 3.1 (37)	4.9 ± 0.9 (33)	70.1 ± 7.9 (19)	0.30	57.17

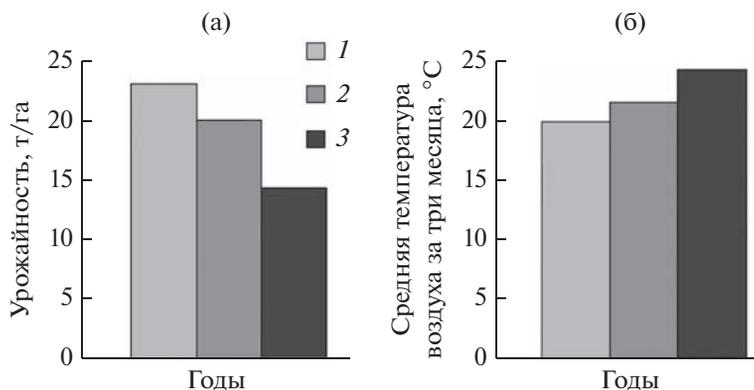
Примечание. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартные ошибки, в скобках показан коэффициент вариации урожайности (%) за 2019–2021 гг.

низким в сравнении со средними многолетними значениями было количество осадков, за исключением июня. Как следствие влажность почвы в верхнем слое на уровне 20 см в исследуемый период постоянно уменьшалась. Например, в 2021 г. она была в 1.4 раза ниже в сравнении с 2019 г. Таким образом, в течение 3-х лет средняя температура воздуха в три летних месяца была выше нормы в среднем на 0.7°C, а количество осадков было ниже – в среднем на 33 мм.

Средние за три года значения урожайности образцов картофеля и ее элементов с разными сроками созревания – раннеспелые (р), среднеранние (ср), среднеспелые (сс) и позднеспелые (сп) представлены в табл. 2.

Средняя урожайность составила 19.4 т/га. Максимально стабильной урожайностью в различные по агроклиматическим условиям годы ха-

рактеризовались с. Краса Мещеры ( $c_v = 12.5$ ) и с. Кумач ( $c_v = 16.7$ ). Наиболее вариативные показатели урожайности среди ранних и среднеранних сортов оказались у с. Барин ( $c_v = 53.4$ ) и с. Сударыня ( $c_v = 37.4$ ). Наибольшая урожайность выявлена у трех сортов – с. Краса Мещеры, с. Дебют и с. Сиверский. Количество клубней на одно растение и вес клубня по результатам трех лет у ранних, среднеранних и у среднеспелых сортов оказались одинаковыми: число клубней – 6.5 шт., вес клубня – 70.9 и 68.2 г, соответственно. Однако в контексте увеличения средней температуры в летние месяцы 2019–2021 гг. значение урожайности всех сортов картофеля снижалось (рис. 1). Урожайность картофеля складывается из количества клубней на одно растение и средней массы клубня. При общем снижении урожайности наблюдалось снижение среднего веса клубня с 95 г (2019 г.) до 47 г



**Рис. 1.** Средние значения урожайности (а) 22 сортов картофеля и средней температуры воздуха (б) за три летних месяца. 1 – 2019, 2 – 2020, 3 – 2021.

(2021 г.) при одинаковом количестве клубней на 1 растение. Установлена отрицательная взаимосвязь между урожайностью и температурой воздуха ( $R = -0.63$ , при  $p = 0.06$ ) и положительная – между урожайностью и содержанием влаги в почве ( $R = 0.95$ , при  $p = 0.01$ ).

Анализ коэффициента регрессии сорта на индекс среды (bi) показал существенные различия между сортами и группами спелости. Так среди ранних сортов значения bi варьировали в интервале 0.05–2.30, а среди среднеспелых – в интервале 0.3–3.89. Среди наиболее урожайных сортов урожайность снижалась в ряду с. Краса Мещеры → с. Сиверский → с. Дебют, а показатель экологической пластичности увеличивался в ряду с. Краса Мещеры → с. Дебют → с. Сиверский (1.09 → 1.69 → 2.07). Как правило, при значении  $b_i > 1$ , сорт относится к интенсивному типу. При значениях  $b_i \approx 1$  сорт характеризуется высокой, а при  $b_i < 1$  – низкой экологической пластичностью.

Стабильность урожайности сорта  $S_i^2$  в различных условиях определяется квадратическим отклонением фактических показателей урожайности от теоретически ожидаемых: чем меньше  $S_i^2$ , тем стабильнее урожайность. Согласно данным табл. 2 показатели стабильности различались на несколько порядков в зависимости от сорта (0.02–88.61). Половина исследованных сортов относится к стабильному и средне-стабильному типу ( $S_i^2 = 0.02–12.38$ ).

Оценка роста по длительности прохождения фенологических фаз показала, что продолжительность фазы от посадки до полных всходов у большинства сортов составляла 23–25 сут. вне зависимости от группы спелости (табл. 3).

Средняя продолжительность цветения у сортов с ранними сроками созревания (26.5 сут.) была выше, чем у более поздних сортов (24.9 сут.). В обеих группах спелости обнаружены как сорта с минимальной (с. Эликсред, с. Августин, с. Север-

ное сияние), так и максимальной продолжительностью цветения (с. Барин, с. Третьяковка, с. Утро). Однако взаимосвязи между длительностью прохождения фенологических фаз и урожайностью в климатических условиях исследованного региона в период 2019–2021 гг. не установлено.

Прохождение отдельных фаз и их взаимообусловленность тесно связаны с ростом, и физиологическими процессами на уровне целого растения и отдельных органов. Листья растений с более ранними сроками созревания отличались большей удельной поверхностной плотностью листа (УППЛ) по сравнению с листьями более поздних сортов (табл. 4). Площадь листовой пластины у растений этой группы варьировала от 6 см<sup>2</sup> (с. Калибр) до 21.3 см<sup>2</sup> (с. Красавчик), в среднем площадь листьев оказалась меньше (11.6 см<sup>2</sup>) по сравнению с площадью листа у растений с более поздними сроками созревания (13.7 см<sup>2</sup>).

Содержание воды в листьях ранних сортов картофеля было на 10% ниже. Количество устьиц по средним показателям мало различалось между группами, но зависело от конкретного сорта. Общее содержание фотосинтетических пигментов также мало различалось между группами, с разным сроком созревания. В листьях ранних и среднеранних сортов количество пигментов было лишь на 10% выше по сравнению со среднеспелыми сортами, но разница между сортами могла достигать до 40%.

При использовании дискриминантного анализа по всему комплексу морфо-физиологических параметров обнаружено четкое ранжирование растений по урожайности и экологической стабильности. Высоко- (Дебют, Краса Мещеры, Сиверский), средне- (Августин, Варяг, Гранд, Жигулевский, Калибр, Красавчик, Кумач, Нарымская ночка, Сердолик, Сигнал, Сударыня, Удача, Утро, Эликсред) и низкоурожайные сорта (Барин, Брусника, Казачок, Северное сияние, Третьяковка) образо-

**Таблица 3.** Длительность прохождения фенологических фаз (сутки) растениями картофеля различных сортов в вегетационные периоды 2019–2021 гг.

