

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 72 • № 3 • 2017 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Ботаника

- Соколов Д.Д., Нуралиев М.С., Оскольский А.А., Ремизова М.В. Эволюция гинеец покрытосеменных растений: мономерия, псевдомономерия и миксомерия . . . 115

Гидробиология

- Белевич Т.А., Ильяш Л.В., Милютин И.А., Логачева М.Д., Троицкий А.В. Обилие и видовой состав фотоавтотрофных пикозоокариот Онежского залива Белого моря . . 128
- Даллакян Г.А., Гершкович Д.М., Ипатова В.И., Исакова Е.Ф. Совместное действие тяжёлых металлов и шунгита на индикаторные планктонные организмы 135

Микология и альгология

- Бубнова Е.Н. Разнообразие микроскопических грибов в литоральных песках Белого моря 142
- Камзолкина О.В., Киселица М.А., Кудрявцева О.А., Штаер О.В., Мажейка И.С. Эндоцитоз и его ингибиторы у базидиального гриба *Rhizoctonia solani*. 149
- Шибзухова К.А., Гаврилова О.В., Чивкунова О.Б., Сидоров Р.А., Соловченко А.Е., Лобакова Е.С. Оценка биотехнологического потенциала и уточнение таксономического статуса микроводорослей рода *Parietochloris* (Trebouxiophyceae) коллекции CALU 158

Молекулярная биология

- Грибкова А.К., Армеев Г.А., Шайтан А.К. Исследование энергетического профиля процесса отворачивания ДНК от гистонового ядра нуклеосомы методами молекулярного моделирования 164
- Любителиев А.В., Студитский В.М., Феофанов А.В., Кирпичников М.П. Влияние ионов натрия и калия на конформацию линкерных участков нуклеосом 169

Физиология

- Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Парадоксальное влияние сочетанного воздействия семакса и молибдат аммония на обучение и память крыс. 174

Физиология растений

- Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Мапелли С., Михеева Л.Е., Карбышева Е.А. Влияние ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона на содержание и спектр полиаминов в листьях и корнях дикорастущих растений 179

CONTENTS

Botany

- Sokoloff D.D., Nuraliev M.S., Oskolski A.A., Remizova M.V.* Evolution of angiosperm gynoecium: monomery, pseudomonomery and mixomery 115

Hydrobiology

- Belevich T.A., Ilyash L.V., Milyutina I.A., Logacheva M.D., Troitsky A.V.* Phototrophic picoeukaryotes of the Onega Bay, the White Sea: abundance and species composition . . 128
- Dallakyan G.A., Gershkovich D.M., Ipatova V.I., Isakova E.F.* The combined effect of heavy metals and shungite on indicator plankton organisms. 135

Mycology and algology

- Bubnova E.N.* Diversity of microscopic fungi in lithorial sands of the White Sea. 142
- Kamzolkina O.V., Kiselica M.A., Kudryavtseva O.A., Shtaer O.V., Mazheika I.S.* Endocytosis and its inhibitors in basidiomycetous fungus *Rhizoctonia solani* 149
- Shibzukhova K.A., Gavrilova O.V., Chivkunova O.B., Sidorov R.A., Solovchenko A.E., Lobakova E.S.* Biotechnological potential assessment and taxonomic status refinement of microalgae of the genus *Parietochloris* (Trebouxiophyceae) in the CALU-collection . 158

Molecular biology

- Gribkova A.K., Armeev G.A., Shaytan A.K.* Investigation of histone-DNA binding energy as a function of DNA unwrapping from nucleosome using molecular modeling 164
- Lyubitelev A.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P.* Influence of sodium and potassium ions on conformation of linker parts of nucleosomes 169

Physiology

- Inozemtsev A.N., Bokieva S.B., Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F.* The paradoxical influence of Semax and ammonium molybdate co-exposure on learning and memory in rats 174

Plant Physiology

- Radyukina N.L., Ivanov Y.V., Mapelli S., Mikheeva L.E., Karbysheva E.A.* The effect of medium wave ultraviolet radiation on the content and spectrum of polyamines in leaves and roots of wild-growing plants 179

БОТАНИКА

УДК 581.46

**ЭВОЛЮЦИЯ ГИНЕЦЕЯ ПОКРЫТОСЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ:
МОНОМЕРИЯ, ПСЕВДОМОНОМЕРИЯ И МИКСОМЕРИЯ****Д.Д. Соколов^{1,*}, М.С. Нуралиев¹, А.А. Оскольский^{2,3}, М.В. Ремизова¹**¹*Кафедра высших растений, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Department of Botany and Plant Biotechnology, University of Johannesburg, South Africa, Johannesburg, Auckland Park 2006, PO Box 524;*³*Ботанический музей, Ботанический институт имени В.Л. Комарова, РАН, Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, д. 2***e-mail: sokoloff-v@yandex.ru*

Наличие гинецея, состоящего из плодолистиков, — важная особенность цветковых растений. Плодолистик нередко рассматривают как гомолог мегаспорофилла голосеменных (т.е. листа, на котором расположены семяпочки), но не исключено, что он имеет более сложную природу. Плодолистики покрытосеменных могут срастаться между собой, образуя синкарпный гинецей. В синкарпных гинецеях обычно развит компитум — область, где объединяются пути роста пыльцевых трубок отдельных плодолистиков, так что пыльцевые трубки могут переходить из одного плодолистика в другой. Это создает предпосылку возникновения диморфизма плодолистиков, при котором часть из них может не иметь функционального рыльца или фертильных семяпочек. Частный случай диморфизма — псевдомономерия, при которой только один из плодолистиков имеет фертильную семяпочку/семяпочки. Псевдомономерный гинецей обычно имеет одну плоскость симметрии и в отношении регуляции морфогенеза должен иметь общие черты с моносимметричными околоцветником и андроцеом. Истинно мономерный гинецей состоит из единственного плодолистика. Синкарпные гинецеи в ходе эволюции могут скачкообразно переходить к мономерным либо претерпевать стерилизацию и постепенную редукцию части плодолистиков. В особой группе гинецеев имеет место частичная или почти полная утрата индивидуальности плодолистиков, так что отнесение семяпочки/семяпочек к конкретному плодолистiku невозможно. Это явление, которое следует отличать от псевдомономерии, названо нами миксомерией.

Ключевые слова: *гинецей, мономерия, плодолистик, псевдомономерия, синкарпия, цветок, эволюция, обзор*

Наличие плодолистиков, образующих гинецей, — важнейший признак покрытосеменных растений. Внутри этих структур расположены семяпочки, из которых образуются семена, и поэтому само название “покрытосеменные растения” связано с наличием плодолистиков. Выделение плодолистика как особой структуры — одно из наиболее удачных обобщений сравнительной морфологии растений, удобных и в практической работе. Определение термина “плодолистик”, как и многих других базовых научных понятий, дать непросто. При этом происхождение и гомологии плодолистика — одна из главных загадок эволюционной ботаники [1–4]. Дать ответ на вопрос о морфологической природе плодолистика означало бы во многом решить проблему происхождения и родственных связей покрытосеменных растений.

Гинецей представляет собой совокупность всех плодолистиков цветка. При этом плодолистик обычно определяется как структурная единица гинецея [5]. Такое “кольцевое” определение не проясняет морфологической природы плодолистика и гине-

цея, но удобно в практическом отношении. Очевидно, что это определение может быть использовано, только если границы анализируемого цветка не вызывают сомнений (такие сомнения возникают относительно редко [6–9]), а цветки всех покрытосеменных рассматриваются как гомологичные друг другу структуры.

Плодолистики могут быть свободными или срастаются между собой, их число в гинецеях покрытосеменных варьирует в значительных пределах. Цветки с несколькими свободными плодолистиками, вероятно, представляют собой исходное (плезиоморфное) состояние у покрытосеменных растений [10]. Действительно, представители базальной грады покрытосеменных, за исключением Nymphaeaceae, — растения со свободными плодолистиками [10, 11]. Гинецей из нескольких свободных плодолистиков развит у Amborellaceae — вероятной сестринской группы по отношению к прочим покрытосеменным [10, 11].

В большинстве случаев гинецей из нескольких сросшихся между собой плодолистиков легко от-

личить от гинецея, образованного единственным плодолистиком, однако это не всегда так [12–17]. Наш обзор посвящён анализу проблемных ситуаций, в которых подсчёт числа плодолистиков не является тривиальной задачей. Для того чтобы обсуждать эти проблемы, необходимо сначала кратко рассмотреть представления о природе плодолистика.

Концепция кондупликатного плодолистика и проблема происхождения гинецея

Во второй половине XX века широкое признание получила концепция кондупликатного плодолистика [18–20]. Она интерпретирует плодолистик как исходно листовидный орган, у которого на морфологически верхней (адаксиальной) поверхности (в большинстве случаев, вблизи краёв) формируются семязачатки. Этот орган сложен вдоль средней жилки на верхнюю сторону. Такое сложение характерно для листьев многих растений внутри почки, однако у кондупликатного плодолистика оно сохраняется и в дефинитивном состоянии. Кроме того, правый и левый края плодолистика срастаются между собой. Срастание краёв ведет к интернализации адаксиальной поверхности и расположенных на ней семязачатков и, соответственно, образованию полости завязи. Это срастание краёв рассматривается, с одной стороны, как эволюционный тренд, а с другой — его можно наблюдать в ходе морфогенеза кондупликатного плодолистика. Срастание, которое включает контакт поверхностей органов и может непосредственно наблюдаться в ходе морфогенеза, называется постгенитальным [21]. Считается, что способность к постгенитальным срастаниям в ходе эволюции высших растений появилась у покрытосеменных в связи с возникновением плодолистиков [22]. При условии сохранения непрерывности первичной морфологической поверхности [23] и экзогенного заложения семязачатков формирование полностью замкнутой завязи без участия постгенитального срастания краёв невозможно [17]. Так как срастание краёв плодолистика всегда происходит на брюшной стороне (то есть в случае нескольких плодолистиков в гинецее — со стороны, обращённой к центру цветка), линия зарастания получила название брюшной шов.

В рамках концепции кондупликатного плодолистика предполагают, что его эволюционным предшественником был фертильный лист — мегаспорофилл [18, 19] — на верхней стороне которого развивались семязачатки (в семязачатке находится мегаспорангий — нуцеллус). Эволюционная фиксация ранней стадии морфогенеза этого спорофилла, на которой он оставался ещё вдоль сложенным, как в почке [19], а также возникновение постгенитального зарастания краёв дают возможность представить себе возникновение плодолистика. Специалисты по генетике развития поддержали точку зрения о листовой природе всех элементов цветка [24–27].

Слабым местом представлений о плодолистике как мегаспорофилле является отсутствие каких-либо современных или ископаемых голосеменных растений, у которых семязачатки были бы расположены на морфологически верхней стороне плоских филломов. Конечно, семязачатки расположены на верхней стороне семенных чешуй хвойных, но эти листовидные структуры заведомо не являются филломами, а представляют собой результат преобразования целых боковых осей и располагавшихся на них органов (так называемый аксиллярный комплекс). Адаксиальной считают поверхность структур (называемых купулами или капсулами), вмещающих в достаточной мере интернализированные семязачатки у ископаемых голосеменных из порядков *Caytoniales* и *Glossopteridales* (*Arberiales*) [1, 2]. Эти вмещающие несколько ортотропных унитегмальных семязачатков образования интерпретируют как возникшие в результате глубокой эволюционной трансформации мегаспорофиллов или их частей. В настоящее время данные структуры (купулы) рассматривают как потенциально гомологичные наружному интегументу семязачатков покрытосеменных растений, поскольку такая точка зрения позволяет одновременно объяснить происхождение как двойного интегумента, так и анатропного типа семязачатков [2, 3]. Если так, то структуры, вмещающие семязачатки у *Caytoniales* и *Glossopteridales*, нельзя считать гомологами плодолистиков. Таким образом, данные палеоботаники не дают убедительных доказательств теории о плодолистике-мегаспорофилле.

Существуют гипотезы, позволяющие видеть в плодолистике филлом, но не мегаспорофилл.

Согласно взглядам С.В. Мейена [28] и авторов преимущественной мужской теории происхождения цветка [29, 30], плодолистик скорее гомологичен микроспорофиллу предков цветковых растений, при этом в его происхождении важную роль играли резкие гомеотические преобразования, в силу которых на плодолистике появились семязачатки и исчезли микроспорангии. Слабым местом этих взглядов являются недостаточно убедительные объяснения происхождения битегмальных семязачатков покрытосеменных, принятые С.В. Мейеном и авторами преимущественно мужской теории [4, 30]. Выбранные в рамках этих представлений вероятные предковые группы цветковых (беннеттитовые и користо-спермиевые), в отличие от рассмотренных выше кейтониевых и глоссоптерид, не позволяют легко представить себе возникновение наружного интегумента из стенки структуры, вмещавшей унитегмальные семязачатки. Впрочем, специалисты по генетике развития указывают, что сверхэкспрессия гена *WUSCHEL* у *Arabidopsis* вызывает заложение дополнительных интегументов и похожий механизм мог лежать в основе происхождения битегмальных семязачатков покрытосеменных [31, 32].

Ряд авторов сравнивает стенку плодолистика цветковых с листьями, на которых (всегда на верхней стороне) были расположены вмещающие семя-

почки структуры у глоссоптерид. Согласно одной из точек зрения, у глоссоптерид пазушный побег, несущий сложенные мегаспорофиллы, конгенитально прирастал к своему кроющему листу, и если сами мегаспорофиллы — это гомологи внешнего интегумента цветковых, то кроющий лист мог бы быть гомологом стенки плодолистика (опять-таки, филломом, но не мегаспорофиллом) [1, 2]. Слабыми местами этой точки зрения являются: 1) большой временной разрыв между глоссоптеридами (до рубежа перми/триаса) и самыми древними из достоверно известных цветковых (мел) [2]; 2) отсутствие каких-либо структурных или морфогенетических свидетельств различного происхождения плаценты и стенки завязи у представителей базальной грады покрытосеменных [11] (за исключением, возможно, *Illicium*, где единственная семяпочка возникает, по мнению некоторых авторов, на оси цветка в пазухе плодолистика [33]). Кейтониювые, имеющие много общего с глоссоптеридами, в отличие от последних были современниками первых цветковых, но характер расположения на растении осей с капсулами у кейтониювых не установлен из-за недостаточной сохранности материала. Существует гипотеза, согласно которой их расположение напоминало таковое у глоссоптерид [1, 2], но прямых доказательств этому нет.

Данные генетики развития отчасти подтверждают идею о плодолистике как филломе, но не мегаспорофилле. Регуляция морфогенеза семяпочки имеет много общего с регуляцией морфогенеза побега, а заложение и развитие интегументов и листьев во многом сходны [31, 32]. Это указывает на значительную автономность морфогенеза семяпочки по отношению к морфогенезу плодолистика. Главным регулятором развития плодолистиков (у *Arabidopsis*) является ген *AGAMOUS* (*AG*) [32, 34]. У растений, мутантных по этому гену, нормальные плодолистики отсутствуют. Однако даже в отсутствие активности *AG* цветки *Arabidopsis* в некоторых случаях способны развивать семяпочки, которые располагаются эктопически на чашелистиках. Это показывает, что развитие семяпочек контролируется отчасти независимо от развития стенки плодолистика в целом. Для нормального развития плодолистика у *Arabidopsis* необходимо участие 4 генов, принадлежащих к одному семейству, — это вышеупомянутый *AG*, а также *SEEDSTICK* (*STK*) и *SHATTERPROOF* (*SHP1* и *SHP2*) [32, 34]. *AG* определяет положение плодолистиков в центре цветка и задает места экспрессии *STK* и *SHP*, “ответственных” за развитие семяпочек. Характерно, что мутанты *stk shp1 shp2* развивают гинецей как таковой, но не имеют нормально сформированных семяпочек [34].

Изложенные в предыдущем абзаце факты не являются главными аргументами в пользу плодолистика как филломы, но не мегаспорофилла, так как сходная автономность морфогенеза семяпочки должна быть выражена и в несомненных мегаспорофиллах голосеменных. Гораздо интереснее дан-

ные о том, что вся плацента, несущая семяпочки, по характеру генетической регуляции морфогенеза у *Arabidopsis* напоминает пазушную меристему [32]. Впрочем, не очень понятно, как различить процессы морфогенеза плаценты и семяпочки в плодолистиках с единственной семяпочкой, которые преобладают у представителей базальной грады покрытосеменных.

Асцидиатный плодолистик и структура синкарпного гинецея

Концепция кондупликатного плодолистика не описывает всё разнообразие плодолистиков покрытосеменных. У многих растений брюшной шов не доходит до основания плодолистика. В таких случаях дистальную область с брюшным швом называют пликатной зоной, а проксимальную область, которая на всём протяжении своего развития является мешковидной, называют асцидиатной зоной [33, 35, 36]. Относительная длина двух зон сильно различается у плодолистиков разных покрытосеменных. Семяпочки могут быть расположены только в одной из зон либо в обеих. Если семяпочка в плодолистике одна, то во многих случаях (хотя далеко не всегда) она прикреплена к брюшной стороне на границе асцидиатной и пликатной зон — в так называемой поперечной зоне [35, 36]. У некоторых покрытосеменных асцидиатные плодолистики совсем не имеют пликатной зоны. Именно этот вариант характерен для большинства представителей базальной грады цветковых растений [11], и поэтому он выявляется как исходный (плезиоморфный) при реконструкции эволюции типов плодолистиков методом максимальной экономии [10]. Концепция асцидиатного плодолистика удобна для описания разнообразия гинецеев покрытосеменных, но не решает описанной выше проблемы происхождения и гомологий плодолистика. Действительно, в асцидиатном плодолистике, как и в кондупликатном, семяпочки находятся на морфологически адаксиальной поверхности.

В гинецеях, где плодолистики срастаются между собой, это срастание в большинстве случаев носит конгенитальный характер, то есть объединённые части плодолистиков с самого начала своего развития представляют собой единое целое. Мы будем следовать авторам, которые называют гинецеи с конгенитальным срастанием между плодолистами синкарпными, а гинецеи без конгенитального срастания между плодолистами — апокарпными [35, 36]. Факт наличия нескольких плодолистиков в синкарпном гинецее доказывается, прежде всего, путём сравнительного анализа, включающего гинецеи широкого круга покрытосеменных. В синкарпном гинецее из асцидиатных плодолистиков выделяют синасцидиатную и симпликатную зоны [35, 36]. Первая образована конгенитально сросшимися асцидиатными зонами плодолистиков. Соответственно, она с момента образования в поперечном сечении

многогнёздная, где каждое гнездо — это полость отдельного плодолистика. Симпликатная зона образована конгенитально сросшимися пликатными зонами плодолистиков. На момент образования она одногнёздная. Полость симпликатной зоны непосредственно соединяется с гнёздами синасцидиатной зоны. Как и в случае отдельного свободного плодолистика, брюшные края каждого плодолистика (точнее, стенки, образованные конгенитально сросшимися краями каждых двух соседних плодолистиков) в симпликатной зоне могут постгенитально соединиться друг с другом с образованием брюшных швов. Если это происходит, то симпликатная зона становится многогнёздной. Образование брюшного шва в данном случае не является фактором, определяющим интернализацию семян, и поэтому образование брюшных швов в симпликатной зоне имеет место далеко не всегда. У многих растений она так и остается одногнёздной. Выше симпликатной зоны может быть расположена асимпликатная (аналогичная апокарпному гинецею), где отсутствует конгенитальное срастание между пликатными частями отдельных плодолистиков [36].

Наличие исходно одногнёздной области гинецея (симпликатной зоны) имеет большое значение для организации роста пыльцевых трубок. У большинства цветковых растений пыльцевые трубки растут по так называемой проводниковой ткани, которая, как правило, является производным клеток внутренней поверхности плодолистика или слоёв клеток, близких к внутренней поверхности [5]. У некоторых других цветковых пыльцевые трубки растут в полости плодолистика — вдоль его внутренней поверхности или внутри занимающей полость плодолистика слизи [5]. Во всех этих случаях наличие симпликатной зоны позволяет создать область (компитум), где пути роста пыльцевых трубок разных плодолистиков пересекаются и трубки, растущие от пыльцевых зёрен, проросших на разных рыльцах, могут перераспределяться между плодолистами и конкурировать между собой. Эти процессы имеют большое биологическое значение [5, 35, 37, 38]. В процессе формирования проводниковой ткани полость плодолистика в симпликатной зоне может полностью зарастать, так что эта полость не выявляется как таковая на поперечных срезах. Компитум может возникать не только в типичных синкарпных гинецеях, но и в апокарпных гинецеях с постгенитальным объединением плодолистиков [37, 39–41]. Общим между этими вариантами является тот момент, что интернализация семян происходит с участием одновременно нескольких плодолистиков.

Диморфизм плодолистиков синкарпного гинецея и псевдомономерия

Наличие компитума определяет возможность возникновения структурно-функционального диморфизма плодолистиков синкарпного гинецея¹. Возможна и широко распространена рассматриваемая в следующем абзаце ситуация (1), при которой один плодолистик (или некоторые плодолистки) участвует лишь в улавливании пыльцы и организации начальных этапов роста пыльцевых трубок, но не имеет фертильных семян, а другой (или другие) — имеет как функциональное рыльце, так и развитую завязь. За счёт перераспределения в области компитума пыльцевые трубки с рыльца стерильного плодолистика могут оплодотворить семяпочки (семяпочку) фертильного плодолистика (плодолистиков), а наличие нескольких рылец повышает надёжность улавливания пыльцы (хотя этого же эффекта можно достигнуть путём усложнения рыльца единственного плодолистика, например, у *Amphibolis* из *Cumodoseaceae* оно разделено на три ветви, каждая из которых в ряде случаев в свою очередь ветвится [44, 45]). В другом варианте диморфизма плодолистиков (2) лишь один из них (или некоторые плодолистки) имеют функционирующее рыльце, в то время как фертильные семяпочки есть у всех плодолистиков. Этот вариант известен, например, в семействе *Polygalaceae* [46]. Наконец, возможна ситуация (3) полного “разделения труда” между плодолистами, когда один из них (или некоторые плодолистки) имеет функционирующее рыльце и не несёт фертильных семян, а другой плодолистик (или плодолистки) — не имеет развитого рыльца, но несёт фертильные семяпочки/семяпочку. Пример этого варианта — *Lagoecia cuminoides* (*Umbelliferae*: *Apiales* [47]). Теоретически можно представить себе гинецей (4), в котором объединены три типа плодолистиков: с семяпочками и рыльцем, с семяпочками без рыльца и с рыльцами без семян, но мы не знаем таких примеров среди реальных растений. Существуют гинецеи, в которых функциональный смысл диморфизма плодолистиков неясен. Например, стерильные плодолистки *Triglochin* (*Juncaginaceae*: *Alismatales*) не улавливают пыльцу, а гинецей этих растений не имеет симпликатной зоны с компитумом [44, 48].

Число стерильных и фертильных плодолистиков может быть различным. Например, у *Emmotum* (*Isacaceae*) три фертильных и два стерильных плодолистика [49]. Частный (но самый распространённый) случай гинецея с диморфизмом плодолистиков — псевдомономерный гинецей [5, 17, 33, 36]. К этому типу могут быть отнесены все синкарпные гинецеи с единственным плодолистом,

¹ Термин “полиморфизм плодолистиков” несколько скомпрометирован серией работ Э.Р. Саундерс (например, [42]), в которых наличие стерильных и фертильных плодолистиков неоправданно декларируется для гораздо более широкого круга покрытосеменных, чуть ли не для большинства представителей этой группы. Представления Саундерс во многом основаны на недостаточном критическом восприятии данных по васкулатуре цветка [43]. Вместе с тем, они представляют интерес в свете идей о возможной двойственной природе плодолистиков покрытосеменных как гомологов репродуктивных структур глоссоперид.

имеющим фертильную завязь. Возможно формирование псевдомономерного гинецея и при постгенитальном объединении плодолистиков (у некоторых пальм) [40, 50]. В псевдомономерных гинецеях может иметь место значительная редукция стерильных плодолистиков (плодолистика), включая утрату их роли в улавливании пыльцы [36, 51].

Доказать наличие в синкарпном гинецее сильно редуцированных стерильных плодолистиков очень трудно, так как речь идет о маленькой и возможно лишенной ярких специальных черт структуре, конгенитально сросшейся с фертильным плодолистиком. Наиболее убедительными доказательствами псевдомономерной природы таких гинецеев служат морфологические ряды с нарастающей степенью редукции стерильных плодолистиков [51]. Такие морфологические ряды можно построить не всегда, особенно если настаивать на том, чтобы они не противоречили молекулярно-филогенетическим данным о родственных связях таксонов, использованных при построении ряда. Мы считаем, что если морфологический ряд не выявляется, а структурные и морфогенетические данные не вскрывают несомненных следов стерильных плодолистиков, гинецей необходимо интерпретировать как мономерный, поскольку это более простая гипотеза. Покажем это на примере группы семейств порядка Poales, которые в последнее время предложено объединять под названием Restionaceae s.l. [52]. У рестиевых в узком понимании выявлены случаи несомненного полиморфизма плодолистиков (например, *Leptocarpus*), где гинецей имеет три функциональных рыльца и завязь с единственной свисающей семязпочкой, которая расположена по отношению к одному из рылец точно так же, как расположена по отношению к рыльцу своего плодолистика семязпочка в каждом из гнезд завязи у видов рестиевых с тремя фертильными плодолистами [13, 53]. Такой гинецей можно считать псевдомономерным. В близком к Restionaceae s.str. семействе Anarthriaceae насчитывается три рода, родственные связи между которыми описываются как *Anarthria* (*Lyginia* + *Hopkinsia*) [54]. У первых двух родов типично тримерный гинецей из одинаковых плодолистиков [53, 55], а у *Hopkinsia* развит единственный плодолистик [56]. Наличие псевдомомерии у *Leptocarpus* не даёт каких-либо аргументов против интерпретации гинецея *Hopkinsia* как мономерного, так как эти два рода не являются сестринскими или хотя бы близкородственными в пределах Restionaceae s.l. Различные варианты редукции гинецея, описанные у других Restionaceae [57], по тем же причинам не могут прояснить природу гинецея *Hopkinsia*.

Мономерный гинецей

Мономерный гинецей состоит из одного-единственного плодолистика. Согласно традиционным представлениям, он, в отличие от псевдомомер-

ного, произведен от апокарпного гинецея и возникает при уменьшении числа плодолистиков в нём [19]. Эти взгляды развивались в контексте идеи о преимущественно необратимом переходе от апокарпии к синкарпии в эволюции покрытосеменных. Анализ эволюции признака “наличие конгенитального срастания между плодолистами” на основании молекулярно-филогенетических деревьев покрытосеменных растений указывает, однако, на вторичность апокарпии во множестве групп, включая все апокарпные однодольные и все апокарпные высшие двудольные (группа core eudicots, или Pentapetalae) [58]. Мы считаем, что при отнесении гинецея к мономерному не следует принимать во внимание его вероятное происхождение от полимерно-апокарпного или полимерно-синкарпного типа. Очень часто (хотя и не всегда) отдельные плодолистки синкарпного гинецея закладываются как индивидуальные примордии, а конгенитально сросшиеся участки возникают на более поздних стадиях морфогенеза. Индивидуальность зачатков плодолистиков даёт основание полагать, что синкарпия не вводит никаких принципиальных ограничений для варьирования их числа, включая и уменьшение этого числа до единицы.

В настоящее время накоплено несколько убедительных примеров истинно мономерных гинецеев, возникших при резком уменьшении меризма синкарпного гинецея без постепенного ряда переходных форм (с одним фертильным и одним или несколькими стерильными плодолистами). Например, синкарпия несомненно является исходным состоянием для порядка Caryophyllales, а мерность гинецея в этой группе сильно варьирует. Мономерный гинецей *Trichostigma* (Phytolaccaceae) имеет при основании незаросшее отверстие, ведущее в полость завязи [59]. Оно полностью соответствует той области, в которой плодолистки синкарпных гинецеев ряда представителей Caryophyllales остаются индивидуально раскрытыми в симпликатной зоне. Если бы редукция гинецея в этой группе шла по пути псевдомомерии, то подобное отверстие могло бы сохраниться лишь при условии разрыва контура стенки завязи (как он виден на поперечном срезе), то есть вторичного разделения конгенитально сросшихся частей плодолистиков. Такое объяснение представляется менее экономным, чем предположение о редукции целых плодолистиков, т.е. о мономерии гинецея *Trichostigma*.

Синкарпия и тримерность гинецея были исходными состояниями для группы семейств порядка Poales, включающей осоковые, злаки, рестиевые и Centrolepidaceae. В семействе Centrolepidaceae (сейчас иногда включаемом в Restionaceae) имела место утрата стабильности меризма гинецея. Здесь встречаются как мономерные, так и высокополимерные гинецеи (до 45 плодолистиков) [9].

В качестве аргументов в пользу псевдомономерной природы гинецеев нередко приводили наличие у них тех или иных таксонов необычных

особенностей, которые казалось невозможным представить себе в гинецее, образованном одним-единственным плодолистиком. Например, У.Р. Филиппсон [60] описал одногнёздный гинецей с одной фертильной семяпочкой у *Polyscias* (*Arthrophyllum*) *diversifolia* (Araliaceae: Apiales) как псевдомономерный, отметив наличие лопастей в области рыльца (по его мнению — верхушек отдельных плодолистиков) и наличие большего, чем можно ожидать у одного плодолистика, числа проводящих пучков в дистальной части гинецея (часть из них, по его мнению, — рудименты проводящей системы стерильных плодолистиков). Наши данные показывают, что гинецей этого вида проходит типичную для плодолистика многих покрытосеменных стадию подковообразного зачатка, а лопасти на его верхушке появляются очень поздно и имеют варьирующие от цветка к цветку число и размеры, а поэтому не могут быть следами нескольких плодолистиков [61]. Кроме того, у близких видов с несколькими фертильными плодолистиками мы выявили наличие многочисленных мелких пучков в крыше завязи (их число многократно превышает число плодолистиков). Точно такие же многочисленные пучки, развитые в крыше завязи *P. diversifolia*, следовательно, вполне могут принадлежать единственному плодолистiku. Вся совокупность данных указывает на мономерную природу гинецея *P. diversifolia* [61].

Симметрия и ориентация мономерных и псевдомономерных гинецеев

Поскольку плодолистки покрытосеменных (по крайней мере, имеющие пликатную зону) моносимметричны, мономерный, как и псевдомономерный, гинецей имеет одну плоскость симметрии. Следовательно, можно было бы предположить, что к цветкам с псевдомономерными и мономерными гинецеями применимы обобщения, сделанные относительно моносимметричных цветков покрытосеменных растений. Моносимметричные цветки имеют достаточно большую устойчивость плана строения, т.е. числа и относительного расположения органов [62], что отчасти (но едва ли в полной мере) связано с ролью генов семейства *CYCLOIDEA* в регуляции не только симметрии цветка, но и числа органов в нем [63]. Ориентация плоскости их симметрии чаще всего стабильна в пределах таксона. В большинстве случаев плоскость симметрии у них медианная [64], так как кроющий лист и ось соцветия создают морфогенетический градиент, в рамках которого развивается цветок [65].

Действительно, большинство убедительных примеров псевдомомерии гинецея относится к группам со стабильным планом строения цветка, обычно с медианной плоскостью симметрии. Например, в большом семействе зонтичные (Araliaceae, или Umbelliferae) план строения цветка очень стабilen: цветок (кроме редких случаев, которые

можно рассматривать как тератологические) пентамерный за исключением димерного гинецея [64, 66]. В этом семействе, однако, неоднократно возникала псевдомомерия, причём положение стерильного плодолистика в одних случаях стабильно адаксиальное (*Lagoecia*), а в других — стабильно абаксиальное (*Arctopus*) [47]. Самая крупная группа покрытосеменных с преимущественно мономерным гинецеем — бобовые, цветки которых часто моносимметричны и со стабильным числом органов, а плодолистик лежит в плоскости симметрии цветка [64, 66, 67].

Существует, однако, несколько противоположных примеров, иллюстрирующих нестабильную ориентацию моносимметричных гинецеев. Иногда эти случаи можно связать с общей нестабильностью плана строения цветка в группе. Так, в родственном зонтичным семействе аралиевых (Araliaceae) план строения цветка лабилен как на уровне семейства в целом, так, в ряде случаев, и на уровне конкретных видов [68]. У аралиевых неоднократно возникала момерия гинецея (все случаи — в роде *Polyscias*), и в каждом случае характер ориентации плодолистика по отношению к медианной плоскости цветка нестабilen на уровне вида и даже одного соцветия [61]. При этом у *Polyscias* варьирование характера ориентации гинецея не ограничивается лишь случаями момерии [69]. В этой группе может варьировать и ориентация димерного гинецея, в то время как два плодолистика зонтичных всегда расположены в медианной плоскости [69].

Нестабильную ориентацию плодолистика отмечают и в псевдомономерных (мономерных?) гинецеях Anacardiaceae [14]. У Anacardiaceae встречаются также моносимметричные андроцеи, и у растений, обладающих моносимметричными андроцеем и гинецеем, совпадение плоскостей их симметрии имеет место далеко не всегда (в пределах внутривидового варьирования), а если и случается, то эта плоскость не является для цветка медианной [14]. Как и в случае Araliaceae, план строения цветка значительно варьирует в пределах Anacardiaceae, хотя он и может быть стабильным в рамках конкретного вида [14, 64].

Вероятно, стабильность ориентации мономерного и псевдомономерного гинецея в группах, где она выражена, связана с тем, что важнейшие процессы, определяющие морфогенез плодолистика, происходят на очень ранних этапах развития цветка. Показательно, что у бобовых примордий плодолистика нередко становится заметен раньше, чем примордии тычинок внутреннего круга [67]. В цветках со строго акропетальным появлением примордиев, однако, разметка положения плодолистиков также может проходить ранее разметки положения тычинок (“биполярная разметка” положения органов) [64, 70, 71].

Тот факт, что плодолистик мономерного гинецея у покрытосеменных часто ориентирован в медиан-

ной плоскости, указывает на вероятное непосредственное морфогенетическое влияние кроющего листа цветка и оси соцветия. Крайне интересно таксономически значимое разнообразие ориентации плодолистика мономерного гинецея в группе австралийских представителей семейства *Proteaceae* [72]. Авторы связывают разные варианты ориентации плодолистика этих растений с различными очертаниями меристемы цветка после заложения околоцветника и андроцея. Важно и то, что в данном случае соцветие — очень компактная на ранних стадиях развития двойная кисть (в широком понимании термина кисть) с двухцветковыми осями второго порядка. Возможно, различия в ориентации гинецея австралийских протейных могут быть связаны и с взаимодействием морфогенетических сигналов кроющего листа цветка и кроющего листа оси второго порядка.

Нестабильность ориентации гинецея, в том числе мономерного, подобная выявленной у *Araliaceae* и *Anacardiaceae*, может быть связана с отсутствием (утратой?) биполярной разметки положения органов. При этом определение положения плодолистиков в цветке, вероятно, происходит на несколько более поздней стадии морфогенеза, чем у таких растений, как бобовые. Характер симметрии околоцветника может оказывать влияние на ориентацию плодолистика. Положение фертильного плодолистика *Anacardiaceae* может быть связано с положением наружного чашелистика при черепитчатом почкосложении чашечки [64], то есть позиционная информация чашелистиков оказывается в данном случае важнее, чем морфогенетическое влияние кроющего листа и оси соцветия.

Миксомерия: явление, близкое, но не идентичное псевдомомерии

С псевдомомерией в литературе иногда частично смешивают особый тип гинецея, при котором имеет место значительная утрата индивидуальности плодолистиков и отнесение семян к конкретным плодолистикам невозможно. Для описания подобных случаев мы предлагаем новый термин миксомерия (от греческих слов *mixis* — смешение и *meros* — часть). Можно предварительно выделить три варианта миксомерных гинеев: с центральной колончатой, базальной и париетальной плацентацией.

Вариант с центральной колончатой плацентацией можно проиллюстрировать на примере семейства *Lentibulariaceae*, где стенка одногнёздного гинецея из двух плодолистиков (с 2 рыльцами) формируется независимо от центральной плаценты с многочисленными равномерно расположенными семязачатками и никак с ней не соединена [73, 74]. П.К. Эндресс отмечает наличие центральной колончатой плацентации у представителей 10 семейств высших двудольных из 5 разных порядков и обра-

щает внимание на то, что у части из них стенка гинецея закладывается как единое кольцо, на котором лишь позже становятся заметны лопасти, которые с большей или меньшей степенью надежности можно рассматривать как верхушки отдельных плодолистиков [74]. Практически полная утрата индивидуальности плодолистиков наблюдается в одногнёздных гинеев *Primulaceae*, где плодолистки срослись по всей длине, а многочисленные семязачатки расположены на центральной колончатой плаценте, которая возникает как физическое продолжение оси цветка и в сформированном гинее свободно закачивается, не доходя до верхушки завязи [75, 76]. По мнению П.К. Эндресса [74], лопасти, которые на относительно поздних стадиях развиваются на верхушке исходно трубчатой стенки гинецея *Primulaceae* [75, 76], возникают лишь как необходимое средство замыкания верхушечного отверстия и их правильнее сравнивать, например, с лопастями интегумента вокруг микропиле семязачатков у различных покрытосеменных. Возможно, в этом случае подсчёт числа плодолистиков можно основывать лишь на числе зубцов, которыми вскрывается коробочка, но плоды первоцветных могут и не вскрываться либо вскрываться поперечно, отделяя крышечку.

Ярко выражена миксомерия и в гинеев, имеющих одногнёздную завязь с единственной базальной ортотропной семязачатком и два или более одинаково развитых рыльца (по числу образующих гинеев плодолистиков). Такой гинеей на первый взгляд похож на псевдомономерные гинеев с одной фертильной семязачатком. Однако его принципиально важное отличие — равная степень развития всех плодолистиков, отсутствие их диморфизма. Базальная семязачаток в процессе морфогенеза возникает непосредственно на верхушке флоральной меристемы и не может быть отнесена к какому-либо из плодолистиков, что подтверждается и анализом васкулатуры цветка. Миксомерные гинеев с одной центральной ортотропной семязачатком описаны в нескольких не связанных близким родством группах покрытосеменных, например, в семействах *Piperaceae* (*Piperales*) [77–79], *Polygonaceae* [80, 81] и *Muricaceae* [82]. По мнению Р. Саттлера с соавторами, эти гинеев (как и большинство рассматриваемых ниже) следует считать “акарпеллятными”, так как семязачатки у них возникают, по мнению этих авторов, не на плодолистиках, а непосредственно на оси цветка [82, 83]. Это возвращает нас к дискуссии о возможности интерпретации плодолистика как мегаспорофилла. Нам представляется убедительной точка зрения тех авторов, которые считают центральную базальную (как и колончатую) плацентацию эволюционно производным состоянием признака у покрытосеменных (например, [19, 84]). Во всяком случае, такая плацентация не отмечена у представителей базальной грады покрытосеменных [11]. Тем не менее, нет

оснований сомневаться в истинно терминальном положении семяпочки *Piperaceae*, *Polygonaceae* и *Mugicaceae*. На это указывает весь комплекс данных по структуре и морфогенезу цветка у этих растений. Существование терминальной семяпочки не следует рассматривать как морфологический нонсенс (каким был бы, например, терминальный лист). Как отмечено выше, меристема, которая даёт начало семяпочке, имеет много общего с апикальной меристемой побега.