Сорт	От посадки до полных всходов	От полных всходов до начала цветения	Продолжительность цветения
		Ранние сорта	
Удача	22.7 ± 0.9	23.3 ± 1.6	19.3 ± 1.3
Барин	25.7 ± 2.0	14.0 ± 1.5	31.5 ± 3.3
		Среднеранние сорта	
Гранд	24.0 ± 2.0	24.7 ± 4.0	20.3 ± 3.2
Дебют	22.5 ± 0.5	20.0 ± 1.0	23.3 ± 1.2
Калибр	27.5 ± 3.5	18.7 ± 2.0	26.7 ± 2.8
Красавчик	27.0 ± 0.5	23.0 ± 8.5	23.3 ± 8.4
Краса Мещеры	23.3 ± 0.3	20.7 ± 4.0	24.0 ± 4.6
Нарымская ночка	23.7 ± 2.5	22.0 ± 1.0	18.7 ± 0.8
Сердолик	21.0 ± 1.5	20.0 ± 0.5	31.0 ± 0.7
Сударыня	21.5 ± 0.5	26.0 ± 7.5	17.3 ± 4.9
Третьяковка	26.5 ± 0.5	22.3 ± 3.0	30.7 ± 4.1
Эликсред	28.7 ± 7.5	23.7 ± 3.0	16.5 ± 2.0
		Среднезрелые сорта	
Жигулевский	20.7 ± 2.0	20.7 ± 5.0	18.7 ± 4.5
Августин	23.7 ± 2.0	22 ± 4.0	17.0 ± 3.1
Брусника	23.5 ± 2.5	27.0 ± 1.0	22.0 ± 0.8
Варяг	23.3 ± 2.5	21.0 ± 1.0	26.0 ± 1.2
Кумач	21.7 ± 1.9	24.3 ± 2.2	22.3 ± 2.0
Северное Сияние	22.7 ± 0.7	27.0 ± 4.5	12.0 ± 1.9
Сиверский	21.3 ± 1.5	25.7 ± 2.0	21.3 ± 1.6
Сигнал	23.0 ± 2.1	25.3 ± 2.1	10.0 ± 0.8
Утро	22.7 ± 0.5	19.7 ± 1.0	32.3 ± 1.6
Казачок	24.5 ± 1.5	25.3 ± 5.0	18.3 ± 3.6

вали три четких независимых кластера. Аналогичное разделение установлено для высоко- (Августин, Барин, Варяг, Дебют, Жигулевский, Красавчик, Сиверский, Сударыня, Удача, Утро, Эликсред), средне- (Брусника, Калибр, Краса Мещеры, Кумач, Сердолик, Сигнал, Третьяковка) и низкопластичных сортов (Гранд, Казачок, Нарымская Ночка, Северное сияние) (табл. 1, рис. 2а, 2б).

Распределение исследованных сортов, соответствующих 3 группам разной урожайности, в пространстве 1-й и 2-й дискриминантных функций показало, что наибольший вклад в кластеризацию (83%,  $p = 0.03$ ) вносит первая дискриминантная функция (рис. 2а). Различия между сортами, выделенными по значениям урожайности, обуславливаются в первую очередь количеством клубней (29%) и средним весом клубня (21%), затем следуют размеры устьиц (12%), общее содержание Хл (10%). В отношении экологической пластичности установлено, что первая дискрими-

нантная функция определяет 88% ( $p = 0.05$ ) всех различий между вычлененными группами сортов (рис. 2б). Наибольший относительный вклад в дискриминацию вносит параметр УППЛ (38%), за которым следуют содержание Хл (13%) и Кар (13%), площадь листа (12%). Подобной закономерности в отношении стабильности урожайности сорта не выявлено.

Более подробный анализ отдельных морфофизиологических параметров листа показал, что высокоурожайные сорта в среднем имеют большее число устьиц в единице площади листа (рис. 3). Площадь листовой пластины у высокоурожайных сортов ниже, чем у низкоурожайных, а показатель УППЛ напротив более чем в два раза выше.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ климатических условий (табл. 1) в периоды проведения экспериментов показывает, что район исследования, расположенный в степ-

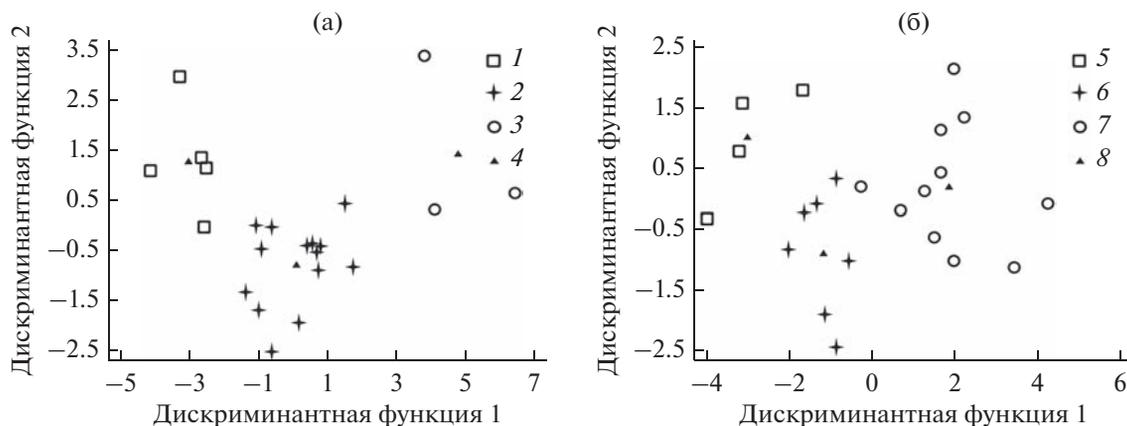
**Таблица 4.** Средние значения физиологических параметров листьев сортов картофеля по результатам 2019–2021 гг.