Появление радиально-симметричной строго терминальной семяпочки можно сравнить с возникновением терминальных цветков или цветкоподобных структур в кистях, колосьях или тирсах, которое известно для разных групп покрытосеменных [85]. По аналогии с возникновением терминальных структур в соцветиях, можно предполагать, что терминальная семяпочка в ряде случаев возникала как результат резких (сальтационных) преобразований, что может объяснять отсутствие ясно выраженных непрерывных рядов переходных форм, приводящих к гинецеям с терминальной семяпочкой (например, у *Polygonaceae*). Ещё более впечатляющее сходство можно отметить между возникновением терминальных семяпочек у покрытосеменных и у хвойных из рода *Juniperus* (*Cupressaceae*) [86]. Для хвойных характерно расположение семяпочек на семенной чешуе, которая у кипарисовых срастается с кроющей чешуей. Однако в некоторых случаях у *Juniperus* главная ось женской шишки завершается терминальной семяпочкой, причём эта семяпочка может быть единственной в шишке и иметь три плоскости симметрии (следуя тримерным кругам чешуй в шишке) [86], а не две, как это бывает во всех остальных случаях у хвойных [87]. Пример с *Juniperus* говорит о том, что случаи возникновения терминальной семяпочки не уникальны для покрытосеменных. По-видимому, сами по себе они ничего не говорят о морфологической природе плодолистика.

В некоторых таксонах цветковых единственная семяпочка, возникающая терминально, представляет собой радиально-симметричную структуру лишь на ранних стадиях развития, а позже становится анатропной (*Сурегасеае* [88]), анатропной с закрученным на 180 градусов фуникулусом (*Plumbaginaceae* [89]), в разной степени изогнутой и часто с закрученным фуникулусом (*Chenopodiaceae* [90, 91]). У близкого к *Chenopodiaceae* рода *Polyscenum* показано изменение характера изгиба фуникулуса единственной терминальной семяпочки как до, так и после опыления [92]. Направление изгиба семяпочки можно было бы использовать как аргумент в пользу отнесения её к какому-то конкретному плодолисту, но правомочность использования этого аргумента нуждается в доказательствах, желательно в виде серий переходных форм. Кроме того, данные по васкулатуре цветка подтверждают терминальное положение таких семяпочек (например, [88]).

В некоторых группах ниже единственной терминальной семяпочки расположена многогнёздная часть гинецея (синасцидиатная зона или конгенитально приросшие к оси цветка основания пликатных плодолистиков?), например, у *Juglans* [93, 94] и *Basella* [83]. Эта многогнёздная область в морфогенезе становится заметной позже, чем семяпочка. Во всех этих случаях миксомерного гинецея положение семяпочки указывает на частичную утрату индивидуальности плодолистиков.

В кладе, объединяющей семейства *Chenopodiaceae* и *Amaranthaceae*, большинство представителей имеют единственную семяпочку, которая закладывается терминально, но есть небольшая группа с многочисленными семяпочками на свободной центральной колончатой плаценте [80]. Выдвинута гипотеза, согласно которой наличие многочисленных семяпочек в данной группе есть эволюционно производное состояние [64, 95]; она хорошо согласуется с молекулярно-филогенетическими данными [96].

Представляют интерес морфологическая интерпретация и происхождение гинецея *Peperomia* (*Piperaceae*). Это замкнутая трубчатая структура без лопастей по краю или с двумя слабо выраженными и поздно возникающими лопастями, имеющая в центре одну базальную ортотропную семяпочку [97, 98]. Филогенетические данные чётко указывают на происхождение этого гинецея из миксомерного с одной базальной семяпочкой и несколькими рыльцами [99]. Обычно гинецей *Peperomia* считают возникшим в результате редукции числа плодолистиков до одного (мономерным), но не менее правдоподобна гипотеза о его происхождении путём полной утраты индивидуальности плодолистиков, подобной тому, что мы наблюдаем у *Primulaceae* (см. обзор гипотез в работе Ш. Такер [97]).

На примере *Сурегасеае* убедительно показано [88], что частичная утрата индивидуальности плодолистиков ведёт к утрате эволюционной стабильности их числа и расположения в цветке. В тримерных гинецеях однодольных, не имеющих прицветничков на цветоножке, за редчайшим исключением, один плодолистик медианно-абаксиальный, а два — трансверзально-адаксиальные [100]. Возникновение димерного гинецея логично представить себе как выпадение медианного плодолистика, что и имеет место у многих осоковых. Однако у некоторых осоковых оба плодолика расположены в медианной плоскости и их гомологии с плодолистами исходного тримерного гинецея неясны [88].

Все рассмотренные выше миксомерные гинецеи имеют базальную или центральную колончатую плацентацию. Представляет интерес вопрос о возможности “обобществления” семяпочек, расположенных в симпликатной зоне синкарпного гинецея. Действительно, в гинецеях с фертильной симпликатной зоной иногда бывает трудно указать,

какому из соседних плодolistиков принадлежит каждая конкретная (или единственная) расположенная на париетальной плаценте семяпочка. Трудности возникают при наличии на плаценте многочисленных семяпочек, расположенных во много рядов (например, у *Rapaceae* [101]), а также при расположении на париетальной плаценте расположенных в один ряд ортотропных либо изогнутых в вертикальной плоскости семяпочек. Один из наиболее показательных примеров, ставящих под сомнение использование концепции плодolistика, — гинецей *Scaphocalyx* (*Achariaceae*, *Malpighiales*). Этот гинецей имеет трубчатую завязь и 5–7 рылец. На стенке завязи расположены ортотропные семяпочки — по одной на радиусе каждого рыльца (это нижний круг семяпочек) и по одной на радиусах между рыльцами (верхний круг семяпочек) [102]. Таким образом, степень индивидуальности плодolistиков в симпликатной зоне гинецея, вероятно, неодинакова в разных группах покрытосеменных и этот вопрос перспективен для дальнейших исследований.

Заключение

Традиционно основной акцент в дискуссии о псевдомономерных гинецеях делался на их отграничение от мономерных. Мы считаем, что помимо мономерного и псевдомономерного следует выделять ещё и миксомерный гинецей. Мономерный гинецей состоит из единственного плодolistика. Псевдомономерный гинецей — это частный случай гинецея с диморфизмом плодolistиков, где один плодolistик фертильный, а другой (или другие) — стерильный. Миксомерный гинецей характеризуется частичной или почти полной утратой индивидуальности плодolistиков и невозможностью отнесения семяпочки или семяпочек к конкретным плодolistикам. Псевдомономерный гинецей — моносимметричная структура. Морфогенез псевдомономерного гинецея, если он стабилен у конкретного вида, должен иметь специальный механизм регуляции, который может иметь общую основу с регуляцией морфогенеза цветков с моносимметричным околоцветником. Механизмы регуляции моносимметрии цветка в основном изучали на примере околоцветника и андроеца, и анализ

генетических механизмов развития псевдомономерного гинецея является перспективной задачей.

В рассматриваемой области остается много нерешённых вопросов, прежде всего — относительно определения типа гинецея у представителей конкретных таксонов. Наличие псевдомомерии можно признать не у всех таксонов, для которых она ранее указывалась. Необходимо уточнить возможность использования критерия переходных форм для установления псевдомономерной природы гинецея. Не любую промежуточную форму можно рассматривать как потенциально переходную. Одно дело, если она представляет собой фиксированное в пределах таксона состояние. Гораздо менее очевидно привлечение данных тератологии. Представим себе два родственных вида, у одного из которых в цветке в норме один плодolistик, а у другого — два. Неограниченно увеличивая объём выборки изученных цветков, мы должны получить всё более полный ряд переходных типов строения, связывающих 1- и 2-плодolistиковый варианты. Это совершенно не означает, что данный ряд будет отражать сценарий эволюционной трансформации признака.

Заслуживают дальнейшего изучения гинецеи, которые одновременно проявляют свойства псевдомономерных и миксомерных. Считается, например, что в гинецее *Viburnum* гнезда двух из трёх плодolistиков сильно редуцированы, а плацента, общая для этих двух плодolistиков, содержит семяпочку, свисающую в крупное гнездо третьего, стерильного, плодolistика [103]. Принимая во внимание такие случаи, лучше не рассматривать псевдомомерию и миксомерию как два состояния одного признака. Вероятно, для целей анализа эволюции признаков лучше говорить о нескольких отдельных признаках, в том числе “наличие диморфизма плодolistиков” и “связь семяпочек с конкретными плодolistиками”.

Анализ разнообразия псевдомономерных гинецеев выполнен при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-05836), а анализ морфологической природы плодolistика — в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (темы АААА-А16-116021660045-2 и АААА-А16-116021660105-3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doyle J.A. Integrating molecular phylogenetic and paleobotanical evidence on origin of the flower // *Int. J. Plant Sci.* 2008. Vol. 169. N 7. P. 816–843.
2. Doyle J.A. Molecular and fossil evidence on the origin of angiosperms // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2012. Vol. 40. P. 301–326.
3. Frohlich M.W., Chase M.V. After a dozen years of progress the origin of angiosperms is still a great mystery // *Nature*. 2007. Vol. 450. N 7173. P. 1184–1189.
4. Соколов Д.Д., Тимонин А.К. Морфологические и молекулярно-генетические данные о происхождении цветка: на пути к синтезу // *Журн. общ. биол.* 2007. Т. 68. № 2. С. 83–97.
5. Endress P.K. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms // *Amer. J. Bot.* 2011. Vol. 98. N 3. P. 370–396.
6. Prenner G., Rudall P.J. Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* and its allies: Exploring the organ — flower — inflorescence boundaries // *Amer. J. Bot.* 2007. Vol. 94. N 10. P. 1612–1629.

7. Sokoloff D.D., Rudall P.J., Remizowa M.V. Flower-like terminal structures in racemose inflorescences: a tool in morphogenetic and evolutionary research // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. N 13. P. 3517–3530.
8. Rudall P.J., Remizowa M.V., Prenner G., Prychid C.J., Tuckett R.E., Sokoloff D.D. Nonflowers near the base of extant angiosperms? Spatiotemporal arrangement of organs in reproductive units of Hydatellaceae and its bearing on the origin of the flower // Amer. J. Bot. 2009. Vol. 96. N 1. P. 67–82.
9. Sokoloff D.D., Remizowa M.V., Linder H.P., Rudall P.J. Morphology and development of the gynoecium in Centropetalaceae: the most remarkable range of variation in Poales // Amer. J. Bot. 2009. Vol. 96. N 11. P. 1925–1940.
10. Endress P.K., Doyle J.A. Reconstructing the ancestral flower and its initial specializations // Amer. J. Bot. 2009. Vol. 96. N 1. P. 22–66.
11. Endress P.K. The flowers in extant basal angiosperms and inferences on ancestral flowers // Int. J. Plant Sci. 2001. Vol. 162. N 5. P. 1111–1140.
12. Кедров Г.Б. К определению типа гинецея // Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол., почв. 1969. № 6. С. 44–47.
13. Philipson W.R. Is the grass gynoecium monocarpellary? // Amer. J. Bot. 1985. Vol. 72. N 12. P. 1954–1961.
14. Bachelier J.B., Endress P.K. Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoecium structure and evolution // Bot. J. Linn. Soc. 2009. Vol. 159. N 4. P. 499–571.
15. Шамров И.И., Яндовка Л.Ф. Развитие и строение гинецея и семязачатка у *Cerasus vulgaris* (Rosaceae) // Бот. журн. 2008. Т. 93. № 6. С. 902–914.
16. Шамров И.И. Морфологическая природа гинецея и плода у *Ceratophyllum* (Ceratophyllaceae) // Бот. журн. 2009. Т. 94. № 7. С. 938–961.
17. Соколов Д.Д. Корреляции между типом гинецея и положением завязи в цветках покрытосеменных растений: роль морфогенетических и терминологических запретов // Журн. общ. биол. 2015. Т. 76. № 2. С. 146–160.
18. Bailey I.W., Swamy B.G.L. The conduplicate carpel of dicotyledons and its initial trends of specialization // Amer. J. Bot. 1951. Vol. 38. N 5. P. 373–379.
19. Takhtajan A. Evolutionary trends in flowering plants. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1991. 241 p.
20. Swamy B.G.L., Periasamy K. The concept of the conduplicate carpel // Phytomorphology. 1964. Vol. 14. N 7. P. 319–327.
21. Verbeke J.A. Fusion events during floral morphogenesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P. 583–598.
22. Endress P.K. Origins of flower morphology // J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). 2001. Vol. 291. N 2. P. 105–115.
23. Endress P.K. Angiosperm floral evolution: Morphological developmental framework // Adv. Bot. Res. 2006. Vol. 44. P. 1–61.
24. Theissen G., Saedler H. Floral quartets // Nature. 2001. Vol. 409. N 6819. P. 469–471.
25. Becker A., Kaufmann K., Freialdenhoven A., Vincent C., Li M.-A., Saedler H., Theissen G. A novel MADS-box gene subfamily with a sister-group relationship to class B floral homeotic genes // Mol. Genet. Genomics. 2002. Vol. 266. N 6. P. 942–950.
26. de Almeida A.M.R., Yockteng R., Schnable J., Alvarez-Buylla E.R., Freeling M., Specht C.D. Co-option of the polarity gene network shapes filament morphology in angiosperms // Sci. Rep. 2014. Vol. 4. Article 6194.
27. Prunet N., Meyerowitz E.M. Genetics and plant development // Comptes Rendus Biologies. 2016. Vol. 339. N 7–8. P. 240–246.
28. Meyen S.V. Origin of the Angiosperm gynoecium by gamoheterotopy // Bot. J. Linn. Soc. 1988. Vol. 97. N 2. P. 171–178.
29. Frohlich M.W., Parker D.S. The Mostly Male Theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils // Syst. Bot. 2000. Vol. 25. N 2. P. 155–170.
30. Frohlich M.W. An evolutionary scenario for the origin of flowers // Nature Rev. Genetics. 2003. Vol. 4. N 7. P. 559–566.
31. Groß-Hardt R., Lanhard M., Laux T. WUSCHEL signalling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development // Genes Dev. 2002. Vol. 16. N 9. P. 1129–1138.
32. Mathews S., Kramer E.M. The evolution of reproductive structures in seed plants: a re-examination based on insights from developmental genetics // New Phytologist. 2012. Vol. 194. N 4. P. 910–923.
33. Leins P., Erbar C. Flower and fruit. Morphology, ontogeny, phylogeny, function and ecology. Stuttgart: Schweizerbart, 2010. 439 p.
34. Pinyopich A., Ditta G.S., Savidge B., Liljgren S.J., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.F. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development // Nature. 2003. Vol. 424. N 6944. P. 85–88.
35. Endress P.K. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge Univ. Press, 1994. 511 p.
36. Weberling F. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge Univ. Press, 1989. 423 p.
37. Endress P.K. Syncarpy and alternative modes of escaping disadvantages of apocarpy in primitive angiosperms // Taxon. 1982. Vol. 31. N 1. P. 48–52.
38. Armbruster W.S., Debevec E.M., Wilson M.F. Evolution of syncarpy in angiosperms: Theoretical and phylogenetic analyses of the effects of carpel fusion on offspring quantity and quality // J. Evol. Biol. 2002. Vol. 15. N 4. P. 657–672.
39. Endress P.K., Jenny M., Fallen M.E. Convergent elaboration of apocarpous gynoecia in higher advanced dicotyledons (Sapindales, Malvales, Gentianales) // Nord. J. Bot. 1983. Vol. 3. N 3. P. 293–300.
40. Stauffer F.W., Endress P.K. Comparative morphology of the female flowers and systematics in Geonomeae (Arecaceae) // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 242. N 1. P. 171–203.
41. Remizowa M.V., Sokoloff D.D., Rudall P.J. Evolution of the monocot gynoecium: Evidence from comparative morphology and development in *Tofieldia*, *Japonolirion*, *Petrosavia* and *Nartheceum* // Plant Syst. Evol. 2006. Vol. 258. N 3. P. 183–209.
42. Saunders E.R. On carpel polymorphism. I. // Ann. Bot. 1925. Vol. 39. N 1. P. 123–167.
43. Eames A.J. The vascular anatomy of the flower with refutation of the theory of carpel polymorphism // Amer. J. Bot. 1931. Vol. 18. N 3. P. 147–188.
44. Igersheim A., Buzgo M., Endress P.K. Gynoecium diversity and systematics in basal monocots // Bot. J. Linn. Soc. 2001. Vol. 136. N 1. P. 1–65.
45. McConchie C.A., Ducker S.C., Knox R.B. Biology of Australian seagrasses: floral development and morphology in *Amphibolis* (Cymodoceaceae) // Austral. J. Bot. 1982. Vol. 30. N 3. P. 251–264.
46. Leinfellner W. Zur Morphologie des Gynözeums der Polygalaceen // Österr. Bot. Z. 1972. Bd. 120. N 1. S. 51–76.

47. Magin N. Eine blütenmorphologische Analyse der Lagoecieae (Apiaceae) // Plant Syst. Evol. 1980. Vol. 133. N 3. P. 239–259.
48. Remizowa M.V., Sokoloff D.D., Rudall P.J. Evolutionary history of the monocot flower // Ann. Missouri Bot. Gard. 2010. Vol. 97. N 4. P. 617–645.
49. Endress P.K., Rapini A. Floral structure of *Emmotum* (Icacinales sensu stricto or Emmotaceae), a phylogenetically isolated genus of lamiids with a unique pseudotrimerous gynoecium, bitegmic ovules and monosporangiate thecae // Ann. Bot. 2014. Vol. 114. N 5. P. 945–959.
50. Uhl N.W., Moore H.E. The palm gynoecium // Amer. J. Bot. 1971. Vol. 58. N 10. P. 945–992.
51. Eckardt T. Untersuchungen über Morphologie, Entwicklungsgeschichte und systematische Bedeutung des pseudomonomeren Gynoeciums // Nova Acta Leopold. 1937. Bd 5. N 26. S. 1–112.
52. Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV // Bot. J. Linn. Soc. 2016. Vol. 181. N 1. P. 1–20.
53. Kircher P. Untersuchungen zur Blüten- und Infloreszenzmorphologie, Embryologie und Systematik der Restionaceen im Vergleich mit Gramineen und verwandten Familien. Berlin; Stuttgart: J. Cramer, 1986. 219 s.
54. Briggs B.G., Marchant A.D., Perkins A.J. Phylogeny of the restiid clade (Poales) and implications for the classification of Anarthriaceae, Centrolepidaceae and Australian Restionaceae // Taxon. 2014. Vol. 63. N 1. P. 24–46.
55. Linder H.P. The gynoecia of Australian Restionaceae: morphology, anatomy and systematic implications // Austral. Syst. Bot. 1992. Vol. 5. N 2. P. 227–245.
56. Fomichev C.I., Briggs B.G., Macfarlane T.D., Sokoloff D.D. Inflorescence, flower and fruit morphology of *Hopkinsia anoetocolea* (Anarthriaceae) and multiple origins of one-seeded fruits in the graminid clade of Poales // XIX International Botanical Congress. Abstracts. Shenzhen, 2017. Abstract No. T2-67-139.
57. Ronse De Craene L.P., Linder H.P., Smets E.F. Ontogeny and evolution of the flowers of South African Restionaceae with special emphasis on the gynoecium // Plant Syst. Evol. 2002. Vol. 231. N 1. P. 225–258.
58. Sokoloff D.D., Remizowa M.V., Rudall P.J. Is syncarpy an ancestral condition in monocots and core eudicots? // Early Events in Monocot Evolution / Eds. P. Wilkin and S.J. Mayo. Cambridge Univ. Press, 2013. P. 60–81.
59. Волгин С.А. Морфология и васкулярная анатомия цветка *Trichostigma peruviana* (Моq.) Н. Walt. (Phytolaccaceae) // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1986. Т. 91. № 1. С. 96–102.
60. Philipson W.R. *Griseliinia* Forst. fil. – anomaly or link // New Zeal. J. Bot. 1967. Vol. 5. N 1. P. 134–165.
61. Karpunina P.V., Oskolski A.A., Nuraliev M.S., Lowry P.P., Degtjareva G.V., Samigullin T.H., Valiejo-Roman, C.M., Sokoloff D.D. Gradual versus abrupt reduction of carpels in syncarpous gynoecia: a case study from *Polyscias* subg. *Arthrophyllum* (Araliaceae: Apiales) // Amer. J. Bot. 2016. Vol. 103. N 12. P. 2028–2057.
62. Jabbour F., Damerval C., Nadot S. Evolutionary trends in the flowers of Asteridae: is polyandry an alternative to zygomorphy? // Ann. Bot. 2008. Vol. 102. N 2. P. 153–165.
63. Cubas P. Floral zygomorphy, the recurring evolution of a successful trait // BioEssays. 2004. Vol. 26. N 11. P. 1175–1184.
64. Ronse De Craene L.P. Floral diagrams: an aid to understanding flower morphology and evolution. Cambridge Univ. Press, 2010. 441 p.
65. Endress P.K. Symmetry in flowers: diversity and evolution // Int. J. Plant Sci. 1999. Vol. 160. N S6. P. S3–S23.
66. Eichler A.W. Blüthendiagramme. Teil 2. Leipzig: W. Engelmann, 1878. 575 S.
67. Tucker S.C. Floral development in Legumes // Plant Physiol. 2003. Vol. 131. N 3. P. 911–926.
68. Nuraliev M.S., Oskolski A.A., Sokoloff D.D., Remizowa M. V. Flowers of Araliaceae: structural diversity, developmental and evolutionary aspects // Plant Divers. Evol. 2010. Vol. 128. N 1–2. P. 247–268.
69. Karpunina P.V., Oskolski A.A., Nuraliev M.S., Sokoloff D.D. Patterns of carpel arrangement in gynoecia of Araliaceae: evidence from *Polyscias* // IX Apiales Symposium. Abstract book / Eds. M. Nuraliev, A. Oskolski, and P. Tilney. Guangzhou, 2017. P. 15–16.
70. Choob V.V., Penin A.A. Structure of flower in *Arabidopsis thaliana*: spatial pattern formation // Russ. J. Dev. Biol. 2004. Vol. 35. N 4. P. 224–227.
71. Endress P.K. Evolution of floral diversity: the phylogenetic surroundings of *Arabidopsis* and *Antirrhinum* // Int. J. Plant Sci. 1992. Vol. 153. N 3, Part 2. P. S106–S122.
72. Douglas A.W., Tucker S.C. The developmental basis of diverse carpel orientations in Grevilleoideae (Proteaceae) // Int. J. Plant Sci. 1996. Vol. 157. N 4. P. 373–397.
73. Degtjareva G.V., Sokoloff D.D. Inflorescence morphology and flower development in *Pinguicula alpina* and *P. vulgaris* (Lentibulariaceae: Lamiales): monosymmetric flowers are always lateral and occurrence of early sympetaly // Org. Divers. Evol. 2012. Vol. 12. N 2. P. 99–111.
74. Endress P.K. Patterns of angiospermy development before carpel sealing across living angiosperms: diversity, and morphological and systematic aspects // Bot. J. Linn. Soc. 2015. Vol. 178. N 4. P. 556–591.
75. Caris P., Ronse De Craene L.P., Smets E., Clinckemilieu D. Floral development of three *Maesia* species, with special emphasis on the position of the genus within Primulales // Ann. Bot. 2000. Vol. 86. N 1. P. 87–97.
76. Caris P.L., Smets E.F. A floral ontogenetic study on the sister group relationship between the genus *Samolus* (Primulaceae) and the Theophrastaceae // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. N 5. P. 627–643.
77. Tucker S.C. Inflorescence and flower development in the Piperaceae. III. Floral ontogeny of *Piper* // Amer. J. Bot. 1982. Vol. 69. N 9. P. 1389–1401.
78. Liang H.-X., Tucker S.C. Floral ontogeny of *Zippelia begoniaefolia* and its familial affinity: Saururaceae or Piperaceae? // Amer. J. Bot. 1995. Vol. 82. N 5. P. 681–689.
79. Johnson D.S. On the development of certain Piperaceae // Bot. Gaz. 1902. Vol. 34. N 5. P. 321–340.
80. Payer J.B. Traité d'organogénie compare de la fleur. Paris: Masson, 1857. 748 p.
81. Galle P. Untersuchungen zur Blütenentwicklung der Polygonaceen // Bot. Jahrb. Syst. 1977. Bd. 98. N 4. S. 449–489.
82. Macdonald A.D., Sattler R. Floral development of *Myrica gale* and the controversy over floral concepts // Can. J. Bot. 1973. Vol. 51. N 10. P. 1965–1975.
83. Sattler R., Lacroix C. Development and evolution of basal cauline placentation: *Basella rubra* // Amer. J. Bot. 1988. Vol. 75. N 6. P. 918–927.
84. Cresens E.M., Smets E.F. The carpel: a problem child of floral morphology and evolution // Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 1989. Vol. 59. N 3/4. P. 377–409.
85. Sokoloff D.D., Rudall P.J., Remizowa M.V. Flower-like terminal structures in racemose inflorescences: a tool in

- morphogenetic and evolutionary research // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. N 13. P. 3517–3530.
86. Schulz C., Jagel A., Stützel T. Cone morphology in *Juniperus* in the light of cone evolution in Cupressaceae s.l. // Flora. 2003. Vol. 198. N 3. P. 161–177.
87. Meyen S.V. Basic features of gymnosperm systematics and phylogeny as evidenced by the fossil record // Bot. Rev. 1984. Vol. 50. N 1. P. 1–111.
88. Reynders M., Vrijdaghs A., Larridon I., Huygh W., Leroux O., Muasya A.M., Goetghebeur P. Gynoecial anatomy and development in Cyperoidae (Cyperaceae, Poales): congenital fusion of carpels facilitates evolutionary modifications in pistil structure // Plant Ecol. Evol. 2012. Vol. 145. N 1. P. 96–125.
89. De Laet J., Clinckemaillie D., Jansen S., Smets E. Floral ontogeny in the Plumbaginaceae // J. Plant Res. 1995. Vol. 108. N 3. P. 289–304.
90. Коньчева В.И., Кадырова Р.У. Chenopodiaceae // Сравнительная эмбриология цветковых растений Phytolaccaceae-Thymelaeaceae / Под ред. М.С. Яковлева. Л.: Наука, 1983. С. 49–52.
91. Olvera H.F., Smets E., Vrijdaghs A. Floral and inflorescence morphology and ontogeny in *Beta vulgaris*, with special emphasis on the ovary position // Ann. Bot. 2008. Vol. 102. N 4. Vol. 643–651.
92. Veselova T.D., Dzhalilova K.K., Timonin A.C. Embryology of *Polycnemum arvense* L. (lower core Caryophyllales) // Wulfenia. 2016. Vol. 23. P. 221–240.
93. Langdon L.M. Ontogenetic and anatomical studies of the flower and fruit of the Fagaceae and Juglandaceae // Bot. Gaz. 1939. Vol. 101. N 2. P. 301–327.
94. Schaffer K.L., George M.F., Peleg M., Garrett H.E., Cecich R.A. Pistillate flower development in eastern black walnut // Can. J. For. Res. 1996. Vol. 26. N 8. P. 1514–1519.
95. Ronse De Craene L.P., Volgin S.A., Smets E.F. The floral development of *Pleuropetalum darwinii*, an anomalous member of the Amaranthaceae // Flora. 1999. Vol. 194. N 2. P. 189–199.
96. Sukhorukov A.P., Mavrodiev E.V., Struwig M., Nilo-va M.V., Dzhalilova K.K., Balandin S.A., Erst A., Krinitsyna A.A. One-seeded fruits in the core Caryophyllales: their origin and structural diversity // PLoS ONE. 2015. Vol. 10. N 2. e0117974.
97. Tucker S.C. Inflorescence and flower development in the Piperaceae. I. *Peperomia* // Amer. J. Bot. 1980. Vol. 67. N 5. P. 686–702.
98. Remizowa M.V., Rudall P.J., Sokoloff D.D. Evolutionary transitions among flowers of perianthless Piperales: inferences from inflorescence and flower development in the anomalous species *Peperomia fraseri* (Piperaceae) // Int. J. Plant Sci. 2005. Vol. 166. N 6. P. 925–943.
99. Wanke S., Vanderschaeve L., Mathieu G., Neinhuis C., Goetghebeur P., Samain M.S. From forgotten taxon to a missing link? The position of the genus *Verhuellia* (Piperaceae) revealed by molecules // Ann. Bot. 2007. Vol. 99. N 6. P. 1231–1238.
100. Remizowa M.V., Rudall P.J., Choob V.V., Sokoloff D.D. Racemose inflorescences of monocots: structural and morphogenetic interaction at the flower/inflorescence level // Ann. Bot. 2013. Vol. 112. N 8. P. 1553–1566.
101. Endress P.K. Floral structure and evolution in Ranunculanae // Systematics and Evolution of the Ranunculiflorae. Plant Systematics and Evolution. Supplement 9, vol 9 / Eds. U. Jensen and J.W. Kadereit. Vienna: Springer, 1995. P. 47–61.
102. van Heel W.A. Flowers and fruits in Flacourtiaceae. I. *Scaphocalyx spathacea* Ridl. // Blumea. 1973. Vol. 21. N 2. P. 259–279.
103. Wilkinson A.M. Floral anatomy and morphology of some species of *Viburnum* of the Caprifoliaceae // Amer. J. Bot. 1948. Vol. 35. N 8. P. 455–465.

Поступила в редакцию

01.06.2017

Принята в печать

15.06.2017

BOTANY

EVOLUTION OF ANGIOSPERM GYNOCIDIUM: MONOMERY, PSEUDOMONOMERY AND MIXOMERY

D.D. Sokoloff^{1,*}, M.S. Nuraliev¹, A.A. Oskolski^{2,3}, M.V. Remizowa¹¹Department of Higher Plants, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;²Department of Botany and Plant Biotechnology, University of Johannesburg, South Africa, Johannesburg, Auckland Park 2006, PO Box 524;³Botanical Museum, V.L. Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, Prof. Popov str. 2, St. Petersburg, 197376, Russia

*e-mail: sokoloff-v@yandex.ru

The presence of a gynoecium composed by carpels is a key feature of angiosperms. The carpel is often viewed as homologous to megasporophyll of gymnosperms (i.e., a leaf bearing ovules), but it is possible that its morphological nature is more complex. Carpels of angiosperms can unite to form a syncarpous gynoecium. Most syncarpous gynoecia possess a compitum, which is a region where pollen tube transmitting tracts of individual carpels unite in a way that pollen tubes can grow from one carpel to another. The presence of a compitum is a precondition for evolution of carpel dimorphism, where some carpels do not possess functional stigma or fertile ovules. Pseudomonomery is a kind of carpel dimorphism where only one carpel has a fertile ovule (or ovules). Pseudomonomeric gynoecium usually has a single symmetry plane and it is likely that regulation of its development is similar to those of monosymmetric perianth and an-

droecium. Monomerous gynoecium consists of a single carpel. In course of evolution, syncarpous gynoecia can jump abruptly to monomerous gynoecia or undergo sterilization and gradual reduction of some carpels. There is a peculiar group of gynoecia with partial or complete loss of carpel individuality, so that it is impossible to assign an ovule (or ovules) to particular carpel. A term mixomery is proposed for this phenomenon, which is not identical to pseudomonomery.

Keywords: *gynoecium, monomery, carpel, pseudomonomery, syncarpy, flower, evolution, review*

Сведения об авторах

Соколов Дмитрий Дмитриевич — зав. кафедрой высших растений биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-18-27; e-mail: sokoloff-v@yandex.ru

Нуралиев Максим Сергеевич — ст. науч. сотр. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-18-27; e-mail: max.nuraliev@gmail.com

Оскольский Алексей Асафьевич — ст. преп. кафедры ботаники и биотехнологии растений Университета Йоханнесбурга; вед. науч. сотр. Ботанического музея Ботанического института имени В.Л. Комарова РАН. Тел. 8-812-234-06-73; e-mail: aorskolski@binran.ru

Ремизова Маргарита Васильевна — ст. преп. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-18-27; e-mail: margarita.remizowa@gmail.com

ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 551.465

ОБИЛИЕ И ВИДОВОЙ СОСТАВ ФОТОАВТОТРОФНЫХ ПИКОЭУКАРИОТ ОНЕЖСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ

Т.А. Белевич^{1,*}, Л.В. Ильяш¹, И.А. Милютина², М.Д. Логачева², А.В. Троицкий²¹Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Численность, биомасса и состав фотоавтотрофных пикоэукариот (ФПЭ, размер клеток менее 3 мкм) оценены в Онежском заливе Белого моря в июне 2015 г. Наибольшие значения численности и биомассы ФПЭ были приурочены к слою 0–5 м, в котором средние значения этих показателей ФПЭ по акватории залива изменялись в пределах $0\text{--}36,8 \cdot 10^4$ кл/л и $0\text{--}117$ мкг С/м³, соответственно. Метагеномное секвенирование области V4 гена 18S рРНК выявило присутствие таксонов ФПЭ, относящихся к восьми классам водорослей. По числу прочтений и операционных таксономических единиц преобладали Mamiellophyceae. До видового уровня идентифицированы зелёные водоросли *Bathycoccus prasinos*, *Ostreococcus tauri* и *Micromonas pusila*, а также диатомеи *Skeletonema marinoi* и *Minidiscus trioculatus*.

Ключевые слова: пикопланктон, фототрофные пикоэукариоты, *Micromonas*, *Bathycoccus*, *Ostreococcus*, метагеномный анализ

Пикофракция планктона (размер клеток менее 2–3 мкм) состоит из фотосинтезирующих (пикофитопланктон) и гетеротрофных организмов. Пикофитопланктон (ПФП) представлен цианобактериями и эукариотами. Фотосинтезирующие пикоэукариоты (ФПЭ) являются одним из ключевых компонентов планктона, дающим существенный вклад в биомассу фитопланктона и первичную продукцию в разных районах Мирового океана [1, 2].

При всей значимости ФПЭ они являются наименее изученной по таксономическому составу группой фитопланктона. Малый размер, отсутствие у многих таксонов выраженных морфологических признаков, разрушение нежных форм при фиксации — всё это затрудняет идентификацию ФПЭ природного фитопланктона традиционными методами микроскопического анализа и ведёт к недооценке их видового богатства. В настоящее время для выявления таксономического разнообразия ФПЭ с успехом применяются молекулярно-генетические методы. Генетическое разнообразие ФПЭ исследовано во многих районах Мирового океана, включая Арктику [2–4], однако сведения о составе ФПЭ морей российской Арктики до настоящего времени отсутствовали. При наблюдаемом изменении климата, в высоких широтах [5] прогнозируется изменение видового состава всех размерных групп фитопланктона, включая ФПЭ, за счёт проникновения водорослей умеренных вод и исчезновения арктических эндемиков [6]. В связи с этим исследования ФПЭ субарктического Белого моря, по абиотическим условиям сочетающего

черты как арктических, так и умеренных морей [7], приобретают особую актуальность. К настоящему времени таксономический состав ФПЭ Белого моря определён только для подлёдного планктона Кандакшского залива [8], тогда как сведения о составе ФПЭ в летний период отсутствуют.

Цель настоящей работы состояла в оценке численности и биомассы пикофитопланктона, а также в выявлении с использованием метагеномного подхода таксономического состава фотоавтотрофных пикоэукариот в Онежском заливе Белого моря в третьей декаде июня 2015 г.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили пробы, отобранные на 20 станциях в Онежском заливе (рисунок) с 22 по 27 июня 2015 г. в ходе рейса научно-исследовательского судна “Эколог”. Сведения о гидрофизических условиях в заливе во время проведения рейса, концентрации биогенных элементов и хлорофилла *a*, суммарной биомассе всех размерных групп фитопланктона в поверхностном слое приведены в работе Белевич и др. [9]. Для оценки количественных параметров ПФП пробы воды отбирали 5-литровыми батометрами Нискина с горизонтов 0, 2, 4–5 м, а на глубоководных станциях — также с глубин 10 и 20 м. Подпробы воды объёмом 10 мл наливали в фильтрационную воронку, добавляли насыщенный раствор примулина, выдерживали 5–7 мин, затем фиксировали 2%-ным раствором глутаральдегида и осаждали на ядерные фильтры с диаметром пор 0,12 мкм, предва-

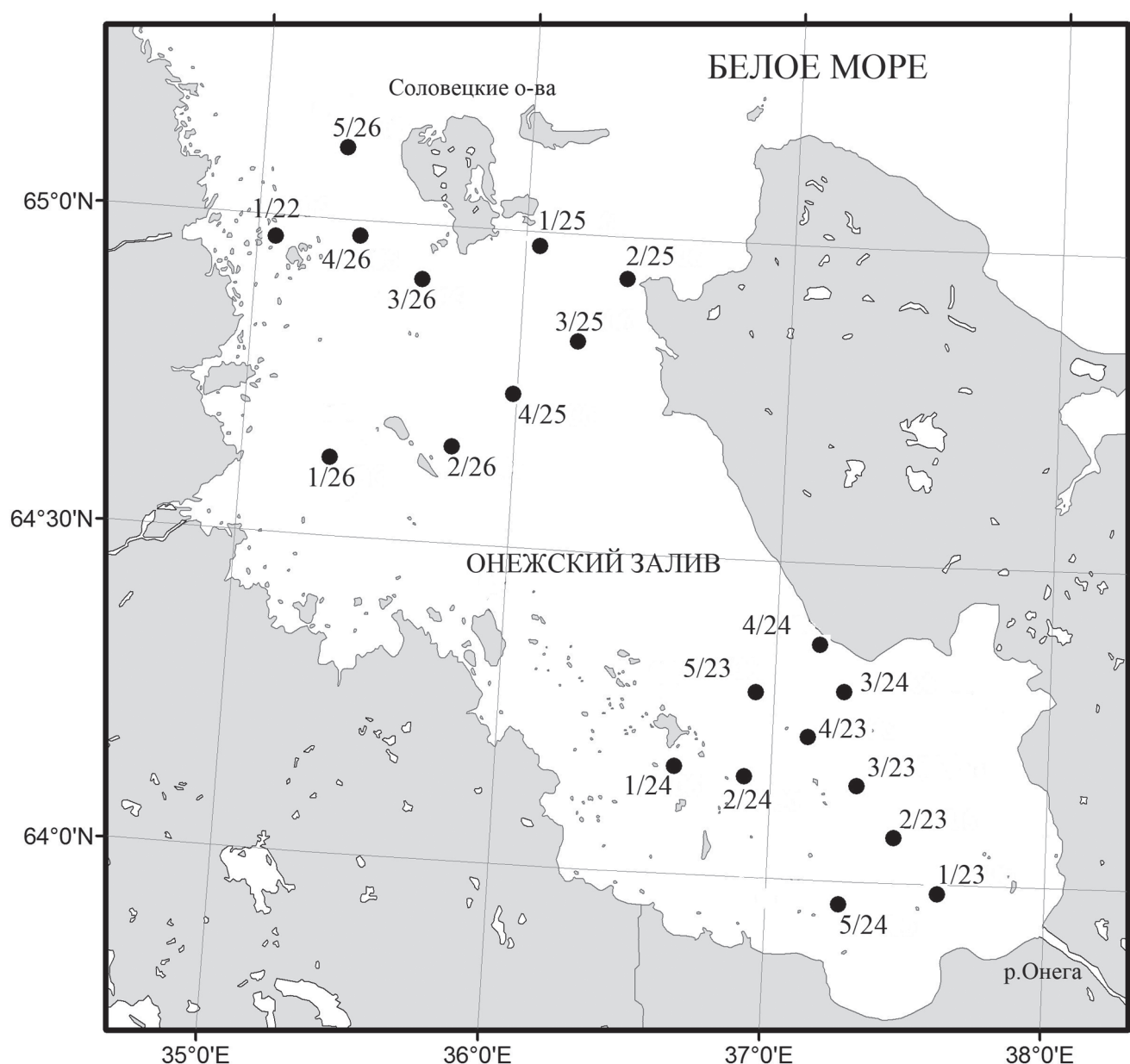


Рисунок. Схема расположения станций отбора проб пикофитопланктона в Онежском заливе

рительно окрашенные суданом чёрным. Подсчёт клеток фотоавтотрофных пикоэукариот и прокариот проводили под люминесцентным микроскопом (Leica DM5000B, Швейцария), разделяя эти группы по “типу” свечения (оранжевый — цианобактерии, красный — эукариотные водоросли). Объём клеток рассчитывали, исходя из объёма соответствующих стереометрических фигур [10]. Клеточное содержание углерода определяли по объёмам клеток с использованием аллометрических зависимостей [11].