Сорт	Площадь листа, см <sup>2</sup>	УППЛ, мг/см <sup>2</sup>	Длина устьиц, мкм	Число устьиц, тыс. шт/см <sup>2</sup>	Вода, %	Хл <i>a + б</i> , мг/г сыр. м.	Кар, мг/г сыр. м
Ранние сорта							
Удача	15.8 ± 1.3	4.1 ± 0.4	24.0 ± 1.0	26.1 ± 1.4	79.7 ± 1.0	1.67 ± 0.17	0.36 ± 0.04
Барин	13.7 ± 1.2	5.9 ± 0.5	22.0 ± 2.0	29.3 ± 1.2	81.1 ± 0.3	1.63 ± 0.22	0.35 ± 0.06
Среднеранние сорта							
Гранд	7.1 ± 0.6	5.4 ± 0.5	27.0 ± 2.0	28.9 ± 6.5	80.5 ± 0.0	1.48 ± 0.34	0.34 ± 0.08
Дебют	7.2 ± 0.6	13.9 ± 1.1	25.0 ± 1.0	31.2 ± 1.2	79.4 ± 2.0	1.52 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Калибр	6.0 ± 0.6	5.0 ± 0.4	28.0 ± 2.0	27.2 ± 2.8	82.0 ± 0.7	1.50 ± 0.06	0.30 ± 0.03
Красавчик	21.3 ± 1.9	4.7 ± 0.4	24.0 ± 1.0	32.6 ± 2.4	80.5 ± 1.3	1.34 ± 0.41	0.33 ± 0.10
Краса Мещеры	10.9 ± 1.1	14.5 ± 1.0	27.0 ± 1.0	24.6 ± 2.2	81.4 ± 0.5	1.45 ± 0.30	0.33 ± 0.06
Нарымская ночка	11.5 ± 1.0	4.4 ± 0.4	25.0 ± 2.0	32.2 ± 4.2	82.4 ± 2.4	1.48 ± 0.09	0.31 ± 0.01
Сердолик	8.4 ± 0.6	6.5 ± 0.6	26.0 ± 0.0	30.0 ± 0.7	80.5 ± 0.6	1.47 ± 0.07	0.32 ± 0.01
Сударыня	12.6 ± 1.2	3.6 ± 0.4	25.0 ± 1.0	32.2 ± 1.8	81.3 ± 0.3	1.35 ± 0.41	0.26 ± 0.04
Третьяковка	13.1 ± 1.2	6.9 ± 0.5	25.0 ± 0.0	28.4 ± 0.4	82.1 ± 0.5	1.52 ± 0.22	0.34 ± 0.02
Эликсред	11.7 ± 1.0	6.6 ± 0.7	26.0 ± 1.0	24.0 ± 4.4	82.8 ± 0.9	1.53 ± 0.04	0.32 ± 0.01
Среднеспелые сорта							
Жигулевский	16.9 ± 1.3	5.2 ± 0.5	25.0 ± 1.0	31.8 ± 4.3	81.3 ± 0.7	1.69 ± 0.09	0.36 ± 0.03
Августин	13.1 ± 1.2	5.2 ± 0.4	27.0 ± 0.0	25.1 ± 1.8	83.3 ± 0.3	1.35 ± 0.18	0.30 ± 0.03
Брусника	12.9 ± 1.3	5.2 ± 0.5	25.0 ± 1.0	32.9 ± 0.8	79.4 ± 0.3	1.29 ± 0.04	0.25 ± 0.01
Варяг	11.2 ± 1.1	5.5 ± 0.5	24.0 ± 1.0	32.9 ± 0.9	80.7 ± 0.5	1.76 ± 0.44	0.36 ± 0.09
Кумач	13.7 ± 1.4	6.9 ± 0.6	25.0 ± 3.0	26.3 ± 4.6	81.5 ± 0.4	1.51 ± 0.18	0.36 ± 0.04
Северное Сияние	10.5 ± 0.8	3.7 ± 0.3	25.0 ± 1.0	25.7 ± 2.5	83.0 ± 1.9	1.33 ± 0.36	0.24 ± 0.08
Сиверский	16.8 ± 1.4	3.3 ± 0.3	21.0 ± 0.0	39.2 ± 0.8	82.1 ± 1.1	1.82 ± 0.04	0.40 ± 0.0
Сигнал	11.6 ± 1.5	3.6 ± 0.2	27.0 ± 3.0	23.8 ± 1.5	80.4 ± 0.0	1.38 ± 0.12	0.29 ± 0.04
Утро	11.5 ± 0.9	4.9 ± 0.4	25.0 ± 2.0	28.3 ± 7.6	83.4 ± 1.9	1.27 ± 0.39	0.30 ± 0.06
Казачок	19.5 ± 1.7	3.5 ± 0.3	24.0 ± 0.0	30.9 ± 3.8	80.6 ± 0.8	1.64 ± 0.26	0.37 ± 0.07

ной зоне Средней полосы России, является удобным экспериментальным полигоном для исследования влияния засушливых условий на сельскохозяйственные растения в полевых условиях (Рубцов и др., 2019; Бакунов и др., 2020). Нами установлено, что увеличение температуры воздуха в летние месяцы 2019–2021 гг. в сравнении с климатической нормой региона привело к увеличению дефицита влаги в почве и, как следствие, к снижению средней урожайности картофеля. Потери урожая, в среднем, составили ~40% в основном за счет снижения массы клубней. При изучении 56 генотипов картофеля, выращиваемых в условиях полива с последующим водным стрессом, было обнаружено снижение, как числа, так и веса клубней (Gervais *et al.*, 2021). Стресс засухи также значительно снизил вес клубней и их количество у сортов *S. tuberosum*, *S. tuberosum* × *S. tuberosum* subsp, однако снижение урожайности

клубней варьировало в зависимости от генотипа (Schafleitner *et al.*, 2007).

Чувствительность картофеля к засухе в основном объясняется малой эффективностью растений усваивать воду из-за неглубокого залегания корневой системы в почве и низкой способностью фотосинтетических механизмов восстанавливаться после водного и теплового стресса (Monneveux *et al.*, 2013; Zarzynska *et al.*, 2017). Содержание воды в листьях растений обуславливает осмос и тургор, от которых зависит рост, поддержание структуры, движение устьиц, фотосинтез и пр. Растения картофеля используют несколько стратегий для выживания в условиях дефицита воды и образования клубней (Plich *et al.*, 2020), например, уменьшения потери воды или поддержание водопоглощения (Obidiegwu *et al.*, 2015). Судя по содержанию воды в листьях, все исследованные нами растения были способны поддерживать достаточно высокий уровень в тканях листьев, несмотря на экстре-



**Рис. 2.** Результаты дискриминантного анализа морфо-физиологических параметров в зависимости от урожайности (а) и пластичности (б). 1 – низкоурожайные сорта, 2 – среднеурожайные сорта, 3 – высокоурожайные сорта; 5 – низкопластичные сорта, 6 – среднепластичные сорта, 7 – высокопластичные сорта; 4, 8 – центры групп.

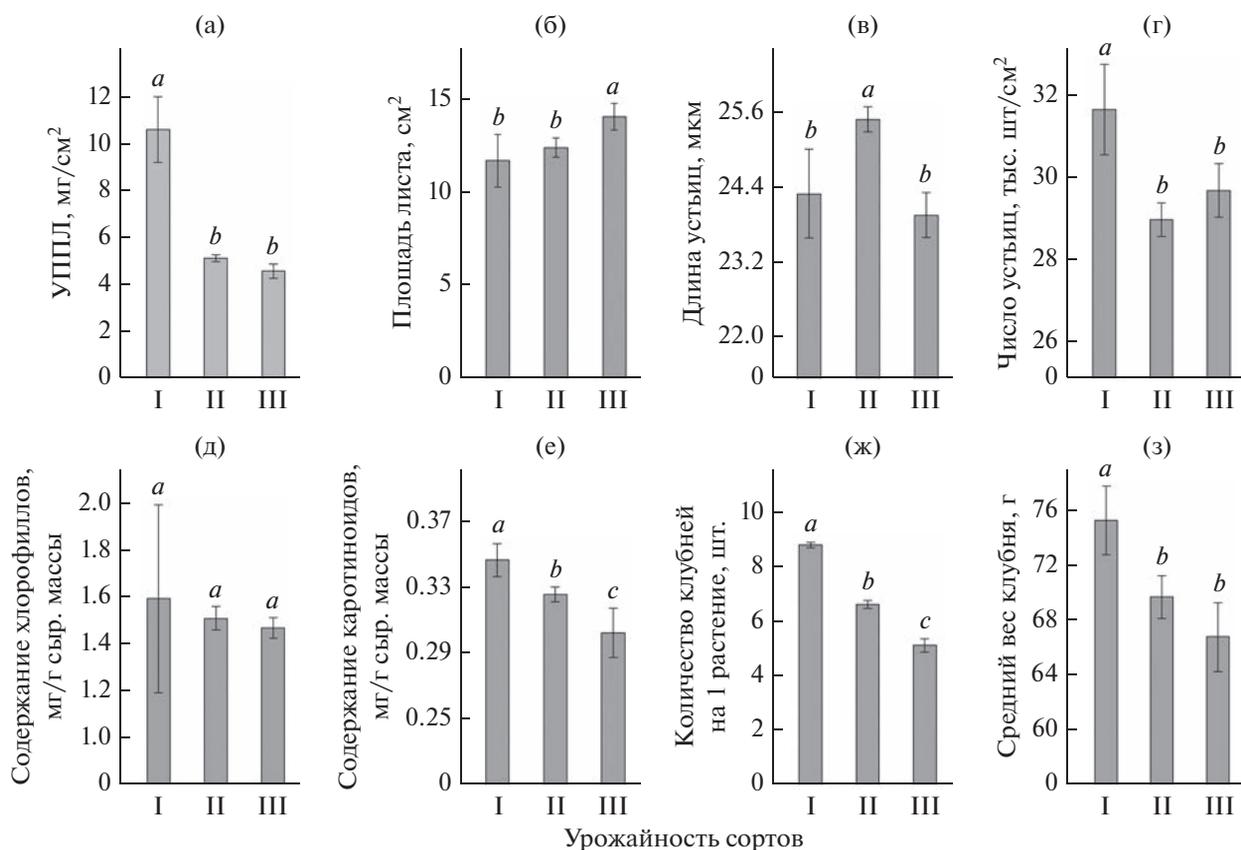
мально низкую влагообеспеченность почвы. Это свидетельствует о том, что урожайность клубней для разных генотипов картофеля при недостатке влаги в почве были связаны не с различиями в содержании воды в листьях, а скорее, с морфологией, физиологическими и биохимическими процессами.

Фотосинтетические пигменты имеют первостепенное значение для фотосинтеза и зависят от водного дефицита (Кароог *et al.*, 2020). Количество Хл, как правило, связано с продуктивностью сорта (Obidiegwu *et al.*, 2015; Бакунов и др., 2020). Большее содержание Хл и Кар у высокоурожайных сортов способствует большему поглощению света и защите фотосинтетического аппарата от окислительных процессов, возникающих при дефиците влаги (Lawlor, Tezara, 2009; Dahal *et al.*, 2019). При этом параметр содержание Хл оказался связан как с экологической пластичностью, так и с урожайностью картофеля, что показывает его интеграционную значимость, как в формировании урожая, так и в адаптации растений к экологическим условиям.

Высокоурожайные сорта отличались также низкой площадью листа по сравнению с низкоурожайными. В их листьях содержится больше сухого вещества в единице площади листа (показатель УППЛ), большое число некрупных устьиц (рис. 3). Эти особенности в структуре листьев способствуют ограничению потери воды и большей ассимиляции  $CO_2$ , что положительно влияет на продуктивность растений. Полученные нами данные согласуются с результатами полевых экспериментов с использованием культуры ячменя: контроль над потерей воды осуществлялся за счет снижения индекса листовых параметров (Lawlor, Tezara, 2009).

Показатель УППЛ важен для таких процессов как отношение процессов фотосинтез/азотфиксация, скорость фотосинтетической ассимиляции, продолжительность жизни листа, а также для разделения растений на функциональные группы в зависимости от условий окружающей среды (Cheng *et al.*, 2014). Это отразилось на разделении групп сортов по коэффициенту пластичности  $b_i$ .

Из всех исследованных сортообразцов картофеля с. Сиверский оказался и высокоурожайным (29 т/га) и высокопластичным ( $b_i = 2.07$ ). Однако коэффициент стабильности его урожайности достаточно высокий ( $Si^2 = 88.61$ ). Это означает, что сорт хорошо отзывается на улучшение условий выращивания, но в неблагоприятные годы урожайность может снизиться. Характерными признаками этого сорта являются наибольшее число устьиц в единице площади листа, высокая гидратационная способность листьев и высокое содержание фотосинтетических пигментов. Из всех высокоурожайных сортов он имел наименьшее значение УППЛ. Как показали наши предыдущие исследования, с. Сиверский отличался большей изменчивостью белкового и липидного метаболизма, а также более интенсивными процессами окисления и антиоксидантной защиты по сравнению с малоурожайным с. Третьяковка (Розенцвет и др., 2021). В свою очередь, с. Краса Мещеры также является высокоурожайным (30.1 т/га), имеет коэффициент  $b_i$  близкий к 1, а  $Si^2$  равный 2.29, то есть характеризуется, как генотип с высокой экологической пластичностью и высокой стабильностью генотипа. Учитывая, что в основе реакции растений на стресс лежат сотни генов, можно полагать, что оба сорта могут служить источником генетического материала для молекулярно-физиологических и селекционных исследований с целью отбора сортов для интенсивного или стабильного урожая.



**Рис. 3.** Средние значения морфо-физиологических параметров листьев (а–ж) и среднего веса клубней (з) сортов картофеля и их стандартная ошибка в зависимости от урожайности по результатам 2019–2021 гг.: I – высокоурожайные сорта ( $n = 3$ ), II – среднеурожайные сорта ( $n = 14$ ), III – низкоурожайные сорта ( $n = 5$ ). Значимость различий между средними значениями признака устанавливали с использованием с однофакторного дисперсионного анализа (ANO-VA). При нормальном распределении данных применяли поправку Бонферрони, а при отклонении от нормального распределения – критерий Краскела–Уоллиса. Разными буквами (a–c) обозначены достоверные различия между средними значениями признака (при  $p < 0.05$ ).

Таким образом, морфо-физиологические показатели листьев и клубней определяют урожайность и экологическую пластичность сортов картофеля. Характеристиками, способствующими высокой урожайности и адаптационной способности, являются число устьиц в единице площади листа, УППЛ и содержание фотосинтетических пигментов. В целом полученные результаты детализируют концепцию “адаптация/продуктивность”, согласно которой либо достигается наибольшая защита (экологическая пластичность), либо максимум продукции (урожайность), что необходимо учитывать при подборе сортов к конкретным почвенно-климатическим условиям.

**Финансирование.** Данная работа выполнена в рамках Комплексного плана научных исследований “Развитие селекции и семеноводства картофеля” и “Структура, динамика и устойчивое развитие экосистем Волжского бассейна” (№ 021060107217-0-1.6.19).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха” и создателям сортов *S. tuberosum* за предоставленный для исследований семенной материал.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Бакунов А.Л., Милехин А.В., Рубцов С.Л., Шевченко С.Л. Содержание фотосинтетических пигментов как косвенный признак устойчивости сортов картофеля к высоким температурам воздуха и недостаточному увлажнению // Изв. Сам. гос. сельскохоз. акад. 2020. № 2. С. 8–13.

Головки Т.К., Табаленкова Г.Н. Донорно-акцепторные связи в растении картофеля // Физиология растений. 2019. Т. 66, 34. С. 313–320.

Давыденко О.В., Лопух П.С. Влияние термических условий на урожайность картофеля в административных районах республики Беларусь // Журн. Белорус. гос. универ. Геог. Геол. 2019. № 1. С. 46–62.