Для оценки таксономического состава фотоавтотрофных пикоэукариот проба воды объемом 10 л была отобрана на станции 3/24 с глубины 4 м, где флуоресценция хлорофилла достигала максимального значения. Температура воды на этом горизонте составила 11,2°C, солёность — 24,3‰, воды были слабо стратифицированы. Для удаления нано- и микропланктона 5 л морской воды

пропускали через камеру обратной фильтрации (диаметр пор фильтра 3 мкм), фильтрат осаждали на картридж Sterivex (Millipore, США) с диаметром пор 0,2 мкм, заполняли его лизирующим раствором [8], замораживали и хранили в жидком азоте до дальнейшего анализа.

Для выделения ДНК использовали набор “Nucleospin Plant” (Macherey-Nagel, Германия), амплификацию проводили с праймерами на область V4 гена 18S рРНК: прямой — EuF-V4 и обратный — rpscoR2 [8], секвенирование ПЦР-продуктов осуществлялось на платформе “Illumina MiSeq” (США). Прямые и обратные прочтения были объединены, отфильтрованы по качеству и проверены на наличие химер при помощи программного продукта MOTHUR [12]. Для идентификации операционных таксономических единиц (ОТЕ) нуклеотидные последовательности анализировали пакетом про-

грамм SILVAngs 1.2 (порог кластеризации 97%) [13], последовательности классифицировали при помощи BLASTn (версия 2.2.30+) со стандартными установками.

При использовании фракционной фильтрации в фильтрах помимо пикоформ регистрируются организмы нано- и микропланктона, что обусловлено разрушением нежных форм даже при самой мягкой фильтрации, прохождением через поры фильтра простейших с эластичной клеточной оболочкой, а также присутствием в воде пула растворенной ДНК разных размерных групп организмов [14]. Хотя фракционная фильтрация не дает полного отделения пикофракции от нано- и микроорганизмов, при метагеномном секвенировании она способствует снижению риска недоучета пикоформ из-за малого числа копий их генов [15]. В пикофракции планктона также присутствует значительное число гетеротрофных простейших [14]. Поскольку объектом настоящего исследования являлись фотоавтотрофные пикозукариоты, то для дальнейшего анализа из выявленных в фильтрах таксонов были отобраны только те виды фотоавтотрофов, размеры клеток которых не превышают 3 мкм. Также в случаях идентификации до уровня рода и выше в анализ включали таксоны, в состав которых согласно опубликованным данным [14] входят виды, соответствующие по размерам пикофракции.

Результаты

Количественные показатели ФПЭ. В третьей декаде июня 2015 г. в Онежском заливе численность и биомасса ФПЭ колебались в значительных пределах. На трёх станциях (5/23, 2/25, 2/26) ФПЭ не были обнаружены; возможно, их численность была меньше порога чувствительности метода. Максимальные значения численности ФПЭ ($1,03 \cdot 10^6$ кл/л) зарегистрированы на глубине 2 м (станция 3/24), биомассы (440 мкг С/м³) — на глубине 10 м (станция 3/25). Наибольшие значения биомассы ФПЭ и суммарной биомассы ПФП на всех станциях, кроме 3/25 и 2/25, были приурочены к слою 0–5 м. Пики биомассы ФПЭ и ПФП регистрировались на горизонтах 0, 2 и 5 м. В большинстве случаев биомасса ФПЭ на глубинах 2 и 5 м была выше, чем в поверхностном горизонте. Средние для слоя 0–5 м значения численности и биомассы ФПЭ, суммарной численности и биомассы ПФП приведены в табл. 1. На станциях 2/25 и 3/25 наибольшая биомасса ФПЭ выявлена на глубинах 10 и 20 м, соответственно.

Численность ФПЭ была на 1–2 порядка меньше, чем пикотианобактерий. Благодаря большим клеточным размерам ФПЭ по сравнению с цианобактериями их вклад в суммарную биомассу ПФП был существенно выше вклада в суммарную численность, и на ряде станций ФПЭ доминировали по биомассе (табл. 1).

Таксономический состав организмов, выявленных в фильтрате (фильтр с диаметром пор 3 мкм). Число качественных последовательностей составило 45675, всего выявлено 2139 ОТЕ. К простейшим относились 1614 ОТЕ, соответствовавшим таксонам из филогенетических групп Chloroplastida, Stramenopila, Alveolata, Rhizaria, Cryptophyta, Haptophyta, Opisthokonta, Centrohelida, Telonema, Discoba и Incertae Sedis.

Таксономический состав ФПЭ. Число прочтенных ФПЭ (ПР_{ФПЭ}) и ОТЕ ФПЭ (ОТЕ_{ФПЭ}) составило 23083 и 484, соответственно. Выявленные ОТЕ соответствовали таксонам, относящимся к трём филогенетическим группам, включающим 8 классов водорослей (табл. 2).

По числу прочтений и ОТЕ преобладали Chloroplastida, представленные тремя классами Chlorophyta. Выявлены представители родов *Micromonas* (19% ОТЕ_{ФПЭ}), *Ostreococcus* (17% ОТЕ_{ФПЭ}), *Bathycoccus* (22% ОТЕ_{ФПЭ}) и *Pyramimonas* (2% ОТЕ_{ФПЭ}). Кроме того, часть последовательностей была идентифицирована на уровне классов Mamiellophyceae и Nephrophyceae.

Представители четырёх классов, относящихся к группе Stramenopila, совокупно составили 3% ОТЕ_{ФПЭ} и 15% ПР_{ФПЭ}. Выявленные ОТЕ Chrysophyceae были определены до уровня класса или порядка Chromulinales, класс Bolidophyceae представлен родом *Bolidomonas*, класс Mediophyceae — родами *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Minidiscus*, класс Pelagophyceae — родом *Pelagococcus*.

Haptophyta были идентифицированы на разных таксономических уровнях. Выявлены ОТЕ на уровне класса Prymnesiophyceae, а также ОТЕ двух родов — *Phaeocystis* и *Chrysochromulina*. Относительный вклад представителей каждого рода не превышал 1% от общего числа ОТЕ_{ФПЭ}.

ФПЭ, идентифицированные до вида. До видового уровня идентифицированы зелёные водоросли *Bathycoccus prasinos* (33,5% ПР_{ФПЭ}), *Ostreococcus tauri* (30,8% ПР_{ФПЭ}) и *Micromonas pusila* (17,5% ПР_{ФПЭ}), а также диатомеи *Skeletonema marinoi* (0,1% ПР_{ФПЭ}) и *Minidiscus trioculatus* (0,01% ПР_{ФПЭ}).

Вид *M. pusila* был представлен 92 ОТЕ. Морфотип *M. pusila* включает шесть филотипов [16], четыре из которых присутствовали в водах Онежского залива: филотип С (более трети общего числа выявленных ОТЕ *Micromonas*), D, E1 и E2. Более половины от общего числа ОТЕ *Micromonas* составили ОТЕ, которые отличались по последовательности области V4 от ранее описанных филотипов и формировали отдельную кладу на филогенетическом дереве, построенном по консенсусным последовательностям ОТЕ Mamiellophyceae.

Обсуждение

В третьей декаде июня 2015 г. в Онежском заливе численность и биомасса ФПЭ были относительно невысокими. Численность ФПЭ была

Таблица 1

Средние для слоя 0–5 м значения численности и биомассы фотоавтотрофных пикоэукариот (ФПЭ), суммарной численности и биомассы пикофитопланктона (ПФП) и вклада ФПЭ в суммарную биомассу пикофитопланктона (ФПЭ, %)

Станции	Численность		Биомасса		
	ФПЭ, 10 ⁴ кл/л	ПФП, 10 ⁵ кл/л	ФПЭ, мкг С/м ³	ПФП, мкг С/м ³	ФПЭ, %
1/22	1,21	1,27	52,57	81,3	64,7
1/23	0,60	7,07	1,92	177,2	1,1
2/23	7,86	7,01	66,55	222,2	30,0
3/23	0,91	6,98	49,79	222,0	22,4
4/23	0,60	2,78	33,19	101,2	32,8
5/23	0	3,26	0	81,6	0
1/24	0,60	0,85	11,58	31,2	37,1
2/24	1,21	2,36	23,16	79,1	29,3
3/24	36,87	7,31	117,21	207,9	56,4
4/24	0,60	17,77	11,58	454,3	2,5
5/24	2,42	34,99	79,88	948,7	8,4
1/25	0,60	1,99	11,58	59,9	19,3
2/25	0	0,60	0	15,1	0
3/25	0,60	0,54	1,92	14,0	13,7
1/26	4,83	1,15	89,96	106,6	84,4
2/26	0	1,15	0	28,7	0
3/26	1,81	0,97	15,42	35,1	44,0
4/26	1,21	2,05	13,50	61,9	21,8
5/26	1,21	9,67	3,84	242,6	1,6
1/27	1,81	5,32	46,69	175,1	26,7
Среднее	3,25	5,76	31,52	167,3	24,8
Стандартное отклонение	8,13	8,08	34,55	212,9	-

меньше значений, выявленных в умеренных водах северной Атлантики осенью [2] и поверхностных водах северо-западной части Тихого океана в июне [17]. Значения биомассы ФПЭ и суммарной биомассы ПФП в слое 0–5 м были достоверно (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно) ниже средних (в столбе воды) значений этих показателей в июне 2012 г. [18].

По акватории залива значения численности и биомассы ФПЭ варьировали в широких пределах. Учитывая, что содержание биогенных элементов превышало пороги лимитирования развития планктонных водорослей [9], к факторам, определявшим пространственную изменчивость количественных характеристик ФПЭ, следует, по-видимому, отнести структуру и динамику вод, а также различия в экологических нишах отдельных представителей ФПЭ. У Соловецких островов и в центральной части залива располагались слабо стратифицированные воды с низкой температурой и повышенной солёностью поверхностного слоя. Слабая стратификация

Таблица 2

Относительное число (%) операционных таксономических единиц (ОТЕ) и прочтений таксономических групп в составе фотоавтотрофных пикоэукариот

Филогенетическая группа	Класс	ОТЕ	Прочтения
Chloroplastida	Mamiellophyceae	64,9	84,6
	Nephrophyceae	0,2	0,02
	Pyramimonadophyceae	1,7	0,6
Stramenopila	Bolidophyceae	8,7	4,7
	Chrysophyceae	20,2	9,2
	Mediophyceae	2,7	0,3
	Pelagophyceae	0,2	0,02
Haptophyta	Prymnesiophyceae	1,4	0,5

в этих районах обусловлена интенсивным приливным перемешиванием. В вершине залива отмечалась выраженная стратификация вследствие речного стока [9]. Зависимость количественных характеристик ФПЭ от структуры и динамики вод отмечена для разных районов Мирового океана [2].

Как и во многих районах умеренных и арктических вод [3, 4, 19], в Онежском заливе среди ФПЭ преобладали Chlorophyta. Наибольшее число прочтений принадлежало видам *Bathycoccus prasinus* и *Ostreococcus tauri*, что согласуется с фактом приуроченности наибольшего обилия этих космополитных видов к прибрежным водам [14, 20].

Филогенетические клады морфотипа *Micromonas pusila*, как полагают, соответствуют отдельным видам [16]. *Micromonas* клады E2 ранее был выявлен только в арктических водах и рассматривался как арктический эндемик [6]. Недавно последовательности, практически идентичные таковым *Micromonas* E2, выявлены в антарктических водах; была выдвинута гипотеза о связи арктической и антарктической популяций *Micromonas* E2 посредством глубоководных океанических течений [21]. Регистрация *Micromonas* E2 в летнем планктоне субарктического Белого моря свидетельствует о более широком ареале этого филотипа, чем считалось ранее [6]. По числу прочтений среди *Micromonas* преобладали ранее не описанный (“новый”) филотип и филотип С, являющийся космополитом. Последовательности V4 варибельной области “нового” филотипа были на 99% схожи с последовательностью некультивируемых Prasinophyceae клона DH114 3A06 (FJ032694), выявленной в планктоне Южной Атлантики. Преобладание филотипов *Micromonas* с широкими ареалами распространения отличает состав ФПЭ субарктического Белого моря от состава ФПЭ арктических морей, где доминирует филотип E2 [6].

Выявленное в водах Онежского залива относительно высокое число ОТЕ и последовательностей Chrysophyceae согласуется с регистрацией высокого разнообразия этого класса в пикопланктоне разных районов Мирового океана [2, 4, 17]. При этом, как и в случае беломорских ФПЭ, большинство ОТЕ не кластеризовалось с ОТЕ известных культивируемых видов. Этот класс является характерным для пресных вод, а число описанных морских видов Chrysophyceae невелико.

Из Bolidophyceae в Онежском заливе выявлены ОТЕ, соответствующие роду *Bolidomonas*. Согласно последним филогенетическим исследованиям [22], ранее описанные виды *B. pacifica* и *B. mediterranea* рассматриваются как базисными видов рода *Tripartita* (*T. pacifica* (Guillou et Chrétiennot-Dinet) Ichinomiya et Lopes dos Santos и *T. mediterranea* (Guillou et Chrétiennot-Dinet) Ichinomiya et Lopes dos Santos).

Диатомея *Minidiscus trioculatus* является широко распространенным видом и в ряде случаев дости-

гает значительной численности [14]. Учитывая незначительное число выявленных прочтений *M. trioculatus*, а также тот факт, что ранее в планктоне Белого моря эта водоросль не была идентифицирована, её следует отнести к редким видам беломорского планктона. Число прочтений диатомеи *Skeletonema marinoi* также было невысоким. Однако это обусловлено тем, что размер колоний *Skeletonema* превышает 3 мкм и в пикофракцию попадают только отдельные клетки. В фитопланктоне на многих станциях залива доминировала *Skeletonema*, ранее идентифицированная как *S. costatum* s. l. [9]. Настоящее исследование позволило уточнить предыдущее определение и идентифицировать вид как *S. marinoi*. Это первая регистрация *S. marinoi* в планктоне Белого моря.

Выявленная незначительная доля *Phaeocystis* в ФПЭ аналогична ситуациям, отмеченным в Беринговом проливе и морях Чукотском, Бофорта [23]. Однако в атлантическом секторе Арктики [4] обнаружено значительное количество Phaeocystaceae.

Структура ФПЭ летнего планктона Онежского залива существенно отличалась от таковой весеннего подледного планктона Кандалакшского залива Белого моря [8]. Летом доля Chlorophyta была выше в 1,5 раза, а вклад Stramenopila был в 3 раза ниже, чем весной. Выявленные различия могут быть обусловлены тем, что исследования проведены в разных заливах. Однако аналогичное увеличение доли Chlorophyta в летний период показано для сезонной динамики планктона арктического фьорда в западной части Шпицбергена [24]. Это даёт основание полагать, что и для Белого моря характерно возрастание доли зелёных водорослей среди ФПЭ летом.

Полученные данные по таксономическому составу ФПЭ актуальны в свете наблюдаемых изменений морских экосистем Арктики под влиянием глобальных климатических изменений [5]. Преобладание в летний период таксонов с широкими ареалами распространения, незначительная доля арктического *Micromonas* E2 среди ФПЭ Белого моря, сочетающего черты водоема умеренной зоны и арктических шельфовых морей, подтверждает высказанное ранее предположение о возможном изменении состава ФПЭ арктических вод за счет проникновения и преимущественного развития водорослей умеренных вод и исчезновения арктических эндемиков [6]. Доминирование в фотоавтотрофном пикопланктоне субарктического Белого моря цианобактерий свидетельствует о возможной экспансии последних в арктические воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-17-00800 — экспедиционные работы, проект № 14-50-00029 — молекулярно-генетический анализ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-05-00502 — количественная обработка проб).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li W.K., McLaughlin F.A., Lovejoy C., Carmack E.C. Smallest algae thrive as the Arctic Ocean freshens // *Science*. 2009. Vol. 326. N 5952. P. 539.
2. Kirkham A.R., Lepère C., Jardillier L.E., Not F., Bouman H., Mead A., Scanlan D.J. A global perspective on marine photosynthetic picoeukaryote community structure // *The ISME J.* 2013. Vol. 7. N 5. P. 922–936.
3. Kiliyas E.S., Nöthig E.-M., Wolf C., Metfies K. Picoeukaryote plankton composition off West Spitsbergen at the entrance to the Arctic Ocean // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2014. Vol. 61. N 6. P. 569–579.
4. Metfies K., von Appen W.-J., Kiliyas E., Nicolaus A., Nöthig E.-M. Biogeography and photosynthetic biomass of arctic marine pico-eukaryotes during summer of the record sea ice minimum 2016 // *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11. N 2. e0148512.
5. Intergovernmental panel on climate change. Working group I 2007. Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change / Eds. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H.L. Miller. Cambridge Univ. Press, 2007. 996 pp.
6. Lovejoy C., Vincent W.F., Bonilla S., Roy S., Martineau M.J., Terrado R., Potvin M., Massana R., Pedros-Alio C. Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprassinophytes in arctic seas // *J. Phycol.* 2007. Vol. 43. N 1. P. 78–89.
7. Berger V., Dahle S., Galaktionov K., Kosobokova X., Naumov A., Rat'kova T., Savinov V., Savinova T. White Sea. Ecology and Environment. St-Petersburg: Zoological Institute Russian Academy of Sciences, 2001. 157 p.
8. Belevich T.A., Ilyash L.V., Milyutina I.A., Logacheva M.D., Goryunov D.V., Troitsky A.V. Metagenomic analyses of White Sea picoalgae: first data // *Biochemistry*. 2015. Vol. 80. N 11. P. 1514–1521.
9. Belevich T.A., Ilyash L.V., Zimin A.V., Kravchishina M.D., Novikhin A.E., Dobrotina E.D. Peculiarities of summer phytoplankton spatial distribution in Onega Bay of the White Sea under local hydrophysical conditions // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 3. P. 135–140.
10. Hillebrand H., Dürselen C.-D., Kirschtel D., Pollinger U., Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae // *J. Phycol.* 1999. Vol. 5. N 2. P. 403–424.
11. Verity P.G., Robertson C.Y., Tronzo C.R., Andrews M.G., Nelson J.R., Sieracki M.E. Relationship between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 1992. Vol. 37. N 7. P. 1434–1446.
12. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75. N 23. P. 7537–7541.
13. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glockner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. N D1. P. D590–D596.
14. Vaillot D., Eikrem W., Viprey M., Moreau H. The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems // *FEMS Microb. Rev.* 2008. Vol. 32. N 5. P. 795–820.
15. Zhu F., Massana R., Not F., Marie D., Vaillot D. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. Vol. 52. N 1. P. 79–92.
16. Worden A.Z., Lee J.-H., Mock T. et al. Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas* // *Science*. 2009. Vol. 324. N 5924. P. 268–272.
17. Choi D.Y., An S.M., Chun S., Yang E.C., Selph K.E., Lee C.M., Noh J.H. Dynamic changes in the composition of photosynthetic picoeukaryotes in the northwestern Pacific Ocean revealed by high-throughput tag sequencing of plastid 16S rRNA genes // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. Vol. 92. N 2. p. 170.
18. Ilyash L.V., Belevich T.A., Stupnikova A.N., Drits A.V., Flint M.V. Effects of local hydrophysical conditions on the spatial variability of phytoplankton in the White Sea // *Oceanology*. 2015. Vol. 55. N 2. P. 216–225.
19. Zhang F., He J., Lin L., Jin H. Dominance of picophytoplankton in the newly open surface water of the central Arctic Ocean // *Polar Biol.* 2015. Vol. 38. N 7. P. 1081–1089.
20. Clayton S., Lin Y.-C., Follows M.J., Worden A.Z. Co-existence of distinct *Ostreococcus* ecotypes at an oceanic front // *Limnol. Oceanogr.* 2017. Vol. 62. N 1. P. 75–88.
21. Simmons M.P., Bachy C., Sudek S., van Baren M.J., Sudek L., Ares M. Jr., Worden A.Z. Intron invasions trace algal speciation and reveal nearly identical Arctic and Antarctic *Micromonas* populations // *Mol. Biol. Evol.* 2015. Vol. 32. N 9. P. 2219–2235.
22. Ichinomiya M., Lopes dos Santos A., Gourvil P., Yoshikawa S., Kamiya M., Ohki K., Audic S., Vargas C. de Noël M.-H., Vaillot D., Kuwata A. Diversity and oceanic distribution of the Parmales (Bolidophyceae), a picoplanktonic group closely related to diatoms // *ISME J.* 2016. Vol. 10. N 10. P. 2419–2434.
23. Balzano S., Marie D., Gourvil P., Vaillot D. Composition of the summer photosynthetic pico and nanoplankton communities in the Beaufort Sea assessed by T-RFLP and sequences of the 18S rRNA gene from flow cytometry sorted samples // *The ISME J.* 2012. Vol. 6. N 8. P. 1480–1498.
24. Marquardt M., Vader A., Stübner E.I., Reigstad M., Gabrielsen T.M. Strong seasonality of marine microbial eukaryotes in a high-Arctic fjord (Isfjorden, West Spitsbergen) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 82. N 6. P. 1868–1880.

Поступила в редакцию

21.03.2017

Принята в печать

15.06.2017

HYDROBIOLOGY

PHOTOTROPHIC PICOEUKARYOTES OF THE ONEGA BAY, THE WHITE SEA:
ABUNDANCE AND SPECIES COMPOSITIONТ.А. Белевич^{1,*}, Л.В. Ильяш¹, И.А. Милютина², М.Д. Логачева², А.В. Троцкий²¹Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;²A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

The abundance, biomass and species composition of phototrophic picoeukaryotes (PPE, cells size less than 3 µm) were studied in Onega Bay of the White Sea in June 2015. The highest PPE abundance and biomass were registered in the 0–5 m water layer. In the bay the average (in the 0–5 m water layer) abundance and biomass varied from 0 to $36,8 \cdot 10^4$ cell/l and from 0 to 117 µg C/m³, respectively. The Illumina sequencing of V4 region of 18S rRNA gene revealed eight classes of PPE. Mamiellophyceae dominated both in number of reads and operational taxonomic units. The green algae *Bathycoccus prasinos*, *Ostreococcus tauri* and *Micromonas pusila*, as well as diatoms *Skeletonema marinoi* and *Minidiscus trioculatus* were identified to species level.

Keywords: picoplankton, phototrophic picoeukaryotes, *Micromonas*, *Bathycoccus*, *Ostreococcus*, Illumina sequencing

Сведения об авторах

Белевич Татьяна Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Ильяш Людмила Васильевна — докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: ilyashl@mail.ru

Милютина Ирина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского. Тел: 8-495-939-31-93; e-mail: iramilyutina@yandex.ru

Логачева Мария Дмитриевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского. Тел: 8-495-939-31-93; e-mail: maria.log@gmail.com

Троцкий Алексей Викторович — докт. биол. наук, зав. отделом НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского. Тел: 8-495-939-31-93; e-mail: bobr@belozersky.msu.ru

ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 574.583:582.263:574.63:574.64

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ШУНГИТА
НА ИНДИКАТОРНЫЕ ПЛАНКТОННЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Г.А. Даллакян*, Д.М. Гершкович, В.И. Ипатова, Е.Ф. Исакова

*Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: honaris@bk.ru*

Исследовано совместное действие солей тяжёлых металлов и шунгита на тест-организмы фито- и зоопланктона. Показано, что токсическое действие как сульфата кадмия, так и бихромата калия на рост культуры микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* ингибируется в присутствии шунгита (100 г/л). Добавление шунгита в среду культивирования (без токсикантов) увеличивало эффективность фотосинтеза, численность клеток и долю живых клеток. Одновременно происходило увеличение продолжительности жизни популяции клеток. Кроме того, в острых опытах на ракообразных длительностью до 96 ч определяли токсичность бихромата калия, сульфата меди и сульфата кадмия в присутствии 0,01 г/л шунгита и без него. Изучение действия шунгита на ракообразных показало, что он в минимальной из пяти исследованных концентраций (0,01 г/л) защищает как цериодафний, так дафний от действия токсикантов. При высоких концентрациях шунгита дафнии погибали. Показано, что острая токсичность солей тяжёлых металлов для двух видов рачков снижается в ряду Cu—Cd—Cr. Анализ полученных данных показывает, что концентрации шунгита, необходимые для инактивации тяжёлых металлов, в тысячи раз выше для водорослей, чем для ракообразных. В связи с этим для использования шунгита как протектора от токсического действия различных веществ необходим предварительный лабораторный анализ на выживаемость разных видов гидробионтов на конкретной водной среде.

Ключевые слова: *шунгит, Scenedesmus quadricauda, Daphnia magna, Ceriodaphnia affinis, тяжёлые металлы, эффективность фотосинтеза, выживаемость*

Известно, что токсиканты как антропогенного, так и природного происхождения снижают эффективность фотосинтеза, темп деления клеток, усиливают окислительные процессы в организме и влияют на другие жизненно важные процессы у гидробионтов. В связи с этим возникает необходимость поиска новых универсальных и экономически эффективных способов инактивации этих соединений. Как было показано ранее [1], повреждающее действие синглетного кислорода, образующегося в присутствии фотосенсибилизаторов, можно ослабить с помощью шунгита. Защита от токсического действия бихромата калия шунгитом была нами показана ранее [2].

Природный композит шунгит в основном состоит из аморфного глобулярного углерода. В шунгите Зажогинской породы (Карелия) обнаружены кремний, алюминий, железо, магний, калий, сера, кальций, фосфор, фуллерен и др. [3]. Фуллерен был обнаружен в шунгитах Карелии в 1992 г. [4]. Показано, что фуллерены могут встраиваться в биологические мембраны, влиять на их структуру, изменять каталитическую активность мембранных ферментов. При этом характер токсического действия фул-

лерена зависит от многих факторов [5, 6]. Фуллерен в сверхмалых концентрациях оказывает токсическое действие на жизнеспособность клеток китайского хомячка, что, возможно, связано с особыми свойствами воды, окружающей молекулу фуллерена, является своеобразным донором и акцептором электронов, регулирующих окислительно-восстановительные процессы, протекающие в водных системах [7]. Стабилизирующее влияние фуллерена C_{60} при термической обработке оксидазных ферментов в концентрациях 10^{-9} – 10^{-23} М было показано ранее [8]. Авторы это связывают с образованием вокруг фуллеренов водных оболочек, оптимизирующих устойчивость ферментов в экстремальных условиях.

Научные исследования последних лет указывают на то, что токсичность, нейтральность или положительное действие водорастворимых фуллеренов на клеточном, ферментативном и организменном уровнях определяются способами получения, чистотой этих соединений, концентрацией, а также особыми свойствами водных сферических оболочек фуллеренов, являющихся одновременно донорами и акцепторами электронов.

Водорастворимые фуллерены привлекают внимание исследователей разных специальностей (биологов, медиков, физиков, химиков) благодаря своей противовирусной активности, антирадикальным свойствам, способности генерировать активные формы кислорода и др.

В настоящее время как применение, так и исследование фуллеренов сдерживаются их высокой стоимостью, которая связана с низкой экономической эффективностью технологий получения и самих фуллеренов, и их производных.

Все вышесказанное о свойствах фуллеренов имело определяющее значение при выборе более доступных протекторов для наших исследований. В связи с этим нами был выбран шунгит (содержащий в своей структуре фуллерен) для возможной защиты гидробионтов от воздействия тяжёлых металлов.

Способность шунгита очищать воду известна давно. Первые фильтры для очистки воды на основе шунгита были созданы в 1995 г. Известно, что вода, пропущенная через шунгит, обладает благоприятным действием на многие организмы. Однако влияние шунгита на различные биологические объекты практически не исследовано, хотя продажа и реклама этого соединения продолжают увеличиваться.

Тяжёлые металлы представляют серьезную угрозу для биоты вследствие их острой токсичности и постепенного накопления в окружающей среде. Основными источниками тяжёлых металлов и их соединений являются выбросы с перерабатывающих предприятий. Значительные количества тяжёлых металлов поступают в водную среду с промышленными стоками. В связи с этим возникает необходимость поиска новых экономически доступных методов и подходов к снижению уровня уже имеющегося загрязнения водной среды.

В настоящей работе рассмотрен один из важных вопросов, имеющий научно-практическое значение, — возможность использования шунгита для уменьшения токсического действия некоторых солей тяжёлых металлов — бихромата калия, сульфата кадмия и сульфата меди. Эти вещества являются сильнодействующими ядами. По степени воздействия на организм человека их относят к вредным веществам 1-го класса опасности (как чрезвычайно опасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. Кроме того, бихромат калия и сульфат кадмия используются в качестве эталонных токсикантов как в России, так и за рубежом для изучения чувствительности различных тест-объектов при проведении биотестирования. Культуры зелёной хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. и ракообразных *Daphnia magna* Straus и *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg рекомендованы рядом документов для биотестирования и нормирова-

ния в качестве тест-объектов для оценки качества водной среды.

Целью данной работы было исследование защитных свойств шунгита в условиях токсического действия солей тяжёлых металлов на микроводоросль *S. quadricauda* и ракообразных *D. magna* и *C. affinis*.

Материалы и методы

Альгологически чистую культуру *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.) выращивали в конических колбах ёмкостью 250 мл на среде Успенского № 1 (100 мл) при температуре 25°C и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов/м²·с. В экспериментах использовали шунгит Зажогинского месторождения от компании “Арго” (Россия), бихромат калия (K₂Cr₂O₇) и сульфат кадмия (CdSO₄). Шунгит из расчета 100 г/л, бихромат калия в концентрации 3 мг/л и сульфат кадмия в концентрации 1,5 мг/л добавляли в среду однократно на третьи сутки после посева культуры. Шунгит предварительно обрабатывали согласно инструкции изготовителя с учётом специфики выращивания водорослей. Для этого гранулы шунгита промывали холодной водой, затем высыпали в 3-литровую стеклянную банку и настаивали в воде в течение 2 сут, после чего снова промывали дистиллированной водой для удаления посторонних примесей и автоклавировали (одна атмосфера, 30 мин). После обработки шунгит добавляли в культуральную среду.

Определение живых и мёртвых клеток в культуре осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Axioscop 2 FS Plus (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете. При облучении объекта короткими сине-фиолетовыми лучами получали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, а мёртвые — зелёное. Кривые индукции флуоресценции были построены на основе данных, полученных на приборе “МЕГА-25” (Россия). Эффективность фотосинтеза рассчитывали по формуле: $\psi = (F_m - F_0)/F_m$ [9], где F_0 — интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах, а F_m — максимальная интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах. Контролем служили водоросли, выращиваемые в чистой среде без добавления шунгита и сульфата кадмия. Эксперименты проводили в трёх повторностях длительно-стью 20–30 сут.

Для проведения исследований на ракообразных использовали синхронизированные лабораторные культуры *Daphnia magna* Straus и *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. Исследования проводили согласно рекомендациям стандартных методических указаний [10].

Ракообразных содержали в климатостате при температуре 22–23°C с 12-часовым циклом освещения. Кормление культуры и опытных выборок производили зелёными водорослями *Chlorella vulgaris* Beijer, внося по 1,5 мл концентрированной культуры (плотность культуры не менее $(3,0–3,5) \cdot 10^7$ клеток/см³) на 1 л среды. Для проведения экспериментов и поддержания культуры использовали подготовленную водопроводную (биологизированную) воду. В этих опытах, как и в экспериментах на водорослях, использовали шунгит Зажогинского месторождения, бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$), сульфат кадмия ($CdSO_4$) и сульфат меди ($CuSO_4$).

Лабораторную воду насыщали шунгитом, добавляя 0,1 г препарата на 1 л воды. Раствор настаивали не менее 2 сут, затем разбавляли в 10 раз для достижения условной концентрации 0,01 г/л. Параллельно проводили все серии экспериментов для каждого тест-объекта и каждого металла. Навески солей тяжёлых металлов растворяли либо в чистой лабораторной воде, либо в воде, насыщен шунгитом (0,01 г/л).

В четыре стакана (повторности) объёмом 100 мл наливали по 50 мл соответствующих растворов и помещали по 5 цериодафний в возрасте не более 24 ч. При работе с дафниями в ёмкости наливали по 100 мл растворов и помещали по 10 рачков (три повторности). Эксперименты по совместному влиянию шунгита и солей тяжёлых металлов проводили с условной концентрацией шунгита 0,01 г/л и сериями концентраций бихромата калия, сульфата меди и сульфата кадмия от 0,00025 до 0,0020 г/л. Продолжительность опытов составляла 24–96 ч. Начиная со вторых суток опыта, рачков кормили *C. vulgaris* согласно описанной ранее методике [10].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Office Excel 2010. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок в экспериментах на водорослях проводили с использованием теста Стьюдента, считали различия достоверными при $p < 0,05$. Для вычисления полулетальных концентраций (LK_{50}) металлов для ракообразных в острых опытах использовали пробит-анализ [10].

Результаты и обсуждение

Исследование жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии, показало, что при концентрации 3 мг/л бихромата калия количество живых клеток в культуре со временем постепенно уменьшалось, а доля мёртвых — соответственно увеличивалась (рис. 1, А). В присутствии 100 мг/л шунгита доля живых клеток в культуре была на уровне

контроля. При комбинированном действии бихромата калия и шунгита доля живых клеток составляла 98–99% на протяжении всего эксперимента и к концу эксперимента была даже выше уровня контроля (рис. 1, А). Полученные результаты свидетельствуют о снижении токсического действия бихромата калия на культуру *S. quadricauda* при добавлении шунгита.

На рис. 1, Б представлены данные изменения эффективности фотосинтеза ψ (в %). Эти данные хорошо согласуются с результатами по оценке доли живых клеток в культуре. Во всех случаях, как при добавлении шунгита, так и при одновременном присутствии в среде шунгита и бихромата калия, клетки водорослей растут лучше. В то же время эффективность фотосинтеза и доля живых клеток становятся выше, чем в среде с бихроматом калия без шунгита. Эффективность фотосинтеза была наиболее низкой в пробах с бихроматом калия. Относительно близкие значения эффективности фотосинтеза через 11 сут (начало стационарной фазы роста) водорослей во всех остальных пробах можно объяснить тем, что происходила адаптация культуры к условиям среды.

На рис. 2, А приведены результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda* при добавлении сульфата кадмия и шунгита. В присутствии 1,5 мг/л сульфата кадмия количество живых клеток в культуре со временем постепенно уменьшалось и к 15 сут составляла около 4%, а доля мёртвых — соответственно со временем увеличивалась. После добавления шунгита доля живых клеток в культуре была на уровне контроля или выше. При комбинированном действии сульфата кадмия и шунгита доля живых клеток составляла 98–99% на протяжении всего эксперимента и была близка к контрольным показателям. Полученные результаты также свидетельствуют о снижении токсического действия сульфата кадмия на культуру *S. quadricauda* в присутствии шунгита.

Как и в опыте с бихроматом калия (рис. 1), так и в случае с сульфатом кадмия (рис. 2) с добавлением шунгита, данные по величине эффективности фотосинтеза *S. quadricauda* согласуются с данными по оценке доли живых клеток в культуре. При добавлении в среду шунгита и при одновременном присутствии в среде шунгита и сульфата кадмия культура водоросли растёт лучше. В то же время эффективность фотосинтеза и доля живых клеток становятся выше, чем в контроле и в присутствии в среде только сульфата кадмия. Эффективность фотосинтеза была наиболее низкой в пробах с сульфатом кадмия. В начале стационарной фазы роста культуры значения эффективности фотосинтеза через 11 сут роста водорослей во всех пробах с би-

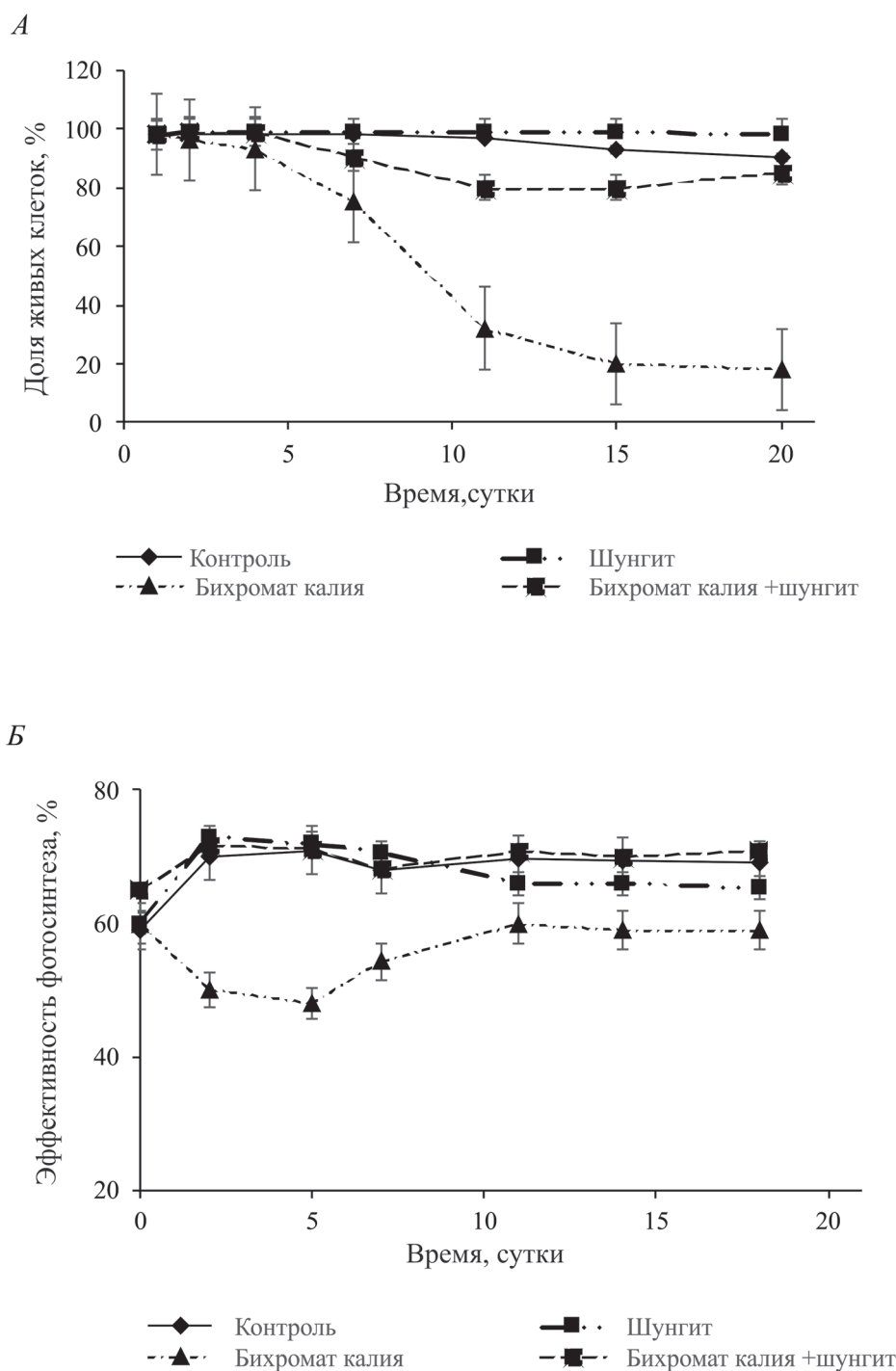


Рис. 1. Доля живых клеток (А) и эффективность фотосинтеза (Б) во время роста культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита (100 г/л) и бихромата калия (3 мг/л). Планки погрешности — доверительный интервал с уровнем доверия 95%

хроматом калия и частично с сульфатом кадмия можно объяснить адаптацией наиболее устойчивых клеток культуры в токсичной среде. Как известно, эффективность фотосинтеза не отражает численность клеток, а показывает состояние фотосинтетического аппарата адаптированных водорослей на разных стадиях роста культуры. Клетки с низкой эффективностью фотосинтеза элиминировались, в популяции оставались только клетки с высокой эффективностью фотосинтеза.

Таким образом, бихромат калия и сульфат кадмия оказывают выраженное токсическое действие на культуру микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* по показателям доли живых и мёртвых клеток, а также эффективности фотосинтеза, характеризующей физиологическое состояние культуры. При комбинированном действии шунгита (100 г/л) и бихромата калия или сульфата кадмия шунгит инактивирует их токсическое действие.