Пакудин В.З., Лопатина Л.М. Оценка экологической пластичности и стабильности сортов сельскохо-

- зайственных культур // Сельскохозяйственная биол. 1984. № 4. С. 109–113.
- Попова Л.А., Головина Л.Н., Гинтов В.В., Шаманин А.А. Оценка адаптивности сортообразцов картофеля в условиях северных территорий Архангельской области // Карт. и овощи. 2021. № 1. С. 34–37.
- Розенцвет О.А., Богданова Е.С., Нестеров В.Н., Шевченко С.Н., Бакунов А.Л., Милехин А.В., Рубцов С.Л. Продуктивность и динамика морфологических и физиолого-биохимических параметров картофеля в условиях засушливого климата // Док. Рос. акад. наук. Науки о жизни. 2021. Т. 497. С. 143–147.
- Рубцов С.Л., Бакунов А.Л., Милехин А.В., Дмитриева Н.Н. Критерии отбора новых сортов картофеля для Средневолжского региона // Изв. Оренбург. гос. аграр. универ. 2019. № 1(75). С. 52–55.
- Симаков Е.А., Склярлова Н.П., Яшина И.М. Методические указания по технологии селекционного процесса картофеля. М.: Достижения науки и техники АПК, 2006.
- Aliche E.B., Oortwijn M., Theeuwes T.P.J.M., Bachem C.W.B., Vissers R.G.F., van der Linden C.G. Drought response in field grown potatoes and the interactions between canopy growth and yield // *Agricult. Water Manag.* 2018. V. 206. P. 20–30.
- Alam M.S., Islam M.F., Rahman M.S., Molla M.M., Uddin M.Z., Mian M.A. Varietal evaluation and selection of yield-associated traits of potato (*Solanum tuberosum*) using correlation and path analysis in haor area of Moulvibazar Bangladesh // *J. Agric. Sci. Engin. Innov.* 2020. V. 1(10). P. 2–9.
- Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28(1). P. 169–183.
- Cheng T., Rivard B., Sanchez-Azofeifa A.G., Feret J.-B., Jacquemoud S., Ustin S.L. Deriving leaf mass per area (LMA) from foliar reflectance across a variety of plant species using continuous wavelet analysis // *ISPRS J. Photogram. Rem. Sens.* 2014. V. 87. P. 28–38.
- Dahal K., Li X.Q., Tai H., Creelman A., Bizimungu B. Improving potato stress tolerance and tuber yield under climate change scenario – a current overview // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 563.
- Deblonde P.M.K., Ledent J.F. Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars // *Europ. J. Agron.* 2001. V. 14(1). P. 31–41.
- Eiasu B.K., Soundy P., Hammes P.S. Response of potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield components to gelpolymer soil amendments and irrigation regimes // *New Zealand J. Crop and Horticult. Sci.* 2007. V. 35(1). P. 25–31.
- Eberhart S., Russel W. Stability parameters for comparing varieties // *Crop. Sci.* 1966. V. 6. № 1. P. 36–42.
- Evers D., Lefèvre I., Legay S., Lamoureux D., Hausman J.F., Rosales R.O., Marca L.R.T., Hoffmann L., Bonierbale M., Schafleitner R. Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61(9). P. 2327–2343.
- George T.S., Taylor M.A., Dodd I.C., White P.J. Climate change and consequences for potato production: a review of tolerance to emerging abiotic stress // *Pot. Res.* 2018. V. 60. P. 239–268.
- Gervais T., Creelman A., Li X-Q, Bizimungu B., De Koeve D., Dahal K. Potato response to drought stress: physiological and growth basis // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. 698060.
- Hijmans R.J. The effect of climate change on global potato production // *Amer. J. Pot. Res.* 2003. V. 80. P. 271–279.
- Kapoor D., Bhardwaj S., Landi M., Sharma A., Ramakrishnan M., Sharma A. The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production // *App. Sci.* 2020. V. 10(16). P. 5692.
- Kumar S., Asrey A., Mandal G. Effect of differential irrigation regimes on potato (*Solanum tuberosum*) yield and post-harvest attributes // *Indian J. Agricult. Sci.* 2007. V. 77(6). P. 366–368.
- Lawlor D.W., Tezara W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes // *Ann. Bot.* 2009. V. 103(4). P. 561–579.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes / Eds. Douse R., Packer L. // *Methods in enzymology.* 1987. N.Y.: Academic Press Inc. P. 350–382.
- Mahgoub H.A.M., Eisa G.S.A., Youssef M.A.H. Molecular, biochemical and anatomical analysis of some potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars growing in Egypt // *J. Gen. Engin. Biotech.* 2015. V. 13(1). P. 39–49.
- Monneveux P., Ramirez D.A., Pino M.-T. Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.). Can we learn from drought tolerance research in cereals? // *Plant Sci.* 2013. V. 205. P. 76–86.
- Obidiegwu J.E., Bryan G.J., Jones H.G., Prashar A. Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 1–23.
- Parry M.L., Rosenzweig C., Livermore M. Climate change, global food supply and risk of hunger // *Philosoph. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 2005. V. 360(1463). P. 2125–2136.
- Plich J., Boguszevska-Mańkowska D., Marczewski W. Relations between photosynthetic parameters and drought-induced tuber yield decrease in Katahdin-derived potato cultivars // *Pot. Res.* 2020. V. 63(4). P. 463–477.
- Raymundo R., Asseng S., Cammarano D., Quiroz R. Potato, sweet potato, and yam models for climate change: A review // *Field Crops Res.* 2014. V. 166. P. 173–185.
- Rowe R.C., Powelson M.L. Potato early dying: management challenges in a changing production environment // *Plant Dis.* 2002. V. 86. P. 1184–1193.
- Schafleitner R., Gutierrez R., Espino R., Gaudin A., Pérez J., Martínez M., Bonierbale M. Field screening for variation of drought tolerance in *Solanum tuberosum* L. by agronomical, physiological and genetic analysis // *Pot. Res.* 2007. V. 50. P. 71–85.
- van Loon C.D. The effect of water stress on potato growth, development, and yield // *Am. Pot. J.* 1981. V. 58(1). P. 51–69.
- Zarzynska K., Boguszevska-Mankowska D., Nosalewicz A. Differences in size and architecture of the potato cultivars root system and their tolerance to drought stress // *Plant Soil Environ.* 2017. V. 63. P. 159–164.

## Morpho-Physiological Determinants of Potato Yield Formation under Conditions of Moisture Deficiency and High Temperatures

A. L. Bakunov<sup>1</sup>, N. N. Dmitrieva<sup>1</sup>, S. L. Rubtsov<sup>1</sup>, A. V. Milekhin<sup>1</sup>, V. N. Nesterov<sup>2</sup>,  
E. S. Bogdanova<sup>2</sup>, and O. A. Rozentsvet<sup>2, #</sup>

<sup>1</sup> Samara Federal Research Scientific Center RAS, Samara Scientific Research Agriculture Institute named after N.M. Tulajkov, 41, K. Marx St., Bezenchuk, 446254 Russia

<sup>2</sup> Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS, 10, Komzina, Togliatti, 445003 Russia

#e-mail: olgarozen55@mail.ru

Morphological and physiological parameters of leaves and tubers of 22 varieties of potato (*Solanum tuberosum*) were investigated. Discriminant analysis found that stomata size (12%), chlorophyll content (10%), number of tubers (29%), and average tuber weight (21%) determined the gradation of plants by yield. The specific surface density of leaves (38%), the content of chlorophyll (13%) and carotenoids (13%), and leaf area (12%) made the greatest contribution to discrimination in relation to ecological plasticity. It is concluded that the number of stomata per unit area of the leaf, the specific surface density of the leaf and the content of photosynthetic pigments are the key characteristics that contribute to both high yield and adaptive capacity of potatoes.