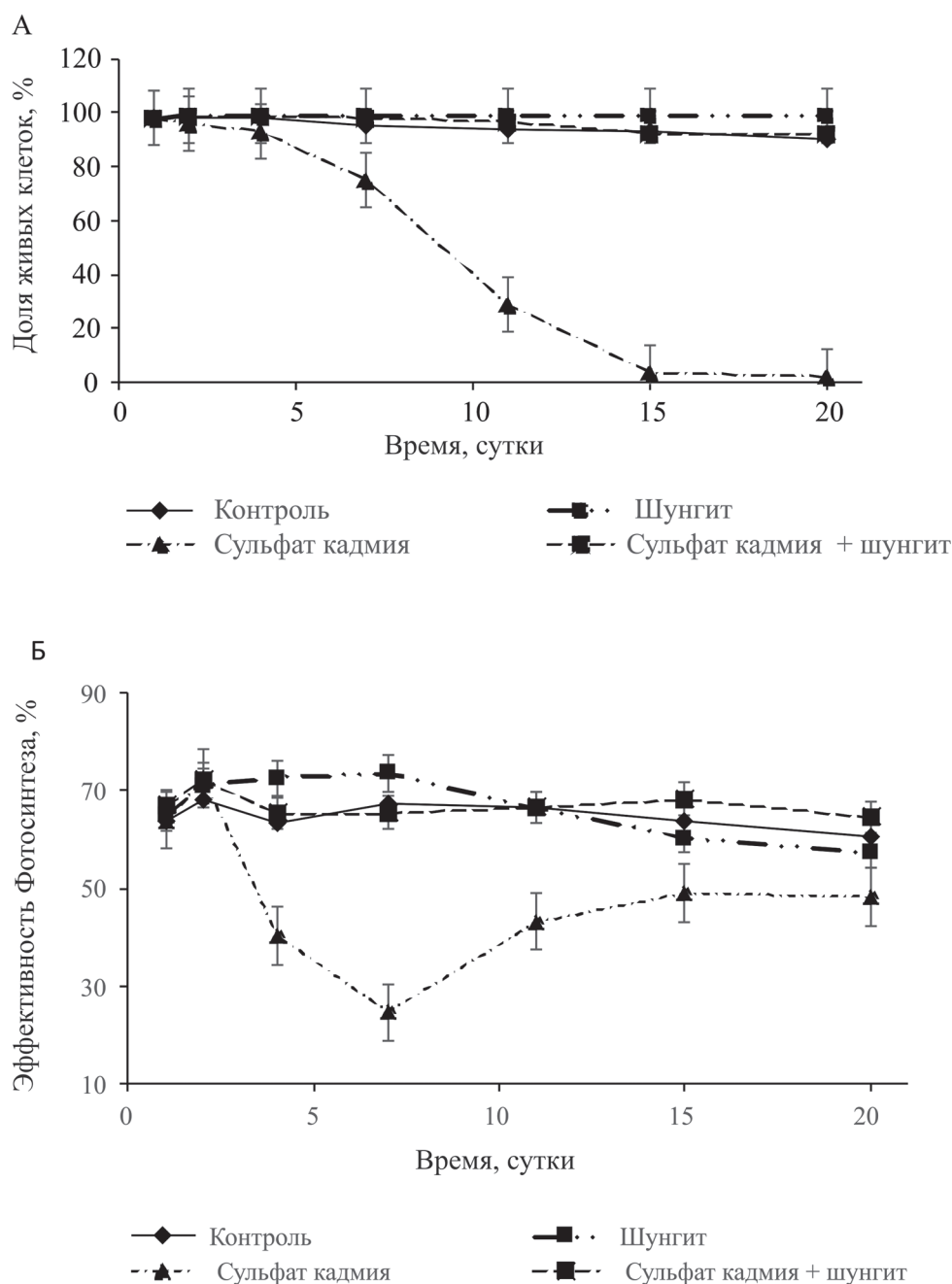


Рис. 2. Доля живых клеток (А) и эффективность фотосинтеза (Б) во время роста культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита (100 г/л) и сульфата кадмия (1,5 мг/л). Планки погрешности — доверительный интервал с уровнем доверия 95%

Результаты экспериментов на *Ceriodaphnia affinis* и *Daphnia magna* с солями кадмия, меди и бихроматом калия приведены в таблице.

По величинам расчетных полулетальных концентраций ($ЛК_{50}$) видно, что присутствие шунгита (0,01 г/л) оказывает протекторное действие на ракообразных при воздействии солей тяжёлых металлов при всех сроках экспозиции в остром эксперименте (24–96 ч) на обоих тест-объектах.

Показано, что острая токсичность тяжёлых металлов для двух видов рачков снижается в ряду Cu—Cd—Cr.

Цериодафнии проявили большую устойчивость к действию хрома и кадмия, чем дафнии. Устойчи-

вость рачков обоих видов к воздействию меди была примерно одинакова.

Добавление шунгита в концентрации 0,01 г/л в растворы солей тяжёлых металлов приводило к повышению устойчивости рачков к токсическому воздействию в разной степени. Защитные свойства шунгита в концентрации 0,01 г/л возрастали в ряду токсичности металлов Cu—Cd—Cr, т.е. чем токсичнее металл, тем менее выражен протекторный эффект.

Шунгит только в минимальной из исследованных концентраций (0,01 г/л) снижал токсичное действие бихромата калия как на цериодафний, так и на дафний. Одним из возможных механизмов

Таблица

Полулетальные концентрации соединений тяжёлых металлов (мг/л) для *Ceriodaphnia affinis* и *Daphnia magna* в присутствии шунгита

Вещество	Время воздействия	<i>Ceriodaphnia affinis</i>		<i>Daphnia magna</i>	
		Без шунгита	+ Шунгит (0,01 г/л)	Без шунгита	+ Шунгит (0,01 г/л)
Сульфат кадмия	24 ч	0,89	1,08	0,29	0,38
	48 ч	0,61	0,59	0,13	0,29
	72 ч	—	—	0,02	0,04
	96 ч	0,14	0,21	—	—
Сульфат меди	24 ч	0,20	0,34	0,29	0,36
	48 ч	0,17	0,31	0,23	0,28
	72 ч	—	—	0,18	0,24
	96 ч	0,17	0,30	0,17	0,23
Бихромат калия	24 ч	2,78	4,00	0,74	1,24
	48 ч	1,33	2,38	—	—
	72 ч	0,93	1,33	0,68	1,20

защиты ракообразных от токсического действия бихромата калия в присутствии шунгита (0,01 г/л) является переход шестивалентного хрома в менее токсичный трёхвалентный. Кроме того, могло иметь место связывание молекул или ионов бихромата компонентами шунгита. Ухудшение биологических показателей ракообразных при воздействии высоких концентрации 1, 10 и 100 г/л шунгита, возможно, связано с увеличением содержания ионов переменной валентности и фуллеренов в среде, приводящем к усилению образования активных форм кислорода в воде, что вызывает гибель дафнии. Токсическое действие фуллеренов на дафний связано с инициированием перекисного окисления липидов клеточных мембран [11]. Кроме этого, снижение выживаемости и плодовитости ракообразных связано с механическим повреждением фильтраци-

онного аппарата дафний шунгитом при его присутствии в высоких концентрациях (1–100 г/л) [12].

Анализ полученных данных показывает, что концентрации шунгита, необходимые для инактивации тяжёлых металлов, в тысячи раз выше для водорослей, чем для ракообразных. Механизм токсического или защитного действия шунгита на организменном уровне в настоящее время в литературе обсуждается с разных точек зрения. Большинство исследователей это связывают со свойством фуллеренов. Наши результаты не противоречат концепциям, высказанным в других работах [8, 9, 11].

Исходя из вышесказанного, мы полагаем, что для использования шунгита как протектора от токсического действия различных веществ необходим предварительный лабораторный анализ на выживаемость разных видов гидробионтов на конкретной водной среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даллакян Г.А. Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным кислородом // Изв. РАН. Сер. биол. 1998. № 6. С. 751–753.
2. Даллакян Г.А., Погосян С.И., Ипатов В.И., Агеева И.В. Инактивация токсического действия бихромата калия шунгитом в присутствии микроводорослей // Токсикол. вестн. 2014. № 5. С. 39–44.
3. Каленин Ю.К. Экологический потенциал шунгита // Наука в России. 2008. № 6. С. 39–44.
4. Buseck P.R., Tzipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment // Science. 1992. Vol. 257. N 5067. P. 215–217.
5. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective

effects of hydrated C_{60} fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo* // Free Radic. Biol. Med. 2009. Vol. 47. N 6. P. 786–793.

6. Voznyakovskii A.P., Kudoyarov M.F., Piotrovskii L.B. Self-organization of fullerene molecules in thin polymeric films fullerenes // Fuller. Nanotub. Car. N. 2008. Vol. 16. N 5. P. 654–658.

7. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C_{60} -fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 2. P. 63–68.

8. Voeikov V.L., Yablonskaya O.I. Stabilizing effects of hydrated fullerenes C_{60} in a wide range of concentrations on luciferase, alkaline phosphatase, and peroxidase *in vitro* // Electromagn. Biol. Med. 2015. Vol. 34. N 2. P. 160–166.

9. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла. Учебно-методическое пособие. М.: МАКС Пресс, 2010. 116 с.

10. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency, 2002. 275 p.

11. Oberdörster E., Zhuc S., Blickleyb M., McClellan-Greend P., Haaschc M. Ecotoxicology of carbon-based engi-

neered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms // Carbon. 2006. Vol. 44. N. 6. P. 1112–1120.

12. Даллакян Г.А., Исакова Е.Ф., Гершкович Д.М. Действие шунгита на ракообразных и его влияние на токсичность бихромата калия // Токсикол. вестн. 2016. № 5. С. 53–58.

Поступила в редакцию
31.03.2017

Принята в печать
15.06.2017

HYDROBIOLOGY

THE COMBINED EFFECT OF HEAVY METALS AND SHUNGITE ON INDICATOR PLANKTON ORGANISMS

G.A. Dallakyan*, D.M. Gershkovich, V.I. Ipatova, E.F. Isakova

Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: honaris@bk.ru

The combined effect of salts of heavy metals and schungite on the test organisms of phyto- and zooplankton has been studied. The toxic effect, of both cadmium sulfate and potassium dichromate on the culture of *Scenedesmus quadricauda* was inactivated in the presence of schungite (100 g/l). The efficiency of photosynthesis, the number of cells, the proportion of living cells and the lifetime of the microalgal cell population increased after adding schungite to the medium (without toxicants). In addition, in acute experiments with a duration up to 96 hrs, the toxicity of potassium dichromate, copper sulfate and cadmium sulfate on crustaceans (*Daphnia magna* and *Ceriodaphnia affinis*) was determined in the presence of schungite (0.01 g/l) and without schungite. The study of the action of schungite on crustaceans showed that it protects, both *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia affinis*, from the action of toxicants at the minimum concentration (0.01 g/l) of the five tested concentrations. At higher concentrations of schungite, *Daphnia magna* died. It was shown that the acute toxicity of heavy metals for two species of crustaceans decreases in the series Cu–Cd–Cr. An analysis of the obtained data showed that the schungite concentrations necessary for the inactivation of heavy metals are thousands of times higher for algae than for crustaceans. Therefore, for the use of schungite as a protector against the toxic effects of various substances, a preliminary laboratory analysis of the survival of different species of hydrobionts in a specific aquatic environment is needed.

Keywords: schungite, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, heavy metals, photosynthetic efficiency, survival

Сведения об авторах

Даллакян Генарис Арменакович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-676-18-99; e-mail: honaris@bk.ru

Гершкович Дарья Михайловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-548-76-01, e-mail: papirus451@yandex.ru

Ипатова Валентина Ивановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-903-263-87-11; e-mail: viipatova@hotmail.com

Исакова Евгения Филипповна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-015-27-57, e-mail: evgenia_isakova@mail.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.28:574

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ
В ЛИТОРАЛЬНЫХ ПЕСКАХ БЕЛОГО МОРЯ

Е.Н. Бубнова

Беломорская биологическая станция имени Н.А. Перцова, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 184042, Карельская республика, пос. Приморский
e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Впервые проведено исследование микобиоты песчаных грунтов литорали холодно-водного Белого моря. 24 образца были отобраны в июле–августе 2015 г. в Онежской губе, Кандалакшском заливе и на Терском берегу. Численность колониеобразующих единиц (КОЕ) и видовой состав грибов определяли культуральными методами. Численность КОЕ невелика, и составляет от 0 до 57 в 1 см³. Всего обнаружено 54 морфотипа, среди которых 22 были идентифицированы до вида, 7 – не точнее, чем до уровня рода, и 25 не были идентифицированы, т.к. не образовали спороношения. С обилием более 10% и встречаемостью более 50% отмечены только два вида: *Cladosorium sphaerospermum* и *Paradendryphiella salina*. Ещё 5 видов встречались более чем в одном образце: *Penicillium chrysogenum*, *Cadophora fastigiata*, *Acremonium fuci*, анаморфа *Pseudogymnoascus pannorum* и телеоморфа *Pseudeurotium hygrophilum*. Все остальные морфотипы, были обнаружены в незначительном числе в отдельных образцах. В целом в микобиоте как по разнообразию, так и по численности преобладали темноокрашенные формы.

Ключевые слова: морские грибы, аскомицеты, литораль, прибрежная зона, Белое море, Субарктика, песчаные грунты

Песчаные грунты прибрежной зоны морей – специфические и практически неизученные местообитания грибов. Их уникальность связана, в первую очередь, с особенностями литоральной зоны как таковой. Это периодическое затопление и осушение, регулярные изменения влажности, солёности и температуры [1]. Литораль – это экотон, находящийся под одновременным воздействием факторов, характерных как для моря, так и для суши [2]. Промытые песчаные грунты распространены, как правило, на абразионных и абразионно-аккумулятивных формах берегового рельефа [3]. Здесь процессы вымывания преобладают над процессами накопления материалов. Вследствие этого песчаные грунты относительно бедны органическими веществами; микроклимат здесь отличается от такового в заиленных грунтах. В Белом море наиболее распространены литоральные грунты разной степени заиления, а чистые, промытые пески встречаются относительно редко. В основном они распространены на Терском берегу, реже в других районах [4].

Что касается микобиоты песчаных грунтов прибрежной зоны, то о ней до сих пор сведений не очень много [1]. Во-первых, в морской микологии выделяют небольшую группу псаммофитных грибов. Это около двух десятков видов облигатных морских грибов, которые могут жить в пространстве между песчинками на литорали. Их плодовые тела прикрепляются к самим песчинкам [5, 6] и могут быть обнаружены при прямом наблюдении. Культуральные исследования микобиоты литораль-

ных грунтов крайне немногочисленны. В основном они проводились в тёплых и умеренных регионах с заиленными грунтами [1, 7–9]. Результаты этих работ указывают на то, что в грунтах литоральной зоны присутствуют довольно многочисленные и разнообразные грибы. Согласно имеющимся сведениям о микобиоте заиленных грунтов побережья Белого моря, здесь также присутствуют грибы, хотя их численность и разнообразие несколько ниже, чем в более южных районах [10]. О грибах, населяющих песчаные литоральные грунты, сведений в литературе нет. Дополнительно отметим, что известные данные по микобиоте грунтов сублиторальной зоны свидетельствуют, что численность и разнообразие грибов в заиленных грунтах выше, чем в песчаных, галечных и ракушечных [11]. Скорее всего, на литорали также может быть обнаружена связь между гранулометрическим составом грунта и особенностями композиции микобиоты.

Наша работа посвящена изучению, с использованием культуральных методов, видового состава микроскопических грибов в песчаных грунтах литорали различных прибрежных районов Белого моря.

Материалы и методы

Материалами для нашего исследования послужили образцы песчаных грунтов, отобранные на средней литорали в следующих районах Белого моря: Онежский залив, Кандалакшский залив и Терский берег (рис. 1). Всего с середины июля по середину августа 2015 г. было отобрано 24 образца (табл. 1).

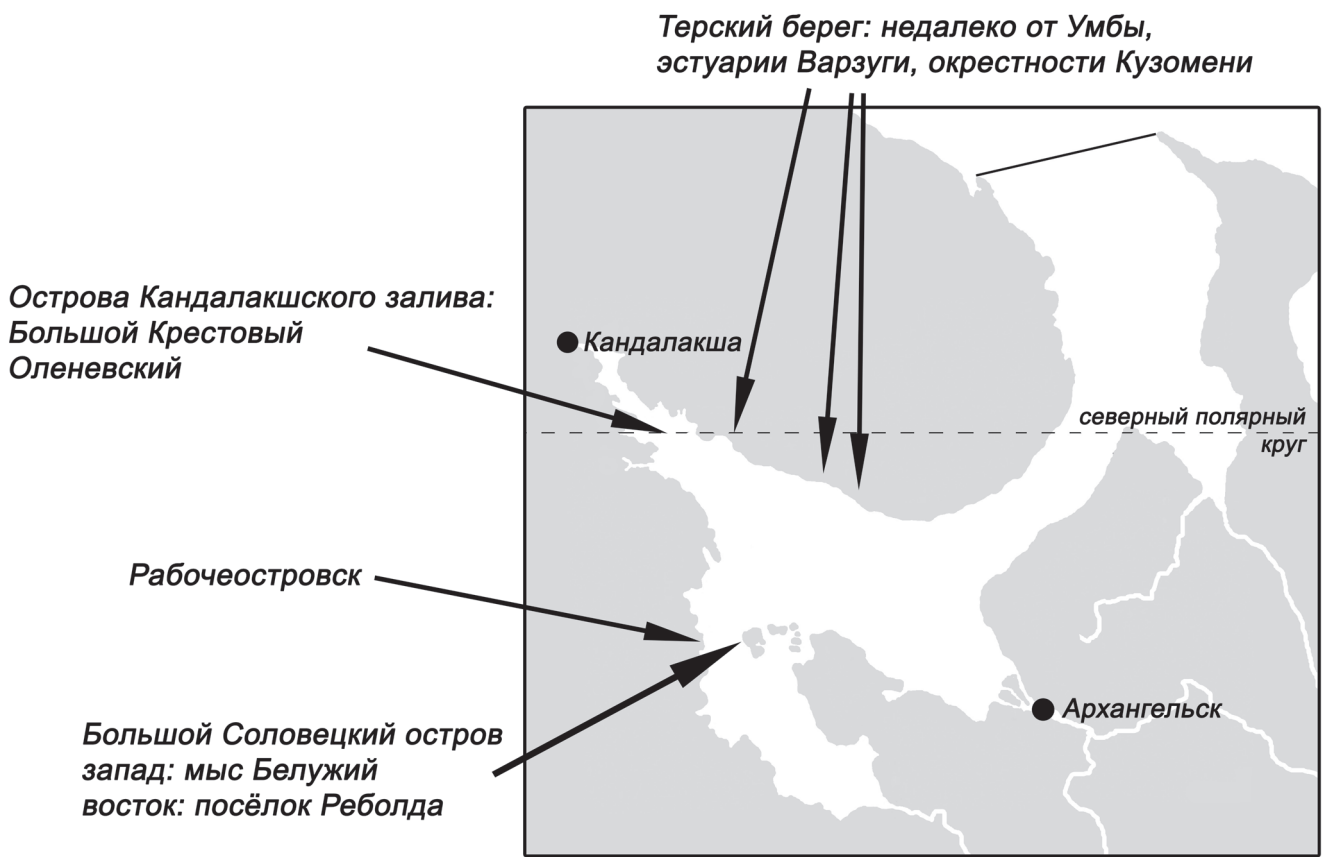


Рис. 1. Расположение районов отбора материала

Таблица 1

Характеристика образцов песчаных грунтов литорали из различных районов Белого моря

Локация	Координаты	№ образцов	Грунт
<i>Онежский залив</i>			
Рабочеостровск, недалеко от пирса и впадения ручья	64°59'24" с.ш. 34°47'29" в.д.	01, 02, 03	заиленный песок
Остров Большой Соловецкий, мыс Белужий	65°04'28" с.ш. 35°30'50" в.д.	04, 05, 06, 07	песок
Остров Большой Соловецкий, посёлок Реболда	64°08'42" с.ш. 35°49'27" в.д.	08, 09	песок
<i>Терский берег</i>			
Недалеко от трассы, между Умбой и Варзугой	66°21'11" с.ш. 35°50'60" в.д.	10	песок
Песчаная коса около деревни Кузомень, 1 км от эстуария реки Варзуги	66°16'13" с.ш. 36°54'07" в.д.	11	песок
У впадения реки Варзуги, справа по течению	66°16'04" с.ш. 36°56'02" в.д.	12	песок
У впадения реки Варзуги, слева по течению	66°15'59" с.ш. 36°56'50" в.д.	13	песок
Песчаная коса около деревни Кузомень, справа от эстуария реки Варзуги	66°15'41" с.ш. 36°58'57" в.д.	14	песок
Слева от эстуария реки Варзуги, у впадения Лодочного ручья	66°15'15" с.ш. 37°03'86" в.д.	15	песок
<i>Кандалакшский залив</i>			
Остров Большой Крестовый	66°31'12" с.ш. 33°12'01" в.д.	16, 17, 18, 19, 20	песок
Остров Оленевский	66°31'17" с.ш. 33°07'36" в.д.	21, 22, 23, 24	песок

Во всех случаях, кроме образцов 01, 02 и 03, это был хорошо промытый, незаиленный песок. В образцах 01, 02 и 03 было отмечено незначительное заиление. Часть образцов была отобрана недалеко от впадения в море малых рек или ручьёв. Это образцы 01, 02 и 03 в Онежском заливе; 12, 13 и 15 на Терском берегу. С образцами, взятыми на островах Кандалакшского залива, ситуация не такая однозначная. С одной стороны, непосредственно около них в море не впадает ручьёв и рек. С другой стороны, сами острова находятся внутри и на выходе из малой губы, близко от устьев рек Чёрная и Нильма. Остальные участки, на которых проводились сборы, не подвержены непосредственному воздействию постоянного пресного стока. Образцы отбирали следующим образом: с помощью срезанного шприца на 2 мл, в каждой локации отбирали три раза по 1 см³ грунта из поверхностного слоя (точки на расстоянии 50 см друг от друга), весь отобранный материал помещали в один конверт. Полученные смешанные образцы подсушивали и хранили до посева не более 2 мес.

Для выявления видового состава микобиоты использовали метод обрастания агаровых пластин [12]. Для этого 1/3 каждого образца равномерно распределяли на 10 чашек Петри с агаризованной средой Сусло-агар (0,03% углеводов), солёностью 34‰ (обеспечиваемой добавлением морской соли) и антибиотиком Цефатоксимом (0,8 г/л). Данную среду использовали как наиболее обычную и применимую в работах с морскими грунтами и другими объектами [5, 18]. Чашки с посевами инкубировали не менее 40 сут при температуре +6°C [18]. Если к этому времени на чашках не был замечен рост грибов, то держали их до 80 сут, после чего отсеивали появившиеся колонии. Если же колоний не было, то считали, что грибы не выделились.

Образовавшиеся колонии идентифицировали после пересева в чистую культуру. Предварительно подсчитывали общее число колоний и число коло-

ний каждого морфотипа. При обсуждении представленности морфотипов использовали следующие понятия: 1) встречаемость — как отношение числа образцов, в которых был обнаружен данный морфотип, к общему числу образцов; 2) обилие — как отношение числа колоний данного морфотипа к общему числу колоний в образце. Все величины выражали в процентах. При подсчётах исходили из того, что объём посеянного материала равен 1 см³. Использовали понятие колониеобразующих единиц (КОЕ), которое принимали равным числу образовавшихся колоний в расчёте на 1 см³. Синонимия и таксономическое положение проверяли по базе Indexfungorum (www.indexfungorum.org).

Результаты и обсуждение

Всего из всех образцов было выделено 470 колоний мицелиальных грибов. В среднем это составляет 19–20 КОЕ на 1 см³ грунта. Из отдельных образцов выделялось от 0 (два образца с Белужьего мыса на Большом Соловецком острове) до 57 (один из образцов, отобранных на литорали в посёлке Рабочеостровск). В любом случае, это единицы — десятки колоний на 1 см³ субстрата (табл. 2, рис. 2). Полученные значения относительно низкие. Они на один-два порядка ниже, чем, например, в заиленных донных грунтах Белого [13] и Японского [11] морей; на два-три порядка ниже, чем в илистом грунте и почвах литорали английского побережья Северного моря [7], а также в грунтах и почвах приморских маршей Красного моря [8, 9]. Подобные низкие значения КОЕ грибов ранее были обнаружены только в заиленных донных осадках Обской губы Карского моря. В удалённых от берега районах Карского моря численность КОЕ грибов ниже полученных нами значений [14]. В наземных почвах прилегающих к Белому морю районов — на 2–4 порядка выше, чем в исследованных нами грунтах [13]. Таким образом, мы обнаружили, что численность КОЕ грибов в песчаных грунтах ниже, чем в исследованных ранее заиленных грунтах как литорали, так и сублиторали из разных географических областей, в том числе побережья Белого моря.

Что касается численности КОЕ грибов в отдельных образцах (рис. 2), то наибольшее среднее число колоний выделялось из грунтов, отобранных на литорали в посёлке Рабочеостровск. Это связано, очевидно, с тем, что очень близко отсюда находится устье реки Кемь, и в самих грунтах заметно заиление. Возможно, также играет роль близкое расположение населённого пункта. Минимальное число грибов выделилось из образцов, отобранных на мысу Белужьем Большого Соловецкого острова. Возможно, это связано с тем, что остров находится на удалении от берегов и мест впадения материковых рек, а также местных, островных, ручьёв. В свою очередь, в грунтах островов Кандалакшского залива численность образовавшихся колоний несколько выше, чем на мысу Белужьем, хотя грунты в обоих

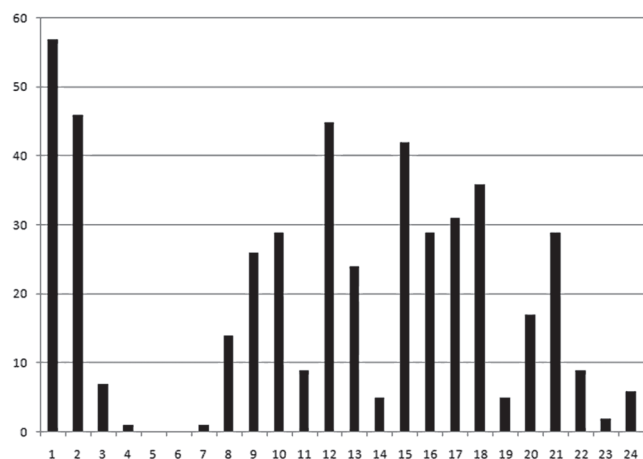


Рис. 2. Численность колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов, содержащихся в 1 см³ исследованного грунта. По оси абсцисс — номера образцов; по оси ординат — число колоний, образовавшихся при посеве 1 см³ грунта

Таблица 2

Разнообразие микобиоты исследованных грунтов

	1	2
Zygomycota		
<i>Umbelopsis isabellina</i> (Oudem.) W. Gams	1	1
Телеоморфы Ascomycota		
<i>Pseudogymnoascus roseus</i> Raillou	5	2
<i>Pseudeurotium hygrophilum</i> (Sogonov, W. Gams, Summerb. & Schroers) Minnis & D.L. Lindner	15	3
Анаморфы Ascomycota		
<i>Acremonium fuci</i> Summerb., Zuccaro & W. Gams	23	6
<i>Acremonium furcatum</i> Moreau & F. Moreau ex Gams	1	1
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	3	2
<i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. & Melin	35	4
<i>Cadophora malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams	4	2
<i>Cephalotrichum nanum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	1	1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	145	14
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	3	2
<i>Isaria farinosa</i> (Holmsk.) Fr.	2	1
<i>Paradendryphiella salina</i> (G.K. Sutherl.) Woudenb. & Crous	83	13
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	19	2
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	38	6
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling	2	1
<i>Phialopora cinerescens</i> (Wollenw.) J.F.H. Beyma	3	1
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc.	2	1
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner	16	3
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.	3	1
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	1	1
<i>Trichurus spiralis</i> Hasselbr	1	1
Неидентифицированные изоляты		
<i>Cadophora</i> sp. 1	1	1
<i>Penicillium</i> sp.	5	1
<i>Phoma</i> sp. 1	1	1
<i>Ulocladium</i> sp. 1	3	1
Anamorphic gen. sp. 1	2	1
Anamorphic gen. sp. 2	1	1
Ascomycetous gen. sp.	1	1
стерильные изоляты	50	12
ВСЕГО КОЛОНИЙ	470	

Примечание: 1 — общее число изолятов данного морфотипа, выделенных из всех образцов; 2 — число образцов, из которых был выделен данный морфотип.

случаях представлены промытыми песками. Возможно, это связано с расположением островов и их близостью к эстуариям двух рек. Для грунтов, отобранных на Терском берегу, средние значения КОЕ не очень низкие, но здесь можно заметить разницу между образцами, отобранными недалеко от устьев рек (где численность выше) и на открытых участках (где она немного ниже). Таким образом, можно проследить некоторую тенденцию к увеличению численности колоний мицелиальных грибов вблизи впадения рек и ручьев, а также при заилении.

Все выделенные колонии мы отнесли к 54 морфотипам. Общее число морфотипов относительно велико, но 25 из них не образовывали в культуре споронии (т.е. были стерильными), и, следовательно, не могли быть идентифицированы. Ещё 7 не могли быть идентифицированы точнее, чем до уровня рода, так как имели признаки, не подходящие под описания известных видов. 25 стерильных морфотипов мы выделили на основе следующих морфолого-культуральных признаков: размер и цвет колонии; наличие и цвет пигмента в среде и в мицелии; наличие и цвет эксудата; степень развития субстратного и воздушного мицелия; цвет, толщина, морфологические признаки мицелия. Очевидно, что для полного описания таксономического разнообразия микобиоты необходимо в дальнейшем провести молекулярно-генетические исследования. Пока же мы можем говорить о предположительно довольно высоком разнообразии грибов в исследованных грунтах, достигаемом за счёт стерильных форм.

Идентифицированные спорообразующие изоляты относятся к двум отделам: Zygomycota и Ascomycota (табл. 2). К первому относится один вид — *Umbelopsis isabellina*. Все остальные — к аскомицетам, причём большинство из них были выделены в виде анаморфных форм. Половые споронии в культуре образовывали представители только двух видов: *Pseudogymnoascus roseus* и *Pseudeurotium hygrophilum*. Остальные образовывали только конидиальные структуры. Эти грибы относились к 19 видам из 15 родов. Абсолютное большинство родов содержат по одному виду; три вида обнаружено в роде *Penicillium* (и ещё один неидентифицированный), по два — в родах *Cadophora* (в данном роде три морфотипа, включая один неидентифицированный) и *Acremonium*. Видовой состав спороний грибов в исследованных грунтах выглядит не очень богатым. Здесь, например, отсутствуют обычно многочисленные в подобных местах представители рода *Penicillium*, довольно обычные *Trichoderma* и *Tolypocladium* [10, 11, 13, 14]. Морских видов выделено только два: *Acremonium fuci* и *Paradendryphiella salina*. Все остальные — представители почв.

Всего два вида были отмечены с общим обилием более 10% и встречаемостью более 50%. Это *Cladosporium sphaerospermum* (145 колоний в 14 образцах) и *Paradendryphiella salina* (83 колонии в 13 образцах). Встречаемость ещё пяти видов составляла не

менее 10%: *Penicillium chrysogenum* (38 колоний/6 образцов), *Cadophora fastigiata* (35/4), *Acremonium fuci* (23/6), анаморфа *Pseudogymnoascus pannorum* (16/3) и телеоморфа *Pseudeurotium hygrophilum* (15/3). Перечисленные 7 видов имели общее обилие более 75%, и только в 3 образцах не было обнаружено ни одного из них. Все остальные виды и морфотипы были отмечены в отдельных образцах, в основном единичными колониями. Что касается группы наиболее обычных видов, то в неё входят оба морских. Кроме того — *P. chrysogenum*, один из наиболее широко распространённых представителей своего рода [15], который встречается в том числе и в морских грунтах [10, 11, 13, 14]. Анаморфная стадия *Pseudogymnoascus roseus* — вид, очень широко распространённый в холодных регионах [15], в том числе и в морских местообитаниях [10, 13, 14], поэтому его высокая численность в исследованных грунтах не удивительна. *Cl. sphaerospermum* — также один из наиболее широко распространённых грибов; он довольно часто выделяется из различных солоноводных местообитаний [15, 16]. *Cadophora fastigiata* — почвенный сапротроф и ксилотроф, также чаще встречается в средних и полярных широтах [15, 17]. Согласно последним данным молекулярной биологии, виды этого рода, и всего семейства Helotiales, возможно играют очень важную и пока недооцененную роль в экосистемах арктических морей [18]. *Pseudeurotium hygrophilum* был одним из наиболее встречаемых, например, в донных грунтах Карского моря [14]. Таким образом, среди доминантов грибных сообществ в исследованных грунтах мы не встретили ничего неожиданного. Кроме того, довольно большая группа была представлена разнообразными неспоронийными формами, обилие которых составило 11%, а общая встречаемость — 50%. В основном они встречались в числе 1–3 КОЕ на 1 см³ образца.

Обращает на себя внимание соотношение тёмно- и светлоокрашенных грибов (рис. 3). Светлоокрашенных морфотипов обнаружено 23, включая 8 стерильных и 2 неидентифицированных. Тёмноокрашенных больше: их обнаружено 31, включая 17 стерильных и 5 неидентифицированных. Численность тёмноокрашенных грибов также превышает численность светлоокрашенных. Всего было выделено 313 колоний тёмноокрашенных и 157 — светлоокрашенных, т.е. общее обилие тёмноокрашенных грибов составило 67%. Тем не менее, в некоторых образцах все-таки преобладали светлоокрашенные грибы. Заметим, что в исследованных ранее заиленных грунтах литорали, а также и сублиторали, в том числе Белого моря [10, 13], не было отмечено такого преобладания тёмноокрашенных грибов.

Таким образом, мы впервые провели исследование грибов в песчаных грунтах литорали холодноводного Белого моря. Композиция микобиоты имеет ряд особенностей, которые отличают её от

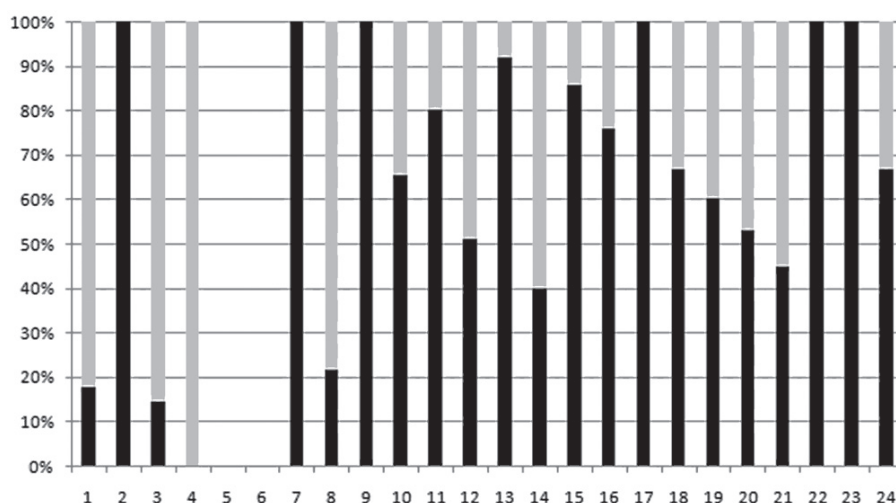


Рис. 3. Соотношение тёмно- и светлоокрашенных грибов в посевах исследованных грунтов. По оси абсцисс — номера образцов; по оси ординат — проценты. Тёмные столбцы — тёмноокрашенные; серые столбцы — светлоокрашенные

ранее исследованных сообществ грибов в аналогичных местообитаниях. Среди этих особенностей мы бы хотели выделить следующие: 1) низкая численность колоний грибов — ниже, чем в илистых литоральных и донных грунтах Белого моря, а также морей умеренных и тёплых широт; 2) невысокое разнообразие спорующих форм грибов (при их численном преобладании) и высокое морфолого-культуральное разнообразие стерильных при относительно меньшем обилии; 3) преобладание тёмноокрашенных грибов как по разнообразию, так и по численности. Кроме того, мы бы хотели отметить неотчётливую, но заметную тенденцию

к увеличению численности грибов под влиянием постоянного пресного стока и заиления грунта.

Автор выражает признательность сотрудникам биологического факультета МГУ — О.В. Штаер, А.А. Георгиеву, Н.Ю. Неретину и О.А. Грум-Гржимайло за помощь в сборе и доставке образцов для исследования.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №15-04-02722а — организация сбора и первичной обработки материалов) и Российского научного фонда (проект №14-50-00029 — выделение и идентификация культур).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pugh G.J.F. Fungi in intertidal region // Vegetation between land and sea / Eds. A.H.L. Huiskes, C.W.P.M. Blow, and J. Rozema. Boston: Dr. W. Junk Publishers, 1987. P. 86–95.
2. Encyclopedia of coastal science / Ed. M.L. Schwartz. Dordrecht: Springer, 2005. 1242 p.
3. Сафьянов Г.А. Геоморфология морских берегов. М.: Изд-во МГУ, 1996. 400 с.
4. Filatov N., Pozdnyakov D., Johannessen O.M., Petersson L.H., Bobylev L.P. White Sea: It's marine environment and ecosystem dynamics influenced by global change. Chichester: Springer, 2005. 530 p.
5. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine mycology — the higher fungi. N.Y.: Academic Press, 1979. 690 p.
6. Zvereva L.V. Arenicolous mycelial fungi from the littoral of the Vostok Bay (Peter the Great Bay, the Sea of Japan) // Microbiology. 2009. Vol. 78. N 4. P. 498–501.
7. Pugh G.J.F. Fungal colonization of a developing salt marsh // Nature. 1961. Vol. 190. N 4780. P. 1032–1033.
8. Abdel-Fattah H.M., Moubasher A.H., Abdel-Hafez S.I. Studies of mycoflora of salt marshes in Egypt. I. Sugar fungi // Mycopathologia. 1977. Vol. 61. N 1. P. 19–26.
9. Abdel-Hafez S.I., Moubasher A.H., Abdel-Fattah H.M. Studies of mycoflora of salt marshes in Egypt // Mycopathologia. 1977. Vol. 62. N 3. P. 143–151.
10. Согонов М.В., Марфенина О.Е. Особенности микобиоты приморских маршей Кандакшского залива Белого моря // Вестн. Моск. ун-та Сер. Биол. 1999. № 3. С. 42–47.
11. Khudyakova Yu.V., Pivkin M.V., Kuznetsova T.A., Svetashev V.I. Fungi on sediments of the Sea of Japan and their biologically active metabolites // Microbiology. 2000. Vol. 69. N 5. P. 722–726.
12. Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. The Fungi. London: Academic Press, 2001. 603 p.
13. Бубнова Е.Н. Грибы донных грунтов Кандакшского залива Белого моря // Микол. фитопатол. 2009. Т. 43. № 4. С. 4–11.
14. Bubnova E.N. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea // Bot. Mar. 2010. Vol. 53. N 6. P. 595–600.
15. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. Eching: IHW-Verlag, 2007. 672 p.
16. Zalar P., de Hoog G.S., Schroers H.-J., Crous P.W., Groenewald J.Z., Gunde-Cimerman N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments // Stud. Mycol. 2007. Vol. 58. P. 157–183.
17. Hassan N., Rafiq M., Hayat M., Shah A.A., Hasan F. Psychrophilic and psychrophilic fungi: a comprehensive review // Rev. Environ. Sci. Bio. 2016. Vol. 15. N 2. P. 147–172.
18. Rämä T., Davey M.L., Nordén J., Halvorsen R., Blaallid R., Mathiassen G.H., Alsos I.G., Kauserud H. Fungi sailing the Arctic ocean: speciose communities in North Atlantic driftwood as revealed by high-throughput amplicon sequencing // Microb. Ecol. 2016. Vol. 72. N 2. P. 295–304.

Поступила в редакцию 23.04.2017

Принята в печать 15.06.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

DIVERSITY OF MICROSCOPIC FUNGI IN LITHORIAL SANDS
OF THE WHITE SEA*E.N. Bubnova*

*N.A. Pertsov White Sea Biological Station, Lomonosov Moscow State University,
Primorsky pos., Karelia Republic, 184042, Russia
e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru*

For the first time, a study of the mycobiota of littoral sands of the cold-water White Sea was made. 24 samples were collected in July–August 2015 in Onega Bay, Kandalaksha Bay and on the Tersky coast. Culture methods were used to detect the number of colony forming units (CFU) and diversity of fungi. The number of CFUs is small, and ranges from 0 to 57 per 1 cm³. A total of 54 morphotypes were detected, of which 22 were identified to the species, 7 – not more accurately than to the genus level, and 25 were not identified, because did not form sporulation. With an abundance of more than 10% and a occurrence of more than 50%, only two species are noted: *Cladosorium sphaerospermum* and *Paradendryphiella salina*. Five more species were found in more than one samples: *Penicillium chrysogenum*, *Cadophora fastigiata*, *Acremonium fuci*, anamorph of *Pseudogymnoascus pannorum* and teleomorph of *Pseudeurotium hygrophilum*. All other morphotypes were found in a small number in individual samples. In general, dark-colored forms predominated in the mycobiota both in diversity and in number.

Keywords: *marine fungi, Ascomycetes, littoral, coastal zone, White Sea, Subarctic, sands*

Сведения об авторе

Бубнова Екатерина Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова биологического факультета МГУ. 8-495-939-54-82; e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 576.08:576.311.33:576.314:576.342

ЭНДОЦИТОЗ И ЕГО ИНГИБИТОРЫ
У БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *RHIZOCTONIA SOLANI*О.В. Камзолкина^{1,*}, М.А. Киселица¹, О.А. Кудрявцева¹, О.В. Штаер¹, И.С. Мажейка^{1,2}¹Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова, РАН, Россия, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3

*e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru

Эндоцитоз — сложный процесс поглощения из внешней среды и дальнейшего распределения внутри клетки растворимых веществ, макромолекул, микрочастиц и т.п. с помощью везикул, формируемых цитоплазматической мембраной. Эндоцитоз в клетках животных и человека активно и успешно исследуют. Так, классификация данного процесса у животных, основанная только на особенностях образования первичных везикул, включает в себя до десяти различных путей эндоцитоза. Современные знания об эндоцитозе у мицелиальных грибов не столь обширны, поэтому его изучение в данной группе организмов — актуальное и перспективное направление в фундаментальной и прикладной микологии. В настоящей работе мы исследовали воздействие на динамику эндоцитоза у фитопатогенного гетеробазидиального гриба *Rhizoctonia solani* шести различных ингибиторов, действующих как на сборку актинового/тубулинового цитоскелетов, так и на становление разных типов эндоцитоза. Оценку влияния ингибиторов проводили с помощью микроскопического анализа поглощения клетками мицелия флуоресцентного маркера эндоцитоза AM4-64. В результате проведенного исследования выявлено четыре типа воздействия ингибиторов на эндоцитоз *R. solani*: от полного отсутствия воздействия до сильной супрессии разных стадий грибного эндоцитоза. Оказалось, что четыре из шести ингибиторов, используемых для подавления эндоцитоза у животных и человека, оказывают супрессирующее действие на эндоцитоз гетеробазидиального гриба *R. solani*. Это указывает на консервативную природу отдельных механизмов эндоцитоза у исследованного гриба и, возможно, у мицелиальных грибов в целом. Предложены различные гипотезы, касающиеся принципов действия изучаемых ингибиторов на эндоцитозную активность грибов.

Ключевые слова: эндоцитоз у мицелиальных грибов, флуоресцент AM4-64, механизмы эндоцитоза, ингибиторный анализ, цитоскелет, макропиноцитоз, *Rhizoctonia solani*

Эндоцитоз представляет собой многофункциональный процесс, который является ключевым в поддержании физиологического статуса и гомеостаза эукариотической клетки [1]. В ходе эндоцитоза клетка собирает внеклеточный материал и связанные с мембраной различные белки, упаковывает их в везикулы различных форм и размеров, отделяет от плазмалеммы и транспортирует в цитоплазму. В цитоплазме первичные эндоцитозные везикулы сливаются между собой и в большинстве случаев с ранними эндосомами. На данном этапе начинается сортировка поглощенного с помощью эндоцитоза материала — часть его может быть возвращена в цитоплазматическую мембрану, передана в аппарат Гольджи, а также направлена на деградацию в вакуолярно-лизосомальную систему и т.д. [2, 3].

Эндоцитоз — это общий термин, описывающий целый спектр близких процессов. Единой терминологической системы, объединяющей данные процессы, пока нет, но многие исследователи подразделяют эндоцитоз на фагоцитоз и пиноцитоз (заключение в везикулу, соответственно, либо твердофазного материала, либо жидкости). Макропи-

ноцитоз — формирование крупных везикул (>200 нм в диаметре). Однако именно макропиноцитоз (он же пиноцитоз, или эндоцитоз в узком смысле) чаще всего подразумевают, когда говорят про эндоцитоз (далее мы будем использовать термин эндоцитоз чаще всего именно в таком значении). Также эндоцитоз классифицируют по наличию/виду покровных белков первичной везикулы (клатрин, кавеолин), по участию динамина в отделении везикулы от плазмалеммы, по типам ранних эндосом и по другим признакам [4].

Показано участие эндоцитоза в апикальном росте гиф грибов, в обмене сигнальными молекулами при взаимодействии клеток грибов с растениями, в половом процессе и т.д. [5, 6].

Лучше всего изучен эндоцитоз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в связи с тем, что для данного гриба получена большая коллекция мутантов по генам, отвечающим за синтез белков, участвующих в эндоцитозе. В клетках *S. cerevisiae* эндоцитоз флуоресцентного производного α -феромона и флуоресцентного маркера FM4-64 протекает в две стадии [7]. Первая стадия занимает 1–3 мин и связана

с процессом накопления меченого α -феромона и/или FM4-64 в определенных участках плазмалеммы и с формированием клатриновой оболочки вокруг впячивания плазмалеммы в данных участках. Одновременно с формированием клатриновой оболочки к сайтам формирования везикул транспортируются адапторные белки [8]. Вторая стадия занимает примерно полминуты, в течение которых происходит сборка F-актина вокруг формирующейся везикулы. Далее происходит отшнуровывание эндоцитозной везикулы с помощью ГТФазы динамина либо, в случае бездинаминовых вариантов, с помощью белков амфифизина [9]. У почкующихся дрожжей охарактеризован также клатрин-независимый путь поглощения FM4-64 [10]. Показано участие в данном процессе белка формина Vni1p (принимает участие в сборке актиновых филаментов) и ГТФазы Rho1p, в то время как белковый комплекс Arp2/3p, отвечающий за формирование специфических пристеночных структур актина (actin patches), представляющих собой скопление коротких, часто разветвленных, филаментов актина, не участвует в процессе эндоцитоза FM4-64.

Эндоцитоз у мицелиальных грибов исследован поверхностно. Опубликованы сведения о поглощении и накоплении в вакуолях мицелиальных грибов флуоресцента FM4-64 и роли эндоцитоза в апикальном росте гиф [11, 12]. Показано накопление вдоль цитоплазматической мембраны субапикальных участков гиф у *Aspergillus nidulans* белка флотиллина, участвующего в клатрин-независимом пути у животных [13]. У другого вида аспергиллов — *A. oryzae* — обнаружены адапторные белки клатрин-зависимого эндоцитозного пути Aip1p, близкие по функциям к адапторному белку Abp1p *S. cerevisiae* [14]. Предполагают, что в растущих гифах *A. oryzae* могут действовать одновременно разные эндоцитозные механизмы.

Первые представления об участии цитоскелета (актина и микротрубочек) в эндоцитозе у грибов получены при изучении дрожжевой стадии диморфного базидиомицетного гриба *Ustilago maydis*, а позднее — при исследовании мицелиального гриба *A. nidulans* [15]. Актиновый цитоскелет может принимать участие во всех стадиях эндоцитоза: как в формировании и отделении первичных везикул, так и в перемещении эндосом в клетке. Большая часть экспериментальных данных о связи между актиновым цитоскелетом и эндоцитозом получена для клеток дрожжей [6]. При клатрин-зависимом эндоцитозе у *Candida albicans* динамин и быстро полимеризующийся актин способствуют отделению везикулы от плазмалеммы [8]. В эндоцитозе у *Ashbya gossypii* выявлен активный процесс полимеризации актина с участием комплекса Arp2/3. Ингибирование полимеризации актина латрункулином А влияет на динамику эндоцитоза у грибов [16, 17]. У ряда изученных мицелиальных грибов (*A. gossypii*, *A. nidulans*, *U. maydis*) в перемещении везикул и эндосом на существенные расстояния принимают уча-

стие микротрубочки и моторные белки (динеин и кинезин). За перемещение на близкие расстояния нередко отвечают актиновые филаменты и миозин. У почкующихся дрожжей любую транспортную функцию выполняет актин [18].

В настоящей работе мы исследовали воздействие на динамику эндоцитоза у фитопатогенного гетеробазидиального гриба *Rhizoctonia solani* различных ингибиторов, действующих как на сборку актинового/тубулинового цитоскелетов, так и на эндоцитоз. Оценку влияния ингибиторов проводили с помощью микроскопического анализа поглощения клетками мицелия флуоресцентного маркера эндоцитоза AM4-64.

Материалы и методы

Штамм гриба и культивирование. Фитопатогенный гриб *R. solani*, штамм 3.3 (коллекция кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова) был выделен из клубней картофеля в 2013 г. Он хорошо растет на стандартной питательной среде Чапека, мицелий имеет высокую скорость роста (5 мм/сут при оптимальной температуре роста 22°C) и состоит из крупных клеток 6–8 мкм шириной и более 100 мкм длиной, что делает данный гриб удобным объектом для флуоресцентно-микроскопического анализа.

Флуоресцентное мечение мицелия *R. solani* проводили маркером эндоцитоза стириловым флуоресцентом AM4-64 (Biotium, США), он является аналогом известного флуоресцентного зонда от Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific) FM4-64FX. Отличается AM4-64 (и FM4-64FX) от классического FM4-64, используемого во многих работах, наличием аминогруппы в гидрофильном участке молекулы. Такая модификация приводит к совместимости с альдегидной фиксацией, в остальном AM4-64 аналогичен классическому FM4-64. При обработке клеток флуоресцент прочно встраивается в липидный бислой плазмалеммы за счёт своих липофильных участков. Флуоресценция метки значительно выше в связанном с мембранами состоянии, нежели в свободном. Низкая специфичность встраивания AM4-64 в мембраны и прочное удерживание в них позволяют анализировать общую динамику эндоцитоза — от начальных этапов поглощения до встраивания AM4-64 вместе с поглощёнными участками мембран в вакуолярную систему клетки.

Мицелий, выращенный на агаризованной среде Чапека (4 сут роста), перед окрашиванием помещали на лёд на 10 мин. Тонкие агаровые блоки с мицелием вырезали из зоны роста колонии (из молодых участков колонии) и помещали на предметное стекло. На мицелий в блоке агара наносили рабочий раствор AM4-64 в концентрации 12 мкМ в 1 мл жидкой питательной среды Чапека и инкубировали мицелий на льду 8 мин в темноте [12]. Препараты трижды отмывали ледяной питательной средой.

Микроскопировали препараты с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axioskop 40 FL (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 100х с использованием фильтра 43НЕ сразу (0–15 мин) или через 15 минут (15–30 мин), в течение 15 мин препарат хранили при 25°C. Фотографировали с помощью камеры AxioCam MRc (Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Германия) не менее 50 клеток для каждого препарата.

Контроль пермеабилзации цитоплазматической мембраны. Повреждение плазмалеммы клеток *R. solani* контролировали йодидом пропидия (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл. Препарат вносили в охлаждённую питательную среду, инкубировали 8 мин на холоду и микроскопировали с использованием фильтра 43НЕ. В пермеабилзированных клетках ядра дают флуоресцентный сигнал в оранжевом спектре.

Ингибиторы. Концентрации и время инкубации для ингибиторов подбирали опытным путём. Использовали следующие ингибиторы (в скобках приведены выбранные условия постановки экспериментов): 1) натамицин (концентрация 80 мкМ, время инкубации 30 мин) — необратимо связывается с эргостерином, влияет на кавеолин/RAFT-зависимый эндоцитоз (здесь используем термин “липидно-доменный эндоцитоз”); 2) диназор (Sigma, США; концентрация 100 мкМ, время инкубации 30 мин) — ингибитор разных видов динамина, который участвует в отщеплении эндоцитозной везикулы от цитоплазматической мембраны; 3) пит-стоп 2 (Abscam, США; концентрация 7,5 мкМ, время инкубации 15 мин) — препятствует закреплению клатрина на поверхности первичной везикулы; 4) нокодазол (Santa Cruz Biotechnology, США, концентрации 10 мкг/мл, время инкубации 30 мин) — связывается с тубулином, препятствуя полимеризации микротрубочек; 5) монодансилкадаверин (Sigma, США; концентрация 300 мкМ, время инкубации 60 мин) — действует на клатринзависимый путь эндоцитоза у животных; 6) латрункулин А (Santa Cruz Biotechnology, США; концентрации 0,6 и 2 мкМ, время инкубации 20 мин) — ингибитор сборки актиновых филаментов. Проводили преинкубацию агаровых блоков с мицелием *R. solani* в растворе питательной среды с ингибитором (опыт) или без него (контроль), отмывали дважды от ингибиторов и окрашивали флуоресцентом AM4-64 по методу, описанному выше.

Действие каждого потенциального ингибитора проверяли в трёх независимых экспериментах. В полученных с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss, Германия) фотографиях оценивали и классифицировали фенотипы 50–150 клеток мицелия гриба для каждого варианта наблюдений (опыт и контроль в интервале 0–15 мин, опыт и контроль 15–30 мин) для каждого из шести ингибиторов. Для каждого ингибитора в трёх независимых экспериментах анализировали одинаковое количество клеток во всех вариантах наблюдений (стандарт-

ное требование для статистического критерия хи-квадрат).

Диаграммы распределения наблюдений разных стадий эндоцитоза (ввели четыре ранга от 0 до 3, соответствующие разным клеточным фенотипам и, соответственно, стадиям эндоцитоза, см. Результаты) строили в программе Microsoft Excel. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 6 (StatSoft). Достоверность различий в экспериментах проверяли с использованием критерия хи-квадрат Пирсона. Различие между двумя распределениями считали статистически достоверным при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Наблюдение за перемещением флуоресцентного зонда AM4-64 в клетках мицелия *R. solani* в течение 40 мин от цитоплазматической мембраны к мембранам везикул, эндосом и вакуолей позволило нам разделить общий ход эндоцитоза *R. solani* на четыре дискретные и последовательные стадии (рис. 1). Стадия 0 — сигнал локализован только в цитоплазматической мембране. Стадия 1 — флуоресцентно окрашенные пристеночные везикулы предположительно — первичные эндоцитозные везикулы; возможно, флуоресцируют только макропиноцитозные везикулы (макропиносомы), а сигнал от микропиноцитозных везикул слишком слабый и сливается с сигналом от плазмалеммы. Стадия 2 — сигнал локализован в более крупных, чем на стадии 1, эндомембранных структурах, распределённых как пристеночно, так и в цитоплазме; предположительно на данной стадии маркированы везикулы, эндосомы и маленькие вакуоли, цитоплазматическая мембрана уже не флуоресцирует или флуоресцирует слабо. Стадия 3 — окрашены вакуоли разного размера в цитоплазме, цитоплазматическая мембрана практически не окрашена.

Конечно, такая дискретизация непрерывного процесса, которым является эндоцитоз, достаточно субъективна, но позволяет количественно оценить и статистически обработать характер и степень воздействия ингибиторов на эндоцитоз *R. solani*. На рис. 2 представлена динамика эндоцитоза у *R. solani* (в двух временных интервалах 0–15 мин и 15–30 мин) с преинкубацией препаратов в растворе с ингибитором (опытные наблюдения, тёмные столбики диаграмм) или в питательной среде (контрольные наблюдения, светлые столбики).

На рис. 2 приведены диаграммы с использованием усреднённых между тремя независимыми биологическими экспериментами данных. Такой способ представления результатов может показаться не совсем корректным, поскольку эндоцитоз — сложный процесс со множеством путей реализации, а такие биологические процессы всегда дают большие дисперсии при попытке их количественно оценить и усреднить. Действительно, разброс величины стандартного отклонения (планки погреш-

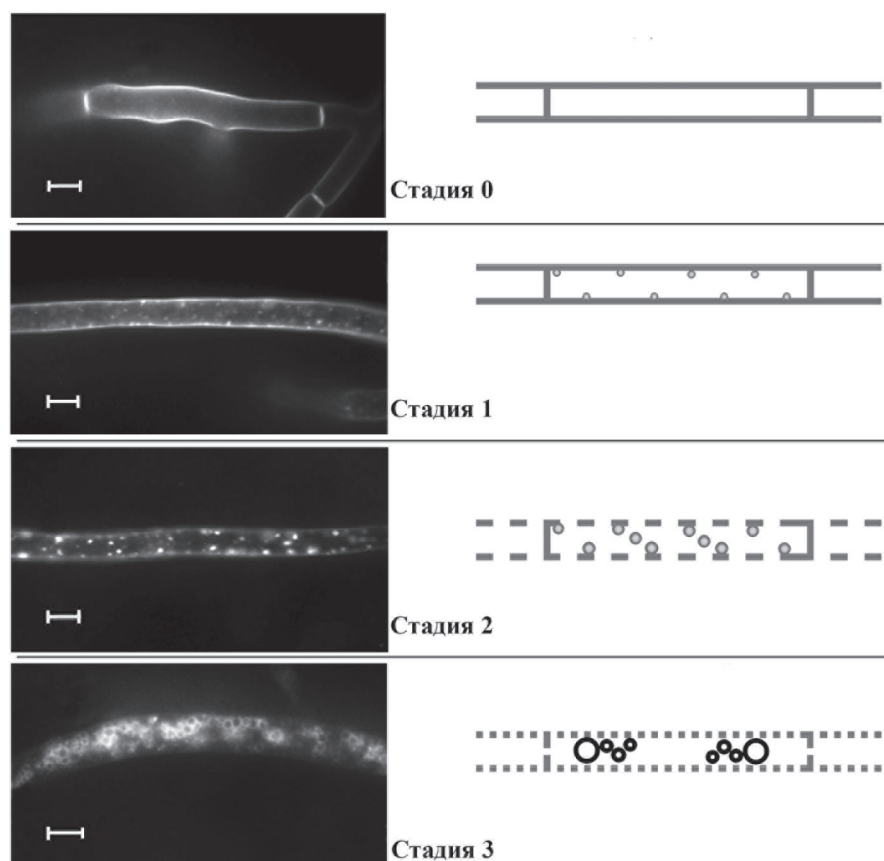


Рис. 1. Иллюстрации распределения флуоресцентного сигнала AM4-64 в клетках *R. solani*: фотографии (слева) и соответствующие им схемы (справа), демонстрирующие принцип разбиения эндоцитоза в клетках гриба на четыре последовательные дискретные стадии (от стадии 0 до стадии 3). Масштабные отрезки соответствуют 10 мкм. Объяснения в тексте

ностей на рис. 2) в ряде опытов достаточно значителен. Однако усредненные диаграммы оказались наиболее показательными в демонстрации тенденций в действии разных ингибиторов на динамику эндоцитоза *R. solani*, поэтому вместо приведения в качестве иллюстрации распределений одного из биологических повторов, наиболее отражающего общую тенденцию, мы использовали усреднённые данные.

По характеру воздействия на эндоцитоз *R. solani* мы разделили используемые ингибиторы на четыре группы. Ингибиторы первой группы — натамицин, диназор, питстоп 2 — значительно подавляют эндоцитоз в клетках изучаемого гриба (рис. 2, А–В). Для данной группы ингибиторов характерно слабое отличие между опытными наблюдениями в первые 15 мин и в интервале 15–30 мин. Другими словами, в опытных препаратах AM4-64 в начале наблюдений включается в цитоплазматическую мембрану (стадия 0), формируется обычное для ранней стадии 1 количество первичных везикул, но дальнейшее отшнуровывание везикул и передача метки в эндосомы и вакуоли сильно замедляются (но не супрессируются полностью). Также не происходит формирование новых первичных везикул сверх тех, которые образовались в самом начале наблюдения. В итоге эндоцитоз почти останавливается на стадиях 0 и 1 с доминированием стадии 0.

Натамицин (рис. 2, А) — полиеновый противогрибный антибиотик. Как и другие полиеновые антибиотики, нистатин и флипидин, он необратимо связывается со стеринами цитоплазматической мембраны, подавляя кавеолы/липидно-доменный эндоцитоз [4, 19]. Данная группа антибиотиков вызывает пермеабиллизацию клеток грибов, на чём и основано их фунгицидное действие, поэтому для ингибирования эндоцитоза используют их низкие концентрации. Мы опытным путём подобрали рабочую концентрацию натамицина 80 мкМ. Превышение данной концентрации вызывает появление пермеабиллизированных клеток в препаратах *R. solani* (пермеабиллизацию можно выявить и по появлению стадии 3 сразу после начала наблюдений, и по тесту с йодидом пропидия). Во всех трёх независимых экспериментах и в усреднённых данных распределения опытных и контрольных наблюдений в интервале 15–30 мин достоверно различаются. Тогда как статистических различий между опытом и контролем в первые 15 мин, и опытами 0–15 мин и 15–30 мин в усреднённых данных нет.

Диназор, ингибитор динамина, в концентрации 100 мкМ оказывает, в целом, схожее с натамицином действие на эндоцитоз *R. solani* (рис. 2, Б). Динамин — белок, участвующий в отделении первичной эндоцитарной везикулы от плазмалеммы

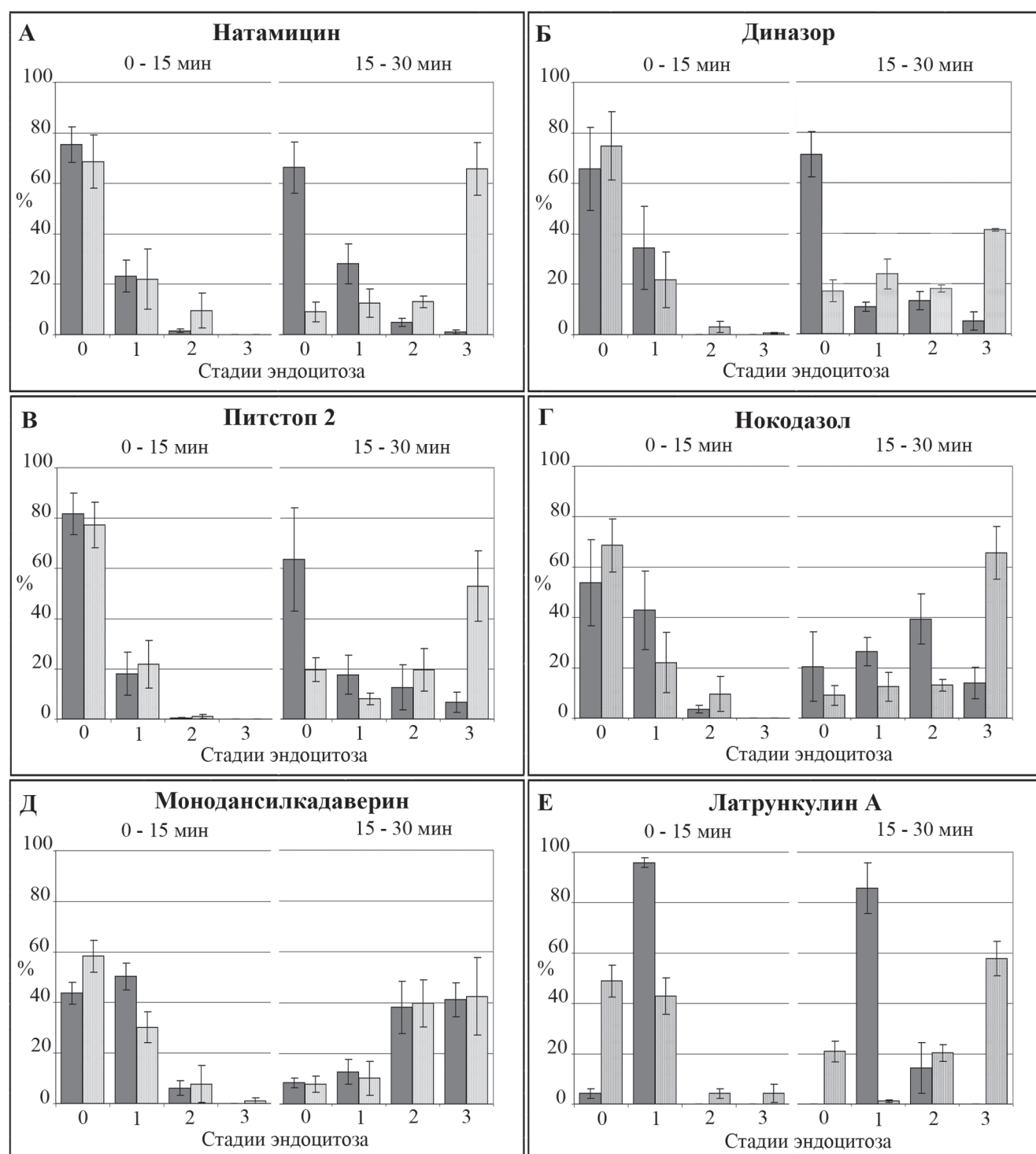


Рис. 2. Диаграммы, отражающие действие шести разных ингибиторов на эндоцитоз *R. solani*. Тёмные столбики диаграмм соответствуют частотам встречаемости (в %) в препаратах клеток, соответствующих каждой из четырёх стадий эндоцитоза в опытных наблюдениях (мицелий обработан соответствующим ингибитором). Светлые столбики — то же для контрольных наблюдений. Каждая диаграмма состоит из двух частей — левая часть отражает распределения наблюдений во временном интервале 0–15 мин; правая — 15–30 мин. Диаграммы построены с использованием усреднённых данных, полученных в трёх независимых экспериментах. Планки погрешностей соответствуют величине стандартного отклонения

в некоторых типах эндоцитоза [9]. Согласно обзорной работе [20], у животных динамин так или иначе принимает участие в шести из десяти типов эндоцитоза. Как и в случае натамицина, во всех экспериментах распределения опытных и контрольных наблюдений в интервале 15–30 мин статистически различны. Но в отличие от натамицина

у диназора опыты 0–15 мин и 15–30 мин согласно критерию хи-квадрата также имеют разные распределения. Последнее может быть связано с несколько меньшим ингибиторным эффектом диназора относительно натамицина: на диаграммах (рис. 2, А и Б) видно, что стадии 2 и 3 в случае диназора более выражены, чем у натамицина — часть

сформированных первичных везикул (стадия 1) все же транспортируются внутрь клетки.

Питстоп 2 (рис. 2, В) — современный высокоэффективный ингибитор, разработанный медицинскими исследователями, в том числе для клинического применения. Питстоп 2 взаимодействует с одним из сайтов связывания N-концевого домена тяжёлой цепи клатрина и препятствует прикреплению клатрина к адапторным белкам, например, к амфифизину [21]. Таким образом, питстоп 2 является ингибитором клатрин-зависимых путей эндоцитоза. Производитель (Abcam) указывает, что превышение определенной концентрации ингибитора приводит к множественным побочным действиям в клетке животных. Мы выяснили, что рекомендуемые производителем рабочие концентрации 20–25 мкМ для клеток животных являются слишком высокими для *R. solani*. При таких концентрациях повышается доля повреждённых грибных клеток. Максимальная концентрация питстопа 2, при которой клетки гриба остаются интактными, — 7,5 мкМ. Абсолютно во всех экспериментах с питстопом 2 нет статистической разницы между опытными и контрольными наблюдениями в первые 15 мин — ингибитор совершенно не действует на раннее формирование первичных везикул. Опыты 0–15 и 15–30 мин, а также опыты и контроли 15–30 мин значимо статистически различаются. Последнее вместе с внешним видом диаграмм указывает на то, что питстоп 2 по характеру воздействия в своей группе ингибиторов ближе к диназору, чем к натамицину.

Если бы действие натамицина, диназора и питстопа 2 на эндоцитоз *R. solani* было специфическим, т.е. они влияли бы только на свои канонические мишени (эргостерин, динамин и клатрин соответственно), то натамицин, вероятно всего, препятствовал бы формированию первичных везикул (диназор и питстоп 2, возможно, не влияют на сам процесс впячивания везикулы). Иначе говоря, с самого начала наблюдений стадия 1 была бы менее представлена хотя бы в случае одного из двух обсуждаемых ингибиторов. Но наши результаты демонстрируют схожесть контролей и опытов в интервале 0–15 мин, а у питстопа 2 они еще и статистически одинаковы с высоким уровнем достоверности. Кроме того, если действие на эндоцитоз диназора и питстопа 2 могут значительно пересекаться (динамин задействован в клатрин-зависимом эндоцитозе, но динамин используют и некоторые не клатриновые типы эндоцитоза), то натамицин и питстоп 2/диназор по определению ингибируют совершенно разные пути эндоцитоза. Отсюда следует, что каждый из названных ингибиторов теоретически должен блокировать лишь часть эндоцитозной активности гриба. При нашем методе количественной оценки динамики эндоцитоза с использованием ранжирования фенотипов целых клеток, скорее всего, исключение отдельных путей эндоцитоза на фоне работающих

других не привело бы к такому значительному снижению встречаемости стадий 2 и 3.

Можно предложить несколько гипотез, объясняющих механизмы действия натамицина, диназора и питстопа 2. Первая гипотеза — изучаемые ингибиторы оказывают неспецифическое действие на клетки *R. solani*. Неспецифическое воздействие ингибиторов может быть множественным и даже возможно влияние в целом, например, на катаболизм клетки, но всё же первым кандидатом на роль неспецифической мишени является актин. Широкое участие актина в эндоцитозных процессах показано во многих научных работах: в обзорной публикации Г.Дж. Доэрти и Х.Т. МакМахон [20] для шести путей эндоцитоза из десяти у животных отмечено участие актина; актиновые филаменты участвуют в формировании эндоцитарных везикул и в их транспорте к ранним эндосомам у дрожжей [22]; цитохалазин Д (ингибитор сборки F-актина) подавляет эндоцитоз у ксилотрофного гриба *Lentinula edodes* [12] и т.д. Также известно, что актин принимает непосредственное участие в образовании макропиносом [20], а мы выше указывали, что, возможно, на стадии 1 окрашены преимущественно именно макропиносомы.

Для диназора и полиеновых антибиотиков показано их влияние на актин клетки [4, 19]. Например, в случае полиеновых антибиотиков предполагают, что они нарушают связь между актином и плазмалеммой [19]. Возможно, поэтому натамицин полностью не препятствует формированию первичных везикул, но блокирует их транспорт к эндосомам.

Для питстопа 2 у нас нет информации относительно его воздействия на актин, однако даже для данного ингибитора современного поколения установлены различные побочные эффекты на живую клетку, в том числе влияние на клатрин-независимый эндоцитоз, на вязкость мембран и т.д. [4, 23].

Вторая гипотеза, объясняющая значительное и схожее влияние ингибиторов первой группы на эндоцитоз *R. solani*, — реакция фитопатогенного гриба на ингибиторы в виде снижения активности эндоцитоза, что может являться защитным механизмом против цитотоксических веществ, выделяемых растением-хозяином или другими микроорганизмами. Возможно, гриб предотвращает вход в свои клетки молекул извне, “почувствовав” в окружающей среде физиологически активные вещества, влияющие на грибной метаболизм. Второй гипотезе противоречат наши неопубликованные данные, полученные при инкубации культуры *R. solani* в присутствии антибиотиков — бензилпенициллина и гризеофульвина. Данные антибиотики не ингибировали эндоцитоз, хотя подавляли накопление биомассы мицелия *R. solani*. Тем не менее, полностью отбрасывать обсуждаемую гипотезу не стоит.

Ко второй группе ингибиторов эндоцитоза у *R. solani* мы отнесли нокодазол (рис. 2, Г). Во всех

биологических повторах распределения опытов и контролей 15–30 мин, а также опытов 0–15 мин и опытов 15–30 мин, статистически различаются. Из диаграммы на рис. 2, *Г* видно, что в начале наблюдений нокодазол, как и ингибиторы первой группы, мало влияет на эндоцитоз, но в интервале 15–30 мин он начинает оказывать ингибиторное воздействие. Однако, если натамицин, диназор и питстоп 2 препятствуют переходу стадий 0 и 1 в стадии 2 и 3, то нокодазол замедляет эндоцитоз *R. solani* на этапе перехода стадии 2 в стадию 3. Другими словами, нокодазол частично подавляет транспорт эндосом к вакуолям, либо слияние эндосом, макропиносом или маленьких вакуолей в более крупные структуры, но не влияет на формирование первичных везикул и их транспорт к эндосомам.

Нокодазол является эффективным обратимым деполимеризатором микротрубочек. Полученный нами результат согласуется с данными, показанными на клетках животных и даже для отдельных других мицелиальных грибов — принято считать, что, как минимум, ранние стадии эндоцитоза не зависят от тубулинового цитоскелета [12]. Известно, что, по крайней мере, в верхушечных клетках грибов ранние эндосомы активно двунаправленно перемещаются с помощью микротрубочек [3, 24]. Более крупные эндомембранные структуры (поздние эндосомы, вакуоли, макропиносомы и т.д.), скорее всего, особенно на дальние расстояния, транспортируются с участием микротрубочкового цитоскелета [18]. Таким образом, нарушение сборки микротрубочек приводит к замедлению внутриклеточного транспорта эндосом и вакуолей.

В третью группу по типу действия на эндоцитоз *R. solani* попал монодансилкадаверин. Данное вещество используют как ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза, однако известны проявления его активности в отношении макропиноцитоза, фагоцитоза и актина [4, 19]. В концентрациях ниже 100 мкМ монодансилкадаверин применяют для относительно специфического флуоресцентного мечения кислых и аутофагических вакуолей, а также аутофагосом [25]. На рис. 2, *Д* видно, что характер распределения в диаграммах как в интервале 0–15 мин, так и 15–30 мин между опытными и контрольными наблюдениями схожи. Статистически нет различий в интервале 0–15 мин в одном из биологических экспериментов, а в интервале 15–30 мин — в одном эксперименте и в усреднённых данных. Но даже в опытах со статистическим различием распределения в целом похожи. Отсюда можно сделать вывод о том, что монодансилкадаверин не оказывает выраженного воздействия на эндоцитоз *R. solani*. Поскольку мы использовали в работе максимальную концентрацию испытуемого вещества (300 мкМ), приводимую в научной литературе, и не обнаружили даже слабого влияния монодансилкадаверина на динамику поглощения грибом АМ4-64, то следует полагать, что эндоцитоз у грибов не чувствителен к монодансилкадаверину.

Латрункулин А, ингибитор сборки актиновых филаментов, отнесенный нами к последней четвёртой группе по типу воздействия, введён в работу для установления непосредственной зависимости общего грибного эндоцитоза от работы актинового цитоскелета. Однако несмотря на то, что латрункулин А другие исследователи применяли в работе с грибами [16, 17], мы обнаружили, что действие данного вещества на клетки *R. solani* носит, скорее, специфический повреждающий характер. При обработке мицелия *R. solani* латрункулином А в концентрациях ниже 1 мкМ воздействие его на гриб не имеет чётких закономерностей — так, при работе с латрункулином в концентрации 0,6 мкМ мы получили неоднозначные результаты в разных биологических экспериментах. Концентрации выше 1 мкМ приводят к практически полному доминированию стадии 1 в обоих временных интервалах (рис 2, *Е*, диаграммы построены для 2 мкМ концентрации латрункулина). Иными словами, обработка 2 мкМ латрункулином мицелия *R. solani* вызывает быструю интернализацию значительной поверхности плазмалеммы — цитоплазматическая мембрана большинства клеток формирует множество везикул, но дальнейшее их развитие и транспорт оказываются заблокированы. Причём речь идёт не просто об ингибировании эндоцитоза при переходе от 1 ко 2 стадии, здесь уже в интервале 0–15 мин нет стадии 0 и доминирует стадия 1, а значит, происходит своеобразное специфическое нарушение целостности клетки и цитоплазматической мембраны. Анализ обработанных латрункулином клеток с помощью электронной микроскопии показал (данные не представлены), что такие клетки теряют свою обычную форму, а клеточная стенка оказывается повреждённой во многих местах. Повреждения клеточной стенки, конечно, вряд ли обусловлены прямым действием латрункулина А. Возможно, распад на мономеры филаментов актинового кортекса, вызывает резкое изменение внутреннего давления клетки на стенку. Последнее может снижать прочность клеточной стенки в определенных участках, и в процессе инфильтрации смолой при приготовлении ТЭМ-препаратов данные участки повреждаются. Возможно, именно распад пристеночных структур актина и филаментов актина приводит к наблюдаемой нами массивной интернализации плазмалеммы. Принято считать, что макропиносомы возникают за счёт образования выростов плазмалеммы при участии актиновых филаментов. Наши результаты располагают к выдвижению интересной гипотезы — может быть, некоторые типы макропиносом возникают не за счёт цитоскелетной поддержки актином, а, наоборот, за счёт локальной разборки актинового кортекса, что приводит при определённых условиях к ослаблению натяжения участка плазмалеммы и её локальной интернализации.