*Keywords:* *Solanum tuberosum* L., leaf area, productivity, stomata, chlorophyll, ecological plasticity

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 576.7

КУТИКУЛА КУКОЛОК ЧЕРНОЙ ЛЬВИНКИ *HERMETIA ILLUCENS*  
КАК БИОСОРБЕНТ ДЛЯ ПРОБИОТИКОВ

© 2023 г. Н. А. Ушакова\*, @, С. В. Свергузова\*\*, И. Г. Шайхиев\*\*, Ж. А. Сапронова\*\*,  
А. И. Бастраков\*, Е. А. Левенко\*, Р. М. Хацаева\*

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

\*\*Белгородский технологический университет им. В.Г. Шухова, ул. Костюкова, 46, г. Белгород, 308012 Россия

@E-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

С помощью метода сканирующей электронной микроскопии проведено сравнительное исследование морфологии поверхности частиц и элементного состава кутикулы куколки *Hermetia illucens* до и после нанесения культуральной жидкости (КЖ) пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* В 2707. Показано, что после щадящего высушивания сорбированные клетки лактобацилл сохраняются под пленкой на носителе. При этом под воздействием КЖ наблюдается деструкция относительно крупных частиц порошка хитин-белкового комплекса кутикулы (средний диаметр частиц  $D 845.3 \pm \pm 109.1$  мкм) и образование мелких фрагментов (средний  $D 63.4 \pm 13.9$  мкм), в том числе, наночастиц (средний  $D 54 \pm 18$  нм). Получена обогащенная кальцием, магнием и фосфором биопленка лактобактерий на сорбенте, состоящем из микрочастиц кутикулы куколок насекомого, и включающем наночастицы, что обеспечило пробиотическому препарату высокую биологическую эффективность.

**Ключевые слова:** кутикула, хитин, черная львинка, сорбент, пробиотик

**DOI:** 10.31857/S1026347022601072, **EDN:** MOPXXE

Хитин мухи черная львинка *Hermetia illucens* привлекает внимание исследователей в связи с возможностью промышленного разведения насекомого и получения возобновляемого сырья, обладающего биологической активностью. Жизненный цикл мухи включает стадию куколки, из которой вылупляется имаго. После вылета взрослой мухи остаются пустые пупарии, представляющие собой хитин-содержащий экзувий. Хитин является основой экзоскелета членистоногих, обеспечивает жесткость и структурную целостность; выделенный в чистом виде хитин характеризуется также иммуномодулирующими, противомикробными, противогрибковыми и сорбционными свойствами (Скрябин и др., 2002; Lenardon *et al.*, 2010; Варламов и др., 2020).

В организме насекомых хитин присутствует в комплексе с белками (Henriques *et al.*, 2020) и его содержание варьирует от 0.27% у пчелиного расплода, до 5% у мучных червей (Finke, 2013). По литературным данным личинки черной львинки 5-го возраста содержат от 4.5% (Caruso *et al.*, 2014) до 8.7% хитина (Diener *et al.*, 2009). После вылета мухи кутикула, содержащая хитин, может быть использована как биосорбент, в том числе и как сорбент для получения препаратов пробиотиче-

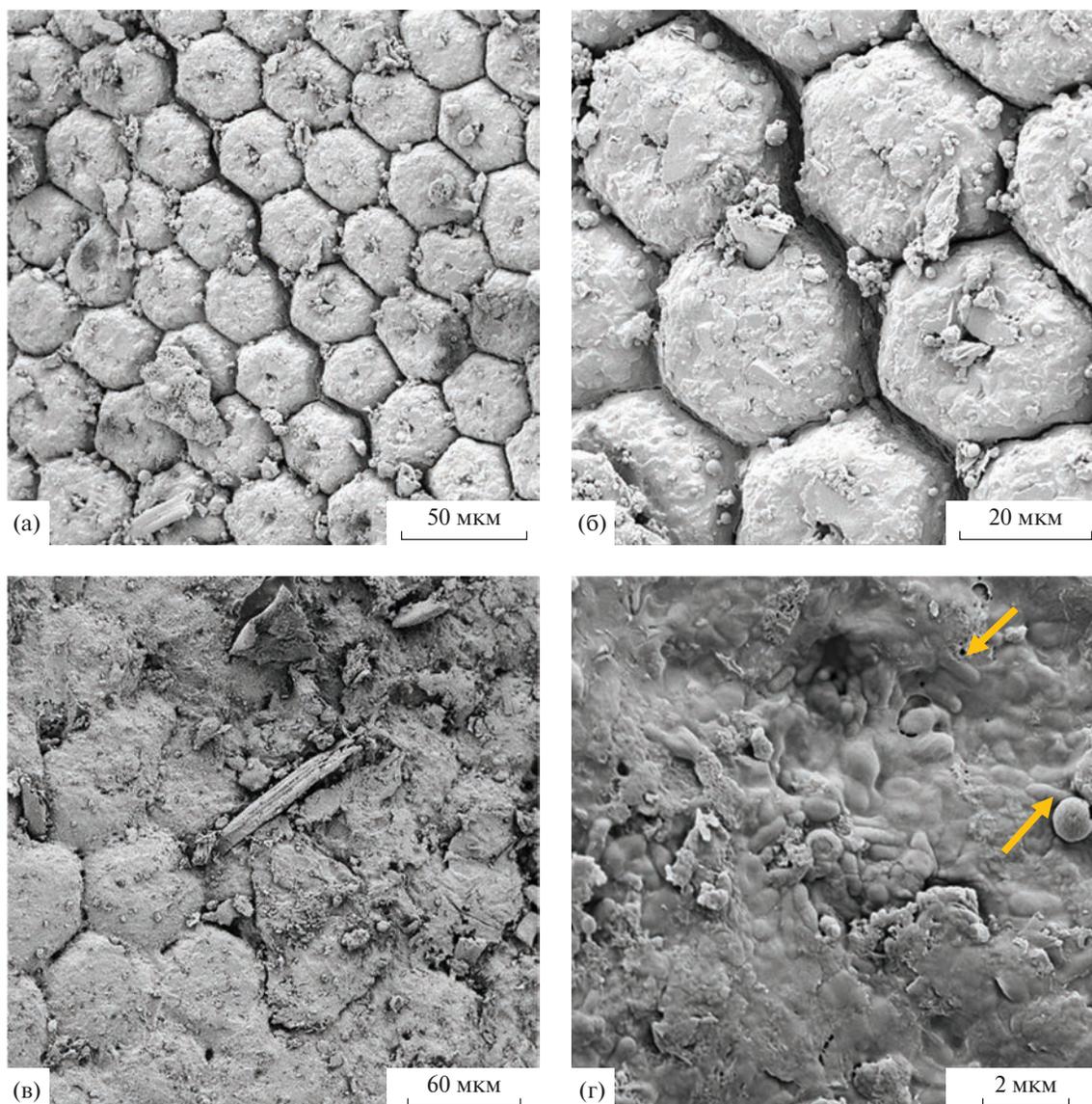
ских бактерий, усиливающий их выживаемость в кишечном тракте и пробиотическую эффективность.

Цель исследования – изучение поверхности кутикулы куколки *H. illucens* до и после нанесения суспензии молочнокислых пробиотиков, щадящего высушивания и измельчения.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат биомассы кутикул куколок после вылета мух *H. illucens* получен при содержании личинок насекомого на комбикорме ПК-3 Раменского комбината хлебопродуктов, Россия. Кутикулу измельчали растиранием в фарфоровой ступке и стерилизовали термически в сухожарном шкафу при 160°C 2 ч.