На основании полученных нами результатов четыре из шести ингибиторов, используемых для

подавления эндоцитоза у животных и человека, оказывают супрессирующее действие на эндоцитоз гетеробазидиального гриба *R. solani*, что указывает на консервативную природу отдельных механизмов эндоцитоза у исследованного гриба и, возможно, у мицелиальных грибов в целом. В пользу такой консервативности говорит и то, что деполимеризация микротрубочкового цитоскелета у *R. solani* замедляет только поздние стадии, не влияя на ранние стадии эндоцитоза. Однако характер влияния на динамику включения внутрь клеток метки АМ4-64 у таких ингибиторов как натамицин, диназор и питстоп 2 чётко указывает на неоднозначность интерпретации их влияния на грибной эндоцитоз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goode B.L., Eskin J.A., Wendland B. Actin and endocytosis in budding yeast // *Genetics*. 2015. Vol. 199. N 2. P. 315–358.
2. Tokarev A.A., Alfonso A., Segev N. Overview of intracellular compartments and trafficking pathways // *Trafficking inside cells: Pathways, mechanisms and regulation* / Ed. N. Segev. N.Y.: Springer, 2009. P. 3–14.
3. Penalva M.A. Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward // *Curr. Opin. Microbiol.* 2010. Vol. 13. N 6. P. 684–692.
4. Dutta D., Donaldson J.G. Search for inhibitors of endocytosis // *Cell Logist.* 2012. Vol. 2. N 4. P. 203–208.
5. Fuchs U., Steinberg G. Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis* // *Protoplasma*. 2005. Vol. 226. N 1–2. P. 75–80.
6. Toshima J.Y., Toshima J., Kaksonen M., Martin A.C., King D.S., Drubin D.G. Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103. N 15. P. 5793–5798.
7. Weinberg J., Drubin D.G. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast // *Trends Cell. Biol.* 2012. Vol. 22. N 1. P. 1–13.
8. Epp E., Nazarova E., Regan H., Douglas L.M., Konopka J.B., Vogel J., Whiteway M. Clathrin- and Arp2/3-independent endocytosis in the fungal pathogen *Candida albicans* // *MBio*. 2013. Vol. 4. N 5. e00476-13.
9. Wang D., Sletto J., Tenay B., Kim K. Yeast dynamin implicated in endocytic scission and the disassembly of endocytic components // *Commun. Integr. Biol.* 2011. Vol. 4. N 2. P. 178–181.
10. Prosser D.C., Drivas T.G., Maldonado-Baez L., Wendland B. Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin // *J. Cell Biol.* 2011. Vol. 195. N 4. P. 657–671.
11. Fischer-Parton S., Parton R.M., Hickey P.C., Dijksterhuis J., Atkinson H.A., Read N.D. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae // *J. Microsc.* 2000. Vol. 198. N 3. P. 246–259.
12. Lee M.T., Szeto C.Y., Ng T.P., Kwan H.S. Endocytosis in the shiitake mushroom *Lentinula edodes* and involvement of GTPase LeRAB7 // *Eukaryot. Cell.* 2007. Vol. 6. N 12. P. 2406–2418.
13. Takeshita N., Diallinas G., Fischer R. The role of flo-tillin FloA and stomatin StoA in the maintenance of apical sterol-rich membrane domains and polarity in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* // *Mol. Microbiol.* 2012. Vol. 83. N 6. P. 1136–1152.
14. Masuo K., Higuchi Y., Kikuma T., Arioka M., Kitamoto K. Functional analysis of Abp1p-interacting proteins involved in endocytosis of the MCC component in *Aspergillus oryzae* // *Fungal Genet. Biol.* 2013. Vol. 56. P. 125–134.
15. Straube A., Brill M., Oakey B.R., Horio T., Steinberg G. Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis* // *Mol. Biol. Cell.* 2003. Vol. 14. N 2. P. 642–657.
16. Walther A., Wendland J. Apical localization of actin patches and vacuolar dynamics in *Ashbya gossypii* depend on the WASP homolog Wal1p // *J. Cell Sci.* 2004. Vol. 117. N 21. P. 4947–4958.
17. Aghamohammadzadeh S., Ayscough K.R. Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis // *Nat. Cell Biol.* 2009. Vol. 11. N 8. P. 1039–1042.
18. Schuster M., Lipowsky R., Assmann M.-A., Lenz P., Steinberg G. Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108. N 9. P. 3618–3623.
19. Ivanov A.I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? // *Exocytosis and endocytosis. Methods Mol. Biol.* Vol. 440. / Ed. A.I. Ivanov. N.Y.: Humana press, 2008. P. 15–33.
20. Doherty G.J., McMahon H.T. Mechanisms of endocytosis // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Vol. 78. P. 857–902.
21. Willox A.K., Sahraoui Y.M., Royle S.J. Non-specificity of Pitstop 2 in clathrin-mediated endocytosis // *Biol. Open*. 2014. Vol. 3. N 5. P. 326–331.
22. Girao H., Geli M.I., Idrissi F.Z. Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals // *FEBS Lett.* 2008. Vol. 582. N 14. P. 2112–2119.
23. von Kleist L., Stahlschmidt W., Bulut H. et al. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition // *Cell*. 2011. Vol. 146. N 3. P. 471–484.
24. Steinberg G. Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi // *Curr. Opin. Microbiol.* 2014. Vol. 20. N 100. P. 10–18.
25. Niemann A., Baltes J., Elsasser H.P. Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine // *J. Histochem. Cytochem.* 2001. Vol. 49. N 2. P. 177–185.

Поступила в редакцию
29.03.2017
Принята в печать
15.06.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

ENDOCYTOSIS AND ITS INHIBITORS IN BASIDIOMYCETOUS FUNGUS
*RHIZOCTONIA SOLANI**O.V. Kamzolkina*^{1,*}, *M.A. Kiselica*¹, *O.A. Kudryavtseva*¹, *O.V. Shtaer*¹, *I.S. Mazheika*^{1,2}¹*Department of Mycology and Algology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*²*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences,
ul. Gubkina 3, Moscow, 119333, Russia***e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru*

Endocytosis is a complex process of absorption from the external environment and further distribution within the cell of soluble substances, macromolecules, microparticles, and etc. which occurs with the participation of vesicles formed by the cytoplasmic membrane. Endocytosis in the cells of animals and humans is actively and successfully explored. Thus, the classification of this process in animals, based only on the characteristics of the formation of primary vesicles, includes up to ten different ways of endocytosis. Modern knowledge of endocytosis in mycelial fungi is not so extensive, so its study in this group of organisms is an actual and promising direction in fundamental and applied mycology. In the present work, we investigated the effect of six different inhibitors, acting both on the assembly of actin/tubulin cytoskeletons and on the formation of different types of endocytosis, on the dynamics of endocytosis in the phytopathogenic heterobasidial fungus *Rhizoctonia solani*. The effect of inhibitors was evaluated by microscopic analysis of the mycelial cell absorption of a fluorescent marker of endocytosis AM4-64. As a result of the study, four types of inhibitor effects on *R. solani* endocytosis were revealed: from complete absence of action to severe suppression of different stages of fungal endocytosis. Four of the six inhibitors, used to inhibit endocytosis in animals and humans, have a suppressing effect on the endocytosis of the heterobasidial fungus *R. solani*, which indicates the conservative nature of individual mechanisms of endocytosis in the examined fungus and, possibly, in mycelial fungi as a whole. Various hypotheses on the principles of the action of the studied inhibitors on the endocytosis activity of fungi are proposed.

Keywords: *endocytosis in filamentous fungi, AM4-64 fluorescent, mechanisms of endocytosis, inhibitory analysis, cytoskeleton, macropinocytosis, Rhizoctonia solani*

Сведения об авторах

Камзолкина Ольга Владимировна — докт. биол. наук, проф. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru

Киселица Марина Алексеевна — студентка кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: kiselicam@mail.ru

Кудрявцева Ольга Александровна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: for-ol-ga@yandex.ru

Штаер Оксана Васильевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: sht-oks@yandex.ru

Мажейка Игорь Стасисович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: mycol@yandex.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.263

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И УТОЧНЕНИЕ
ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СТАТУСА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
РОДА *PARIETOCHLORIS* (TREBOUXIOPHYCEAE) КОЛЛЕКЦИИ CALUК.А. Шибзухова^{1,*}, О.В. Гаврилова², О.Б. Чивкунова¹,
Р.А. Сидоров³, А.Е. Соловченко¹, Е.С. Лобакова¹¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²кафедра микробиологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9;³лаборатория липидного обмена, Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН,
Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

*e-mail: karina_shibzuhova@rambler.ru

Проведены морфологическое, биохимическое и молекулярно-генетическое исследование зелёных микроводорослей из коллекции цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей Санкт-Петербургского государственного университета (CALU), предположительно принадлежащих к роду *Parietochloris*, с целью оценки биотехнологического потенциала и уточнения филогенетического положения. Определено, что исследованные штаммы имеют близкое родство к двум родам из разных классов — *Lobosphaera* (Trebouxiaceae) и *Deasonia* (Actinochloridaceae) — и могут представлять биотехнологический интерес в качестве продуцентов ценных полиненасыщенных жирных кислот, в особенности арахидоновой, линолевой и α -линоленовой.

Ключевые слова: зелёные микроводоросли, *Parietochloris*, *Lobosphaera*, *Deasonia*, арахидоновая кислота, молекулярная идентификация

В последние годы наблюдается рост интереса исследователей к микроводорослям (МВ) близкородственных родов *Parietochloris* и *Lobosphaera*, обусловленный их способностью накапливать рекордные количества ω 6-полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), таких как докозагексаеновая (ДГК, С22:6), эйкозапентаеновая (ЭПК, С20:5) и, в особенности, арахидоновая (АК, С20:4). Последняя играет одну из ключевых ролей в синтезе важной группы биогенных физиологически активных веществ, эйкозаноидов, в организме человека [1]. Накопление в клетках МВ жирных кислот (ЖК) регулируется целым рядом факторов окружающей среды и является, как правило, стрессовым для их роста. В качестве стрессовых факторов выступают изменения элементного состава минерального питания (в частности, дефицит азота в питательной среде), низкая температура и высокая интенсивность освещения [2]. Характер ответа МВ на стрессовые факторы и накопления в их клетках ПНЖК, как правило, являются штамм-специфичными.

Зелёная МВ *Parietochloris incisa* (H. Reisigl) S.Watanabe на сегодняшний день представляет собой богатейший природный растительный источник АК [2]. В связи с этим продолжается поиск новых штаммов МВ данного вида в природе и существующих коллекциях, а также подбор условий их культивирования для достижения максимального выхода АК [3].

Систематическое положение МВ данного вида в последнее время подвергается ревизии из-за противоречий между результатами молекулярной идентификации и литературных данных по таксономии [3].

В этой связи целью данной работы было уточнение таксономического статуса и оценка биотехнологического потенциала штаммов МВ, предположительно относящихся к роду *Parietochloris*, из коллекции цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей Санкт-Петербургского государственного университета (CALU).

Материалы и методы исследования

Культуры шести штаммов зелёных МВ рода *Parietochloris* из коллекции CALU были предоставлены ресурсным центром “Культивирование микроорганизмов” научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Штаммы *P. pseudoalveolaris* (Deason et Bold) CALU 924 и CALU 925 были выделены из почвенных проб Дальнего Востока России, штаммы *Parietochloris* sp. CALU 934 и 1488 — из почвенных проб берега озера в посёлке Гвардейское (Ленинградская область, Россия), штаммы *P. bilobata* (Vinatzer) V. Andr. comb. nov. CALU 1497 и CALU 855 — из почвенных проб разнотравного луга (Овручский район, Житомирская область, Украина).

Альгологически чистые культуры МВ выращивали в конических колбах Эрленмейера на азот-

содержащей (N+) и безазотной (N-) средах Громова [4] при температурах +22°C и +10°C при постоянном освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР/м²·с в течение 7 сут (ФАР – фотосинтетически активная радиация). Культивирование при низкой температуре и отсутствии в среде культивирования азота моделировало рост МВ в условиях стресса.

Спектры поглощения суспензий и экстрактов пигментов регистрировали на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Жирнокислотный состав суммарных липидов анализировали методом газовой хроматографии масс-спектрометрии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США), соединенного с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975C (Agilent Technologies, США) [5]. Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах (вес.%) от суммарного содержания в пробе, коэффициент ненасыщенности ЖК определяли как описано ранее [6]. Коэффициент ненасыщенности ЖК рассчитывали по формуле:

$$K = \Sigma UFA / \Sigma SFA,$$

где K – коэффициент ненасыщенности, ΣUFA – суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот (вес.%), ΣSFA – суммарное содержание насыщенных жирных кислот (вес.%) в пробе.

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили путём анализа нуклеотидной последовательности фрагмента ядерного рибосомального кластера генов, включающего последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, а также ген 5.8S рРНК, с использованием праймеров NS1 и ITS2 [7]. Поиск ближайших гомологов полученных последовательностей проводили в базе данных NCBI GeneBank с помощью программы BLAST [8]. Построение филогенетических деревьев осуществляли при помощи алгоритма ближайших соседей (NJ) [9]. Достоверность топологии оценивалась при помощи bootstrap-теста (1 000 повторностей) [10].

Подготовка и исследование образцов с помощью растрового (сканирующего) и просвечивающего (трансмиссионного) микроскопов проводили согласно модифицированной методике, описанной ранее [11].

Результаты и обсуждение

Исследованные штаммы МВ были представлены в основном неподвижными одиночными сферическими вегетативными клетками диаметром 4–10 μm (CALU 924), 2–15 μm (CALU 925), 7–14 μm (CALU 1497 и CALU 855), до 20 μm (CALU 934 и CALU 1488). В жизненном цикле большинства штаммов выявлены подвижные зооспоры с двумя изоконтными жгутиками на апикальном конце клетки и неподвижные автоспорангии,

содержащие в среднем восемь дочерних клеток. Исключением был штамм CALU 934, у которого основная жизненная форма была представлена вегетативными клетками и апланоспорами, окрашенными в зелёный и оранжевый цвет.

По данным растровой и трансмиссионной электронной микроскопии, клетки всех исследованных культур обладали толстой клеточной стенкой, состоящей, как правило, из четырёх хорошо выраженных слоёв. На её поверхности присутствовали штамм-специфичные эпиструктуры: бородавки, булабовидные выросты, тяжи. Изученные клетки МВ содержали пристенный лопастной хлоропласт, окружённый двумя мембранами и имеющий хорошо развитую систему тилакоидов в строме. У всех штаммов в хлоропластах был обнаружен крупный пиреноид с интрапиреноидными тилакоидами, окружённый крахмальными зёрнами. В цитоплазме наблюдалось накопление многочисленных липидных глобул.

Спектры поглощения суспензий клеток изученных культур имели характерную для зелёных МВ форму: они характеризовались наличием максимумов хлорофиллов a (678 и 438–440 нм) и b (плечо около 650 нм), а также плечом в диапазоне 460–490 нм, свойственным каротиноидам.

Из спектров поглощения суспензий, компенсированных на рассеяние, следует, что присутствие азота в среде культивирования не влияло на содержание каротиноидов в клетках культуры CALU 934, тогда как в клетках штаммов CALU 924, CALU 925, CALU 1497 и CALU 855 на безазотной среде их количество возрастало. При выращивании на среде (N+) штаммы CALU 924, CALU 925, в отличие от штаммов CALU 1497 и CALU 855, были чувствительными к пониженной температуре (+10°C) и реагировали на неё снижением содержания хлорофиллов.

У всех штаммов, за исключением CALU 934, главными ЖК в составе суммарных липидов были пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1), линолевая (C18:2), α-линоленовая (C18:3) и арахидоновая кислоты. В суммарных липидах клеток всех изученных штаммов присутствовала также ЭПК, однако её доля не превышала 3 вес.%.

Состав ЖК липидов клеток МВ CALU 934 значительно отличался от такового у других изученных культур. Суммарные липиды клеток данной культуры не содержали ЖК с очень длинной цепью (рис. 1, А). Главными ЖК были C₁₆-кислоты (27 вес.%), из которых 17 вес.% составляла пальмитиновая, и C₁₈-кислоты (олеиновая, линолевая, α-линоленовая), на долю которых приходилось 72 вес.%.

У штамма CALU 924 на безазотной среде значительно увеличивалось содержание АК, достигая 33 вес.%, тогда как доля C18:3 снижалась почти втрое (с 10 до 3,5 вес.%). Снижение температуры при культивировании на азотсодержащей среде индуцировало повышение доли C₁₈-кислот (олеи-

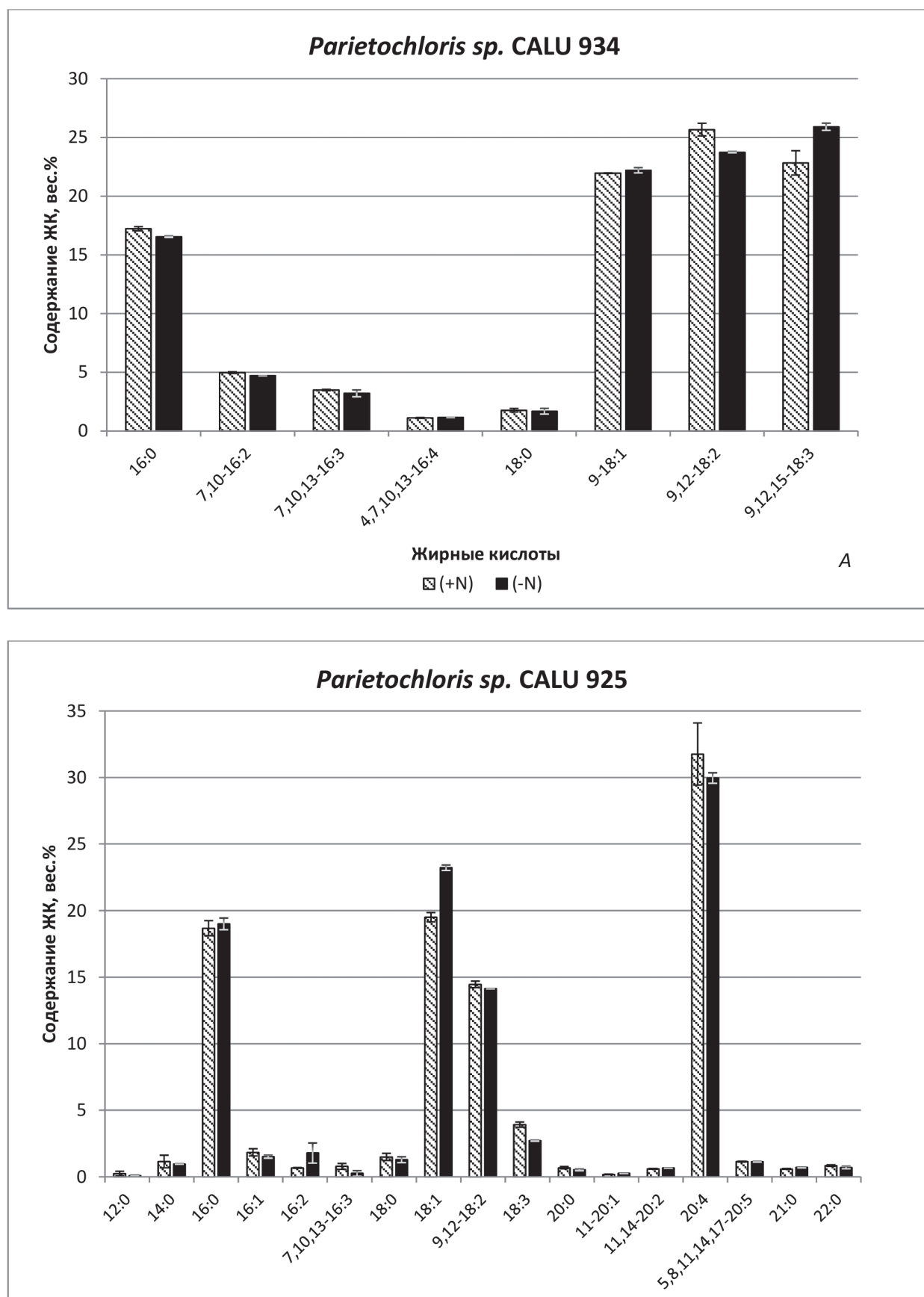
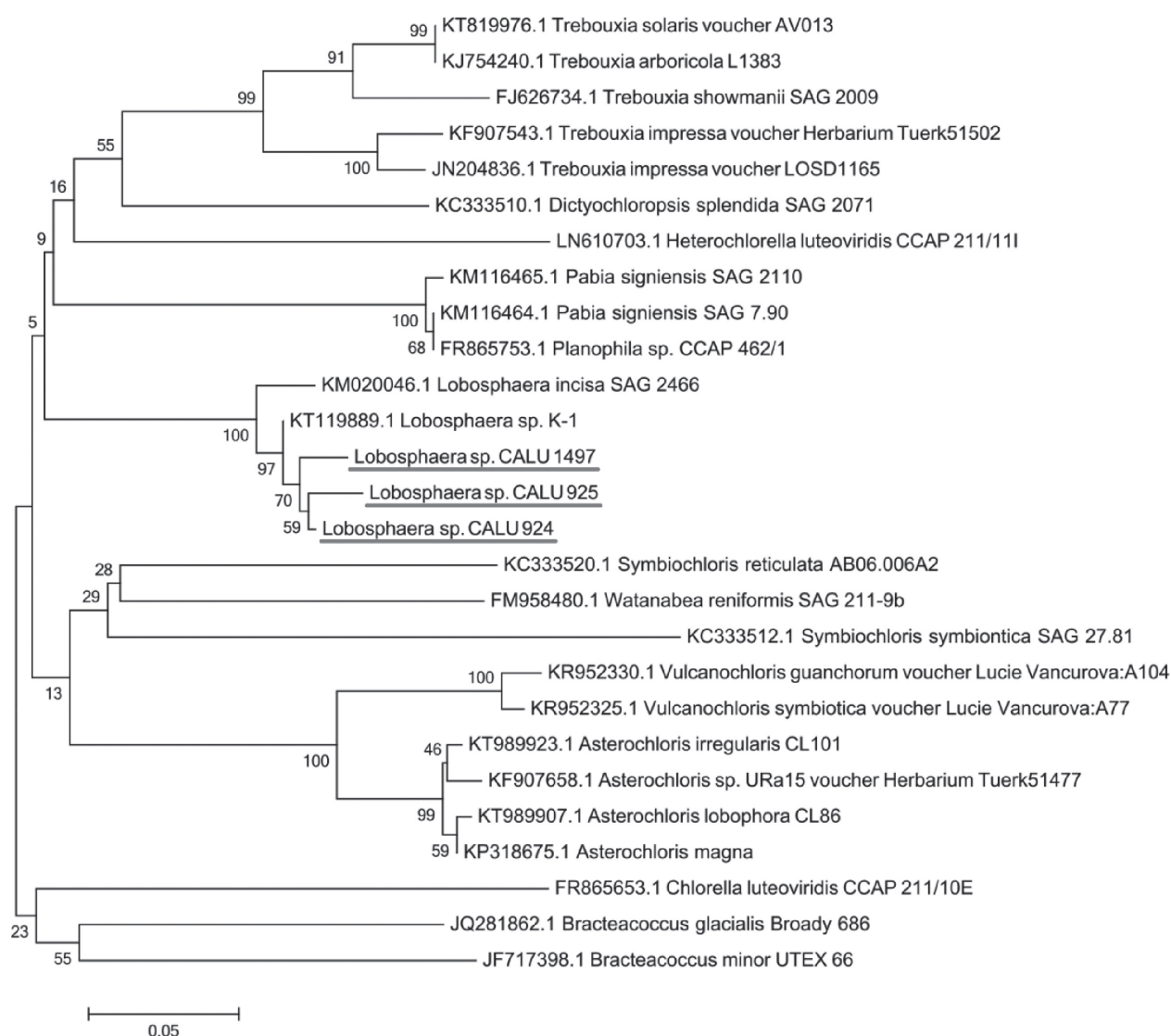
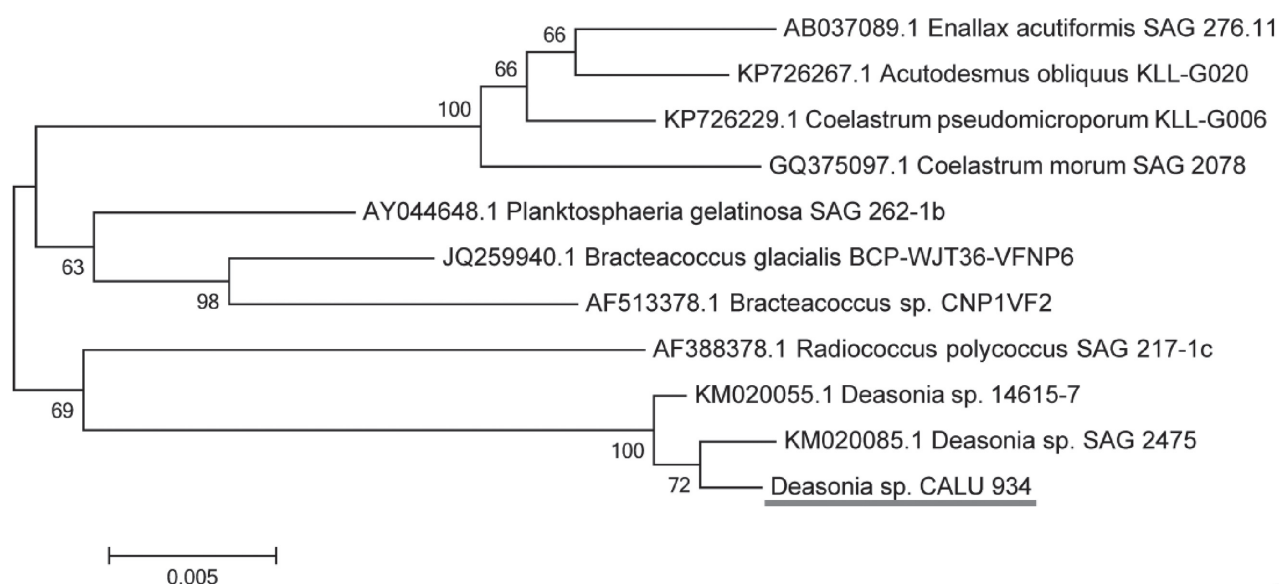


Рис. 1. Состав жирных кислот липидов в клетках штаммов *Parietochloris pseudoalveolaris* (Deason et Bold) CALU 925 (А) и *Parietochloris* sp. CALU 934 (Б), культивируемых на азотной (N+) и безазотной (N-) средах Громова



A



Б

Рис. 2. Филогенетическое положение исследованных штаммов *Lobosphaera* sp. CALU 924, 925, 1497 (А) и *Deasonia* sp. CALU 934 (Б) (подчёркнуты), определённое по результатам анализа участков нуклеотидной последовательности ITS1-5.8SpPHK-ITS2

новой и *цис*-вакценовой) (с 12 до 20 вес.%) и незначительный рост относительного содержания C20:4 и C20:5 (на 2 и 0,5 вес.%, соответственно). Вместе с тем, отмечалось повышение коэффициента ненасыщенности от 2,17 (при +22°C на (N+) среде) до 3,00 (при +10°C на (N-) среде).

МВ CALU 925 характеризовались наибольшим по сравнению с МВ CALU 924, CALU 855 и CALU 1497, исходным количеством АК, достигающим 32 вес.% от суммарного содержания ЖК, и большим разнообразием минорных ЖК с очень длинной цепью, содержание которых не превышало 4 вес.% (рис. 1, Б). Следует отметить, что у данного штамма было выявлено низкое, по сравнению с CALU 924, CALU 855 и CALU 1497, содержание C18:3, составлявшее менее 4 вес.%. Уровень АК у штамма CALU 925 увеличивался лишь на 2 вес.% при культивировании при пониженной температуре. Отсутствие азота в среде культивирования не влияло на содержание АК. При понижении температуры отмечалось незначительное увеличение коэффициента ненасыщенности ЖК.

Изменение условий культивирования МВ CALU 1497 не влияло на содержание АК (21–25 вес.%). Для данного штамма было характерно накопление C18:1 до 30–32 вес.% на безазотной среде. Коэффициент ненасыщенности ЖК возрастал с 3,4 при культивировании на полной среде и температуре +22°C до 4,5 на безазотной среде и температуре +10°C.

Полученные в ходе молекулярно-генетических исследований данные свидетельствуют о близком родстве штаммов CALU 924 и CALU 925, идентифицированных при первичном депонировании как *P. pseudoalveolaris* Watanabe et Floyd, и штаммов CALU 1497 и CALU 855, определённых как *P. bilobata* V. Andr. comb. nov., с МВ рода *Lobosphaera* (Trebouxiaceae), а штамма *P. pseudoalveolaris* Watanabe et Floyd CALU 934 с МВ рода *Deasonia* (Actinochloridaceae). На основании сравнительного анализа

нуклеотидных последовательностей фрагмента ITS1-5.8SpPHK-ITS2 МВ можно заключить, что все изученные штаммы, за исключением *Deasonia sp.* CALU 934, имеют близкое родство между собой и, вместе с тем, с МВ рода *Parietochloris* (рис. 2, А, Б).

Таким образом, в ходе исследования был проведён сравнительный морфологический, биохимический и молекулярно-генетический анализ шести штаммов МВ из коллекции CALU. Установлено, что как по молекулярно-генетическим, так и биохимическим данным штамм CALU 934 и CALU 1488 имеют родство с МВ рода *Deasonia* (Actinochloridaceae), тогда как МВ CALU 924, CALU 925, CALU 855 и CALU 1497 имеют близкое родство между собой и с МВ рода *Lobosphaera* (Trebouxiaceae). Проведена оценка биотехнологического потенциала исследованных штаммов МВ. По результатам биохимических исследований *Deasonia sp.* CALU 934 может представлять биотехнологический интерес как потенциальный продуцент C18-ПНЖК, в частности, линолевой и α -линоленовой кислот, а штаммы *Lobosphaera sp.* CALU 924 и CALU 925 – в качестве продуцентов в рекордных количествах C20-ПНЖК, в особенности АК. Особый интерес для биотехнологии может представлять штамм *Lobosphaera sp.* CALU 1497, как продуцент АК, не требующий создания особых условий культивирования для накопления в биомассе данной ПНЖК в значительных количествах.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, к.б.н. К.А. Чеканову за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований и обработке полученных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029) с использованием оборудования Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weber P.C., Fischer S., von Schacky C., Lorenz R., Strasser T. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoids formation in man // Health effects of polyunsaturated fatty acid in seafood's / Eds. A.P. Simopoulos, R.R. Kifer, and R.E. Martin. Orlando: Academic press, 1986. P. 227–238.
2. Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Cohen Z., Merzlyak M.N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa* // J. Appl. Phycol. 2008. Vol. 20. N 3. P. 245–251.
3. Dumancas G.G., Murdianti B.S., Lucas E.A. Arachidonic acid. Dietary sources and general functions. N.Y.: Nova Science Publishers, 2013. 255 pp.
4. Громов Б.В., Титова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета (CALU) // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Межвуз. сб. / Под ред. Б.В. Громова. Л.: Из-во Ленингр. ун-та, 1983. С. 3–27.
5. Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Recht L., Boussiba S. Stress induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis sp.*: Implications for non-destructive assay of total fatty acids // Mar. Biotechnol. 2011. Vol. 13. N 3. P. 527–535.
6. Ветчинникова Л.В., Серебрякова О.С., Ильинова М.К. Динамика содержания липидов и жирнокислотного состава отдельных фракций в женских сережках березы повислой (*Betula pendula* Roth) // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 74–81.
7. White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. A guide to methods and applications / Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. N.Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.

8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25. N 17. P. 3389–3402.

9. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol. 4. N 4. P. 406–425.

10. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. Vol. 39. N 4. P. 783–791.

11. Gorelova O.A., Kosevich I.A., Baulina O.I., Fedorenko T.A., Torshkheeva A.Z., Lobakova E.S. Associations between the White Sea invertebrates and oxygen-evolving phototrophic microorganisms // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2009. Vol. 64. N 1. P. 16–22.

Поступила в редакцию

15.05.2017

Принята в печать

15.06.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL ASSESSMENT AND TAXONOMIC STATUS REFINEMENT OF MICROALGAE OF THE GENUS *PARIETOCHLORIS* (TREBOUXIOPHYCEAE) IN THE CALU-COLLECTION

K.A. Shibzukhova^{1,*}, O.V. Gavrilova², O.B. Chivkunova¹,
R.A. Sidorov³, A.E. Solovchenko¹, E.S. Lobakova¹

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Microbiology, School of Biology, Saint Petersburg State University,
Universitetskaya nab. 7–9, Saint-Petersburg, 199034, Russia;

³Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science,
Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276, Russia

*email: karina_shibzuhova@rambler.ru

We have carried out morphological, biochemical, as well as molecular and genetic studies of green microalgae from the Collection of cyanobacteria, algae and algal parasites of Saint-Petersburg State University (CALU), presumably belonging to the genus *Parietochloris*, to assess their biotechnological potential and to refine their phylogenetic position. It was found that the investigated strains have a close relationship to two genera from different classes – *Lobosphaera* (Trebouxiaceae) and *Deasonia* (Actinochloridaceae). They can be of interest as producers of valuable polyunsaturated fatty acids, especially arachidonic, linoleic, α -linolenic.

Keywords: green microalgae, *Parietochloris*, *Lobosphaera*, *Deasonia*, arachidonic acid, molecular identification

Сведения об авторах

Шибзухова Карина Ахмедовна – аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: karina_shibzuhova@rambler.ru

Гаврилова Ольга Владимировна – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета СПбГУ. Тел.: 8-812-321-33-59; e-mail: avanti1958@inbox.ru

Чивкунова Ольга Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: olga.chivkunova@mail.ru

Сидоров Роман Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Лаборатории липидного обмена Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН. Тел.: 8-499-678-54-24; e-mail: roman.sidorov@mail.ru

Соловченко Алексей Евгеньевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Лобакова Елена Сергеевна – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.323

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ПРОЦЕССА
ОТВОРАЧИВАНИЯ ДНК ОТ ГИСТОНОВОГО ЯДРА НУКЛЕОСОМЫ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

А.К. Грибкова, Г.А. Армеев*, А.К. Шайтан

*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: armeev@molsim.org*

Работа посвящена изучению компактизации ДНК на нуклеосомном уровне. Взаимодействие ДНК с гистонами влияет на протекание ключевых процессов репликации и транскрипции. Такое взаимодействие в общем случае может быть охарактеризовано величиной свободной энергии связывания. В данной работе рассчитывалось изменение свободной энергии связывания в процессе отворачивания ДНК от гистонного ядра нуклеосомы. Расчёты проводились методом ММ/PBSA. Рассчитанные профили хорошо согласуются с экспериментальными данными из литературных источников. Полученные результаты свидетельствуют о применимости методики для изучения влияния посттрансляционных модификаций гистонов и гистоновых вариантов на энергетику нуклеосом, что важно для понимания механизмов регуляции транскрипции в хроматине.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, молекулярная динамика, ММ/PBSA, свободная энергия, ДНК, гистоны

В клетках эукариот геномная ДНК организована в хроматин. Элементарной повторяющейся единицей хроматина является нуклеосома, представляющая собой ~145–147 нуклеотидных пар (н.п.) ДНК, обвивающих гистоновый октамер около 1,7 раз. Белковая часть нуклеосомы имеет вид цилиндра (радиус 65 Å, высота 60 Å) и состоит из четырёх димеров гистонов: H2A-H2B, H3-H4. Наматывание ДНК на нуклеосомы приводит к компактизации линейных размеров ДНК в 6–7 раз, что приводит к возникновению физических препятствий для взаимодействия ДНК с различными белковыми факторами. Регуляция плотности упаковки, а, следовательно, и доступности ДНК, может осуществляться при помощи гистоновых шаперонов и факторов ремоделирования хроматина путём введения посттрансляционных модификаций гистонов или изменения гистонного состава [1]. Несмотря на плотную упаковку, для нуклеосом характерны высокочастотные тепловые движения и крупномасштабные конформационные переходы; примером такой подвижности является частичное отделение концевых участков ДНК от нуклеосом – “дыхание”, что говорит о меньшей энергии связывания этих участков ДНК с гистонами. Таким образом, нуклеосома является стабильным, но в то же время динамичным комплексом, обеспечивающим помимо компактизации генетического материала ещё и регуляцию экспрессии генов.

Нуклеосомы соединены между собой участками линкерной ДНК длиной приблизительно 50 н.п. Формированию более плотной укладки ДНК (на-

пример, 30-нанометровой фибриллы) способствует гистон H1, взаимодействующий с ДНК в местах её входа и выхода из октамера гистонов.

Существует ряд экспериментальных методов для оценки энергии ДНК-гистоновых взаимодействий. Первые кристаллографические исследования рассматриваемых взаимодействий выявили следующее расположение наиболее сильных контактов: симметричные относительно диадной оси положения ± 5 н.п. и $\pm 36 - \pm 46$ н.п. [2]. Экспериментальные методы не позволяют оценить энергию взаимодействия нуклеосомной ДНК с октамером гистонов через измерение равновесных концентраций свободной ДНК и нуклеосом [3], однако существуют методы для прямого измерения профиля энергии взаимодействия отдельных участков ДНК с гистонами. Одними из наиболее интересных примеров являются эксперименты по силовому растягиванию одиночных нуклеосом при помощи оптического пинцета [4].

Экспериментально наблюдаемые ступенчатые удлинения нуклеиновой кислоты при растягивании описываются трёхстадийной моделью [2]. Согласно этой модели, в начале воздействия внешний виток ДНК может быть обратимо отделён, дальнейшее удлинение требует преодоления энергетического барьера и приводит к необратимому скручиванию внутреннего витка ДНК. На последней стадии октамер полностью отделяется от ДНК.

Несмотря на то, что октамер гистонов считается довольно стабильным, не до конца ясно, что происходит с ним в ходе силового разворачива-

ния. Началу отворачивания нуклеиновой кислоты мешает её взаимодействие с N-концом (H3) и C-концом (H2A), в то время как N-концы (H2A, H2B, H4) препятствуют процессу отворачивания на поздних стадиях. Так, в исследованиях методом молекулярной динамики (МД), контакты ДНК-гистоны (в случае нуклеосом с гистоновыми хвостами) оказались прочнее, чем межгистоновые [5]. Исследования, выполненные методом Фёрстеровского резонансного переноса энергии от одиночных молекул (spFRET), продемонстрировали мобильность гистонового кора, способного разбираться с потерей димера H2A-H2B и даже тетрамера (H3-H4)₂ [6]. Помимо прочего, в экспериментах, совмещающих в себе spFRET и оптический пинцет, было показано, что гибкость ДНК зависит от нуклеотидной последовательности [6].

Подвижность нуклеосомы и гистоновых хвостов, малые размеры объекта вносят затруднения при проведении экспериментальных исследований, которые отличаются высокой сложностью. В связи с этим методы компьютерного моделирования для оценки энергии взаимодействия ДНК с гистонами являются весьма перспективной альтернативой таким экспериментам.

В литературе описан ряд методов для теоретической оценки энергетики взаимодействия ДНК-гистоны. Однако они не лишены ряда приближений и допущений. В общем случае, прочность связывания комплекса лиганд-рецептор (ДНК-гистоны) определяется свободной энергией связывания, ΔG_{bind} . Эту энергию можно оценить, повторив эксперимент по растягиванию нуклеосом методом молекулярной динамики (МД) путём приложения внешних сил к концевым участкам ДНК [5]. В ранее проведенных экспериментах было выявлено пять стадий процесса отворачивания ДНК и два основных энергетических барьера в областях 70 и 45 н.п. от носительно диадной оси.

Проводить оценку энергии взаимодействий можно как с помощью метода термодинамического интегрирования на основе полноатомных силовых полей, так и с помощью эмпирических огрубленных моделей. Но для полноатомного моделирования требуется произвести очень большое число вычислений, а использование огрубленных моделей не дает желаемой точности.

В данной работе для расчета энергетики профиля отворачивания ДНК от гистонового ядра нами был использован метод MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) [7]. Данный метод комбинирует полноатомные модели нуклеосомы с полевыми моделями растворителя, что позволяет проводить расчёты с адекватной точностью за разумное время. Рассчитанные профили согласуются с ранее полученными экспериментальными данными, что указывает на применимость подхода для решения следующего уровня биологических задач, например, оценки влияния пост-

трансляционных модификаций гистонов на энергетические профили процесса откручивания ДНК от нуклеосомы.

Материалы и методы

В методе MM/PBSA ΔG_{bind} имеет следующий вид:

$$\Delta G_{bind} = \langle G_{PL} \rangle - \langle G_P \rangle - \langle G_L \rangle.$$

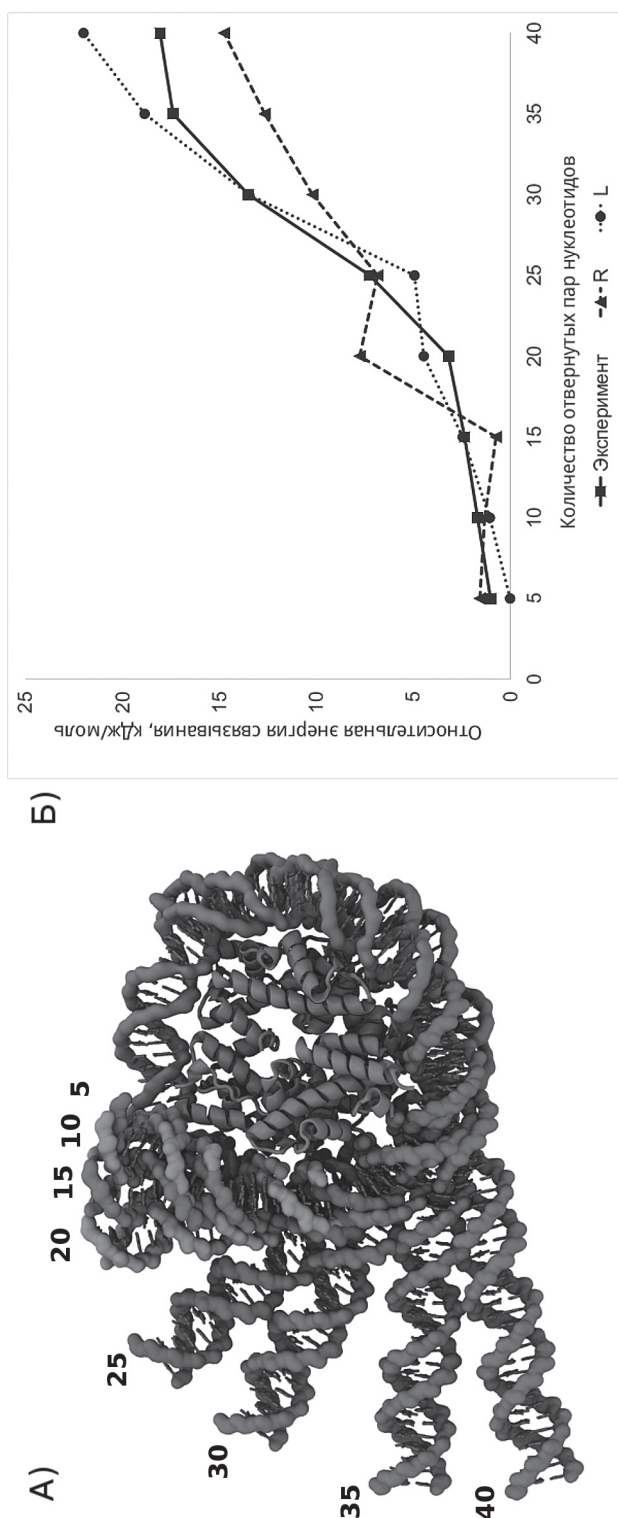
Свободная энергия систем (Р-гистоны, L-ДНК, или PL-нуклеосома) определена как:

$$G = E_{bnd} + E_{el} + E_{vdW} + G_{pol} + G_{np} - TS,$$

где E_{bnd} — энергия связей, валентных и двугранных углов, E_{el} — электростатических взаимодействий, E_{vdW} — Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий; G_{pol} и G_{np} — полярный и неполярный вклады в свободную энергию сольватации, TS — энтропийный компонент.

При использовании MM/PBSA нужно учитывать следующие особенности метода. Во-первых, расчёт электростатического потенциала по Пуассону-Больцману не позволяет учитывать ряд эффектов, в частности, адсорбцию ионов на ДНК. Во-вторых, в методе используются следующие термодинамические приближения: не учитывается конформационная энтропия комплекса (в связи с большой погрешностью вычисления энтропии методом нормальных мод этот вклад часто опускается), не учитываются эффекты, связанные с присутствием молекул воды на интерфейсе взаимодействия ДНК с гистонами.

Для проведения исследования на основе кристаллической структуры нуклеосомы из базы данных PDB с индексом 1kx5 [8] были созданы модельные системы в полноатомном приближении. У исходной структуры нуклеосомы были удалены подвижные гистоновые хвосты [9] и откручена ДНК (от 5 до 40 н.п. с шагом в 5 н.п.), как показано на рисунке, А. Далее для данных систем проводилось моделирование методом молекулярной динамики, что позволяло получить ансамбли различных конформаций исходных структур. Для этого системы помещались в прямоугольные расчётные ячейки, с учётом того, что наименьшее расстояние от нуклеосомы до одной из её граней должно быть не менее 1 нм. Свободное пространство ячейки заполнялось молекулами воды (модель TIP3P), ионами натрия и хлора в концентрации 150 мМ. Для предотвращения краевых эффектов были использованы периодические граничные условия. Чтобы привести системы к термодинамическому равновесию была проведена минимизация потенциальной энергии методом наискорейшего спуска. Дальнейшее уравновешивание системы производилось по описанной ранее методике [10]. Для термостатирования расчетной ячейки применялся модифицированный термостат Берендсена со стохастической прибавкой, причём вода и молекулы термостатировались



раздельно. В качестве баростата был использован изотропный баростат Паринелло-Рамана. Далее проводилось вычисление траекторий движения атомов длительностью от 1 до 5 нс. Стабильность систем оценивалась методом расчёта наименьшего среднеквадратичного отклонения структуры по траектории (RMSD).

Моделирование проводилось с использованием силового поля AMBER99SB-BSC0 [11], интегрирование проходило с помощью метода leap-frog с шагом 1 фс. Электростатические взаимодействия

Рисунок. А) Восемь совмещенных нуклеосом с отворнутыми от 5 до 40 н.п. ДНК (сторона отворота R). Б) Предсказанные и экспериментально измеренные профили энергии ДНК-гистоновых взаимодействий (R и L – отворачиваемые концы ДНК)

учитывались при помощи метода PME (шаг решётки 1 Å, радиус обрезания взаимодействий в прямом пространстве 1 нм, интерполяция кубическая). Для учёта Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий использовался радиус обрезания в 1 нм с плавным выравниванием потенциала на границе обрезания. Расчёты проводились в программе Gromacs [12]. Для визуализации моделей применялась программа VMD [13].

Результаты и обсуждение

В ходе работы были созданы и уравновешены модельные нуклеосомные системы в воде с отворнутыми нуклеотидными парами (от 5 до 40 с шагом 5 н.п.) с двух сторон (условно названные R и L) (рисунок, А). Методом молекулярной динамики были рассчитаны траектории движения атомов (длиной от 1 до 5 нс). При помощи метода MM/PBSA были построены энергетические профили процесса отделения ДНК (рисунок, Б), согласующиеся с экспериментальными данными, полученными на одиночных нуклеосомах [14].

Форма теоретических кривых хорошо совпала с экспериментальными данными (рисунок, Б). Разница в абсолютных значениях свободной энергии связывания объясняется особенностями расчёта электростатического вклада в методе MM/PBSA (который определён с точностью до константы). Данное замечание верно и для полученных вкладов различных энергетических компонент в энергию связывания. При расчёте энергии взаимодействия ДНК с гистонами по исходным неуровновешенным структурам был показан сильно завышенный вклад Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, что связано со значительными стерическими перекрытиями в моделях и подтверждает необходимость использования траекторий молекулярной динамики. Однако с увеличением длины траектории (от 1 до 5 нс) точность метода с учётом погрешности измерений не увеличивалась на сопоставимо значимые значения. Таким образом, можно сделать вывод, что для соблюдения баланса между затрачиваемым на расчёты временем и точностью полученных результатов можно ограничиться траекторией длиной в 1 нс.

Помимо расчёта профиля свободной энергии для собранной нуклеосомы был также произведен аналогичный расчёт для гексасомы — нуклеосомы без димера гистонов H2A-H2B (отворачивание производили с противоположной удаленным гистонам стороны). Интересно, что кривая, полученная для этого расчёта, лучше соответствует экспериментальным значениям. Можно предположить, что в эксперименте участвовали не только нуклеосомы, но и гексасомы, ведь гистоны H2A-H2B способны к спонтанной обратимой диссоциации. Данное предположение верно лишь в том случае, если погрешность метода невелика. Действительно, дисперсия рассчитанных по траекториям величин свободной энергии мала относительно аб-

солютных величин, но она, по всей видимости, и не может быть напрямую использована для оценки погрешности метода. Эту оценку можно произвести иначе. Нуклеосома обладает псевдосимметричной структурой относительно диадной оси. В данной работе использовалась структура 1KX5 с палиндромной (относительно диадной оси) ДНК. Таким образом, профили свободной энергии при отворачивании ДНК с разных сторон должны совпадать, однако соответствующие вычисленные профили отличаются друг от друга (рисунок, Б). Разница между профилями может служить мерой погрешности метода. Различия в энергии для разных сторон ДНК можно объяснить тем, что расчёта коротких траекторий молекулярной динамики недостаточно для полного исследования конфигурационного пространства вблизи начальной структуры. Помимо этого, гистоновые хвосты были удалены не полностью (не до первых элементов вторичной структу-

ры), а согласно обычным позициям их удаления в экспериментах. Оставшиеся короткие участки гистоновых хвостов конформационно лабильны и приводят к “зашумлению” рассчитанного профиля свободной энергии при использовании расчётных траекторий небольшой длины.

Таким образом, мы показали, что разработанная методика позволяет исследовать профили энергии связывания ДНК с гистонами в различных нуклеосомных интермедиатах, образуемых при откручивании ДНК от гистонного ядра. Данная методика может быть использована для изучения влияния посттрансляционных модификаций гистонов и гистоновых вариантов на энергетику нуклеосом, что важно для понимания механизмов регуляции транскрипции в хроматине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031, соглашение № 14-24-00031-п).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shaytan A.K., Landsman D., Panchenko A.R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A–H2B dimers // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 32. P. 48–57.
2. Brower-Toland B.D., Smith C.L., Yeh R.C., Lis J.T., Peterson C.L., Wang M.D. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. N 4. P. 1960–1965.
3. Thåström A., Gottesfeld J.M., Luger K., Widom J. Histone-DNA binding free energy cannot be measured in dilution-driven dissociation experiments // *Biochemistry.* 2004. Vol. 43. N 3. P. 736–741.
4. Mihaudja S., Spakowitz A.J., Zhang Y., Bustamante C. Effect of force on mononucleosomal dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103. N 43. P. 15871–15876.
5. Ettig R., Kepper N., Stehr R., Wedemann G., Rippe K. Dissecting DNA-histone interactions in the nucleosome by molecular dynamics simulations of DNA unwrapping // *Biophys. J.* 2011. Vol. 101. N 8. P. 1999–2008.
6. Zhang B., Zheng W., Papoian G.A., Wolynes P.G. Exploring the free energy landscape of nucleosomes // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138. N 26. P. 8126–8133.
7. Kollman P.A., Massova I., Reyes C. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models // *Acc. Chem. Res.* 2000. Vol. 33. N 12. P. 889–897.
8. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.
9. Banks D.D., Gloss L.M. Equilibrium folding of the core histones: the H3–H4 tetramer is less stable than the H2A–H2B dimer // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42. N 22. P. 6827–6839.
10. Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K. Nucleosome structure relaxation during DNA unwrapping: Molecular dynamics simulation study // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 3. P. 141–144.
11. Guy A.T., Piggot T.J., Khalid S. Single-stranded DNA within nanopores: conformational dynamics and implications for sequencing; a molecular dynamics simulation study // *Biophys. J.* 2012. Vol. 103. N 5. P. 1028–1036.
12. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics.* 2013. Vol. 29. N 7. P. 845–854.
13. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33–38.
14. Forties R.A., North J.A., Javaid S., Tabbaa O.P., Fishel R., Poirier M.G., Bundschuh R. A quantitative model of nucleosome dynamics // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 19. P. 8306–8313.

Поступила в редакцию

17.05.2017

Принята в печать

15.06.2017

MOLECULAR BIOLOGY

INVESTIGATION OF HISTONE-DNA BINDING ENERGY AS A FUNCTION OF DNA UNWRAPPING FROM NUCLEOSOME USING MOLECULAR MODELING

A.K. Gribkova, G.A. Armeev*, A.K. Shaytan

Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: armeev@molsim.org

The present study contributes to the understanding of DNA compaction in cell nucleus at the nucleosomal level. The interactions between DNA and histones can be described in terms of a free energy profile, DNA binding affects key processes of cell life including replication and

transcription. MM/PBSA method was used to calculate free energy profile during DNA unwrapping from histone octamer. Our results are in good agreement with experimental data published earlier. The developed approach can be applied to study the effects of post-translational modifications of histones and histone variants on nucleosome stability, which is important for understanding the mechanisms of transcriptional regulation in chromatin.

Keywords: *nucleosomes, chromatin, molecular dynamics, MM/PBSA, free energy calculations, DNA, histones*

Сведения об авторах

Грибкова Анна Кирилловна — студентка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna_gribkova@list.ru

Армеев Григорий Алексеевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: armeev@molsim.org

Шайтан Алексей Константинович — канд. физ-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: alex@molsim.org

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ НА КОНФОРМАЦИЮ
ЛИНКЕРНЫХ УЧАСТКОВ НУКЛЕОСОМА.В. Любителев¹, В.М. Студитский^{1,2}, А.В. Феофанов^{1,3,*}, М.П. Кирпичников^{1,3}¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Fox Chase Cancer Center, Cottman avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA;³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Структура хроматина и доступность ДНК для белков зависят от структуры “линкерной” ДНК, расположенной на входе в нуклеосому и выходе из неё. Поскольку ДНК является отрицательно заряженным полимером, конформация линкерной ДНК, в свою очередь, зависит от ионного микроокружения. В настоящей работе методом флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов исследовано влияние ионов Na^+ и K^+ на структуру линкерной ДНК моонуклеосом. Выявлено, что нуклеосомы находятся в одном из двух конформационных состояний, заселённость которых существенно меняется после замены ионов K^+ на Na^+ . Эти изменения, вероятно, обусловлены различным взаимодействием Na^+ и K^+ с ДНК в областях входа ДНК в нуклеосому и выхода из неё. Катион-зависимые изменения конформации линкерной ДНК могут менять топологические барьеры в нуклеосоме, структуру полинуклеосомного хроматина и влиять на взаимодействия с различными белковыми факторами.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, линкеры, ионы натрия, ионы калия, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула

Хроматин представляет собой сложную, тонко регулируемую ДНК-белковую структуру, единицей которой является нуклеосома. Функционирование хроматина во многом обеспечивается за счёт контролируемых конформационных перестроек, которые происходят на разных структурных уровнях: 30-нанометровой фибриллы, нуклеосомы и ДНК. При этом линкерная область нуклеосом является местом взаимодействия многочисленных структурных и регуляторных белков, включая линкерный гистон H1, факторы транскрипции и её регуляции, такие, как РНК-полимераза и PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1). Структура и динамика линкерной области нуклеосом представляют большой интерес, но лишь немногие методы обеспечивают возможность таких исследований. В качестве экспериментальной системы для решения подобного рода задач могут быть использованы моонуклеосомы, собранные на октамере гистонов с применением короткой строго позиционируемой ДНК (например, последовательности ДНК-матрицы 601 или 603 длиной 147 пар нуклеотидов — п.н.), удлиненной с обеих сторон для формирования линкеров [1, 2]. Если в линкеры ввести две флуоресцентные метки, взаимодействующие по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Forster Resonance Energy Transfer, FRET), то для структурных исследований таких моонуклеосом применим метод флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов [2–4].

Согласно результатам экспериментальных [3–5] и расчётных [6, 7] работ, структура и динамика нуклеосом зависят от ионного окружения, которое является существенным компонентом, стабилизирующим и модулирующим взаимодействия полианионной ДНК с поликатионными гистонами в составе компактной нуклеосомной частицы. Линкеры и прилегающие к ним участки нуклеосомной ДНК наименее прочно взаимодействуют с гистонами нуклеосомного ядра и несут большой нескомпенсированный заряд, нейтрализуют который, в первую очередь, противоионы. При этом даже близкие по своим свойствам моновалентные катионы натрия и калия существенно отличаются как по характеру связывания с ДНК и нуклеосомой, так и по времени жизни связанного состояния [5–7].

В настоящей работе впервые получены данные об изменении конформации линкеров при замене ионов калия на ионы натрия, что, по-видимому, связано с катион-зависимой модуляцией взаимодействий ДНК с гистонами в областях входа в нуклеосому и выхода из неё. Такая модуляция может менять топологические барьеры в нуклеосоме, структуру полинуклеосомного хроматина и влиять на взаимодействия с различными белковыми факторами.

Материалы и методы

Реагенты, использованные в работе, описаны ранее [8, 9]. При сборке нуклеосом в качестве источника гистонов использовали хроматин без гистона

H1, который выделяли из эритроцитов цыплят по ранее описанной методике [8]. ДНК-матрица включала в себя позиционирующую последовательность 603 длиной 147 п.н., удлинённую с обоих концов на 40 п.н. для формирования линкеров. Матрицу получали по методике, описанной в предыдущее работе [10]. При получении ДНК-матрицы, флуоресцентно-меченой в области линкеров, использовали следующие праймеры (“Синтол”, Россия; флуоресцентно-меченые тимидины подчеркнуты; названия меток, Cy3 и Cy5, указаны надстрочным знаком):

5'– TAAGGCGAATTCACAAC^{Cy5}TTT^{Cy5}TGGCAAG
AAAATGAGCt –3'

5' ACACGGCGCACTGCCAACCCAA^{Cy3}T^{Cy3}CGACA
CCGGCACGAG 3'.

Присутствие меток в составе ДНК подтверждено электрофорезом в 4,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ; соотношение акриламид : бисакриламид – 39:1) в нативных условиях с последующим флуоресцентным анализом геля с помощью сканера Typhoon (GE Healthcare) и методом флуоресцентной микроскопии одиночных молекул (рисунок, А). Нуклеосомы собирали методом диализа против растворов с последовательно уменьшающейся концентрацией хлорида натрия, как описано ранее [8]. Эффективность сборки нуклеосом проверяли методом электрофореза в 4,5%-ном ПААГ (неденатурирующие условия, 0,5-кратный буфер TBE состава 44,5 мМ Трис, 44,5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) по флуоресценции Cy3 в составе ДНК.

Для измерений под микроскопом нуклеосомы разбавляли до концентрации 0,4–0,8 нМ в буфере

следующего состава: 10 мМ Трис (pH 8,0), 1 мМ β-меркаптоэтанола, 0,5 мМ ЭДТА с добавлением 150 мМ KCl или 150 мМ NaCl; затем переносили в лунку камеры flexiPERM (Greiner Bio-One, Германия), закрепленной на покровном стекле.

Измерения одиночных нуклеосом проводили, используя лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM710-Confocor3 (Carl Zeiss, Йена), по ранее описанной методике [9]. Флуоресценцию возбуждали при 514,5 нм (0,12 мВт на образце), а регистрировали в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5) с временем интегрирования 3 мс.

Для одиночных нуклеосом, свободно диффундирующих через фокус лазерного луча, измеряли интенсивности флуоресценции Cy3 (I_3) и Cy5 (I_5) и рассчитывали эффективность FRET (E):

$$E = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3) \quad (1),$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 обеспечивают коррекцию на перекрывание спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм.

Для каждого образца нуклеосом измерения выполняли в течение двух последовательных интервалов времени по 10 мин при величине выборки в каждом интервале 1000–3000 нуклеосом. Наборы значений E графически представляли в виде гистограмм относительной частоты распределения величины E. Результаты последовательных измерений сравнивали, чтобы подтвердить стабильность структуры нуклеосом во времени. Измерения нуклеосом проводили в трёх независимых повторях. Частотные гистограммы величины E усредняли по трём измерениям и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Суммарный размер выборок – 9000–14 000 нуклеосом.

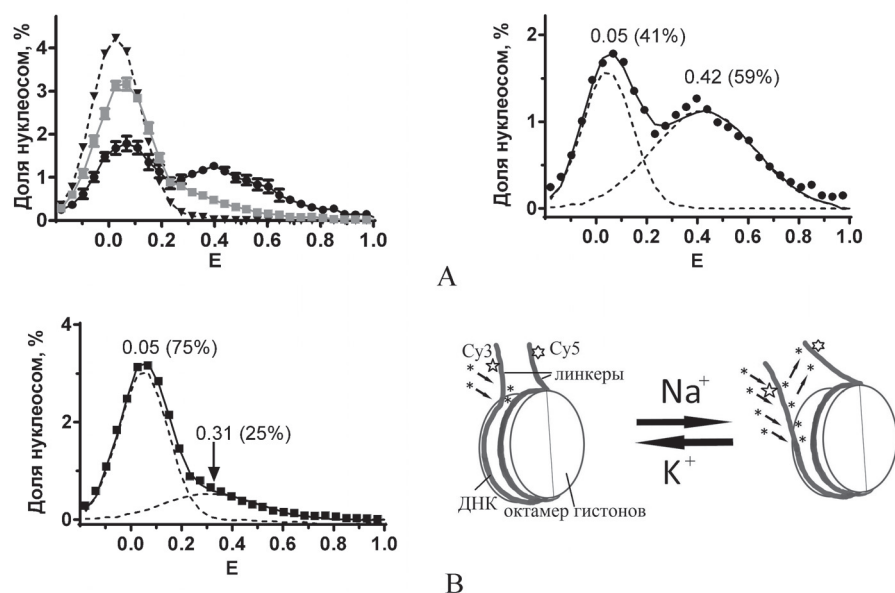


Рисунок. Влияние ионов натрия и калия на структуру линкерной области нуклеосом по данным флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов. А – Сравнение гистограмм относительной частоты распределения величины E для свободной флуоресцентно-меченой ДНК (треугольники, прерывистая линия) и нуклеосом в буфере, содержащем 150 мМ KCl (круги, чёрная линия) или 150 мМ NaCl (квадраты, серая линия). Б, В – Результаты разложения частотных распределений величины E на сумму Гауссовых полос

(прерывистые линии) для нуклеосом в буфере со 150 мМ KCl (Б) или 150 мМ NaCl (В). Цифрами указаны максимумы этих полос и доля нуклеосом (в скобках), соответствующих каждой полосе. Г – Схема возможных конформаций нуклеосомы. Ионы Na⁺ связываются с ДНК значительно сильнее, чем ионы K⁺, препятствуя реассоциации ДНК с нуклеосомным ядром в области, подверженной нуклеосомному “дыханию”. Символом “*” обозначены ионы соответствующих металлов

Результаты и обсуждение

Для проведения исследований нами разработана нуклеосомная матрица, в которой метка Су3 была размещена на расстоянии 18 п.н. до первого нуклеотида, а Су5 — на расстоянии 20 п.н. после последнего нуклеотида позиционирующей последовательности ДНК-матрицы 603. Удалённое от нуклеосомного ядра расположение меток позволяет избежать возможного ограничения подвижности флуорофоров и тушения флуоресценции, влияющих на эффективность FRET. При этом расстояние от нуклеосомной позиционирующей последовательности до меток лишь немного больше персистентной длины молекулы ДНК (около 50 нм или 15 п.н. [11]), что позволяет приблизительно считать участок линкера от нуклеосомы до метки линейным.

Измерения свободно диффундирующих одиночных нуклеосом в растворе, содержащем 150 мМ KCl, выявили, что распределение нуклеосом по величине E неоднородно (рисунок, А) и характеризуется наличием двух состояний с максимумами $E_1 = 0,05$ и $E_2 = 0,42$, к которым относятся соответственно 41 и 59% нуклеосом (рисунок, Б). Это распределение не меняется в течение 40 мин измерений, что подтверждает отмечавшуюся нами ранее стабильность структуры нуклеосом в используемых экспериментальных условиях [8–10, 12]. В случае свободной ДНК величина E имеет нормальное (Гауссово) распределение с одним максимумом вблизи нуля (рисунок, А). Как установлено нами ранее [10] и подтверждено данными электрофореза для изучаемых нуклеосом (данные не показаны), в образце присутствует не более 3% свободной ДНК-матрицы, которая, очевидно, не может быть причиной пика $E_1 = 0,05$ с низкой величиной FRET. В электрофореграмме наблюдается лишь одна полоса, соответствующая нуклеосомам, что исключает их неполную сборку как причину появления двух пиков в распределении нуклеосом по величине E . Возможный вклад фотообесцвечивания акцептора (Су5) в интенсивный пик $E_1 = 0,05$ можно также исключить, так как распределение E не меняется со временем и при 2–3 кратном увеличении мощности возбуждающего флуоресценцию света. Высокую фотостабильность меток в наших экспериментальных условиях подтверждают и проведенные ранее исследования на нуклеосомах с различным положением флуоресцентных меток [8–10, 12, 13]. Таким образом, для нуклеосом в присутствии 150 мМ KCl характерны две конформации, отличающиеся расстоянием между линкерами в области положения меток, на что указывают разные величины E_1 (большое расстояние) и E_2 (меньшее расстояние). Предположительно эти конформации имеют времена жизни значительно больше 3 мс (среднее время диффузии нуклеосомы через фокус лазерного луча), и нуклеосомы могут переходить из одной конформации в другую. Наличие двух

конформаций в присутствии 150 мМ KCl было показано нами и для нуклеосом с иным положением меток на линкерах (Су3 — 10 п.н. до первого нуклеотида, Су5 — 15 п.н. после последнего нуклеотида позиционирующей последовательности ДНК-матрицы) [10]. Таким образом, вывод о наличии двух конформаций у нуклеосомы не связан с индивидуальными особенностями расположения меток на линкерах.

При замене в растворе ионов калия на ионы натрия распределение нуклеосом по величине E достоверно изменяется (рисунок, А): сохраняется состояние с $E_1 = 0,05$ при возрастании доли нуклеосом в нём до 75%, а максимум второго состояния наблюдается при $E_2 = 0,31$ (25% нуклеосом) (рисунок, Б). Такое распределение нуклеосом по величине E , формирующееся в присутствии ионов натрия, стабильно в течение 40 мин измерений. Полученные данные свидетельствуют о том, что катионы натрия заметно уменьшают стабильность конформации с $E_2 = 0,42$: значительная часть нуклеосом переходит в состояние с $E_1 = 0,05$, а у оставшихся в альтернативной конформации нуклеосом увеличивается расстояние между линкерами, что регистрируется как сдвиг максимума второго пика к 0,31 по шкале E .

Изменения в структуре нуклеосом, вероятно, вызваны тем, что ионы Na^+ удерживаются на ДНК намного прочнее, чем ионы K^+ [5–7]. Основной причиной этого является меньший по сравнению с K^+ диаметр внешней электронной оболочки Na^+ , позволяющий ему глубже погружаться в двухцепочечную ДНК [6]. Эти особенности взаимодействия с Na^+ могли бы приводить к сближению линкеров за счет более полной нейтрализации отрицательного заряда ДНК и уменьшению их взаимного отталкивания. Однако данные микроскопии одиночных комплексов (рисунок) свидетельствуют об обратном: расстояние между линкерами увеличивается. Это противоречие устраняется, если предположить, что структурные изменения вызваны особенностями взаимодействия ионов в областях входа ДНК в нуклеосому и выхода из неё. Считается, что в этих областях могут происходить конформационные переходы, называемые “дыханием” нуклеосом: спонтанные и обратимые отворачивания ДНК от нуклеосомного ядра. В пользу существования такого рода переходов говорят как результаты экспериментов *in vitro* [2, 14–16], так и данные компьютерного моделирования [17, 18]. Согласно этим данным, потеря связей с гистоновым ядром при отворачивании ДНК возможна для 20 нуклеотидов на границе нуклеосомного ядра. За пределами этих 20 нуклеотидов эффективность взаимодействия ДНК с гистонами значительно возрастает, резко увеличивая затраты энергии на отворачивание и уменьшая его вероятность [17, 19]. Усиленное связывание Na^+ с ДНК в области этих 20 нуклеотидов может затруднять восстановление контактов ДНК с гистонами и способствовать ста-

билизации конформации с отвёрнутой ДНК и соответственно увеличенным расстоянием между линкерами (рисунок, *Г*). При этом как расчёты, так и экспериментальные данные показывают, что отворачивание ДНК с одной стороны нуклеосомы резко затрудняет её диссоциацию с другой стороны [1].

Наиболее вероятной моделью состояний с $E_2 = 0,42$ и $E_3 = 0,31$ является конформация, при которой оба линкера в областях входа ДНК в нуклеосомное ядро и выхода из него связаны с гистонами нуклеосомы (сильнее в присутствии K^+ и слабее в присутствии Na^+ ; рисунок, *Г*). Тогда состоянию $E_1 = 0,05$ соответствует конформация, при которой один из линкеров отвернут от гистонного кора (рисунок, *Г*). Отметим, что возможно существование ряда конформационных состояний линкерных фрагментов [17], не различимых по величине E .

Представленные результаты свидетельствуют о том, что тип катионов, присутствующих в микроокружении нуклеосомы, существенным образом

влияет на её структуру. Ассоциация ДНК с гистонным ядром в области входа ДНК в нуклеосомное ядро и выхода из него способствует сохранению нуклеосомы и создаёт дополнительный барьер для ферментов и других молекул, функционирование которых связано с отворачиванием ДНК от гистонов нуклеосомы.

В клеточном ядре преобладают ионы K^+ , которые отличаются от ионов Na^+ по взаимодействию со свободной ДНК и с нуклеосомой [5–7], а также по влиянию на структуру нуклеосом (рисунок). В то же время многие исследования методом микроскопии одиночных частиц традиционно проводят в присутствии ионов Na^+ [3, 15, 16]. Полученные нами результаты указывают на необходимость оптимизации ионного состава растворов при проведении как структурных, так и функциональных исследований на нуклеосомах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031, соглашение № 14-24-00031-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell*. 2015. Vol. 160 N 6. P. 1135–1144.
2. Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 46–53.
3. Gansen A., Toth K., Schwarz N., Langowski J. Structural variability of nucleosomes detected by single-pair Förster resonance energy transfer: histone acetylation, sequence variation, and salt effects // *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113. N 9. P. 2604–2613.
4. Gansen A., Valeri A., Hauger F., Felekyan S., Kalinin S., Toth K., Langowski J., Seidel C.A. Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. Vol. 106. N 36. P. 15308–15313.
5. Zinchenko A.A., Yoshikawa K. Na^+ shows a markedly higher potential than K^+ in DNA compaction in a crowded environment // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. N 6. P. 4118–4123.
6. Savelyev A., Papoian G.A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na^+ condensation around DNA compared with K^+ // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. N 45. P. 14506–14518.
7. Materese C.K., Savelyev A., Papoian G.A. Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131. N 41. P. 15005–15013.
8. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin Protocols. Methods Mol. Biol.* Vol. 523 / Ed. S.P. Chellappan. Humana Press, 2009. P. 109–123.
9. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Chromatin Protocols. Methods Mol. Biol.* Vol. 1288 / Ed. S.P. Chellappan. N.Y.: Springer, 2015. P. 395–412.
10. Lyubitelev A.V., Kudryashova K.S., Mikhaylova M.S., Malyuchenko N.V., Chertkov O.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Change in conformation of linker DNA upon binding of histone H1.5 to nucleosome: fluorescent microscopy of single complexes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 108–113.
11. Manning G.S. The persistence length of DNA is reached from the persistence length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force // *Biophys. J.* 2006. Vol. 91. N 10. P. 3607–3616.
12. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
13. Sultanov D., Gerasimova N., Kudryashova K., Maluchenko N., Kotova E., Langelier M.F., Pascal J., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genetics*. 2017. Vol. 4. N 1. P. 21–31.
14. Choy J.S., Lee T.H. Structural dynamics of nucleosomes at single-molecule resolution // *Trends Biochem. Sci.* 2012. Vol. 37. N 10. P. 425–435.
15. Wei S., Falk S.J., Black B.E., Lee T.H. A novel hybrid single molecule approach reveals spontaneous DNA motion in the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 17. e111.
16. Koopmans W.J., Brehm A., Logie C., Schmidt T., van Noort J. Single-pair FRET microscopy reveals mononucleosome dynamics // *J. Fluoresc.* 2007. Vol. 17. N 6. P. 785–795.

17. *Kenzaki H., Takada S.* Partial unwrapping and histone tail dynamics in nucleosome revealed by coarse-grained molecular simulations // *PLoS Comput. Biol.* 2015. Vol. 11. N 8. e1004443.

18. *Li Z., Kono H.* Distinct roles of histone H3 and H2A tails in nucleosome stability // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. 31437.

19. *Forties R.A., North J.A., Javaid S., Tabbaa O.P., Fishel R., Poirier M.G., Bundschuh R.* A quantitative model of nucleosome dynamics // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 19. P. 8306–8313.

Поступила в редакцию

12.05.2017

Принята в печать

15.06.2017

MOLECULAR BIOLOGY

INFLUENCE OF SODIUM AND POTASSIUM IONS ON CONFORMATION OF LINKER PARTS OF NUCLEOSOMES

A.V. Lyubitelev¹, V.M. Studitsky^{1,2}, A.V. Feofanov^{1,3,}, M.P. Kirpichnikov^{1,3}*

¹*Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman avenue, Philadelphia, Pennsylvania 19111, USA;*

³*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, 117997, Moscow, Russia*

**e-mail: avfeofanov@yandex.ru*

The structure of chromatin and DNA accessibility to proteins depend on the structure of DNA “linkers” entering and exiting the nucleosome. Since DNA is negatively charged, conformation of the DNA linkers, in turn, is likely affected by ionic microenvironment. Here method of fluorescence microscopy of single complexes was used to study the effect of Na⁺ and K⁺ ions on the structure of the DNA linkers. It was revealed that nucleosomes adopt one of two conformational states, and occupancy of these states is considerably changed after substitution of K⁺ ions by Na⁺. These changes are likely caused by different interaction of Na⁺ and K⁺ ions with DNA in the regions of entry and exit of DNA from the nucleosome. Cation-dependent changes in conformation of the DNA linkers can affect topological barriers in nucleosomes, structure of polynucleosome chromatin and interactions of DNA with different protein factors.

Keywords: *chromatin, nucleosome, linkers, sodium ions, potassium ions, fluorescence, microscopy, single molecule*

Сведения об авторах

Любителиев Александр Викторович — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел 8 495-938-22-91, e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Кирпичников Михаил Петрович — акад. РАН, проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821.6+591.18+574.24

ПАРАДОКСАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
СЕМАКСА И МОЛИБДАТ АММОНИЯ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ КРЫСА.Н. Иноземцев^{1,*}, С.Б. Бокиева³, О.В. Карпухина^{1,4},
К.З. Гумаргалиева⁴, А.А. Каменский², Н.Ф. Мясоедов⁵¹Кафедра высшей нервной деятельности и ²кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;³Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова,

Россия, 362025 Республика Северная Осетия — Алания, г. Владикавказ, ул. Ватутина, д. 44–46;

⁴Институт химической физики имени Н.Н. Семёнова, РАН, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4;⁵Институт молекулярной генетики, РАН, Россия, 123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

*e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

Изучено сочетанное воздействие семакса с водными растворами диацетата свинца (10^{-7} М) и молибдата аммония (10^{-5} М) на формирование условной реакции двустороннего избегания у крыс в челночной камере. Установлено, что обе соли тяжёлых металлов угнетают обучение и память; большее угнетение вызывал диацетат свинца. Семакс замедлил выработку условной реакции, но противодействовал негативному влиянию на этот процесс со стороны обоих металлов. При этом влияние семакса на формирование реакции избегания в присутствии молибдата аммония, который сам по себе угнетал избегание, парадоксальным образом усилилось. При сочетанном воздействии пептида и молибдата аммония формирование условной реакции происходило значительно быстрее, чем на фоне семакса без сочетания с молибденом. В целом полученные данные свидетельствуют о противодействии семакса нейротоксическому действию солей свинца и молибдена. Поскольку основным механизмом нейротоксического эффекта тяжёлых металлов является окислительный стресс, то указанное положительное влияние семакса может, на наш взгляд, служить подтверждением наличия антиоксидантных свойств в спектре фармакологической активности пептида.

Ключевые слова: окислительный стресс, семакс, молибдат аммония, диацетат свинца, обучение, память

Эндогенные пептидные регуляторы, подобные аденокортикотропному и меланоцитстимулирующим гормонам (меланокортины), играют важную роль в регуляции функций ЦНС. В настоящее время имеется много свидетельств положительного влияния меланокортинов на выработку условных рефлексов. Однако ноотропные эффекты природных фрагментов аденокортикотропного гормона (АКТГ) кратковременны [1]. Это побудило предпринять поиск способов повышения эффективности природных меланокортинов за счёт модификации их структуры, который привел к созданию синтетических аналогов, обладающих выраженной активностью, но лишённых гормональных эффектов [2]. Среди них важное место занимает семакс — ноотропный аналог фрагмента АКТГ(4–10) пролонгированного действия, структура которого включает в себя фрагмент АКТГ(4–7) и трипептид Pro-Gly-Pro. Эксперименты на животных показали, что этот пептид, как и природные меланокортины, обладает широким спектром нейротропной активности [3]. В настоящее время он используется в клинике в качестве ноотропного и нейропротекторного препарата. Несмотря на то, что лекарственные препараты, разработанные на основе семакса, уже давно

используются в клинической практике, исследования его физиологических эффектов продолжаются. Актуальность таких исследований определяется необходимостью выяснения механизмов действия и возможностью расширения спектра клинического применения препарата.

В последнее время установлена антиоксидантная активность пептида, что существенно расширяет спектр его действия [4]. В частности, представляет большой интерес способность пептида противодействовать нейротоксическому влиянию тяжёлых металлов, основной механизм которого состоит в индукции окислительного стресса [5]. Известно, что окислительный стресс, вызываемый тяжёлыми металлами, приводит к нейродегенеративным заболеваниям, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [6–9]. К настоящему времени проведены отдельные работы, в которых показана перспективность использования антиоксидантов для противодействия нейротоксическим эффектам тяжёлых металлов [10–12]. В данной работе анализируется возможность применения семакса в качестве препарата с антиоксидантными свойствами для противодействия угнетению солями молибдена и свинца обучения и памяти у крыс.

Материалы и методы

Опыты поставлены на шести группах самцов белых беспородных крыс (по 20 животных в группе) в возрасте 7–8 нед. к началу опыта. Первой группе вводили семакс в дозе 0,05 мг/кг; 2-й и 3-й группам вводили водные растворы диацетата свинца (10^{-7} М) и молибдата аммония (10^{-5} М), соответственно; 4-й и 5-й группам вводили семакс в комбинации с солями свинца и молибдена, соответственно; 6-я группа служила контролем. Водные растворы солей тяжёлых металлов внутрибрюшинно по 2 мл вводили за 5 ч до опытов, семакс — через 4 ч после введения растворов солей. Контрольным животным за час до опыта вводили 2 мл дистиллированной воды.

Опыты проводили в камере, разделённой на 2 равные половины перегородкой с отверстием. У животных в течение 5 сут (по 25 предъявлений стимулов ежедневно) вырабатывали условную реакцию двустороннего избегания, служащую экспериментальной моделью обучения и памяти. Включали звуковой условный раздражитель и через 10 с подавали ток (0,5–0,7 мА) в проводку пола той половины камеры, в которой находилась крыса. Если крыса не переходила на безопасную половину камеры, то через 10 с выключали оба раздражителя; через 30 с раздражители предъявлялись повторно. Переход животного на безопасную половину камеры, во время действия раздражителей приводил к их выключению.

Исследование проводилось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Динамику обучения в группах оценивали с помощью однофакторного непараметрического дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса; различие между группами — с помощью критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ приведенных на рис. 1 графиков показывает, что обе соли тяжёлых металлов угнетали выработку реакции избегания. Более сильное угнетающее влияние на обучение оказала соль свинца, на фоне воздействия которой животные даже на заключительном этапе обучения в среднем получали более 20 ударов тока за опыт из 25 возможных. Применение дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса показало, что при воздействии диацетата свинца статистически значимого увеличения количества реакций избегания, начиная со 2-го опыта, не происходило, что свидетельствует о глубоком угнетении обучения и памяти. Эти данные согласуются с ранее полученными нами [13]. Применение молибдена вызывало статистически значимое уменьшение числа реакций избегания относительно контроля только в последние трое суток опыта.