Согласно приведенному в паспорте ВКПМ описанию, штамм пробиотических бактерий *Lactobacillus acidophilus* В 2707 выращивали сутки на стерильном обезжиренном молоке, затем смешивали со стерильным порошком кутикулы в соотношении 1 : 2, вес/объем. Высушивали при 45°C в течение 12 ч и измельчали растиранием в фарфоровой ступке.



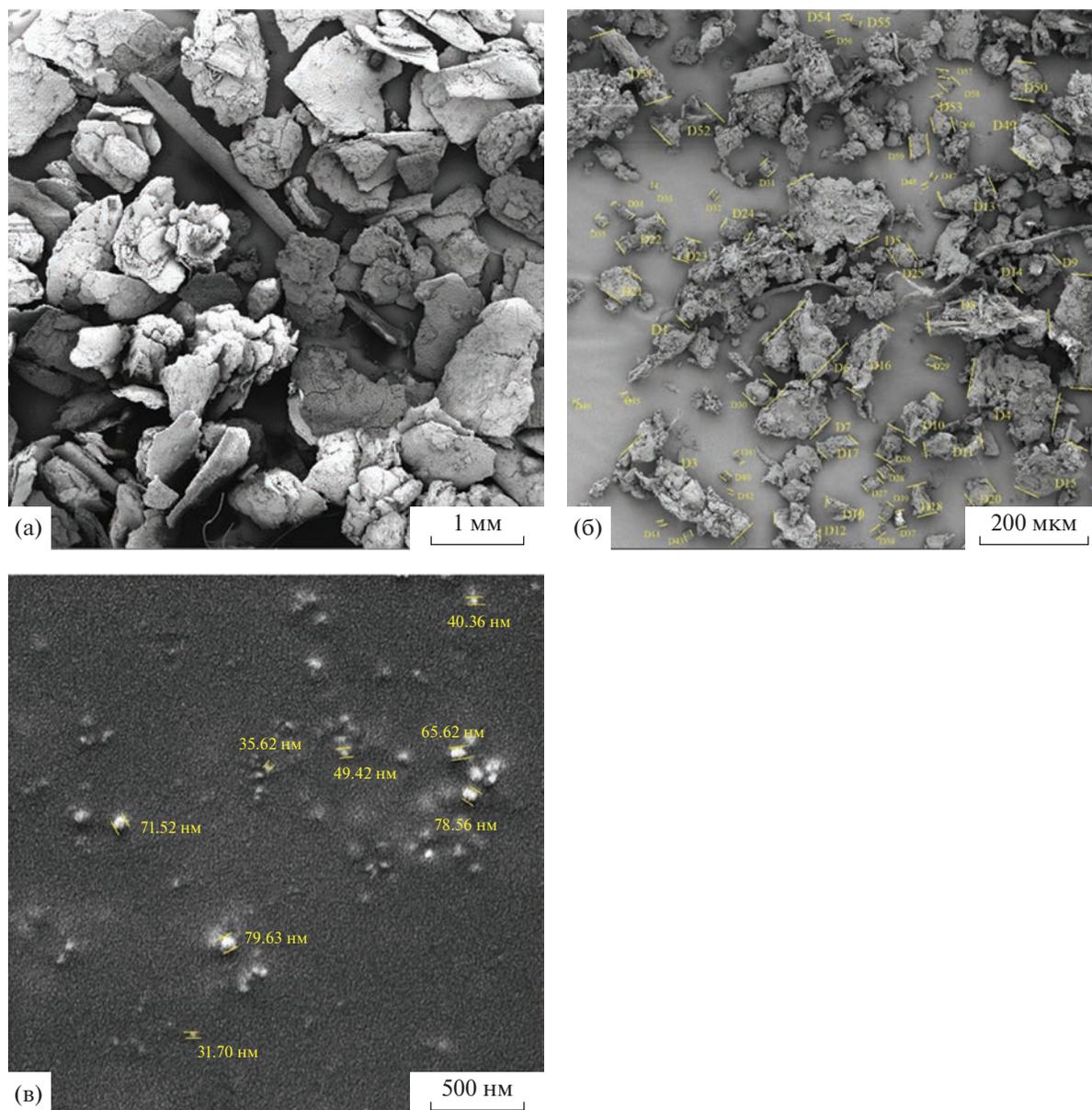
**Рис. 1.** Поверхность шестиугольных единиц кутикулы куколок *H. illucens*: а – увеличение 1480×; б – 3840×; в – частицы кутикулы с нанесенной культуральной жидкостью лактобациллы, 1310×; г – лактобациллы (отмечено стрелками) под пленкой на поверхности носителя, 24600×.

Сканирующую электронную микроскопию осуществляли на микроскопе TESCAN MIRA 3 LMH (TESCAN, Czech Republic). Препараты в виде порошка наносили на поверхность двустороннего проводящего скотча для микроскопии Supplies (США), наклеенного на предметный столик. Напыление осуществляли золотом на установке Q150R ES Plus (Quorum Technologies Ltd, Соединенное Королевство). Оценку элементного состава и размеры частиц определяли с использованием системы энергодисперсионного анализа Oxford AZtecOne X-act (Oxford Instruments, UK) – программного обеспечения к микроскопу TESCAN MIRA 3 LMH (TESCAN, Czech Republic) при ускоряющем напряжении 10 кВ и количестве накопленных импульсов 5 млн. Количественные

расчеты осуществлялись автоматически программой AZtecOne Quant. Статистические различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе Statistica 10 (Anova). Для первичной обработки данных и построения диаграмм использовали Microsoft Excel 2019.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Возможность получения сорбированного на носителе пробиотика во многом определяется структурной организацией сорбента. Электронные фотографии частиц интактной кутикулы куколок *H. illucens* демонстрировали упорядоченную структуру повторяющихся шестиугольных единиц (рис. 1а, 1б), поверхность и пространство

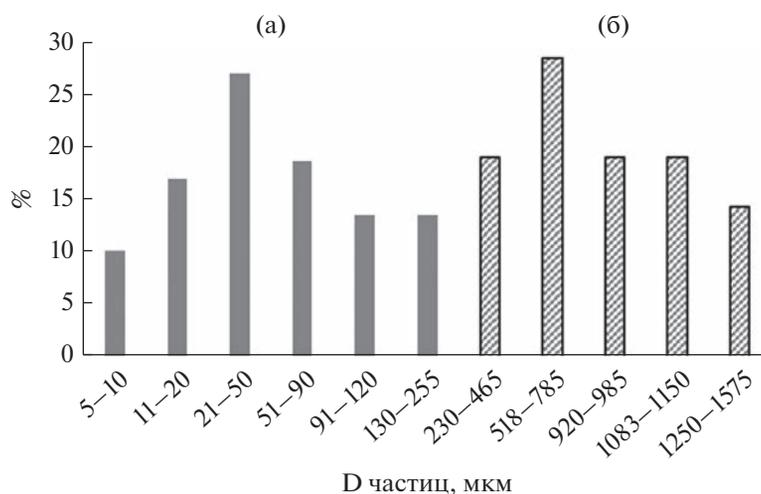


**Рис. 2.** Фото частиц измельченной кутикулы куколок *H. illucens*: а – частицы интактной кутикулы, увеличение 53×; б – высушенные частицы с пробиотиком, 311×; в – наночастицы кутикулы, 109000×. Отрезками на фото 2 б и 2 в отмечены максимальные диаметры (D) частиц, которые учитывали при анализе размерных фракций.