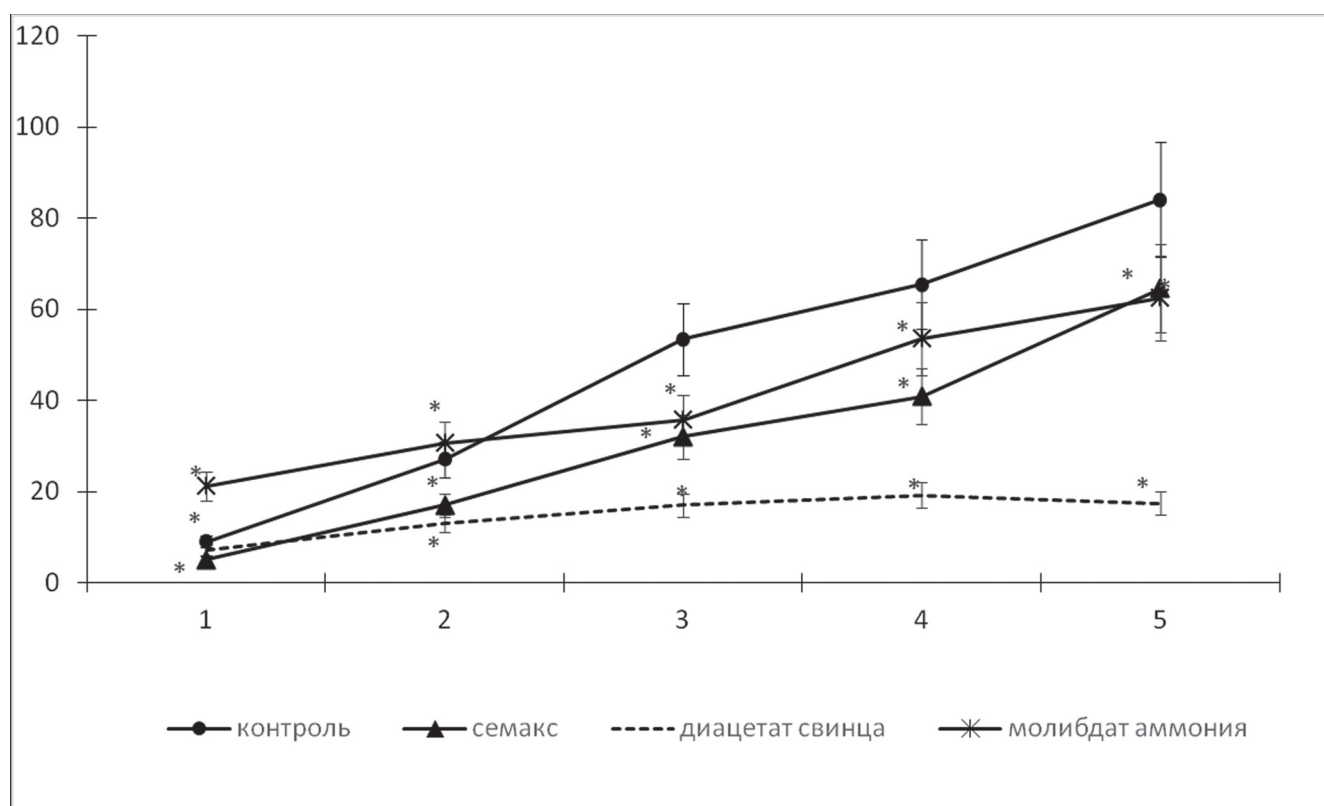


Рис. 1. Влияние семакса, диацетата свинца и молибдата аммония на динамику выработки реакции избегания. По оси абсцисс — время опытов, сут; по оси ординат — число правильных реакций в процентах относительно всех предъявлений. Данные здесь и на рис. 2 и 3 представлены в виде среднего и ошибки среднего. * — $p < 0,05$ относительно контрольных величин

Семакс замедлил выработку реакции избегания. Это согласуется с данными о том, что эффект пептида зависит от методических особенностей опытов. В частности, было показано, что семакс увеличивает число условных реакций одностороннего избегания, но уменьшает число реакций двустороннего избегания, увеличивая при этом, по сравнению с контрольными данными, число этих реакций в условиях эмоционального стресса и необходимости усвоения видоизменённого навыка после функциональных нарушений [14]. Согласно полученным в настоящем опыте результатам, семакс противодействует нейротоксическому влиянию солей обоих тяжёлых металлов на формирование реакции избегания у животных, что подтверждает отмеченную выше способность пептида оказывать положительное влияние в условиях, затрудняющих обучение. Представленные на рис. 2 результаты опытов показывают, что уровни реакций избегания при сочетанном воздействии семакса с солями как свинца, так и молибдена превышают соответствующие показатели, регистрируемые при воздействии солей без пептида. При этом противодействие со стороны пептида угнетению обучения солями свинца и молибдена проявляется в разной мере. Сочетанное воздействие семакса со свинцом ускоряло формирование реакции избегания относительно животных, которым вводили только металл, начиная с третьего дня. Нейропротективный эффект пептида при этом увеличивался по ходу

опыта. Статистически значимое превышение уровня избегания при комбинации семакса с молибденом относительно величин, наблюдаемых при воздействии соли этого металла без пептида, отмечалось на протяжении всего опыта.

Как сказано выше, и семакс, и молибден, введённые по отдельности, замедляют обучение животных. В этой связи интересно отметить, что при сочетанном воздействии пептида и молибдата аммония формирование реакции избегания происходит статистически значимо быстрее, чем на фоне семакса без сочетания с солью молибдена (рис. 3). В первый опытный день число реакций избегания при сочетанном воздействии почти в 7 раз превышало величину реакции избегания у крыс, находящихся под влиянием одного пептида. Этот результат в известной степени выглядит парадоксальным и требующим объяснения. Известно, что металл молибден входит в состав фермента ксантиноксидазы и может увеличивать активность антиокислителей [15]. Ввиду этого указанную особенность сочетанного воздействия молибдена и пептида можно объяснить увеличением антиокислительной активности последнего. В отличие от этого, сочетанное воздействие пептида с диацетатом свинца приводит к уменьшению уровня реакции избегания относительно этого показателя при воздействии только семакса. Последнее означает, что воздействие соли свинца ослабляет активность пептида. Сопоставление сочетанного воздействия

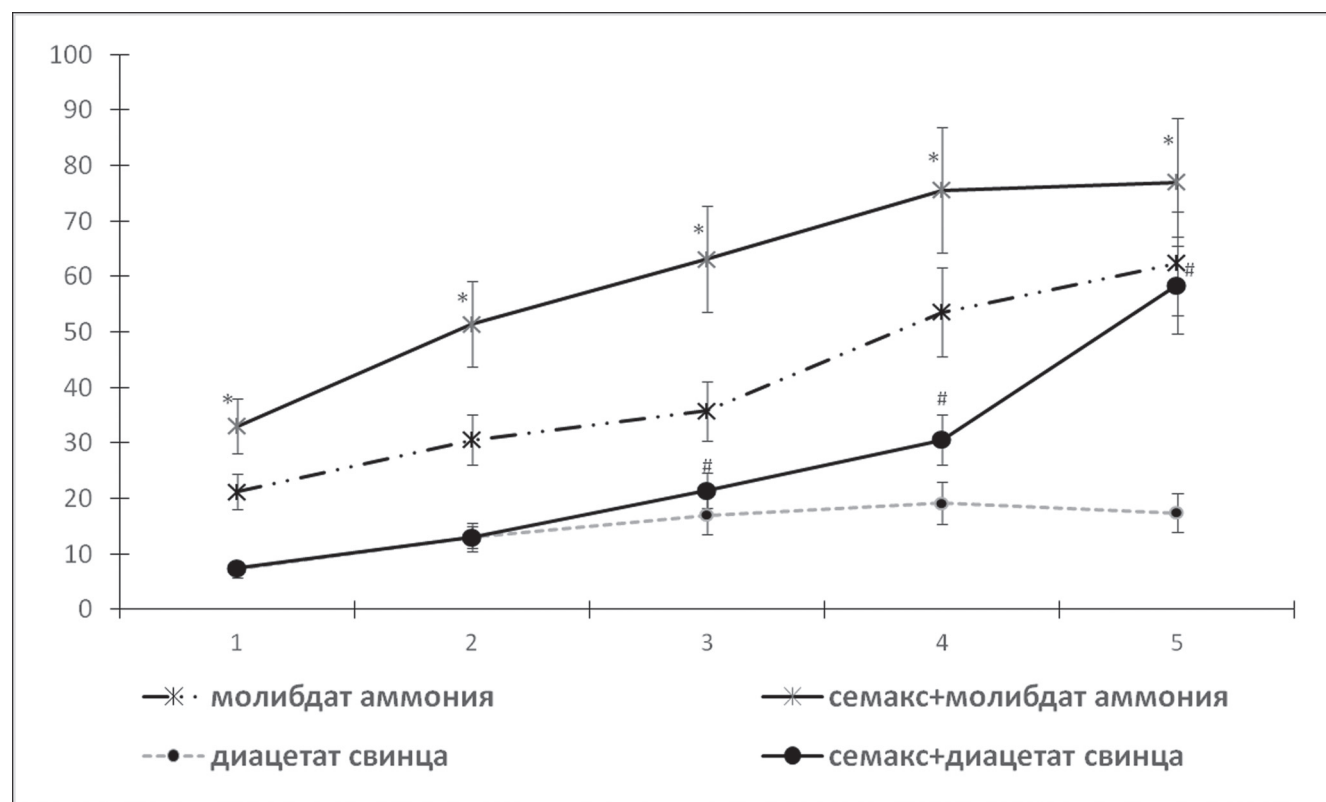


Рис. 2. Противодействие семакса отрицательному влиянию диацетата свинца и молибдата аммония на выработку реакции избегания. Обозначения осей — как на рис. 1. * — $p < 0,05$ относительно величин при отдельном введении молибдата аммония; # — $p < 0,05$ относительно величин при отдельном введении диацетата свинца

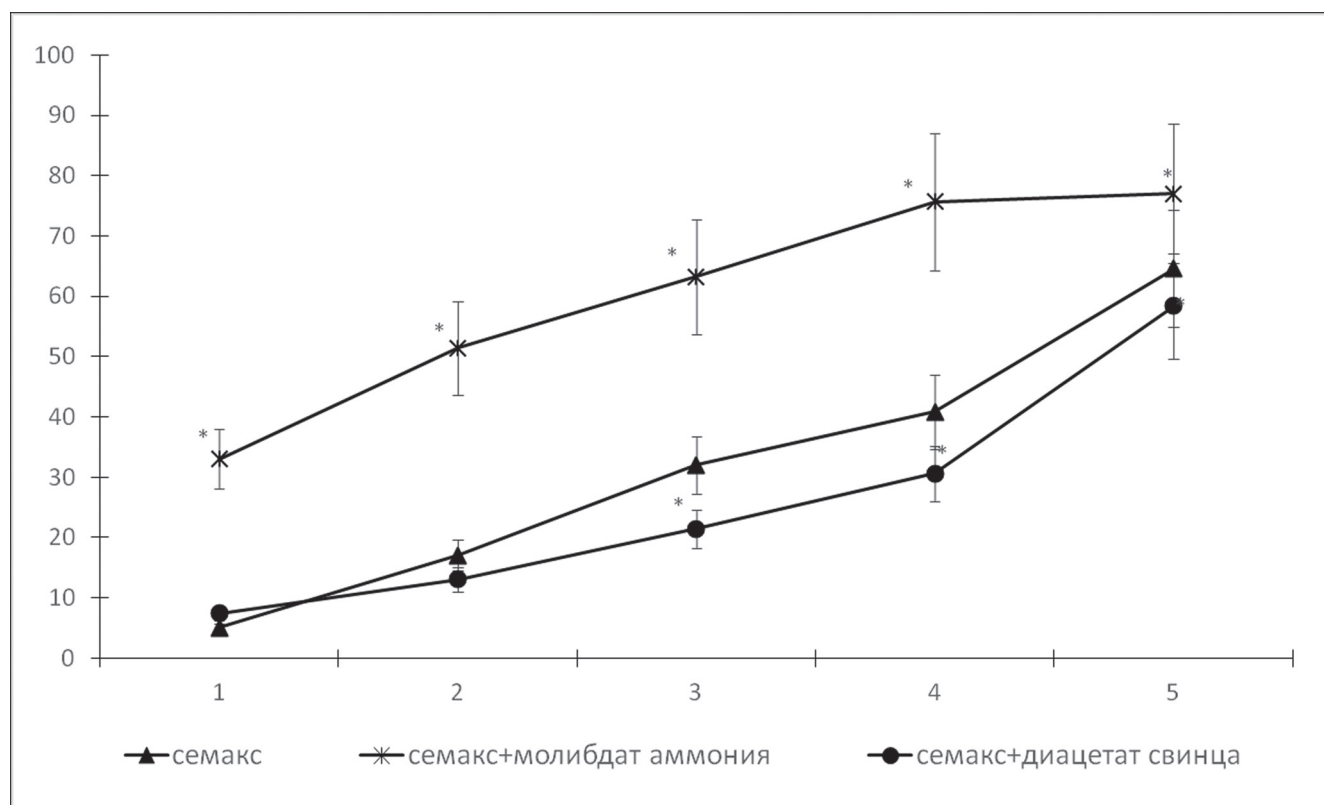


Рис. 3. Сопоставление сочетанного влияния семакса и солей металлов с влиянием одного пептида на реакции избегания. Обозначения осей — как на рис. 1. * — $p < 0,05$ относительно величин при отдельном введении семакса

на обучение семакса с диацетатом свинца и семакса с молибдатом аммония показывает, что усиление нейропротективной активности пептида избирательно, поскольку происходит только в комбинации с молибденом.

Таким образом, из полученных данных следует, что влияние семакса на формирование реакции избегания у крыс в присутствии молибдата аммония, который сам по себе угнетает обучение, парадоксальным образом усиливается. В целом полученные данные свидетельствуют о противодействии

семакса нейротоксическому действию солей свинца и молибдена. Поскольку основным механизмом нейротоксического эффекта тяжелых металлов является окислительный стресс, то положительное влияние семакса на фоне молибдата аммония и диацетата свинца может, на наш взгляд, служить подтверждением наличия антиоксидантных свойств в спектре фармакологической активности пептида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №15-04-05104а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Н.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10-Семакс (15-летний опыт разработки и изучения) // Журн. высш. нерв. деят. им. И.П.Павлова 1997. Т. 47 № 3. С. 420–430.
2. De Wied D. Neuropeptides in learning and memory processes // Behav. Brain Res. 1997. Vol. 83 № 1–2. P. 83–90.
3. Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Виленский Д.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ(4-10) гептапептида семакс // Нейрохимия. 2008. Т. 25 № 1–2 С. 111–118.
4. Odgaeva A.V., Turovetskii V.B., Kamensky A.A. Damage to plasmatic membranes of mice peritoneal macrophages under the influence of H_2O_2 // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2007. Vol. 62. N 4. P. 156–157.
5. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders // Mol. Cell. Biochem. 2010. Vol. 345. N 1–2. P. 91–104.
6. Li J., Wuliji O., Wei L., Jiang Z.-G., Ghanbari H.A. Oxidative stress and neurodegenerative disorders // Int. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. N 12. P. 24438–24475.
7. Chin-Chan M., Navarro-Yepes J., Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases // Front. Cell. Neurosci. 2015. Vol. 9. doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00124>.
8. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases // Indian J. Clin. Biochem. 2015. Vol. 30. N 1. P. 11–26.
9. Ortiz G.G., Pacheco-Moisés F.P., Mireles-Ramírez M.A., Flores-Alvarado L.J., González-Usigli H., Sánchez-López A.L., Sánchez-Romero L., Velázquez-Brizuela I.E., González-Renovato E.D., Torres-Sánchez E.D. Oxidative stress and Parkinson's Disease: Effects on environmental toxicology // Free Radicals and Diseases / Ed. R. Ahmad. InTechOpen, 2016. P. 182–209.

10. *Flora S.J.S.* Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009. Vol. 2. N 4. P. 191–206.

11. *Velaga M.K., Basuri C.K., Robinson Taylor K.S., Yal-lapragada P.R., Rajanna S., Rajanna B.* Ameliorative effects of *Bacopa monniera* on lead-induced oxidative stress in different regions of rat brain // *Drug Chem. Toxicol.* 2014. Vol. 37. N 3. P. 357–364.

12. *Kulikova O.I., Fedorova T.N., Stvolinsky S.L., Orlova V.S., Inozemtsev A.N.* Carnosine prevents the development of oxidative stress under the conditions of toxic action of cadmium // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 240–244.

13. *Inozemtsev A.N., Bokieva S.B., Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z.* Effects of combined treatment with heavy metals and piracetam on learning and memory in rats // *Dokl. Biol. Sci.* 2008. Vol. 442. N 1. P. 301–304.

14. *Иноземцев А.Н., Аганитова А.Е., Бокеева С.Б., Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Разнонаправленное влияние семакса на формирование и функциональные нарушения реакции избегания у крыс // *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова.* 2013. Т. 63. № 6. С. 711–718.

15. *Hille R.* Molybdenum-containing hydroxylases // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. Vol. 433. N 1. P. 107–116.

Поступила в редакцию 06.04.2017

Принята в печать 15.06.2017

PHYSIOLOGY

THE PARADOXICAL INFLUENCE OF SEMAX AND AMMONIUM MOLYBDATE COEXPOSURE ON LEARNING AND MEMORY IN RATS

A.N. Inozemtsev^{1,}, S.B. Bokieva³, O.V. Karpukhina^{1,4}, K.Z. Gumargalieva⁴, A.A. Kamenskii², N.F. Myasoedov⁵*

¹Department of Higher Nervous Activity and ²Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³North Ossetian State University, Vatutin str. 44–46, Vladikavkaz, 362025, Russia;

⁴Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Kosygina str. 4, Moscow, 119991, Russia;

⁵Institute of Molecular Genetics, RAS, Kurchatov sq. 2, Moscow, 123182, Russia

*e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

Combined effects of Semax with an aqueous solutions of lead diacetate (10^{-7} M) and ammonium molybdate (10^{-5} M) on the two-way active avoidance learning in rats in the Shuttle box have been studied. It was established that both salts of heavy metals depressed learning and memory; greater inhibition was caused by the lead diacetate. Semax inhibited the avoidance learning but counteracted the negative impact on this process on the part of both metals. Additionally, the influence of Semax on avoidance learning paradoxically increased in the presence of ammonium molybdate, which inhibited avoidance responses when injected alone. Avoidance learning in rats coexposed to the peptide and ammonium molybdate was much faster than in rats injected by Semax. Overall, the data indicate that Semax counteracts the neurotoxic effect of the salts of lead and molybdenum. As the main mechanism of the neurotoxic impact of heavy metals is oxidative stress, the positive effect of Semax could, in our opinion, serve as confirmation of the presence of antioxidant properties in the spectrum of the peptide pharmacological activity.

Keywords: oxidative stress, Semax, ammonium molybdate, lead diacetate, learning, memory

Сведения об авторах

Иноземцев Анатолий Николаевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории эволюции механизмов памяти, вед. науч. сотр. кафедры ВНД биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-01; e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

Бокеева Светлана Батырбековна — канд. биол. наук, доц., зав. кафедрой анатомии и физиологии человека и животных биолого-технологического факультета Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова. Тел.: 8-867-253-12-57; e-mail: bokievasb@rambler.ru

Карпукхина Ольга Вячеславовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры ВНД биологического факультета МГУ; ст. науч. сотр. лаборатории стабильности и устойчивости органических веществ и материалов Отдела динамики химических и биологических процессов Института химической физики им. Н.Н. Семёнова. Тел.: 8-495-939-50-01; e-mail: karpukhina.msu@yandex.ru

Гумаргалиева Клара Зенноновна — докт. хим. наук, проф., зав. лабораторией стабильности и устойчивости органических веществ и материалов Отдела динамики химических и биологических процессов Института химической физики им. Н.Н. Семёнова. Тел.: 8-495-939-72-76; e-mail: guklara@yandex.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Мясоедов Николай Фёдорович — акад. РАН, докт. хим. наук, проф. Института молекулярной генетики РАН. Тел.: 8-499-196-00-01; e-mail: nfm@img.ras.ru

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.192.2+577.346

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СРЕДНЕВОЛНОВОГО ДИАПАЗОНА НА СОДЕРЖАНИЕ И СПЕКТР ПОЛИАМИНОВ В ЛИСТЯХ И КОРНЯХ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ

Н.Л. Радюкина¹, Ю.В. Иванов¹, С. Мапелли², Л.Е. Михеева³, Е.А. Карбышева^{3,*}¹Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, РАН, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35;²National Research Council, Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, via Bassini 15, 20133 Milano, Italy;³Кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12

*e-mail: karbisheva@mail.ru

Настоящая работа является продолжением серии работ по изучению кратковременного действия ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона (12,5 кДж/м²) на растения. При этом особое внимание уделено быстрому ответу антиоксидантной системы (измерение через 24 ч после облучения). Свободные и конъюгированные формы полиаминов (ПА) путресцинового ряда (путресцин, спермин, спермидин) и кадаверина, как известно, являются частью антиоксидантной системы. В растениях *Thellungiella sal-suginea*, *Salvia officinalis* L., *Plantago major* L., *Geum urbanum* L., выращенных в водной культуре в условиях фитотрона определяли содержание свободных и конъюгированных форм ПА через 24 ч после действия ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона. Полученные данные подтверждают существующую гипотезу о наибольшей роли путресцина в защитном ответе растений на действие ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона. Повышение содержания этого ПА наблюдалось в листьях трёх из четырёх исследованных растений, и именно изменения в его содержании определяли суммарное повышение уровня свободных ПА. В уровне конъюгированных форм спермина, спермидина и кадаверина не удалось выявить общую тенденцию, и только для конъюгатов путресцина отмечено чёткое повышение. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что относительный вклад конкретных форм ПА в защитный ответ определяется прежде всего видовой принадлежностью исследованных растений. Вполне вероятно, что конъюгированные формы ПА могут служить резервом для быстрого восстановления необходимого уровня эндогенных свободных форм ПА.

Ключевые слова: дикорастущие растения, свободные полиамины, конъюгированные полиамины, излучение УФ-В, окислительный стресс, антиоксидантная система

Окислительный стресс, который развивается в растениях при действии как абиотических, так и биотических факторов, вызывает активацию антиоксидантной системы (АОС) [1]. Одними из важнейших компонентов этой системы являются полиамины (ПА) путресцинового ряда [2]. Такие ПА, как путресцин (Пут), спермидин (Спд), спермин (Спм) и кадаверин (Кад) — это низкомолекулярные органические соединения с высокой биологической активностью, различающиеся между собой только числом и положением в молекуле аминогрупп. Протекторная роль ПА основана на химических свойствах этих соединений как органических катионов [3–6]. В растениях присутствуют как свободные формы этих соединений, так и растворимые либо нерастворимые конъюгаты, которые образуются при взаимодействии свободных форм с кофейной и феруловой кислотами [7]. В растениях в норме концентрация всех форм ПА находится в диапазоне 10^{–9}–10^{–5} М, но может увеличиваться на порядок при действии стрессовых факторов различной природы [8]. Вопрос о роли конъюгатов индивидуаль-

ных ПА остается дискуссионным, так как их определение проводится достаточно редко. В связи с этим целью данной работы было исследование изменения уровня всех форм ПА у растений при действии ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона. В качестве объектов исследований использованы дикорастущие растения трёх экофизиологических групп. Для оценки возможной зависимости вклада ПА в защитный ответ было изучено действие УФ-В-излучения на четырёх видах растений, относящихся к различным экофизиологическим группам.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований использовали следующие дикорастущие растения: гравилат городской *Geum urbanum* L. семейства *Rosacea* (далее — “гравилат”), теллунгиелла солонцовая *Thellungiella salsuginea* (Pallas) O.E.Schulz (экотип Shandong) семейства *Brassicaceae* (далее — “теллунгиелла”), шалфей лекарственный *Salvia officinalis* L.

семейства *Lamiaceae* (далее — “шалфей”), подорожник большой *Plantago major* L. семейства *Plantaginaceae* (далее — “подорожник”). Эти растения различаются по уровню устойчивости к действию абиотических факторов, в частности, к действию УФ-В-излучения [9]. Растения культивировали в камере фитотрона при 12-часовом световом периоде и мощности освещения 37,6 Вт/м² люминесцентными лампами Philips F36W/54. Температура воздуха составляла 23±1°C (день) и 16±1°C (ночь), относительная влажность воздуха — 55–70% [9].

При достижении растениями 6-недельного возраста (стадия 4–5 настоящих листьев) группу растений переносили в камеру с ультрафиолетовыми лампами Philips 40W/12RS и облучали в течение 10 мин, что соответствовало дозе ИУФ-Б 12,5 кДж/м². Мощность излучения определяли с помощью люксметра AvaSpec-2048 (Avantes, Голландия). После облучения растения перемещали в камеру фитотрона с нормальными условиями выращивания. Образцы листьев и корней контрольных и опытных растений отбирали через 24 ч после начала эксперимента, фиксировали жидким азотом и хранили при –70°C до проведения анализов.

Определение содержания свободных и конъюгированных ПА. Свободные ПА и их конъюгаты в растительной ткани определяли в виде их бензоильных производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [7]. Представленные данные являются результатом трёх независимых экспериментов, т.е. три отдельно выращенные партии растений подвергали соответствующей обработке. Все биохимические определения проводились в необходимом количестве аналитических повторностей (не менее трёх).

Результаты и обсуждение

Одним из общепринятых маркёров развития окислительного стресса является повышение содержания малонового диальдегида (МДА). Как показали наши исследования, после воздействия УФ-В-излучения в клетках всех изученных растений его содержание повышается (таблица). Эти данные указывают, что действие ИУФ-В вызывает окислительный стресс у исследуемых растений. Ранее в наших работах [9] была продемонстрирована активность компонентов АОС у растений при действии засоления и облучения. В данной работе мы уделили внимание изменению содержания свободных и конъюгированных форм ПА путресцинового ряда и кадаверина как вероятных элементов АОС при действии облучения [7–9]. Для получения более полной картины участия различных форм ПА в защитном ответе определяли сумму растворимых и нерастворимых конъюгированных форм индивидуальных ПА.

На рисунке представлены результаты определения содержания свободных и суммы конъюгированных форм индивидуальных ПА в листьях и корнях контрольных и облучённых растений. Сум-

марное содержание Пут, Спд и Спм в листьях и корнях контрольных (необлучённых) растений находилось в пределах 1000–4000 нмоль/г сухой массы. Следует отметить более высокое содержание Пут в растениях шалфея и пониженное содержание Спм в растениях подорожника и листьях шалфея. Полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное кратковременное воздействие УФ-В-излучения на растения в большинстве случаев приводит к изменениям в содержании свободных и конъюгированных форм отдельных ПА.

Таблица

Содержание малонового диальдегида (мкмоль/г сырого веса) в опытных растениях при действии ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона

Название растения	Контроль	УФ-В-излучение
Гравилат городской (<i>Geum urbanum</i>)	0,035±0,006	0,055±0,007
Подорожник большой (<i>Plantago major</i>)	0,002±0,001	0,016±0,002
Теллунгиелла солонцовая (<i>Thellungiella salsuginea</i>)	0,008±0,004	0,011±0,001
Шалфей лекарственный (<i>Salvia officinalis</i>)	0,005±0,002	0,008±0,001

В проведенных исследованиях мы наблюдали, что уровень свободного Пут наиболее наглядно связан с действием УФ-В-излучения, так как именно за счёт повышения уровня путресцина в листьях и корнях происходит увеличение всего пула свободных ПА. Детальный анализ полученных данных свидетельствует о различиях в распределении форм индивидуальных ПА в листьях и корнях изучавшихся растений разных видов.

Путресцин. В контрольных образцах тканей всех исследованных растений отмечено высокое содержание свободного Пут, а в тканях теллунгиеллы и шалфея также и высокое содержание его конъюгатов (рисунок, а). В необлучённых тканях гравилата и корнях подорожника конъюгаты Пут не обнаруживаются. После воздействия УФ-В-излучения в листьях и корнях шалфея происходило повышение содержания свободного Пут. Такая же тенденция наблюдалась в листьях теллунгиеллы. Только у подорожника и в корнях теллунгиеллы воздействие УФ-В-излучения либо не влияло на уровень Пут, либо приводило к его снижению. Содержание конъюгатов Пут, наоборот, увеличивалось и в корнях, и в листьях всех исследованных растений, за исключением листьев гравилата. Особо следует отметить, что конъюгаты Пут появляются у гравилата после облучения только в корнях.

Спермин. В контрольных образцах высокое содержание свободного Спм (рисунок, б) отмечено у теллунгиеллы и гравилата в корнях и листьях, у шалфея — в корнях. Конъюгаты Спм присутствовали в корнях и листьях всех исследованных рас-

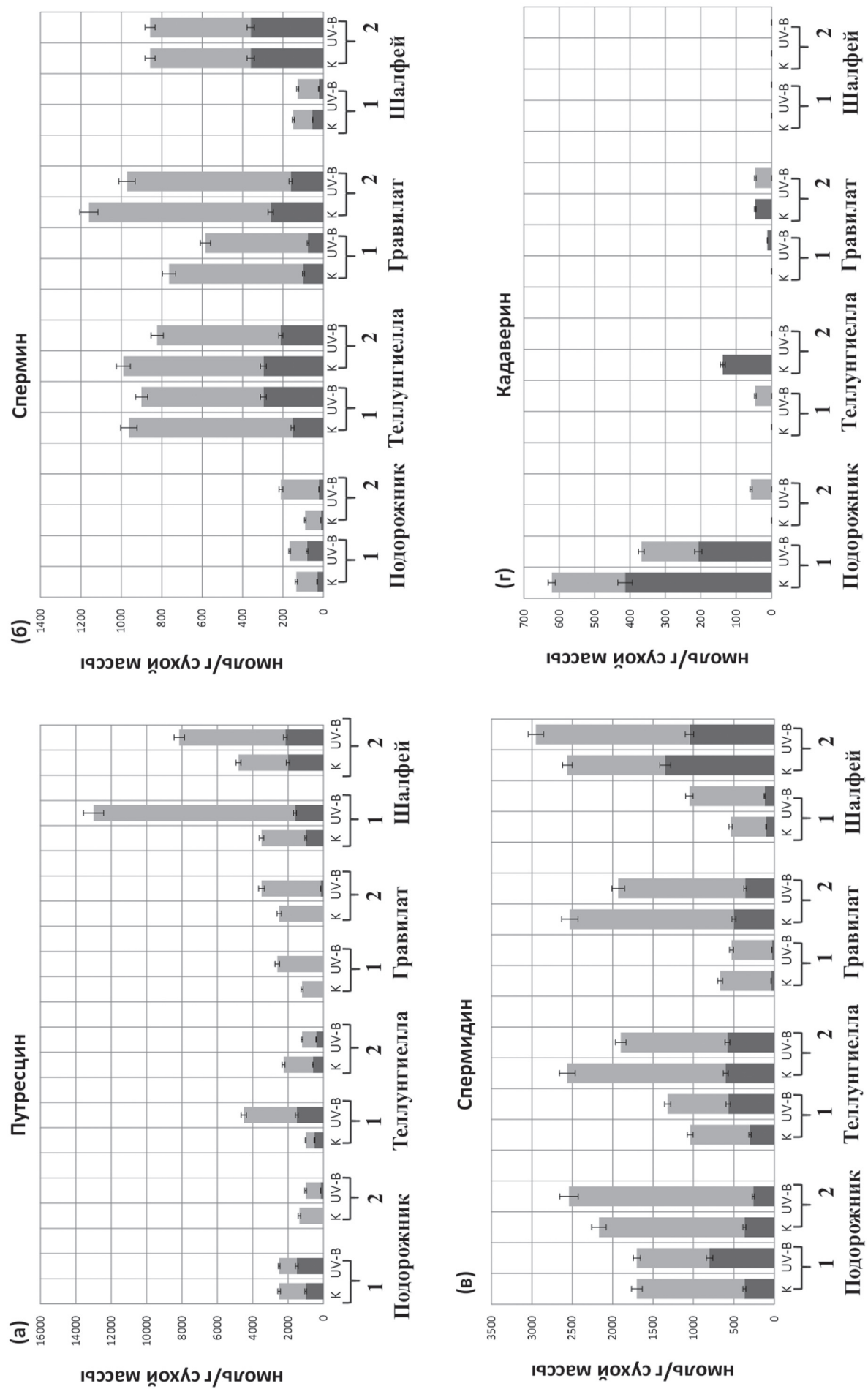


Рисунок. Содержание свободных (■) и конъюгированных (■) форм полиаминов в листьях (1) и корнях (2) исследуемых растений через 24 ч после 10-минутного воздействия ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона. К — группа конт йрольных растений, UV-B — группа, подвергшаяся воздействию излучения. (а) — путресцин, (б) — спермин, (в) — спермидин, (г) — кадаверин

тений при наибольшем содержании этой формы в корнях теллунгииеллы и шалфея. Под действием УФ-В-излучения содержание свободной и конъюгированной форм Спм имеет тенденцию к снижению в листьях и корнях трёх растений. Исключением являлся подорожник, в листьях и корнях которого увеличивались как доля конъюгатов, так и доля свободной формы.

Спермидин. Корни всех контрольных растений отличались достаточно высоким содержанием свободной и конъюгированной форм Спд, и при этом общее содержание спермидина было существенно выше в корнях, чем в листьях (рисунок, в). Под действием УФ-В-излучения в листьях и корнях подорожника, теллунгииеллы и шалфея происходило повышение содержания Спд в свободной и конъюгированной формах. У гравилата и в корнях, и в листьях содержание двух форм Спд снижалось после облучения.

Кадаверин. В контрольных образцах Кад был обнаружен в листьях подорожника (в свободной и связанной формах), а также в корнях теллунгииеллы и гравилата в форме конъюгатов (рисунок, г). Воздействие УФ-В-излучения индуцировало появление Кад в некоторых опытных образцах. Если под влиянием ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона у подорожника в листьях уменьшалось содержание обеих форм, то в его корнях появлялась свободная форма Кад. Сходным образом, воздействие УФ-В-излучения приводило к появлению свободной формы Кад в листьях теллунгииеллы и связанной формы в листьях гравилата. В корнях гравилата влияние УФ-В-излучения вызывало переход конъюгированной формы в свободную форму. В растениях шалфея ни свободная, ни конъюгированная формы Кад не были обнаружены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miura K., Tada Y. Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5. Article 4, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004>.
2. Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I. Polyamines and plant adaptation to saline environment // *Desert Plants. Biology and Biotechnology* / Ed. K.B. Ramawat. Berlin-Heidelberg: Springer, 2010. P. 261–297.
3. Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development // *Plant Sci.* 1999. Vol. 140. N 2. P. 103–125.
4. Kaur-Sawhney R., Tiburcio A.F., Altabella T., Galston A.W. Polyamines in plants: An overview // *J. Cell Mol. Biol.* 2003. Vol. 2. N 1. P. 1–12.
5. Korolkova D.V., Radyukina N.L., Soshinkova T.N., Mapelli S., Kuznetsov V.V. Effect of spermine treatment on the functioning of *Thellungiella salsuginea* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. Vol. 61. N 1. P. 69–76.
6. Minocha R., Majumbar R., Minocha S.C. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5. Article 175. P. 6–22.
7. Mapelli S., Brambilla I.M., Radyukina N.L., Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Reggiani R., Kuznetsov V.V. Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2008. Vol. 34. N 1–2. P. 55–66.
8. Radyukina N.L., Shashukova A.V., Mapelli S., Shevyakova N.I., Kuznetsov V.V. Proline controls the level of polyamines in common sage plants under normal conditions and at UV-B irradiation // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. Vol. 57. N 3. P. 422–429.
9. Radyukina N.L., Kartashov A.V., Ivanov Y.V., Shevyakova N.I., Kuznetsov V.V. Functioning of defense systems in halophytes and glycophytes under progressing salinity // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2007. Vol. 54. N 6. P. 806–815.
10. Son S., Lewis B.A. Free radical scavenging and anti-oxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. N 3. P. 468–472.

11. Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Raymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance // *Planta*. 2010. Vol. 231. N 6. P. 1237–1249.

Поступила в редакцию

10.04.2017

Принята в печать

15.06.2017

PLANT PHYSIOLOGY

THE EFFECT OF MEDIUM WAVE ULTRAVIOLET RADIATION ON THE CONTENT AND SPECTRUM OF POLYAMINES IN LEAVES AND ROOTS OF WILD-GROWING PLANTS

N.L. Radyukina¹, Y.V. Ivanov¹, S. Mapelli², L.E. Mikheeva³, E.A. Karbysheva^{3,*}

¹Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Botanicheskaya ul. 354, 127276, Moscow, Russia;

²National Research Council, Institute of Agricultural Biology and Biotechnology,
via Bassini 15, 20133 Milano, Italy;

³Department of Genetics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: karbisheva@mail.ru

This work is a continuation of a series of studies on the short-term effects of UV-B radiation (12.5 kJ/m²) on plants with particular attention paid to the rapid response of the antioxidant system (measurement 24 hrs after irradiation). Free and conjugated forms of putrescine polyamines (putrescine, spermine, spermidine) and cadaverine are known to be part of the antioxidant system. In the plants *Thellungiella salsuginea*, *Salvia officinalis* L., *Plantago major* L., and *Geum urbanum* L. grown in aquatic culture under phytotron conditions, the content of free and conjugated forms of polyamines was determined 24 hrs after the treatment with UV-B. The obtained data confirm the existing hypothesis about the major role of putrescine in the protective response of plants to UV-B irradiation. An increase in the content of this polyamine was observed in the leaves of three of the four plants studied. And it was the changes in its content that determined the total increase in the level of free polyamines. It was not possible to reveal a general trend in the level of conjugated forms of spermine, spermidine and cadaverine, and only for putrescine conjugates there was a clear increase. The data obtained allow to conclude that the relative contribution of specific forms of polyamines to the protective response is determined primarily by the species of the investigated plants. It is likely that conjugated forms of polyamines can serve as a reserve for rapid recovery of the required level of endogenous free forms of polyamines.

Keywords: wild-growing plants, free polyamines, conjugated polyamines, UV-B irradiation, oxidative stress, antioxidant system

Сведения об авторах

Радюкина Наталья Львовна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН. Тел. 8-499-231-83-59; e-mail: natrad@yandex.ru

Иванов Юрий Валерьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН. Тел. 8-499-231-83-59; ivanovinfo@mail.ru

Мапелли Серджио — науч. сотр. Института сельскохозяйственной биологии и биотехнологии Национального совета по научным исследованиям, Милан, Италия. Тел.: +39 0223699 430; e-mail: mapelli@ibba.cnr.it

Михеева Лидия Евгеньевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-11-79; email: lidamikheeva@yandex.ru

Карбышева Елена Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-11-79; email: karbisheva@mail.ru

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ».**

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: «введение», «материалы и методы», «результаты», «обсуждение результатов», «выводы», «список литературы». Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но даже в этом случае они должны содержать резюме и ключевые слова. Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, 12 кегль, междустрочный интервал — полуторный), включая список литературы. На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК. В следующих строках приводятся: название работы, инициалы и фамилии авторов, наименование подразделения биологического факультета МГУ, e-mail автора, ответственного за переписку с редакцией. Далее следуют резюме статьи на русском языке (100–250 слов) и ключевые слова (6–10). После текста статьи на отдельной странице печатается резюме на английском языке с заглавием и ключевыми словами (полный перевод русской версии). На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью, научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (2–3 таблицы или рисунка с соответствующим уменьшением объема текста). Подписи к рисункам и фотографиям даются на отдельной странице в конце рукописи, они должны содержать расшифровки всех используемых сокращений, а рисунки и таблицы — иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (рис. 1, табл. 2). Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов (разрешение должно быть не менее 300 точек на дюйм), не допускается вставка рисунков и фотографий в основной текст. Таблицы печатаются на отдельных страницах в конце рукописи. Каждая графа таблицы должна иметь заголовок.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При ссылке на несколько источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) включает от 10 до 25 ссылок, оформленных следующим образом:

- 1) **Книга:** *Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age.* Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.
- 2) **Статья в сборнике:** *Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Ed. by J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.*
- 3) **Статья в журнале:** *Hayflick L. Progress in cytogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.*
- 4) **Тезисы докладов (материалы) конференции:** *Болеева Г.С., Борзых А.А. Механизмы повышения адрено-реактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.*
- 5) **Автореферат диссертации:** *Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар, 2012. 23 с.*
- 6) **Электронный ресурс:** Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).
- 7) **Электронная публикация:** *Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).*

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ). Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании. При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны курсивом соответствующие латинские названия (род, вид) согласно Международным кодексам номенклатуры.

Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования. Не принимаются к печати работы, которые уже опубликованы или отправлены на печать в другие издания.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Рукописи после рецензирования отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 2 недели, в противном случае статья будет рассматриваться как вновь поступившая.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Тел. 8-495-938-27-01.

С полным текстом правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала — vestnik-bio-msu.elpub.ru.