между которыми в процессе получения пробиотика на носителе заполнены культуральной жидкостью, что видно на рис. 1 в по изменению рельефа поверхности сорбента. При высушивании частиц кутикулы с иммобилизованным пробиотиком, образовалась пленка, покрывающая клетки микроорганизмов, которая, по-видимому, выполняет функцию защиты лактобактерий, так как они сохранили свою бациллярную морфологию, не сморщены и не сплющены (рис. 1г).

Значительные изменения в структуре частиц интактной измельченной кутикулы наблюдались при медленном 12-часовом режиме высушивания

порошка сорбента с иммобилизованным пробиотиком без применения высоких температур (45°C). За этот период, вероятно, относительно крупные частицы кутикулы (рис. 2а) подверглись ферментативному гидролизу культуральной жидкостью с лактобациллой, что привело к деградации склеротинизированного хитин-белкового комплекса и проявилось в образовании мелких частиц (рис. 2б), включая образование наночастиц (рис. 2в). Средний диаметр частиц порошка измельченной кутикулы куколок составил  $D 845.3 \pm 109.1$  мкм, в то время как средние размеры частиц кутикулы с пробиотиком были достоверно меньше,  $D 63.4 \pm$



**Рис. 3.** Распределение размерных фракций частиц, %: а – препарат пробиотик на частицах кутикулы; б – измельченная интактная кутикула.

$\pm 13.9$  мкм ( $F = 276.1$ ;  $P \leq 0.001$ ), и не превышали  $D 255$  мкм. Распределение размерных фракций частиц в % (без учета наночастиц) приведено на рис. 3. Средний размер наночастиц составил  $D 54 \pm 18$  нм.

Процентный состав основных элементов кутикулы куколок *H. illucens* представлен в табл. 1.

Элементный состав комплекса кутикулы куколок *H. illucens* с внесенной культуральной жидкостью с *L. acidophilus* В 2707 показал отличия от исходной кутикулы не в качественном отношении, а в количественном соотношении элементов. В 6 раз увеличилась величина C/N за счет снижения доли азота, что коррелирует с предположением о расщеплении хитин-белкового комплекса кутикулы и выявленном уменьшении размеров частиц сорбента. Повысилась доля натрия и несколько повысилось содержание кальция, а магния и фосфора уменьшилось, по-видимому, за

счет химического состава нанесенной на кутикулу органики и перераспределения удельного содержания компонентов.

Пробиотик, иммобилизованный на сорбенте из микрочастиц кутикулы куколок *H. illucens*, был протестирован в рационе цыплят. Исследования проводились в условиях СГЦ “Загорское ЭПХ” на бройлерах кросса “Росс 309” в клеточных батареях типа Р-15, по 35 голов в каждой группе, с суточного до 35 – суточного возраста выращивания. Нормы посадки, световой, температурный, влажностный режимы, фронт кормления и поения соответствовали рекомендациям ФНЦ ВНИТИП РАН (Фисинин, Егоров, 2018) и для всех групп были одинаковыми. Включение препарата в дозе 0.5 г/т комбикорма повысило прирост живой массы цыплят в конце опыта на 5.7% по сравнению с бройлерами контрольной группы, и обеспечило высокую сохранность птицы. При этом затраты корма на 1 кг прироста живой массы в

**Таблица 1.** Элементный состав порошка кутикулы куколок *H. illucens* и комплекса кутикулы с культуральной жидкостью *L. acidophilus* В 2707

Элемент	Кутикула			Кутикула с пробиотиком		
	%	$\sigma$	C/N	%	$\sigma$	C/N
С	61.53	0.16	8.7	68.24	0.29	52.5
N	7.08	0.23		1.30	0.40	
O	28.02	0.09		26.74	0.15	
Na	0.09	0.01		0.41	0.01	
Mg	0.38	0.01		0.24	0.01	
P	0.71	0.01		0.51	0.03	
K	0.66	0.01		0.66	0.02	
Ca	1.53	0.02		1.90	0.03	
Всего	100.00			100.00		

опытной группе за период выращивания снизились на 3.5% за счет повышения переваримости и использования питательных веществ корма, что может быть связано с активностью пробиотика.

Таким образом, получена обогащенная кальцием, магнием и фосфором биопленка лактобактерий *L. acidophilus* В 2707 на сорбенте, состоящем из микро частиц кутикулы куколок черной львинки *H. illucens*, включая наночастицы, что позволило получить пробиотический препарат с высокой биологической эффективностью.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной программы поддержки университетов “Приоритет 2030”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // Успехи биол. Хим. 2020. Т. 60. С. 317–368.
- Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.
- Фисинин В.И., Егоров И.А. Руководство по кормлению сельскохозяйственной птицы. Сергиев Посад: ООО “Лица”, 2018. 226 с
- Caruso D., Devic E., Subamia IW., Talamond P., Baras E. Technical handbook of domestication and production of diptera Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens*, Stratiomyidae / IRD Editions IPB Press 2014. 141 p. ISBN: 978–979-493-610-8.
- Diener S., Zurbrügg C., Tockner K. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates // Waste Management & Research. 2009. Т. 27. № 6. С. 603–610.
- Finke M.D. Complete nutrient content of four species of feeder insects // Zoo Biol. 2013. V. 32. № 1. P. 27–36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>
- Henriques B.S., Garcia E.S., Azambuja P., Ariel F.G. Determination of Chitin Content in Insects: An Alternate Method Based on Calcofluor Staining // Methods article Front. Physiol., Sec. Invertebrate Physiology, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00117>
- Lenardon M.D., Munro C.A., Gow N.A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis // Current Opinion in Microbiology. 2010. V. 13. P. 416–423.

### Cuticle of *Hermetia Illucens* Black Lion Pupa as A Biosorbent for Probiotics

N. A. Ushakova<sup>1, #</sup>, S. V. Sverguzova<sup>2</sup>, I. G. Shaikhiyev<sup>2</sup>, Zh. A. Sapronova<sup>2</sup>, A. I. Bastrakov<sup>1</sup>, E. A. Levenko<sup>1</sup>, and R. M. Khatsaeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, A.N. Severtsov Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup> Belgorod Technological University. V.G. Shukhov, st. Kostyukova, 46, Belgorod, 308012 Russia

<sup>#</sup>e-mail: [naushakova@gmail.com](mailto:naushakova@gmail.com)

Using the method of scanning electron microscopy, a comparative study of the particle surface morphology and the elemental composition of the cuticle of *Hermetia illucens* pupa before and after the application of the culture liquid (CL) of the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* B 2707 was carried out. At the same time, under the influence of CL, destruction of relatively large particles of the powder of the chitin-protein complex of the cuticle (average particle diameter  $D 845.3 \pm 109.1 \mu\text{m}$ ) and the formation of small fragments (average  $D 63.4 \pm 13.9 \mu\text{m}$ ), including nanoparticles (average  $D 54 \pm 18 \text{nm}$ ). A biofilm of lactobacilli enriched with calcium, magnesium and phosphorus was obtained on a sorbent consisting of microparticles of the cuticle of insect pupae and including nanoparticles, which provided the probiotic preparation with high biological efficiency.

**Keywords:** cuticle, chitin, black soldier fly, sorbent, probiotic